

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author

**BIOFUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIES DE TITANIO CON COLÁGENO TIPO I
PARA MEJORAR EL SELLADO BIOLÓGICO DE IMPLANTES DENTALES**

Memoria de Tesis presentada por:

Nathalia Marín Pareja

Para optar por el grado de
Doctora en Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica
por la Universitat Politècnica de Catalunya

Dirigida por:

Dra. Maria Pau Ginebra Molins

Dr. Emiliano Salvagni

Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona

Universitat Politècnica de Catalunya

2013





Acta de calificación de tesis doctoral

Curso académico:

Nombre y apellidos

DNI / NIE / Pasaporte

Programa de doctorado

Unidad estructural responsable del programa

Resolución del Tribunal

Reunido el Tribunal designado a tal efecto, el doctorando / la doctoranda expone el tema de la su tesis doctoral titulada _____

Acabada la lectura y después de dar respuesta a las cuestiones formuladas por los miembros titulares del tribunal, éste otorga la calificación:

APTA/O NO APTA/O

(Nombre, apellidos y firma)		(Nombre, apellidos y firma)	
Presidente/a		Secretario/a	
(Nombre, apellidos y firma)	(Nombre, apellidos y firma)	(Nombre, apellidos y firma)	(Nombre, apellidos y firma)
Vocal	Vocal	Vocal	Vocal

_____, _____ de _____ de _____

El resultado del escrutinio de los votos emitidos por los miembros titulares del tribunal, efectuado por la Escuela de Doctorado, a instancia de la Comisión de Doctorado de la UPC, otorga la MENCIÓN CUM LAUDE:

SÍ NO

(Nombre, apellidos y firma)		(Nombre, apellidos y firma)	
Presidenta de la Comisión de Doctorado		Secretaria de la Comisión de Doctorado	

Barcelona a _____ de _____ de _____

AGRADECIMIENTOS

- En primer lugar, deseo agradecer a mis directores la Dra. Maria Pau Ginebra Molins y el Dr. Emiliano Salvagni. A la Dr. Maria Pau Ginebra por enseñarme a ser una investigadora exigente y rigurosa y por su buena disposición siempre que la he necesitado tanto a nivel profesional como personal. Al Dr. Emiliano Salvagni, por las horas de dedicación, orientación y formación y por la paciencia en las discusiones de cada uno de los resultados obtenidos. Gracias porque he aprendido mucho de los dos.
- Al Dr. Conrado Aparicio, agradecerle por ser una de las primeras personas que confió en mí y por poner los primeros granitos de arena con sus valiosos aportes a este trabajo.
- Al Dr. Javier Gil director del grupo BIBITE, por darme la oportunidad de hacer parte del grupo y por su buen sentido del humor.
- A mis compañeros del grupo BIBITE, el más sincero agradecimiento por compartir conmigo el día a día. Sin todos ustedes estos años de trabajo no hubiesen sido lo mismo. A Montse, Carolina, María G., Cristina Caparros, Cristina Canal, Sara, Maria Isabel, Marta P., Marc, Jose Maria, Edgar, Daniel, Txell y Noelia, gracias por brindarme vuestra ayuda y colaboración y por la disposición para compartir conmigo todos sus conocimientos. A Virginia, Kiara, Carles, Pablo, David, Yassine, Roberta, Romain y Jordi gracias por su amabilidad y sinceridad, por brindarme un apoyo incondicional y por haber estado siempre dispuestos a mejorarme el día a día, convirtiéndose en más que compañeros de trabajo. A los recién llegados: Anna, Judit, Mónica, Miquel y Mireia gracias por los momentos compartidos y mis mejores deseos para esta nueva etapa de vuestras vidas.
- A los miembros del Instituto de Bioingeniería de Catalunya, de la Plataforma de Nanotecnología del Parc Científic de Barcelona y de la plataforma de servicios del Centro de Investigación en Nano Ingeniería de la UPC. Gracias por vuestra ayuda y colaboración en la ejecución y comprensión de numerosas técnicas de análisis. En especial agradecer a Belén González, por su buena disposición para ayudarme en todos lo que necesité y por los momentos de amistad compartidos. A Lorena Diez, por su ayuda en la ejecución y comprensión de los análisis realizados mediante OWLS. A Raul Perez, por sus aportes para facilitarme la comprensión del ToF SIMS. A Montse Dominguez por su amabilidad y excelente disposición para realizar los análisis de XPS. También quiero agradecer a los técnicos de microscopia óptica y confocal del Parc Científic, por las horas de formación y por el soporte técnico
- A los miembros del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular –UPV. Al Dr. Manuel Salmerón Sanchez, Dr. Marco Cantini y Dra. Cristina González por

acogerme dentro de su grupo de investigación y por su disponibilidad y generosidad para compartir su invaluable experiencia y amplio conocimiento sobre los estudios de superficies mediante AFM. Gracias por los momentos de amistad compartidos a Cristina, Pepe, Sergiy, Christian, Tiago, Luis y en especial a Lidia y Marina. Gracias por hacerme sentir parte de vuestro grupo.

- Al Instituto de Bioingeniería de Catalunya, en especial al Dr. Josep Planell por concederme una beca para iniciar los cursos de doctorado. A la Universidad Politécnica de Catalunya por la beca concedida durante el primer semestre del 2009. Al Ministerio de Educación de España por financiar los últimos años de mi tesis al otorgarme la beca FPU y por la subvención recibida a través del proyecto MAT2009-13547.

- A mi familia Colombiana, tías, tíos y primos, que desde la distancia me han acompañado en todos los momentos de alegría y tristeza y me han dado fuerzas para culminar con éxito esta etapa de mi vida. A mi madre, mi hermano por estar siempre ahí, por ser mi todo y a mi sobrino por el inmenso amor que le tengo y porque se hizo grande sin mi compañía. Soy como soy y he llegado hasta aquí gracias a que todos ustedes han creído en mí y me han guiado durante toda mi vida, haciendo de mí una mujer luchadora y sin miedo a afrontar nuevos retos.

- A mis amigos colombianos que siempre han estado presentes sin importar los años que han pasado, ni los kilómetros que nos separan: Natalia C., Diana E., Patricia C., Diana A., Mauricio F., Diego C., Juan Pablo, Diego G., Jonathan, Aura.

- A la meva família Catalana por acollir-me, compartir amb mi les seves vides, per preocupar-se sempre pel meu benestar i per brindar-me el seu suport i afecte. A la mama Lidia, per la seva estima i perquè como bona mare sempre està preocupada de que tots estiguem bé. Al papa Josep Lluís per les seves sabies paraules i perquè li agrada que tot estigui ben fet. Al Rubèn i la Susana, perquè són exemple de dedicació i rigor. I a la preciosa i diminuta Martina qui ha arribat a les nostres vides per omplir-les amb tendresa, innocència, però també molt de caràcter.

- A l'Adrià, el meu millor amic, el meu gran amor. Gràcies, por tota la teva tolerància, preocupació, suport i canya. Gràcies per omplir cada dia de la meva vida amb alegria i amor.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	13
----------------------	----

ABSTRACT	16
-----------------------	----

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 LOS IMPLANTES DENTALES	19
1.2 EL SELLADO BIOLÓGICO.....	22
1.3 COLÁGENO.....	24
1.4 LOS FIBROBLASTOS Y SU INTERACCIÓN CON EL COLÁGENO	28
1.5 ESTRATEGIAS USADAS PARA MEJORAR LA OSTEOINTEGRACIÓN Y EL SELLADO BIOLÓGICO DE IMPLANTES DENTALES.....	30
1.5.1 Mejora de la osteointegración.....	31
1.5.2 Mejora del sellado biológico	33
1.6 BIOFUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIES.....	35
1.6.1 Fisisorción de biomoléculas	36
1.6.2 Inmovilización de biomoléculas mediante el uso de silanos	37
1.6.3 Etapas del proceso de biofuncionalización de superficies de titanio.....	43
a) Limpieza y activación.....	43
b) Silanización.....	45
c) Inmovilización de colágeno.....	47
1.7 OBJETIVOS Y ALCANCE DE LA TESIS DOCTORAL.....	49
1.7.1 Objetivo General.....	49
1.7.2 Objetivos Específicos.....	49
1.7.3 Alcance.....	50
1.8 REFERENCIAS.....	50

CAPITULO 2: ACTIVACIÓN Y SILANIZACIÓN DE SUPERFICIES DE TITANIO

2.1 INTRODUCCIÓN	61
2.2 OBJETIVOS.....	65
2.2.1 Objetivo General	65
2.2.2 Objetivos Específicos	65
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
2.3.1 Titanio.....	65
2.3.2 Limpieza y activación de las superficies de titanio	67
a) Plasma de oxígeno	67
b) Ataque químico con solución piraña.....	67
2.3.3 Silanización de las superficies de titanio activadas.....	67
2.3.4 Caracterización de las superficies	68
a) Interferometría de luz blanca	68
b) Ángulo de Contacto Estático: Mojabilidad	70
c) Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (ToF-SIMS).....	72
d) Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)	72
e) Técnica de sustitución del complejo de Zinc.....	74
f) Análisis Estadístico	76
2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	76
2.4.1 Evaluación del grado de limpieza y activación de las superficies de Ti	76
a) Rugosidad superficial.....	76
b) Ángulo de contacto	78
c) ToF-SIMS	79
d) XPS.....	80
e) Cuantificación de los grupos OH	86
2.4.2 Evaluación del grado de silanización de las superficies de Ti	87
a) Ángulo de Contacto	87
b) ToF-SIMS.....	89
c) XPS	90
2.5 CONCLUSIONES.....	95
2.6 REFERENCIAS.....	97

CAPITULO 3: INMOVILIZACIÓN DE COLÁGENO SOBRE LAS SUPERFICIES DE TITANIO

3.1 INTRODUCCIÓN.....	103
3.2 OBJETIVOS	104
3.2.1 Objetivo General.....	104
3.2.2 Objetivos Específicos.....	105
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	105
3.3.1 Disolución del colágeno	105
3.3.2 Inmovilización del colágeno sobre la superficie de titanio modificadas.....	106
3.3.3 Caracterización de las superficies	107
a) Visualización del colágeno inmovilizado por fluorescencia.....	107
b) Ángulo de contacto	108
c) ToF-SIMS	108
d) XPS.....	109
e) Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy: OWLS.....	109
f) Análisis Estadístico	112
3.3.4 Análisis de Estabilidad del colágeno inmovilizado.....	112
3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	113
3.4.1 Visualización del colágeno por fluorescencia.....	113
a) Optimización del protocolo de disolución del colágeno tipo I.....	113
b) Evaluación de la inmovilización del colágeno sobre las diferentes superficies..	114
3.4.2 Ángulo de contacto	119
3.4.3 ToF-SIMS	119
3.4.4 XPS.....	121
3.4.5 OWLS.....	128
3.4.6 Análisis de estabilidad del colágeno inmovilizado.....	130
a) Microscopía óptica de fluorescencia.....	130
b) Análisis de estabilidad mediante XPS.....	133
3.5 CONCLUSIONES.....	142
3.6 REFERENCIAS.....	144

CAPITULO 4: INFLUENCIA DEL COLÁGENO INMOVILIZADO EN LA RESPUESTA DE CÉLULAS FIBROBLASTICAS

4.1 INTRODUCCIÓN	149
4.2 OBJETIVOS.....	151
4.2.1 Objetivo general.....	151
4.2.2 Objetivos específicos.....	151
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS	152
4.3.1 Preparación de las muestras.....	152
4.3.2 Fibroblastos dérmicos humanos (HDF)	153
4.3.3 Cultivo celular.....	153
4.3.4 Estudio de adhesión celular	154
4.3.5 Análisis de proliferación celular.....	155
4.3.6 Estudio de expresión génica	157
4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	159
4.4.1 Adhesión celular	159
4.4.2 Proliferación celular.....	164
4.4.3 Expresión génica.....	166
4.5 CONCLUSIONES.....	172
4.6 REFERENCIAS.....	174

CAPITULO 5: ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA DEL COLÁGENO INMOVILIZADO. EFECTO DE LA MORFOLOGÍA DEL COLÁGENO SOBRE LA RESPUESTA CELULAR.

5.1 INTRODUCCIÓN	179
5.2 OBJETIVOS.....	181
5.2.1 Objetivo General	181
5.2.2 Objetivos Específicos	181
5.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	182
5.3.1 Preparación de las muestras.....	182
5.3.2 Métodos de caracterización	183

a) Microscopía de fuerza atómica: AFM	183
b) OWLS	183
5.3.3 Estudio de adhesión celular	183
a) Cultivo celular	183
b) Inmunofluorescencia	184
5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	184
5.4.1 Caracterización superficial	184
a) AFM	184
b) OWLS	192
5.4.2 Respuesta celular	195
a) Adhesión y extensión celular	195
b) Formación de adhesiones focales y secreción de fibronectina.....	201
5.5 CONCLUSIONES.....	205
5.6 REFERENCIAS.....	207
CAPITULO 6: CONCLUSIONES GENERALES.....	211
ANEXO I: Listado de figuras.....	217
ANEXO II: Listado de tablas.....	223

RESUMEN

El éxito clínico de los implantes dentales depende de una satisfactoria integración de la superficie del material con los tejidos que lo rodean. Dicha integración depende de dos tipos de interacciones interfaciales: una es la interacción con el tejido del hueso, denominada como osteointegración y la otra es la interacción con los tejidos blandos de la encía sobre el cuello del implante, denominado sellado biológico. Un buen sellado biológico evita el paso de bacterias y gérmenes a través de la interfaz implante-tejido, y previene por tanto el posterior aflojamiento y pérdida del implante. La mejora del sellado biológico a corto y largo plazo, dependerá de las propiedades físico-químicas de la superficie del material y de su capacidad para promover y/o acelerar los procesos de curación y restauración de los tejidos de la encía después de la implantación.

En este trabajo se propuso la biofuncionalización de superficies de titanio con colágeno tipo I, como estrategia para mejorar el sellado biológico de implantes dentales. El colágeno tipo I es el principal componente de la matriz extracelular de los tejidos de la encía, y ha sido reportado como un excelente promotor de la adhesión de diferentes tipos de células gingivales. En este estudio se analizó la posibilidad de utilizar silanos como agentes de acoplamiento para formar un enlace covalente entre el metal y la molécula orgánica, y obtener una mayor estabilidad a largo plazo en comparación con la fisisorción.

Se llevó a cabo un estudio de las distintas etapas del proceso de inmovilización de colágeno sobre la superficie de titanio: i) limpieza y activación de la superficie, mediante procedimientos físicos (plasma de oxígeno) o químicos (ataque con solución piraña); ii) silanización con dos silanos distintos, 3-cloropropil-trietoxi-silano (CPTES) y 3-glicidiloxipropil-trietoxi-silano (GPTES); iii) inmovilización de colágeno tipo I sobre las superficies previamente tratadas.

El estudio se llevó a cabo por medio de diferentes técnicas de caracterización: interferometría de luz blanca, ángulo de contacto, ToF SIMS, XPS, microscopia óptica de fluorescencia, OWLS y AFM, identificándose los cambios físico-químicos

generados en la superficie en cada una de dichas etapas, que influyen en la inmovilización del colágeno en términos de cantidad, estabilidad y conformación.

De los resultados obtenidos, cabe destacar que a) la activación por plasma generó una mayor cantidad de grupos OH⁻ en superficie; b) a mayor cantidad de grupos OH⁻, mayor cantidad de moléculas de silano enlazadas; c) el colágeno tipo I se adhirió en mayor cantidad y es más estable sobre las muestras en las que se enlazó mediante la química de los silanos, en especial sobre las muestras previamente tratadas con piraña donde la nanorugosidad generada por este tratamiento tiene un papel importante y d) la cantidad de colágeno adherido sobre el titanio silanizado con CPTES es superior a la obtenida con GPTES.

Una vez obtenidas las superficies biofuncionalizadas, se evaluó la influencia del colágeno tipo I sobre la respuesta de células fibroblásticas humanas, en términos de adhesión, proliferación y expresión génica. En general los fibroblastos mostraron mejor adhesión, mayor proliferación y sobreexpresión de los genes asociados con la activación de los fibroblastos, así como con la secreción y la remodelación de la matriz extracelular, sobre las muestras funcionalizadas con colágeno tipo I que en las muestras control. Además, los fibroblastos sembrados sobre el grupo de muestras previamente tratadas con plasma (PL-col, PL-CP-col, PL-GP-col) mostraron una mejor adhesión así como una mayor sobreexpresión y una anticipación de la expresión génica, que el grupo de muestras previamente tratadas con piraña (PH-col, PH-CP-col, PH-GP-col). Esto se atribuyó a que la rugosidad generada por el tratamiento de piraña, disminuye la respuesta de las células fibroblásticas. El orden de la expresión de estos genes en las muestras de plasma de mayor a menor fue PL-CP-col > PL-col > PL-GP-col.

La conformación del colágeno sobre las superficies se evaluó a partir de soluciones muy diluidas, mediante AFM, revelándose que la química de la superficie afecta a la conformación que el colágeno adopta. Se observó una conformación en forma de fibrillas entrecruzadas sobre las muestras de PL-col y sobre las muestras de PL-CP-col, mientras que sobre las muestras de PL-GP-col se observó una conformación en forma de agregados globulares. Estos resultados se

complementaron con la cuantificación del colágeno adherido mediante OWLS, observándose que la cantidad de colágeno adherido también dependía de la química de la superficie. Se observó que las muestras silanizadas con GPTES presentaron una mayor cantidad de colágeno adherido cuando las muestras fueron sumergidas en soluciones de colágeno con baja concentración. Ambas cosas a su vez influyen en la respuesta de las células, donde se observó que a bajas concentraciones, la conformación del colágeno en forma globular obtenida sobre las muestras silanizadas con GPTES favoreció la respuesta de los fibroblastos. Finalmente, a altas concentraciones se observó que la respuesta celular no se vio influenciada ni por la cantidad ni por las diferentes morfologías de colágeno observadas sobre cada superficie, debido a que se obtuvo un mayor recubrimiento del sustrato que enmascaró el efecto que las diferentes conformaciones de colágeno podían tener sobre las células.

ABSTRACT

The clinical success of dental implants depends on the integration of the material surface with the surrounding tissues. This integration depends on two types of interfacial interactions: the interaction with the bone tissue, known as osseointegration, and the interaction of the gingiva's soft tissues with the implant neck, known as biological sealing. The biological sealing is essential to prevent the passage of bacteria and germs through the implant-tissue interface, and consequently avoid subsequent release and loosening of the implant. Hence, improvement of the biological sealing in the short and the long term, depends on the physicochemical properties of the material surface and its ability to promote and / or accelerate the healing process, leading to the restoration of the gingival tissue after implantation.

The aim of this work is the biofunctionalization of titanium surfaces with type I collagen, as a strategy to improve the biological sealing of dental implants. Type I collagen is the main component of the extracellular matrix of gingiva tissue. In this context, the use of collagen coated implants is a promising route to promote fibroblast adhesion due to the amino acid sequence GFOGER, which improves the adhesion process of tissue to implant and significantly reduces recovery time post-implantation. In this study we examined the possibility of using silanes as coupling agents to form a covalent bond between the metal and the organic molecule, and to obtain greater long term stability when compared with physisorption.

A study of the different stages of collagen immobilization process on the titanium surface was carried out: i) surface cleaning and activation, through physical (oxygen plasma) or chemical methods (piranha solution attack); ii) silanization with two different silanes, 3-chloropropyl-triethoxy-silane (CPTES) and 3-glycidyloxypropyl-triethoxy-silane (GPTES); iii) collagen immobilization on pretreated surfaces.

Several characterization techniques were used throughout the study: white light interferometry, contact angle, ToF SIMS, XPS, fluorescence microscopy, OWLS and AFM, to identify physical and chemical changes generated on the surface in each

stages mentioned above, which influence the collagen immobilization in terms of quantity, stability and conformation.

From the results obtained, it is worth noting that: a) plasma activation treatment generated a greater amount of OH⁻ groups on the surface; b) the higher the number of OH⁻ groups, greater the number of silane molecules bound; c) larger quantities of collagen were immobilized on samples on which it is bonded through the silanes chemistry and with greater stability, especially on the samples pretreated with piranha where nanoroughness generated by this treatment plays an important role and d) the amount of bound collagen on titanium silanized with CPTES is higher than the one obtained with GPTES.

After biofunctionalization of the surface, the influence of type I collagen on fibroblast response was evaluated, in terms of adhesion, proliferation and gene expression of cells. In general fibroblast showed a best adhesion, enhanced proliferation and enhanced gene expression associated with the fibroblast activation, and associated with secretion and remodeling of extracellular matrix, on the collagen functionalized samples that on the control samples. In addition, fibroblasts cultured on the samples previously treated with plasma (PL-col, PL-CP-col and PL-GP-col) showed better adhesion and greater overexpression and anticipation of genes mentioned above, than samples previously treated with piranha (PH-col, PH-CP-col and PH-GP-col). This was attributed to the roughness generated through the piranha treatment, which decreases the response of fibroblast cells. The order of this gene expression on plasma sample from highest to lowest was PL-CP-col > PL-col > PL-GP-col.

The collagen conformation on each surface was evaluated from very dilute solutions by AFM, revealing that the surface chemistry affects the collagen conformation. It was observed a network fibril conformation on PL-col and PL-CP-col samples, while on PL-GP-col samples a globular conformation was observed. These results were complemented by quantification of adhered collagen by OWLS, by which the effect of surface chemistry on the amount of bound collagen was also evaluated. It was observed that the samples silanized with GPTES exhibited a

greater amount of collagen when the concentration of collagen solution has kept lower. At low concentration it was observed that the globular collagen conformation obtained on samples silanized with GPTES apparently favoured fibroblast response, while at high collagen concentrations, was found that cellular response was not influenced neither by the amount nor the conformation of collagen. This behaviour is due to a higher coating of substrate was obtained, which masked the effect that different collagen conformations could have on cells.

1

INTRODUCCIÓN

1.1 IMPLANTES DENTALES

Un *implante dental* es una raíz dental artificial, normalmente de material metálico, que se coloca en la mandíbula para sostener una estructura de material cerámico que se asemeja a un diente natural, con el fin de sustituir dientes perdidos (Figura 1.1). Según el criterio de su posición, los implantes pueden clasificarse en tres tipos: implantes subperiósticos (sobre el hueso), implantes transóseos (a través del hueso) e *implantes*



Figura 1.1: Ilustración esquemática de un implante de titanio de tipo Branemark y de la supraestructura cerámica ¹¹⁷

endoóseos (dentro del hueso)¹, siendo éstos últimos los que son objeto de estudio de este proyecto. Los *implantes dentales endoóseos*, se colocan dentro de una columna vertical de hueso a través de una incisión mucoperiosteal y son los más utilizados. Hay una gran variedad de implantes endoóseos según su diseño, pero los más utilizados debido a su mejor resultado en la osteointegración son los implantes roscados (Figura 1.1).²

Los *implantes dentales endoóseos* empezaron a desarrollarse en la segunda década del siglo XX, al mismo tiempo que empezaron a desarrollarse las primeras prótesis de cadera. En 1937 Strock utilizó la aleación *Cr-Co-Mo* (Vitallium) para fabricar implantes con forma de tornillo consiguiendo así, el primer implante dental exitoso de la historia. En 1952 Brånemark, descubrió de manera fortuita que unos tornillos de *titanio* se habían integrado firmemente en huesos de conejo. El Dr. Brånemark llamó a este efecto osteointegración³ y exploró aplicaciones para el titanio en procedimientos quirúrgicos y dentales.

El uso de *implantes dentales endoóseos* como solución a la carencia parcial o total de piezas dentales ha supuesto una revolución en la práctica de la odontología. En los últimos años se ha incrementado significativamente el uso de estos dispositivos, gracias a las investigaciones desarrolladas sobre el material del implante y el diseño superficial, en las cuales el *titanio comercialmente puro* (Ti c.p.) ha resultado ser uno de los materiales más aptos para esta aplicación, debido a su buena biocompatibilidad y a sus adecuadas propiedades mecánicas y de corrosión.^{1,4-8}

El titanio comercialmente puro (Ti c.p.) y sus aleaciones se han empleado tradicionalmente en el campo biomédico^{9,10}, constituyendo junto con los aceros inoxidables y las aleaciones de cromo-cobalto, una de las principales familias de metales seleccionados para la fabricación de implantes dentales, maxilofaciales, ortopédicos, cardiacos, cardiovasculares y otorrinolaringológicos. El ***titanio comercialmente puro (Ti c.p.)***, es el material más empleado para la fabricación de los implantes dentales, debido a que cumple de forma adecuada con todos los requerimientos que un biomaterial debe cubrir en la implantología dental ¹¹: excelente biocompatibilidad combinada con excelentes propiedades mecánicas, osteointegración, biofuncionalidad, resistencia a la corrosión, procesabilidad y disponibilidad. La alta biocompatibilidad es debida a su alta resistencia a la corrosión en medio fisiológico y a su capacidad para la osteointegración. El titanio es el noveno elemento más abundante en la corteza terrestre y se obtiene a partir de minerales ricos en óxido de titanio como el rutilo y la ilmenita. En 1936 Kroll desarrolló la metodología de separación del mineral que lleva su mismo nombre y

desde entonces se ha empleado en un número creciente de aplicaciones, entre ellas las biomédicas.¹²

El titanio c.p. es un caso especial dentro de los materiales biocompatibles, ya que cuando se implanta en tejido duro el hueso es capaz de crecer de manera ordenada en contacto directo con el implante. No obstante el implante no está adherido al hueso, ya que se aprecia una capa biológica de tejido blando de unos escasos 5-10 nm de grosor. Algunos autores sitúan al titanio como un material bioactivo, ya que tiene la capacidad de generar la respuesta fenotípica del osteoblasto o porque es capaz por sí mismo de adsorber calcio y fosforo en su superficie¹³. Los primeros eventos que se producen tras la implantación son debidos a la interacción entre el ambiente biológico y la superficie del material. Dichos eventos dependen fuertemente de una serie de propiedades superficiales entre ellas *la topografía y las propiedades fisicoquímicas de la superficie*.⁶

En la Tabla 1.1 se detallan las propiedades fisicoquímicas del titanio que se han mostrado influyentes en la interacción entre el metal y las proteínas y las células.¹³ El Ti c.p es un material bioinerte, sin embargo, este posee una *capa de óxido de titanio* que crece sobre él de manera natural y espontanea, en contacto con el aire y con otros medios. Esta capa lo protege contra un aumento incontrolado de su oxidación y por lo tanto de la corrosión y contra las reacciones químicas y biológicas indeseables. También es la responsable de la adsorción de iones y proteínas presentes en los tejidos, ya que los óxidos de esta capa son propensos a la hidroxilación/hidratación y poseen una moderada hidrofiliidad. Sin embargo la adhesión de estas proteínas es no específica e incontrolada.

Tabla 1.1 *Propiedades fisicoquímicas del titanio y de su capa de óxido.*

Óxido más estable	TiO ₂
Punto isoeléctrico	3,5-6,7
Carga a pH=7	Negativa (-)
Constante dieléctrica del óxido	86-170
Solubilidad a pH=7 [mol/l]	3·10 ⁻⁶
Carga de las especies que se disuelven	0
Ángulo de contacto en agua	54
Energía libre superficial (ELS) [mJ/m ²]	50,0
Componente polar de la ELS [mJ/m ²]	31,7
Componente dispersiva de la ELS [mJ/m ²]	18,3

Esta capa de óxido, podría utilizarse como vía para crear uniones químicas entre la superficie del titanio y los tejidos que le rodean. Es aquí en donde entra la posibilidad de *modificarla químicamente*, mediante la *adhesión de silanos* los cuales permiten posteriormente inmovilizar sobre la superficie una *capa de colágeno*. A continuación se espera que las *células del tejido epitelial* reconozcan el colágeno a través de sus integrinas, promoviendo su adhesión a la superficie y en consecuencia mejorando el *sellado biológico*. Las modificaciones superficiales en implantes dentales, pueden mejorar la habilidad de los componentes del tejido conectivo pertenecientes a la mucosa periimplantaria, para adherirse a los implantes ¹⁴. Los conceptos de modificación superficial y silanización, serán analizados con más detalle en los siguientes apartados.

1.2 EL SELLADO BIOLÓGICO DE LOS IMPLANTES DENTALES

Un aspecto relevante en el éxito de los implantes dentales es la integración con los tejidos circundantes incluyendo aquí la *osteointegración* (integración del tejido del hueso al vástago del implante) y *el sellado biológico* (integración del tejido fibroso y del ligamento fibro-ósteo de la encía al cuello del implante) (Figura 1.2).^{1,15} Este último aspecto constituye el objetivo fundamental de estudio de este proyecto.



Figura 1.2. Ilustración esquemática que muestra la región de contacto entre el cuello del implante y la encía.¹¹⁷

El *sellado biológico* se ha definido como la unión de la mucosa gingival ó periodonto al cuello de los implantes dentales de forma similar a como lo hace con un diente natural. Esta unión es un factor fundamental para garantizar el éxito y duración del implante, ya que crea una barrera alrededor de éste, evitando la entrada al *tejido conectivo óseo* de agentes destructores, como pueden ser toxinas bacterianas, restos alimenticios, bebidas y otros agentes que provocarían la destrucción progresiva de los tejidos, y por tanto la pérdida paulatina del soporte

del implante o la denominada osteointegración, que trae consigo la movilidad, y en su caso, la caída del mismo.^{14,16-18}

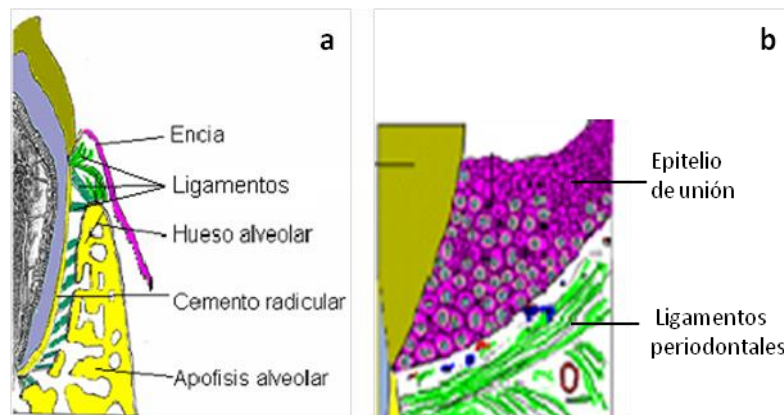


Figura 1.3: Ilustración esquemática de la macroestructura del periodonto.

(a) Partes del periodonto. (b) Epitelio de unión y ligamentos periodontales.¹¹⁸

El *periodonto* es un tejido de sostén que une el diente al tejido óseo de los maxilares y conserva la integridad de la superficie de la mucosa masticatoria de la cavidad bucal. Está comprendido por: la encía, el ligamento periodontal, el hueso alveolar y el cemento radicular (Figura 1.3 a).¹⁹ Para interés de nuestra investigación solo nos dedicaremos al entendimiento de la **encía** ya que es el elemento principal que intervienen en la unión de los tejidos blandos con el cuello del implante.

La **encía** es una fibromucosa formada por tejido conectivo denso con una cubierta de epitelio escamoso queratinizado que cubre el hueso alveolar y rodea a los dientes. Se adhiere al cuello de los dientes y/o implantes por medio del **epitelio de unión** (Figura 1.3 b.) que es una de las regiones del *tejido gingival* más próxima al diente y por medio de **fibras de colágeno tipo I**, constituyendo una barrera entre la cavidad oral llena de bacterias y el tejido conectivo gingival.¹⁶ Las *fibras de colágeno I* están distribuidas en patrones predeterminados para resistir las fuerzas de la masticación. En el caso del implante las *fibras de colágeno* se alinean en dirección paralela a la superficie del implante.¹⁴ Por medio de estas fibras conectivas o ligamentos se da el sellado a la altura de la encía adherida entre el hueso alveolar y el cemento del diente. Estas estructuras colágenas experimentan un remodelado continuo (es decir, reabsorción de fibras viejas y formación de nuevas).

El tejido predominante de la encía es el tejido conectivo. Los componentes principales son las *fibras de colágeno del tipo I*, vasos sanguíneos y nervios, además de proteoglicanos y ácido hialurónico. La matriz de este tejido conectivo, es producida principalmente por los *fibroblastos gingivales* que son las células más abundantes (65%) y cuya función es sintetizar diversos tipos de fibras del tejido conectivo y de la matriz extracelular. Las demás células son: melanocitos (células que sintetizan pigmento) y las células de Langerhans que actúan como mecanismo de defensa de la mucosa bucal. Otros tipos de células minoritarios son: mastocitos, macrófagos, granulocitos neutrófilos, linfocitos y plasmocitos.¹⁹

1.3 EL COLÁGENO

El *colágeno* es la principal proteína fibrosa de los tejidos conectivos como los vasos sanguíneos, la piel, la córnea, los cartílagos, los ligamentos, tendones, y huesos, y de los tejidos que rodean al diente ²⁰. Es sintetizado por los *fibroblastos* y juega un papel importante en la formación de tejidos y órganos y está implicado en varias funciones de la célula.^{21,22}

El colágeno, como muchas otras proteínas, se distingue por tener varios niveles de orden estructural. Jerárquicamente, parte de una estructura primaria formada por la unión de secuencias de aminoácidos a lo largo de una cadena.²³ Los aminoácidos (AA) son compuestos orgánicos que están formados por un carbono asimétrico alfa unido a: un grupo carboxilo (-COOH), un grupo amino (NH₂), un hidrógeno y una cadena lateral con un grupo funcional al final representado con la letra **X** en la Figura 1.4.

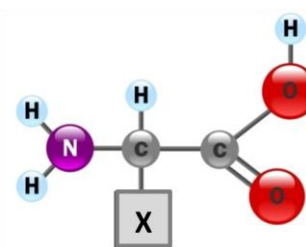


Figura 1.4: Estructura de un aminoácido¹¹⁹

Este último grupo funcional varía en composición y es el que determina las propiedades de cada uno de los aminoácidos. La unión de varios AA da lugar a cadenas llamadas polipéptidos o simplemente péptidos. Se suele hablar de proteína cuando la cadena polipeptídica supere los 100 aminoácidos aunque

existen proteínas más cortas. Dos aminoácidos se combinan en una reacción de condensación que libera agua formando un *enlace peptídico*.

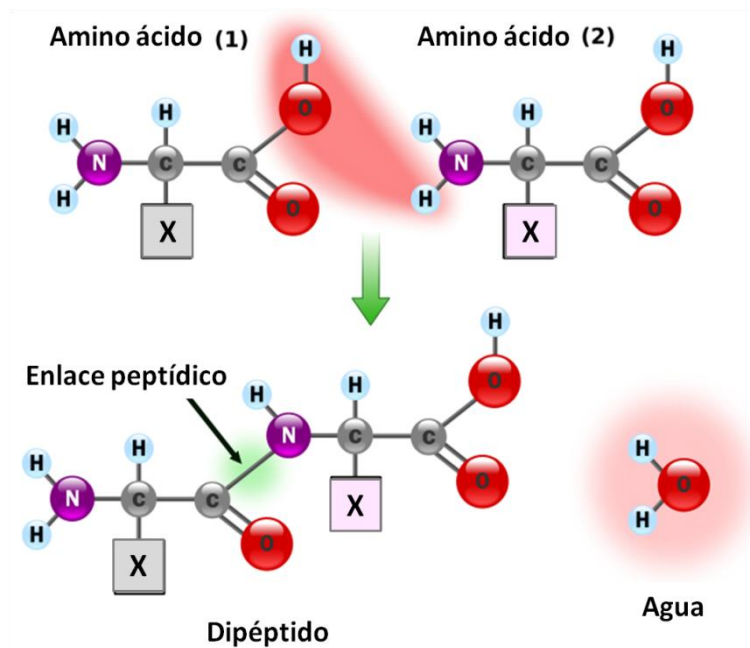


Figura 1.5: Representación de la reacción entre dos aminoácidos, en la cual se genera un enlace peptídico¹¹⁹

El *enlace peptídico* es un enlace covalente entre el grupo amino (-NH₂) de un AA y el grupo carboxilo (-COOH) de otro AA. El enlace peptídico implica la pérdida de una molécula de agua y la formación de un enlace covalente C-N (Figura 1.5). Se pueden seguir añadiendo aminoácidos al péptido, pero siempre en el extremo COOH terminal. Como consecuencia del establecimiento de enlaces peptídicos entre los distintos AA que forman la proteína se origina la cadena principal que compone la estructura primaria del colágeno (Figura 1.6).²⁴

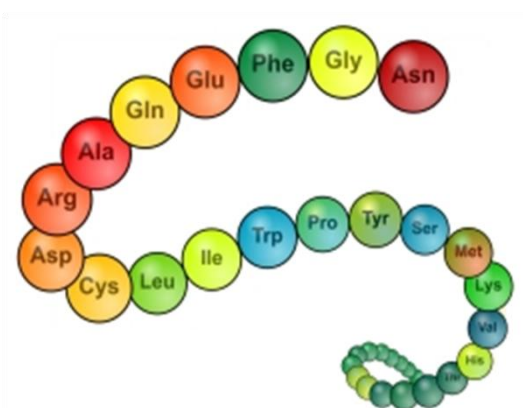


Figura 1.6: Representación esquemática de la estructura primaria del colágeno conformada por la unión de secuencias de aminoácidos (AA)¹²⁰

La estructura secundaria del colágeno es producto de la configuración espacial de la cadena polipeptídica que resulta de la formación de puentes de hidrogeno entre péptidos, dando lugar a la denominada hélice alfa (cadena α) (Figura 1.7). El grupo carboxilo (-COOH) de un aminoácido se une por puente hidrógeno al grupo amino (-NH₂) de otro aminoácido que está tres residuos más allá ($n + 4$). De esta manera cada grupo CO y NH de la estructura central (columna vertebral o "backbone") se encuentra unido por puente hidrógeno.

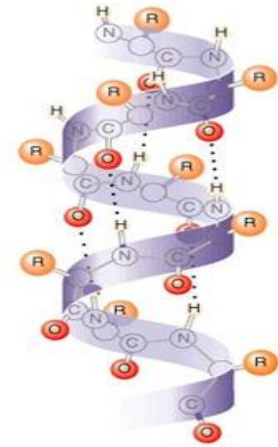


Figura 1.7: Estructura secundaria del colágeno en forma de hélice α ¹²¹

La estructura terciaria del colágeno es la unión de 3 cadenas α -polipeptídicas, cada una formada por más de 100 aminoácidos. En el colágeno tipo I, dos de las cadenas son denominadas como $\alpha 1$ con una composición de aminoácidos idéntica y una cadena $\alpha 2$ con una composición distinta. Los principales AA del colágeno son la glicina (Gly), la prolina (Pro) y la hidroxiprolina (Hyp). Estos aminoácidos representan más del cincuenta por ciento del total de aminoácidos.²⁴⁻²⁶ La abundancia de la glicina tiene un papel en la triple configuración gly-pro-hyp, donde los dos últimos AA controlan la configuración de la cadena debido a la alta rigidez de sus residuos con estructuras en forma de anillo (Figura 1.8).

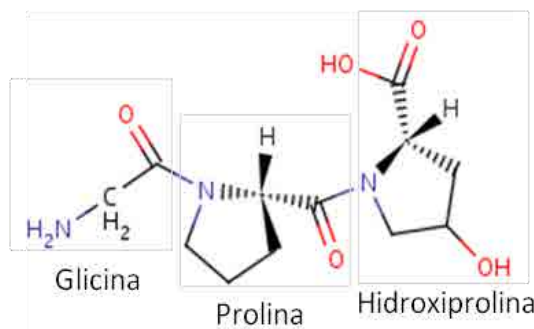


Figura 1.8: Unión de los principales aminoácidos presentes en las cadenas alfa del colágeno: glicina, prolina e hidroxiprolina ²³

La ausencia de una cadena lateral en la glicina, permite un acercamiento de las cadenas polipeptídicas y facilita uniones por puente de hidrogeno entre la prolina de una cadena y la hidroxiprolina de otra cadena α tal y como se esquematiza en la Figura 1.9.

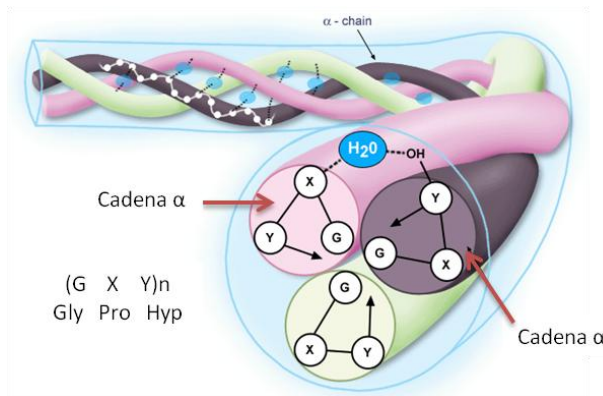


Figura 1.9: Representación esquemática de la estructura en triple hélice del colágeno, formada por la unión de tres cadenas α ²³

Finalmente, la estructura cuaternaria se caracteriza por la repetición de la unidad estructural supramolecular, compuesta por muchos paquetes de triples hélices en un entramado específico el cual constituye el elemento básico del estado sólido, las microfibrillas de colágeno. Las triples hélices dentro de la microfibrilla, son aproximadamente paralelas al eje de la fibra, todas ellas se ponen en la misma dirección dando lugar a un espesor de más o menos 64nm que se puede observar en un microscopio electrónico.

El colágeno, más que una proteína única, se considera como una familia de moléculas estrechamente relacionadas pero genéticamente distintas, por lo cual existen varios tipos de colágeno dependiendo el tipo de tejido conectivo que conformen. Entre los diferentes tipos de colágeno los más comunes son: el colágeno tipo I abundante en la dermis (incluyendo la encía), en la parte orgánica del hueso, tendón y dentina, el colágeno tipo II que compone al cartílago, el tipo III que se encuentra en las paredes de los vasos sanguíneos; el tipo IV que forma la lamina basal de los epitelios y tipo V que se encuentra en las paredes celulares.²⁷ Sin embargo el 90% del colágeno en el cuerpo es el tipo I. En lo sucesivo, cuando se utilice en este documento el término colágeno se hará referencia, a menos que se indique lo contrario, al colágeno de tipo I, que es el componente principal de los tejidos conectivos de la encía.¹⁶

Entre las propiedades más destacables del colágeno dentro de las aplicaciones biomédicas están la biodegradabilidad y el hecho de que no genera respuesta inmune.^{21,22} Una de las razones por las cuales el colágeno es usado en aplicaciones biomédicas es porque éste puede formar fibras con alta resistencia y estabilidad

debido a su estructura entrecruzada.^{22 20} Además, es sabido que el colágeno tiene propiedades hemostáticas, activando la agregación plaquetaria y la formación del coágulo, paso necesario para la formación de tejido. Por todo ello el colágeno aparece como un material capaz de estimular la respuesta celular²⁸⁻³⁰, mejorando la función biológica de los biomateriales.^{7,31-33}

Diferentes estudios sugieren que el colágeno de tipo I promueve la adhesión de las células del tipo fibroblasto al poseer secuencias GFOGER (glicina-fenilalanina-hidroxiprolina-glicina-glutamato-arginina), las cuales son reconocidas principalmente por las integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ presentes en los fibroblastos – proteínas que participan en la unión de las células con la matriz extracelular.^{28-30,34,35} En base a lo anterior, en este estudio se busca favorecer la respuesta de las células del tipo fibroblasto, mediante la inmovilización del colágeno tipo I sobre la superficie del titanio y así mejorar y/o acelerar la unión de los tejidos de la encía al implante.

1.4 LOS FIBROBLASTOS Y SU INTERACCIÓN CON EL COLÁGENO TIPO I

Los ***fibroblastos*** pertenecen a la familia de las células de los *tejidos conectivos* entre las cuales también se encuentran las células que producen cartílago, las células óseas, las células musculares lisas y las células del tejido adiposo. Estas células se especializan en secretar matriz extracelular colagínosa y son responsables de la estructura de los tejidos. Los fibroblastos están dispersos en el tejido conectivo, en el cual secretan matriz extracelular (MEC) elástica que es rica en *colágeno del tipo I* y II. Los fibroblastos tienen la capacidad de proliferar rápidamente, por lo cual son uno de los tipos de células más utilizados para estudios de biología celular.³⁶

Los fibroblastos están involucrados en los procesos de cicatrización de las heridas. Cuando el tejido es dañado, el primer evento que tiene lugar es una hemorragia, producida por la alteración de los vasos sanguíneos, seguida por la agregación plaquetaria que lleva a la formación del coágulo, en el que la fibrina y la

fibronectina forman una matriz provisional para las posteriores respuestas celulares. Los factores segregados por las plaquetas desencadenan la migración de células inflamatorias (macrófagos), que después de limpiar el lugar de la herida, inducen la fase de proliferación, a partir de la producción de factores de crecimiento y citoquinas que promueven la afluencia y proliferación de fibroblastos en el lugar de la herida. Estos últimos, inician la producción de colágeno lo cual ayuda a reparar el tejido dañado.

Los componentes de la MEC pueden influir en el estado de diferenciación de las células del tejido conectivo a través de efectos tanto físicos como químicos, influyendo en la adhesión celular y en su forma. Es bien sabido que la matriz extracelular es quien brinda el soporte necesario a las células para que puedan adherirse, comunicarse entre ellas e interactuar. Las interacciones célula - matriz tienen un alto grado de especificidad, requieren un reconocimiento inicial, comunicaciones físicas, químicas y eléctricas, una reorganización citoesquelética y/o migración. Los receptores celulares de la adhesión, llamados integrinas, actúan como moléculas de señalización transmembrana que transmiten la información del ambiente exterior al interior de la célula. En el caso de los fibroblastos gingivales, estos receptores interactúan con el colágeno del tejido de la encía y lo van remodelando mientras las células promueven la regeneración de tejido conectivo.³⁷

La remodelación de los tejidos incluye la síntesis, reorganización y degradación del colágeno. En el caso de la degradación a nivel extracelular, esta se da a través de unas enzimas denominadas metaloproteinasas que son secretadas por los fibroblastos después de reconocer el colágeno sobre el que se encuentran.^{38,39} También existe una degradación del colágeno a nivel intracelular que está dada por la fagocitosis y la digestión de las fibras de colágeno por medio de enzimas denominadas catepsinas que se encuentran dentro de los lisosomas de las células.⁴⁰

1.5 ESTRATEGIAS USADAS PARA MEJORAR LA OSTEOINTEGRACION Y EL SELLADO BIOLOGICO DE IMPLANTES DENTALES

En la actualidad, el número de odontólogos que colocan implantes se ha incrementado en todo el mundo gracias al éxito clínico alcanzado, a la gran variedad de implantes y al avance en la técnica quirúrgica. Se estima que un millón de implantes dentales endo-óseos se colocan cada año en todo el mundo⁴¹, con un tasa de supervivencia reportada entre 85 y 89% entre los 10 y 15 años de seguimiento. Sin embargo entre el 5 y el 14% de los implantes dentales fallan, lo cual limita el éxito clínico e impone cargas de salud y económicas a los pacientes y a los sistemas sanitarios.⁴²⁻⁴⁵

Algunos de los implantes fallan debido a causas biomecánicas, como fracturas o daños estructurales del implante.^{46,47} Otros fallan debido a causas biológicas, dentro de las cuales está la reabsorción del hueso mandibular ⁴⁸ y/o la formación de una cápsula fibrosa alrededor del implante de unos escasos 5-10nm de grosor, la cual impide que el implante se adhiera a los tejidos que lo rodean.⁴⁹ Además, la pobre fijación de los tejidos de la encía al cuello del implante puede degenerar en una peri-implantitis causada por la acumulación de placa dento-bacteriana en el área de los tejidos blandos y en consecuencia producir el aflojamiento y pérdida del implante debido a la interacción de las bacterias con los tejidos óseos que rodean al implante que llevan a su reabsorción.^{18,41,50,51} De hecho se ha reportado que la peri-implantitis representa una causa de fallo del 11% de los implantes dentales.^{44,45,52,53}

Con el fin de favorecer la unión de los tejidos con el implante, se han venido implementado múltiples estrategias para la mejora de las propiedades de superficie de los implantes dentales. En el caso de los implantes de titanio el objetivo final es obtener una superficie bioactiva. Las estrategias más utilizadas, consisten en el control de la rugosidad (modificación física), la aplicación de un tratamiento químico sobre la superficie (modificación química inorgánica) o la aplicación de recubrimientos bioactivos y biomiméticos (modificación química orgánica).⁵⁴

1.5.1 Mejora de la osteointegración

En los últimos 20 años se ha alcanzado una creciente tasa de éxito relacionada con la mejora de la osteointegración de los implantes, mediante numerosos tratamientos y/o modificaciones de la superficie del implante.⁵⁵⁻⁵⁹ En cuanto a la topografía, es conocido por ejemplo que aumentar la rugosidad del Ti c.p. mejora la respuesta osteoblástica *in vitro* y la fijación mecánica *in vivo*.^{57,60} En una revisión bibliográfica de cerca de 120 publicaciones realizada por Wennerberg et al., en 2009, se reportó que la gran mayoría de las publicaciones demostraron que la respuesta del hueso se vio influenciada por el cambio en la topografía de la superficie de implantes de titanio. En esta recopilación, no pudieron comparar las publicaciones debido a la variación de la calidad de las superficies estudiadas y por lo tanto no pudieron definir que rango exacto de rugosidad favorecía la osteointegración, debido a que en algunas publicaciones las superficies con ciertos valores de rugosidad eran descritas como rugosas, mientras que en otras publicaciones estos mismos valores eran descritos como superficies lisas ⁶¹.

Otro tipo de tratamiento utilizado para mejorar la osteointegración ha sido el tratamiento químico de la superficie, el cual fue introducido por Kokubo en 1990. En este proceso la superficie del titanio se trata con una solución básica de NaOH, la cual genera un gel de titanato de sodio, que se estabiliza mediante un tratamiento térmico, dando lugar a la formación de una capa de titanato de sodio parcialmente cristalina. Una vez formada la capa de titanato, se espera que tanto *in-vitro* como *in-vivo*, la superficie del material se recubra de grupos Ti-OH por medio del intercambio de iones entre la superficie que alberga Na⁺, con iones H₃O⁺ procedentes de suero fisiológico (SBF) en el cual se sumergen las superficies o procedentes de los fluidos corporales cuando el implante entra en contacto con los tejidos. Mediante esta técnica se puede obtener un recubrimiento de apatita similar a la que se encuentra en el hueso.⁶² Otro método utilizado para depositar apatita sobre titanio, consiste en sumergir superficies de TiO₂ poroso, en una solución 1:1 de H₃PO₄ + H₂O₂ y posteriormente sumergirlas en una solución de Hank.⁶³ Se evaluó la respuesta de células provenientes de osteosarcoma, obteniendo una mejor adhesión celular cuando estas superficies fueron comparadas con titanio sin ningún tratamiento.

Otras propuestas radican en la biofuncionalización de superficies con distintas moléculas biológicamente activas como por ejemplo: péptidos que contienen ciclos DfKRG⁶⁴, colágeno tipo I³¹, celulosa de carboximetil fosfatado⁶, péptidos con secuencias RGD^{7,65}, inmovilización de péptidos anfifílicos⁸, sulfato de condroitina y proteína morfogenética ósea-2(BMP₂)⁶⁶. Se han realizado estudios de: inmovilización de BMP-2 (rhBMP-2) sobre titanio^{67,68}, polímeros bioactivos que contienen sulfonatos (sulfonato sódico de estireno, NaSS) y carboxilatos (ácido metil-acrílico, MA) injertados sobre aleaciones de titanio^{69,70}. En todos estos estudios se realizaron estudios *in-vitro* con diferentes tipos de células osteoblásticas, en los cuales obtuvieron una mejora de la respuesta celular así como una mayor expresión de fosfatasa alcalina, sobre las superficies recubiertas con los diferentes péptidos y/o proteínas, en comparación con superficies sin ningún recubrimiento.

En otros estudios relacionados con la inmovilización de péptidos y/o proteínas, se observó, que el cambio en la rugosidad afecta el grado de hidrofiliidad de la superficie, lo que posteriormente afecta a la cantidad de proteínas que se adsorben en la superficie. Algunos autores han reportado que cambios en la rugosidad, aumentan el área superficial del material, y esto a su vez aumenta la cantidad de moléculas biológicas que se adhiere.⁷¹⁻⁷³ Sin embargo otros autores han concluido que no hay una relación lineal entre la rugosidad y la cantidad de proteína absorbida.^{74,75} Estas diferencias en la opinión respecto al efecto de la rugosidad sobre la cantidad de molécula adherida, y la respuesta de células y tejidos pueden ser debidas a que en los estudios se utilizan diferentes sustratos, al tamaño de las proteínas, a los métodos empleados para evaluar la adsorción de las proteínas y por último al grado de rugosidad producido sobre las superficies. Por lo tanto es necesario verificar en este estudio de qué manera puede influir el grado de rugosidad que producimos sobre el titanio en la adsorción del colágeno tipo I.

Entre las distintas biomoléculas estudiadas, hay que destacar los resultados obtenidos con la inmovilización de colágeno. Algunos estudios han demostrado que la adhesión celular osteoblástica es mejor sobre superficies de titanio recubiertas con colágeno tipo I que para implantes sin recubrir.^{32,35,56,57} Todos

estos estudios analizaron la interacción con osteoblastos, sin embargo es poco lo que se ha probado en cuanto al comportamiento de los demás tipos de células.^{59,67,76,77}

1.5.2 Mejora del sellado biológico

En el tema de la mejora del *sellado biológico* -recuperación del tejido blando de las encías alrededor del implante-, algunos estudios han visto una mejora notable en la respuesta de fibroblastos y/o en la adhesión de los tejidos blandos de la encía sobre la superficie del cuello del implante cuando realizan modificaciones a nivel micro y nano-topográfico en la superficie de diferentes sustratos. Algunos autores como Dalby 2007 y Lee et al 2009, han reportado que superficies con micro y/o la nanotopografía mejoran la proliferación de fibroblastos y la expresión de genes típicos de la producción y remodelación de la matriz extracelular.^{78,79} Algunos incluso han observado la formación de fibras del tejido conectivo de las encías, perpendiculares al implante y en la misma dirección de micro ranuras generadas sobre la superficie del implante.¹⁷ Otros autores aseguran que la combinación de múltiples tamaños de ranuras controlan la orientación tanto de los fibroblastos como de los componentes de la matriz extracelular que secretan estas células.⁸⁰ En uno de los estudios más recientes se ha observado que, a pesar de que la generación de micro-ranuras no influye en el número de fibroblastos adheridos en comparación con superficies de titanio lisas, si que se da una mejor expresión de las proteínas relacionadas con la producción temprana de matriz extracelular, sugiriendo una rápida formación de tejido alrededor del implante, el cual es necesario para lograr un sellado biológico.³⁹

En el caso de la *biofuncionalización* de la superficie del implante para mejorar el sellado biológico, se han reportado estudios de superficies de titanio recubiertas con péptidos y/o proteínas que mejoran la adhesión de células gingivales (fibroblastos gingivales y endoteliales gingivales). Dean et al., encontraron que los implantes de titanio recubiertos con fibronectina mejoraban el enlace de fibroblastos gingivales y implantes recubiertos con laminina mejoraban la adhesión de las células epiteliales gingivales.⁸¹ Endo reportó la eficiencia de inmovilizar fibronectina en implantes de NiTi para mejorar la respuesta de células

humanas gingivales.⁸² Zhao et al., compararon la respuesta de células gingivales sobre superficies de titanio puro y superficies de titanio recubiertas con RGD, mostrando que la adhesión y extensión tanto de fibroblastos como de células epiteliales gingivales fue mejor sobre las superficies con RGD inmovilizado covalentemente sobre las superficies de titanio.⁸³ Werner et al., realizaron un recubrimiento de péptido derivado de la lamina-5 α 3, pero en este caso no se usaron silanos sino que el péptido se inmovilizo por medio del entrecruzamiento con el copolímero (PLL/PGA)_{6,5}-PGA depositado sobre superficies de titanio lisas y porosas, las cuales se utilizaron en el diseño del cuello del implante. En este caso se estudió la respuesta de células del tipo epitelial gingival sobre estas superficies y se observaron puntos focales, concluyendo entonces que tanto la porosidad de la superficie como el recubrimiento favorecían la respuesta de las células epiteliales y promovían la adhesión del tejido de la encía al cuello del implante.¹⁸

Hay pocos estudios referentes al uso de recubrimientos de colágeno sobre titanio para mejorar la respuesta de las células gingivales y/o el sellado biológico. En cuanto a la mejora de la respuesta de fibroblastos, Nagai et al., investigaron la influencia de inmovilizar colágeno por fisisorción sobre implantes de titanio en la adhesión inicial de fibroblastos gingivales humanos, reportando un incremento de la actividad de los fibroblastos con este recubrimiento, al comparar el efecto sobre superficies sin recubrimiento.³² En cuanto a la influencia del colágeno sobre la adhesión del tejido blando peri-implantarío *in-vivo*, uno de los estudios más recientes realizado por Welander et al., reportó que las dimensiones de los componentes del tejido conectivo y epitelial de la interfaz tejido blando/implante fue similar en superficies de titanio sin recubrimiento y en superficies con colágeno inmovilizado en el cuello del implante.¹⁴ En este caso el colágeno fue integrado parcialmente a la superficie del titanio mediante una capa de óxido formada anódicamente. Sin embargo, para esta misma aplicación, la inmovilización de colágeno a través del uso de *organosilanos* es un tema sobre el que no conocemos hasta el momento ningún trabajo publicado.

Finalmente la interfaz colágeno/titanio, así como la interfaz titanio-biofuncionalizado/fibroblasto no ha sido estudiada de manera rigurosa. En esta

tesis doctoral no sólo se busca analizar la influencia que tiene el colágeno inmovilizado covalentemente sobre superficies de titanio en la interacción implante/células, si no también, evaluar con profundidad como los cambios en las propiedades físico-químicas de la superficie provocados por los tratamientos químicos de modificación superficial, influyen en la mejora de la inmovilización de proteínas y en la respuesta de las células.

1.6 BIOFUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIES

Su objetivo es aprovechar el conocimiento actual sobre el comportamiento celular, la biología y la bioquímica para inducir una reacción celular específica. De esta manera se pretende controlar la respuesta biológica de un material implantado, como por ejemplo, el crecimiento del tejido vivo sobre los implantes. Esto se hace mediante la inmovilización de biomoléculas funcionales que simulan el ambiente de la matriz extracelular. Entre las biomoléculas más utilizadas se encuentran las proteínas, enzimas o péptidos bioactivos que poseen en su estructura secuencias peptídicas capaces de inducir reacciones específicas en células a través de la unión con sus receptores llamados integrinas, y por tanto, controlar la interacción entre el tejido y el biomaterial. En el caso del titanio, esta estrategia puede ser utilizada para mejorar la cicatrización periimplantaria.

Con la biofuncionalización del titanio se obtiene un mayor control en la interacción entre el implante y los tejidos¹⁰, lo que incluye:

- i) Respuesta celular selectiva, soportando la adhesión y la rápida diferenciación celular.
- ii) Resistencia a ataques de bacterias. Lo cual reduce la tasa de infecciones y la necesidad de antibióticos.
- iii) Reducción del riesgo de inflamación.
- iv) Un incremento a largo plazo en la duración del implante dentro del tejido, debido a la mejora en la respuesta biológica.

Cuando la modificación incluye la biofuncionalización con moléculas orgánicas se deben considerar las siguientes condiciones:

- i) Se debe proporcionar un enlace estable, que no sea sensible a la hidrólisis y que no desnaturalice o inactive las biomoléculas, interfiriendo con el dominio funcional y su estructura. Para esto, se suelen usar grupos funcionales o moléculas que proporcionan una interface para enlazar la biomolécula a la superficie del material.
- ii) La distancia entre estos grupos funcionales y la superficie del material debe ser suficiente para permitir un movimiento flexible de la biomolécula que se inmoviliza. Adicionalmente, es necesaria una orientación particular de las moléculas y una configuración o estructura específicas.
- iii) Para una interacción efectiva entre las biomoléculas inmovilizadas y los receptores celulares debe haber un cierto número de especies bioactivas disponibles en la superficie.

En los últimos años, se han desarrollado nuevas técnicas para funcionalizar los implantes dentales de titanio con moléculas orgánicas. En general, las moléculas orgánicas, pueden ser adheridas a la superficie a través de fisisorción monocapas, auto-ensambladas (self-assembled monolayers SAM) y enlace covalente (silanización).^{59,84,85} A continuación sólo se hablará de la inmovilización de moléculas a través de la fisisorción y del uso de los silanos, ya que estos últimos son los que son objeto de interés de este proyecto.

1.6.1 Fisisorción de biomoléculas

La técnica de adsorción física o fisisorción, conlleva la inmersión del implante en una solución que contenga la molécula bioactiva de interés, seguida por una adsorción espontánea de dicha molécula. La adsorción de moléculas es un proceso muy complejo que depende de la química de la superficie, la topografía, las interacciones electrostáticas entre las moléculas y con la superficie, y las propiedades de la solución. Las moléculas tienden a adsorberse sobre superficies que sean hidrófilas o que por lo menos tengan cierta mojabilidad.^{59,86}

La capa de óxido que posee el titanio de forma natural tiene un punto isoelectrónico de 3.5-6.7, que indica que esta capa se carga negativamente en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, las moléculas cargadas positivamente bajo estas condiciones pueden adsorberse debido a interacciones electrostáticas.¹⁰ Con esta idea G. Csucs inmovilizó poli-L-lisina sobre una capa de óxido de titanio.⁸⁷ La eficacia de la adsorción de biomoléculas en superficies metálicas oxidadas depende de la reactividad de los grupos disponibles en dicha superficie y de los productos químicos utilizados para formar puntos activos de enlace. Por lo tanto es importante controlar la capa de óxido superficial y para ello se requiere de un proceso de limpieza y/o oxidación controlado que facilite la reproducibilidad del protocolo.

La producción de una capa de óxido controlada, así como la introducción de grupos hidroxilos sobre la superficie de materiales metálicos como el titanio, se puede realizar mediante una limpieza/activación por medio del tratamiento de plasma de oxígeno o por ataque químico, por ejemplo con H_2SO_4/H_2O_2 (solución piraña). Ambas técnicas proporcionan capas de óxido limpias y homogéneas.⁸⁸⁻⁹² En el caso de las superficies con grupos hidroxilos, la interacción con la biomolécula se da principalmente mediante puentes hidrógeno e interacciones electrostáticas y/o polares. Sin embargo, el proceso de adsorción de biomoléculas sobre superficies mediante este tipo de interacciones dan lugar a uniones de carácter débil y es posible que las biomoléculas inmovilizadas sean desplazadas por proteínas del medio cuando el material es implantado¹⁰, lo que compromete la estabilidad de las capas obtenidas.

1.6.2 Inmovilización de biomoléculas mediante el uso de silanos

Una de las desventajas de la fisisorción es el pobre control de la cantidad, la densidad y la estabilidad de las moléculas adsorbidas, así como la pérdida de conformación que los péptidos y proteínas pueden sufrir, con el consiguiente cambio de su bioactividad. Para evitar estas limitaciones, las técnicas de enlace covalente consiguen la inmovilización y la orientación específica de la molécula sobre la superficie. La principal ventaja de las técnicas de enlace covalente es la posibilidad de inmovilizar cantidades conocidas de molécula y controlar la

orientación de ésta sobre el material. El enlace covalente de moléculas sobre superficies de implantes de titanio es un método complicado, que requiere de superficies previamente funcionalizadas con grupos reactivos, tales como grupo amino o carboxilo los cuales pueden reaccionar posteriormente con las funciones ácidas o básicas de las moléculas respectivamente, obteniendo finalmente enlaces amida estables entre el material y la molécula.⁵⁹

Una forma de funcionalizar la superficie de un material es a través del proceso de *silanización*. En la *silanización*, son utilizados agentes químicos llamados *organosilanos*, que son monómeros de silicio que contienen al menos un enlace carbono-silicio (CH₃-Si-). El silicio se encuentra en la misma familia de elementos que el carbono en la tabla periódica, por lo tanto, en su estado más estable tiene la capacidad de unirse a otros cuatro átomos como hace el carbono (Figura 1.10). Sin embargo, el silicio es más electropositivo que el carbono y no forma dobles enlaces estables, lo que le permite formar reacciones químicas muy útiles y especiales.⁹³⁻⁹⁵

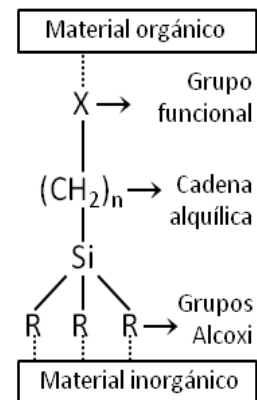


Figura 1.10.
Esquema general
de un organosilano

Los *organosilanos*, son usados para crear un enlace entre la superficie oxidada del titanio y las biomoléculas de interés. De este modo, componentes de la matriz extracelular como la laminina, fibronectina, heparina, colágeno, anticuerpos y secuencias peptídicas pueden ser enlazadas covalentemente a la superficie del titanio ^{59,84,96-98}. Los organosilanos además de ofrecer una mayor estabilidad, una orientación y una configuración de la molécula inmovilizada, poseen agentes espaciadores (cadenas alquílicas) que permiten un movimiento flexible de la biomolécula inmovilizada, lo que proporciona a la silanización una ventaja sobre las demás técnicas de biofuncionalización.^{84,96-99}

Los organosilanos poseen dos partes con reactividad diferentes. Por un lado, una parte de carácter inorgánico, que está compuesta por *grupos alcoxilo*, representados con una R en la Figura 1.10. Los silanos poseen generalmente tres grupos alcoxilo

(grupos hidrolizables) que actúan como agentes de acoplamiento a los sustratos. Estos deben ser previamente hidrolizados (activados) y condensados para permitir la unión entre el silano y la superficie del sustrato.⁹⁴ Por lo tanto la facilidad con la que se puedan hidrolizar dichos grupos es un factor importante para lograr el enlace con el sustrato inorgánico. La tasa de hidrólisis de algunos de los grupos alcoxi más comunes en los organosilanos⁵, se muestra en la Figura 1.11.

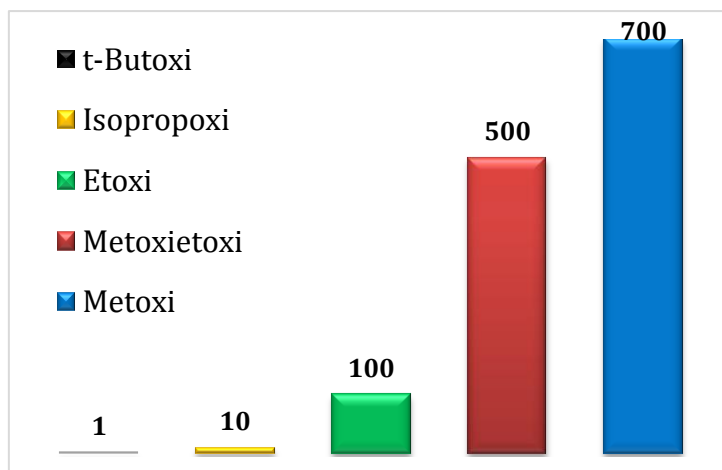


Figura 1.11. Tasa de hidrólisis para diferentes grupos alcoxi que pueden estar presentes en un organosilano⁵

Los *grupos alcoxi* más utilizados en los silanos, son el metoxi ($-O-CH_3$) y/o el etoxi ($-O-CH_2-CH_3$), debido a que son fáciles de manejar, son altamente hidrolizables lo cual proporciona una alta reactividad a la molécula, y por último los alcoholes que quedan como subproducto de la reacción de hidrólisis son volátiles y no corrosivos.^{100,101} Los metoxisilanos son capaces de reaccionar con los sustratos bajo una atmósfera saturada de vapor que contiene dicho silano. Los etoxisilanos, que son menos reactivos, requieren de un catalizador para obtener una reactividad adecuada. Sin embargo, la baja toxicidad del etanol como subproducto de la reacción de adhesión entre el silano y la superficie, favorece el uso de los etoxisilanos.^{93,95}

Los tratamientos de superficies con silanos envuelven una reacción química líquido-sólido. En general son sencillos de realizar y tienen bajo coste. Para generar el enlace entre el organosilano y el sustrato inorgánico, la superficie de este último debe poseer grupos hidroxilo. Materiales como el vidrio, silicona, alúmina y superficies de cuarzo así como muchas superficies oxidadas de metales,

son ricos en grupos hidroxilo. Pero para aumentar o generar una capa de grupos hidroxilo más controlada se requiere de procesos de limpieza y/o activación controlados como el tratamiento de plasma de oxígeno o el ataque químico con H_2SO_4/H_2O_2 , como se menciona en el apartado 1.6.1. La ventaja de las reacciones con silanos es la estabilidad debida a su estructura reticulada y covalente. Sin embargo la reacción entre el silano y un grupo hidroxilo está sujeta a hidrólisis básica, por lo tanto bajo algunas condiciones puede ocurrir una ruptura de este enlace.⁸⁵

La otra parte del silano es de carácter orgánico, la cual está compuesta por una *cadena alquílica* (por ejemplo: el grupo propileno, $-CH_2-CH_2-CH_2-$) que posee en su extremo un *grupo organofuncional* representado con una X en la Figura 1.10. Entre los grupos organofuncional que se pueden unir a la cadena hidrocarbonada se incluyen: el cloro, grupos carboxilo, grupo amina y grupo epoxi entre otros. La mayoría de estos grupos actúan como, electrófilos, es decir, como grupos que permiten el ataque nucleófilo por parte de los grupos funcionales presentes en las biomoléculas, los cuales actúan como nucleófilo.

La cadena alquílica (cadena hidrocarbonada) actúa como *grupo espaciador* entre el silicio y el *grupo funcional*. Al ser dúctil tiene la capacidad de absorber parcialmente las tensiones que se producen en la interfaz tejido-biomaterial y también puede servir para orientar y exponer adecuadamente la molécula bioactiva enlazada al silano, a fin de inducir las reacciones tisulares deseadas.⁸⁸ Debido al carácter químico de cada una de las partes que componen a los organosilanos, éstos pueden actuar como interfaz entre un *material inorgánico* como el vidrio, metal o un mineral, y un *material orgánico* como polímeros, proteínas o péptidos.

La inmovilización de proteínas en superficies metálicas previamente silanizadas ha demostrado ser exitosa, además de ser una de las técnicas más utilizadas por su alta reproducibilidad en la funcionalización de superficies metálicas.^{6,59,84,86} En la última década varios autores han visto que diferentes tipos de organosilanos

pueden reaccionar con el titanio, ofreciendo mejoras en sus enlaces con biomoléculas.⁸⁴

Dentro de los organosilanos conocidos y utilizados sobre superficies metálicas como el *titanio*, los más investigados en los últimos años han sido los *aminosilanos* debido a que estos poseen como grupo funcional una amina la cual se enlaza fácilmente con biomoléculas.⁸ Es el caso de Müller et al., quienes estudiaron como el 3-aminopropil-trietoxi-silano (APTES) adherido covalentemente sobre titanio contribuye de manera favorable en la inmovilización de colágeno.³⁵ En 2007, Bagno et al., gracias al uso del aminoalquil-trialcoxi-silano, lograron inmovilizar péptidos con secuencias RGD que promueven la adhesión celular no específica, y péptidos con secuencias HVP que mejoran la adhesión celular a través de el mecanismo mediado por proteoglicano, que es un mecanismo específico de los osteoblastos.⁷ Sargeant et al., lograron inmovilizar péptidos amfifílicos sobre NiTi con aminosilanos depositados en medio líquido, con el fin de evaluar su influencia en dos tipos de células, células endoteliales de arteria pulmonar y en células pre-osteoblasticas de cráneo de ratón.⁸

Los aminosilanos poseen una amina como grupo funcional que requiere ser activada mediante el uso de un *agente entrecruzante*, para lograr el enlace covalentemente con los grupos funcionales de las biomoléculas. A pesar de que ha sido demostrado que dicho agente entrecruzante es muy eficaz para enlazar biomoléculas, su uso representa una etapa adicional en el proceso de silanización de la superficie del titanio.

Para evitar el aumento de costos y tiempos de producción, así como de posibles efectos secundarios, lo ideal es que las modificaciones químicas de la superficie sean minimizadas y simplificadas. Por lo tanto, en este trabajo se propone el desarrollo de un nuevo método de silanización y el uso de otros organosilanos, que permitan un enlace covalente directo con las biomoléculas. Para lograr este objetivo se propone estudiar al 3-cloropropil-trietoxi-silano (CPTES) y al 3-glicidiloxipropil-trietoxi-silano (GPTES) (Figura 1.12). Ambos silanos tienen en común 3 grupos etoxi (Eto), responsables de la unión con la superficie del titanio y

se diferencian en sus grupos organofuncionales. El CPTES posee como grupo funcional un cloro (Cl), que favorece la *sustitución nucleófila*, y por lo tanto requiere pH de trabajo neutros-básicos y el GPTES posee un grupo epoxi, que tiene un potencial de reactividad más alto que el del cloro del CPTES, y por lo tanto permite el trabajo en un rango de pH más amplio.¹⁰² Ambos grupos organofuncionales no necesitan de activación, en comparación con el grupo amina del APTES. A pesar de que el CPTES y el GPTMS han sido reportados anteriormente, no conocemos hasta el momento ningún trabajo publicado, en el cual estos sean utilizados para inmovilizar colágeno sobre superficies de titanio, ni en el cual hayan evaluado su respuesta sobre células fibroblásticas.

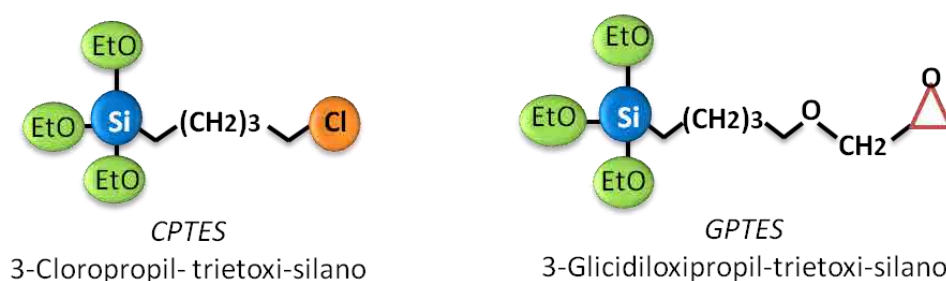


Figura 1.12: Estructura química del 3-cloropropil-trietoxi-silano (CPTES) y el 3-glicidiloxipropil-trietoxi-silano (GPTES). El CPTES tiene como grupo organofuncional el cloro y el GPTES un grupo epoxi.

En la literatura se ha reportado el uso del CPTES para silanizar superficies diferentes al titanio, como por ejemplo, superficies de Silicio para ser usadas en la industria química¹⁰³ ó como reforzante del caucho¹⁰⁴. En un estudio desarrollado recientemente por Tsiourvas et al, se utilizó CPTES para enlazar covalentemente capas de poli(etileno-imina) hyper-ramificado sobre superficies de titanio para promover la deposición de fosfatos de calcio a partir de suero corporal simulado.¹⁰⁵ En estudios realizados recientemente dentro de nuestro grupo de investigación se ha utilizado el CPTES para co-inmovilizar oligopeptidos de RGD y PHSRN¹⁰⁶ y para inmovilizar polimeros a base de proteínas como la elastina con secuencias RGD¹⁰⁷ sobre superficies de titanio. En ambos estudios se ha logrado mejorar la respuesta *in vitro* de células osteoblásticas.

En cuanto GPTES no conocemos hasta el momento ningun trabajo publicado sobre el uso de este en aplicaciones biológicas. La mayoría de los estudios reportados hablan sobre el GPTMS (3-glicidoxipropil-trimetoxi-silano), que es similar al GPTES en cuanto al grupo espaciador y al grupo funcional que en ambos casos es un anillo epoxi, pero se diferencian en cuanto a los grupos alcoxi, ya que el GPTMS posee tres grupos metoxi a diferencia del GPTES que tiene tres grupos etoxi. El GPTMS ha sido utilizado para fabricar andamios de quitosano, a partir de mezclas de ambos con diferentes concentraciones. En dicho trabajo se estudió como la variación de la concentración del GPTMS en la mezcla, afectó el tamaño de los poros obtenidos en el andamio. Además, se realizó un estudio in-vitro con MG63, en el que se determinó que los andamios híbridos de quitosano-silicato porosos obtenidos no presentaron una respuesta citotóxica.¹⁰⁸ En estudios más recientes, fue utilizado para inmovilizar PEG sobre vidrios híbridos inorgánico-orgánico de titanio más nitrato de cromo. En dicho estudio sólo caracterizaron la superficie para determinar la eficiencia de su método de inmovilización, pero no realizaron ninguna prueba biológica.¹⁰⁹ En otro estudio compararon el GPTMS y el APTES como agentes para unir partículas de sílica. También determinaron la eficiencia de un nuevo método de silanización sin el uso de solventes orgánicos.¹¹⁰

1.6.3 Etapas del proceso de biofuncionalización de superficies de titanio

La biofuncionalización es un proceso que involucra una secuencia de tratamientos físico-químicos de la superficie de un material, cuya finalidad es obtener la inmovilización de moléculas bioactivas sobre un material. En este apartado se incluye una descripción completa del diseño experimental propuesto de cada una de las etapas del proceso de biofuncionalización para obtener la inmovilización de colágeno sobre la superficie del titanio.

a) Limpieza y activación

Tratamiento con plasma de oxígeno

Uno de los métodos utilizados para tratar las superficies es denominado plasma de oxígeno, el cual tiene como ventajas la simplicidad, el incremento de la eficiencia y la seguridad ambiental.¹¹¹ La superficie en contacto con el plasma experimenta interacciones con los iones del gas usado, lo cual resulta en una

variedad de cambios de la superficie que están involucrados con los procesos de enlace químicos. Las especies activadas en el gas combinadas con la energía UV crean una reacción química con los contaminantes de la superficie, derivando en un volatización y remoción de éstos. Además, el tratamiento con plasma también se puede usar para crear grupos funcionales activos, tales como grupos amina, carbonilo, hidroxilo y carboxilo. En este trabajo, se ha utilizado plasma de oxígeno para generar grupos hidroxilo y aniones de oxígeno sobre la superficie del Ti. Por lo tanto se estudia el efecto que éste tratamiento tiene sobre la superficie y sobre la eficiencia del proceso posterior de silanización.

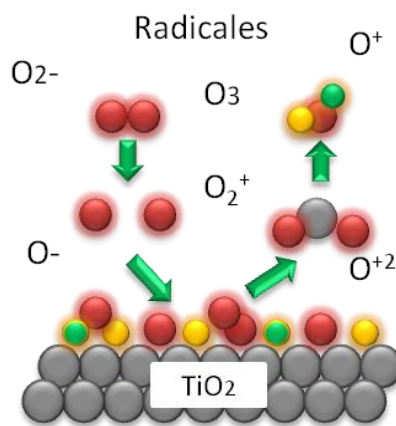


Figura 1.13: Representación esquemática de del tratamiento de plasma por oxígeno, en el cual se generan iones, electrones, radicales y protones de oxígeno que interactúan con la superficie del titanio para eliminar contaminación y generar grupos hidroxilo.

El plasma de oxígeno se suele realizar a baja temperatura, lo cual genera la ionización del gas a una presión entre 1.33 Pa (N/m²) y 26.6 Pa. Este proceso se realiza dentro de una cámara de vacío donde los gases atmosféricos son evacuados por debajo de los 1.33 Pa. Dentro de la cámara, el oxígeno es energizado mediante el uso de radiofrecuencia en el rango de UV, generándose especies que incluyen iones, electrones, radicales y protones. La superficie en contacto con el plasma es bombardeada con estas especies energéticas y su energía es transferida desde el plasma a la superficie del material (Figura 1.13). Las reacciones con la superficie se dan a una profundidad desde varios cientos de angstroms hasta 10 μm sin cambiar las propiedades del sustrato. Al tratarse de un plasma de oxígeno la superficie es enriquecida con grupos hidroxilo, los cuales benefician futuros procesos de modificación química.

Ataque químico con solución piraña

La solución de piraña, es una mezcla de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y se usa comúnmente para limpiar los residuos orgánicos que hay sobre la superficie de un sustrato (Figura 1.14). La mezcla es un agente altamente oxidante, que remueve la mayoría de materia orgánica y también tiene la capacidad de hidroxilar la superficie (adicionar grupos OH^-) haciéndola altamente hidrofílica.^{88,112,113} Mediante la reacción de piraña se genera una capa casi homogénea de óxido de titanio sobre la superficie, si se compara con la capa de óxido de titanio natural que suele ser más heterogénea.

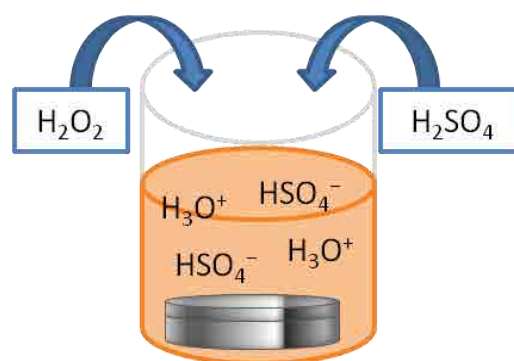


Figura 1.14: Representación esquemática del ataque químico con piraña realizado sobre discos de Titanio comercialmente puro.

Este tratamiento es usado en esta Tesis, como una segunda alternativa para generar grupos hidroxilo sobre la superficie del Titanio. En otros estudios el ataque químico por piraña ha sido utilizado como tratamiento previo a la silanización.^{88,113}

b) Silanización

Para la silanización de las superficies de titanio se ha propuesto el método de silanización en fase líquida, mediante el cual se busca hidrolizar los grupos alcoxi del silano para que los grupos silanol resultantes se unan con los grupos hidroxilo presentes sobre la superficie del titanio. Este tipo de reacción puede tener lugar mediante diferentes tipos de mecanismos de reacción entre el silano con la superficie y/o entre las moléculas de silano. El mecanismo de reacción en fase líquida más frecuentemente descrito en la literatura es el descrito por Matinlinna et al., y es el que se muestra en la Figura 1.15. En este mecanismo los grupos alcoxi del silano se hidrolizan formando grupos silanol ácidos e hidrofílicos ($R-Si(OH)_3$),

y liberan alcohol (R-OH). Durante la condensación, los silanoles se unen con otros silanoles para formar dímeros. La condensación de estos dímeros da lugar a oligómeros de siloxano. Los oligómeros de siloxano reaccionan entre sí formando enlaces siloxano ramificados (-Si-O-Si-) o una cadena de silanos polimerizada, y finalmente en contacto con grupos hidroxilo presentes sobre la superficie del titanio forman enlaces muy estables de -Si-O-Metal. Los siloxanos se enlazan covalentemente a los grupos OH⁻ presentes sobre el titanio.^{5,9} El tiempo de hidrólisis varía dependiendo de la concentración del silano en solución y de la temperatura, pero usualmente son suficientes entre 0.5 y 2 horas para formar el enlace final con el sustrato.⁹⁴

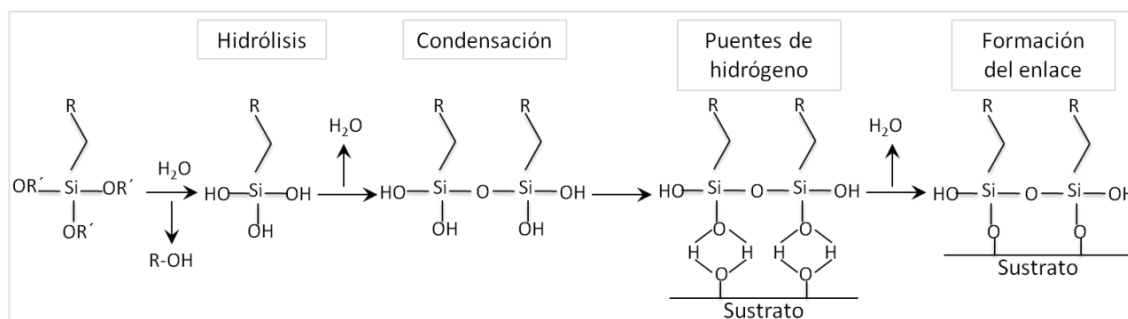


Figura 1.15: Posible mecanismo de la reacción en fase líquida de trialcoxi-silanos con sustratos metálicos activados con grupos hidroxilo, donde tiene lugar la formación de silanoles antes de la unión de los silanos con la superficie del material

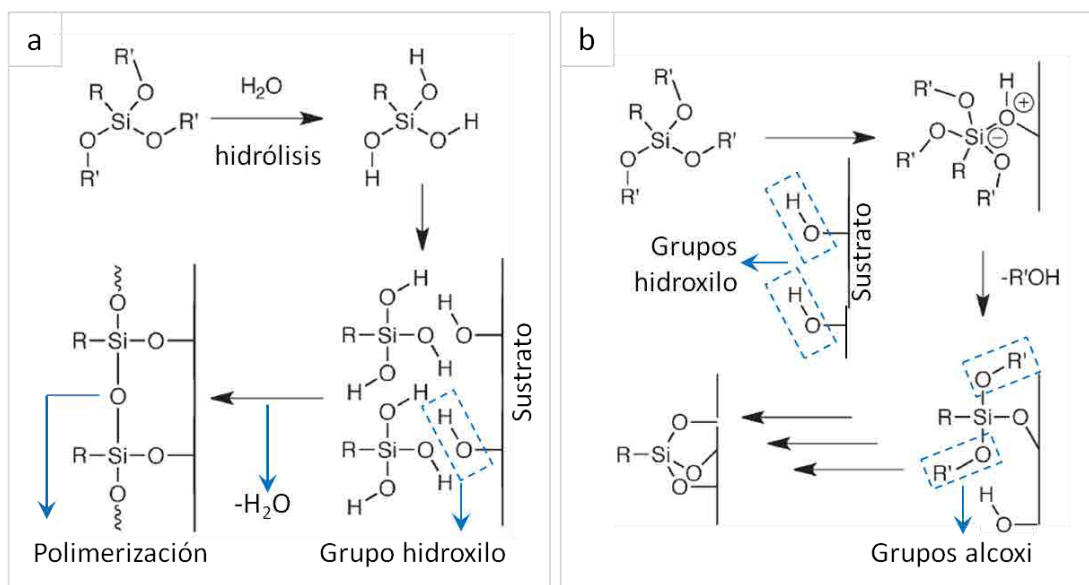


Figura 1.16: Posibles mecanismo de la reacción en fase líquida de trialcoxi-silanos con sustratos metálicos activados con grupos hidroxilo, donde tiene lugar la reacción de las moléculas de silano con la superficie del material antes de darse (a) o no (b) la polimerización entre silanos.

A pesar de que el mecanismo más común descrito en la literatura es el anterior, algunos autores creen que es poco probable que se dé la condensación de silanoles antes de tener lugar la reacción con la superficie. Es el caso de Schlecht et al., quienes describen un mecanismo en donde después del proceso de hidrólisis de los grupos alcoxi de los silanos, cada una de las moléculas de silano interaccionan primero con los grupo hidroxilo (OH^-) presentes sobre la superficie del sustrato y luego se da la polimerización entre los silanos (Figura 1.16-a).¹¹⁴ También describieron otro posible mecanismo en el cual todos los grupos alcoxi del silano pueden reaccionar con los grupos hidroxilo de la superficie del sustrato, y en consecuencia la polimerización entre moléculas de silano podría no tener lugar (Figura 1.16-b).

En este estudio tanto el CPTES como el GPTES han sido adheridos a la superficie del titanio mediante el método de silanización en fase líquida. Se espera que para ambos casos la unión entre el silano y la superficie del titanio sea igual, ya que como se ha descrito anteriormente ambos silanos tienen en común los mismos grupos alcoxi, en este caso grupos etoxi. Sin embargo no podemos asegurar cual de los tres mecanismos antes descritos, podría tener lugar.

c) Inmovilización de colágeno

Como se ha descrito anteriormente, la propuesta de este estudio es comparar la inmovilización del colágeno a través de la *fisisorción* con el método de inmovilización a través del uso de *silanos*, descrito en la literatura como *enlace covalente*. La *fisisorción* del colágeno sobre las superficies de titanio activadas con plasma y con piraña se da a través de la adsorción espontanea de la molécula. Los enlaces producidos entre la molécula y la superficie, pueden ser de diferentes tipos, como por ejemplo puentes de hidrógeno, interacciones de Van der Waals y/o interacciones hidrofóbicas (Figura 1.17 a). La formación de uno u otro tipo enlace, dependerá de la química de la superficie, la topografía y las propiedades de la solución en la que se encuentre la molécula.

En cuanto a la inmovilización del colágeno a través del uso de los *silanos*, en el caso del CPTES, éste posee como grupo funcional un cloro, que favorece la *sustitución*

nucleófila, en la cual los grupos nucleófilos de la biomolécula (por ejemplo: hidroxilo (OH^-), aminas (NH_2)) atacan al carbono electrófilo, desplazando al grupo saliente cloruro (Cl) (Figura 1.17 b). Este organosilano funciona mejor a pHs neutros-básicos y no necesita de activación.^{105,115,116}

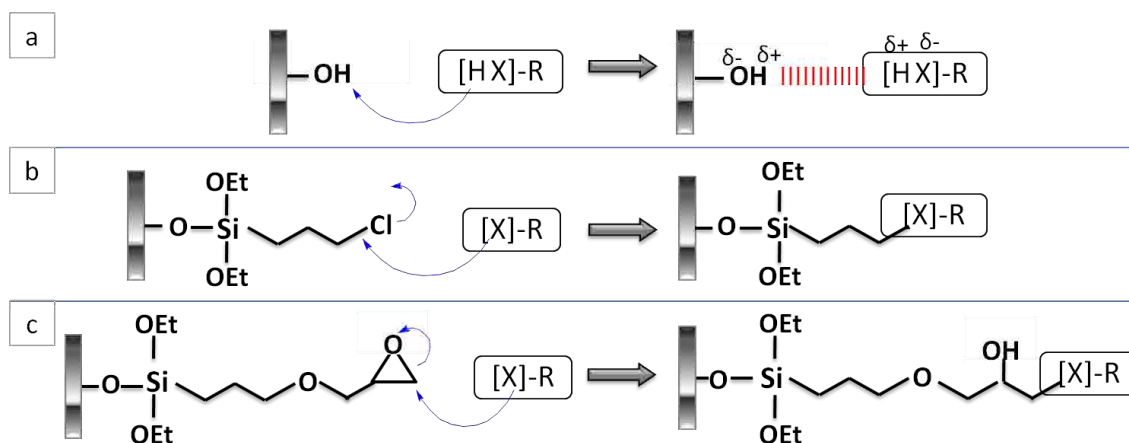


Figura 1.17: Representación esquemática de la inmovilización del colágeno sobre superficies de titanio modificadas. En la estructura del colágeno la R representa los posibles grupos funcionales que pueden reaccionar con la superficie: SH, NH_2 y/o OH. (a) Inmovilización del colágeno a través de la fisisorción. (b) Inmovilización del colágeno sobre las superficies silanizadas con CPTES, a través de una reacción de sustitución nucleófila. (c) Inmovilización del colágeno sobre las superficies silanizadas con el GPTES, a través de una reacción de adición nucleófila.

De forma similar, el GPTES posee un grupo epoxi que es más susceptible a la *adición nucleófila*, en la cual el anillo del grupo epoxi es abierto por el ataque nucleófilo de los grupos funcionales de la biomolécula. La apertura del anillo da lugar a la protonación del oxígeno, lo cual permite la formación de un grupo hidroxilo y da lugar al enlace covalente entre el carbono del grupo epoxi y el grupo nucleófilo de la biomolécula (Figura 1.17 c). Este organosilano en comparación con el CPTES, permite trabajar en un rango de pHs más amplio.^{102,109}

Para que el ataque nucleófilo sea más favorable es deseable obtener protones libres de los grupos funcionales presentes en el colágeno ($-\text{NH}$, $-\text{O}$), condición que se consigue cuando el pH de la solución es lo más básico posible. En medio ácido, algunos grupos funcionales del colágeno como por ejemplo el grupo amina y/o el grupo alcohol, estarían protonados y no permitirían el ataque nucleófilo.¹⁰² Por otro lado, es sabido que el colágeno es soluble en medio ácido, ya que para valores de pH por debajo de 4.25 su estructura cuaternaria en forma de fibrillas se pierde

permitiendo la disolución de este.²⁴ Sin embargo la estructura terciaria se mantiene evitando la desnaturalización de la molécula, lo que es aprovechado en esta investigación para que los residuos o cadenas laterales de los aminoácidos presentes en las triples hélices en solución estén disponibles para reaccionar con la superficie del titanio. En base a lo anterior, el colágeno se ha puesto inicialmente en medio ácido para facilitar su disolución, y posteriormente se ha llevado hasta un pH lo más básico posible.

1.7 OBJETIVOS Y ALCANCE DE LA TESIS DOCTORAL

1.7.1 Objetivo general

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es obtener superficies de titanio biofuncionalizadas con colágeno tipo I por medio de fisorción y/o mediante la unión covalente a través del empleo de silanos, para mejorar el sellado biológico de la superficie de implantes dentales.

1.7.2 Objetivos específicos

Este objetivo general se concreta en una serie de objetivos específicos que se describen a continuación:

1. Caracterizar desde un punto de vista físico, químico y topográfico las superficies de titanio antes y después de los tratamientos de limpieza y activación y de silanización.

2. Optimizar el proceso de disolución del colágeno en condiciones apropiadas para su posterior uso en la biofuncionalización de las superficies de titanio. Obtener el protocolo de inmovilización del colágeno sobre las superficies de titanio modificadas.

3. Caracterizar desde un punto de vista físico y químico las superficies de titanio biofuncionalizadas con colágeno tipo I, a fin de confirmar la presencia del

colágeno, y evaluar la cantidad y la estabilidad de éste sobre cada una de las superficies de titanio modificadas. Estudiar la influencia que tiene cada uno de los tratamientos de modificación superficial sobre la distribución y morfología que adopta el colágeno tipo I.

4. Caracterizar la respuesta biológica *in vitro* de células implicadas en los procesos de regeneración tisular para la mejora del sellado biológico (fibroblastos) sobre las superficies de titanio biofuncionalizadas.

1.7.3 Alcance

En cuanto al alcance de esta investigación, ésta cubre tanto el diseño, procesado y caracterización física y química de los materiales, así como el estudio de las interacciones biológicas a nivel celular. Esta investigación se considera pertinente porque puede representar avances importantes en varios ámbitos:

1. En el ámbito del conocimiento de las interacciones entre la superficie de los materiales y las proteínas, ya que se plantea el estudio exhaustivo de las propiedades que intervienen en la mejora de la inmovilización del colágeno.

2. En el ámbito del conocimiento de las interacciones entre el biomaterial y los tejidos a nivel celular, ya que se plantea el estudio del efecto de una de las proteínas de la matriz extracelular en el comportamiento biológico de los biomateriales sustitutivos de tejidos.

3. En el ámbito de la práctica odontológica, la consecución del sellado biológico en los implantes dentales evitará los problemas de periimplantitis que representan la causa principal de fallo de los implantes en la actualidad.

1.8 REFERENCIAS

1. Cranin AN, Lemons JE. Dental Implantation. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, eds. *Biomaterials Science*. 2nd ed. Seattle, USA; 2004:555 – 570.

2. Schenk RK, Buser D. Osseointegration: a reality. *Periodontology* 2000. 1998;17:22–35.

3. Brånemark IP, Breine U, Johansson B, Roylance P, Röckert H, Yoffey J. Regeneration of Bone around. *Acta Anat.* 1964;59:1 – 46.
4. Brånemark P. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent.* 1983;50:399 – 410.
5. Matinlinna JP, Ozcan M, Lassila LVJ, Vallittu PK. The effect of a 3-methacryloxypropyltrimethoxysilane and vinyltriisopropoxysilane blend and tris(3-trimethoxysilylpropyl)isocyanurate on the shear bond strength of composite resin to titanium metal. *Dental materials.* 2004;20(9):804–13.
6. Pasqui D, Rossi A, Di Cintio F, Barbucci R. Functionalized titanium oxide surfaces with phosphated carboxymethyl cellulose: characterization and bonelike cell behavior. *Biomacromolecules.* 2007;8(12):3965–72.
7. Bagno A, Piovan A, Dettin M, et al. Human osteoblast-like cell adhesion on titanium substrates covalently functionalized with synthetic peptides. *Bone.* 2007;40(3):693–9.
8. Sargeant TD, Rao MS, Koh C-Y, Stupp SI. Covalent functionalization of NiTi surfaces with bioactive peptide amphiphile nanofibers. *Biomaterials.* 2008;29(8):1085–98.
9. Matinlinna JP, Lassila LVJ, Vallittu PK. The effect of three silane coupling agents and their blends with a cross-linker silane on bonding a bis-GMA resin to silicized titanium (a novel silane system). *Journal of dentistry.* 2006;34(10):740–6.
10. Schuler M, Trentin D, Textor M, Tosatti SGP. Biomedical interfaces: titanium surface technology for implants and cell carriers. *Nanomedicine.* 2006;1(4):449–463.
11. Breme J, Biehl V. Metallic Biomaterials. In: Black J, Hasting G, eds. *Handbook of Biomaterials Properties*. 1st ed. London: Chapman & Hall; 1998:135.
12. Colling EW. *The Physical Metallurgy of Titanium Alloys*. Ohio; 1984.
13. Aparicio Bádenas C. Tratamientos de superficie sobre titanio comercialmente puro para la mejora de la osteointegración de los implantes dentales. Tesis Doctoral. Departamento de Materiales e Ingeniería Metalúrgica. Universidad Politécnica de Cataluña. 2005.
14. Welander M, Abrahamsson I, Linder E, Liljenberg B, Berglundh T. Soft tissue healing at titanium implants coated with type I collagen. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2007;34:452 –458.
15. Abrahamsson I, Zitzmann NU, Berglundh T, Linder E, Wennerberg A, Lindhe J. The mucosal attachment to titanium implants with different surface

characteristics: an experimental study in dogs. *Journal of clinical periodontology*. 2002;29(5):448–55.

16. Lindhe J. *Textbook of Clinical Periodontology*. 2 Ed. Copenhagen: Munksgaard Blackwell; 1995:648.

17. Brunette DM, Chehroudi B. The effects of the surface topography of micromachined titanium substrata on cell behavior in vitro and in vivo. *Journal of Biomechanical Engineering*. 1999;121:49 – 57.

18. Werner S, Huck O, Frisch B, et al. The effect of microstructured surfaces and laminin-derived peptide coatings on soft tissue interactions with titanium dental implants. *Biomaterials*. 2009;30(12):2291–301.

19. Lindhe J. *Periodontologia clinica e implantologia odontológica*. 2ª ed. (Ed. Musnksgaard Copenhagen, ed.). Médica Panamericana; 1997.

20. Bolboaca SD, Jäntschi L. Amino acids sequence analysis on collagen. *Bulletin USAMV*. 2007;63 - 64.

21. Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001;221(1-2):1–22.

22. Schoen FJ, Mitchell RN. Tissue Response to Injury. In: Ratner BD, Hoffmann A, Schoen FJ, Lemons JE, eds. *Biomaterials Science*. 2nd ed. San Diego, California, USA; 2004:272 – 274.

23. Shoulders MD, Raines RT. Collagen Structure and Stability. *Annu Rev Biochem*. 2010;78:929–958.

24. Yannas I V. Structure of native collagen. In: Ratner BD, Hoffmann A, Schoen FJ, Lemons JE, eds. *Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine*. 2nd ed. Seattle, USA; 2004:128 – 130.

25. Friess W. Collagen-biomaterial for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1998;45(2):113–136.

26. Cui F-Z, Li Y, Ge J. Self-assembly of mineralized collagen composites. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 2007;57(1-6):1–27.

27. Hulmes DJ. The collagen superfamily-Diverse structures and assemblies. *Essays Biochem*. 1992;27:49–67.

28. Gullberg D, Gehisen KR, Turner DC, et al. Analysis of $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$ integrins in cell-collagen interactions: identification of conformation dependent $\alpha 1\beta 1$ binding sites in collagen type I. *EMBO Journal*. 1992;11(11):3865 – 3873.

29. Knight CG, Morton LF, Peachey AR, et al. Recognize the Same Specific Amino Acid Sequence, GFOGER, in Native (Triple-helical) Collagens. *Biochemistry*. 2000;275(1):35–40.
30. Yamamoto, M., Yamato, M., Aoyagi, M., Yamamoto K. Identification of integrins involved in cell adhesion to native and denatured type I collagens and the phenotypic transition of rabbit arterial smooth muscle cells. *Experimental Cell Research*. 1995;219:249 – 256.
31. Rammelt S, Schulze E, Bernhardt R, et al. Coating of titanium implants with type-I collagen. *Journal of Orthopaedic Research*. 2004;22(5):1025–34.
32. Nagai M, Hayakawa T, Fukatsu A, et al. In vitro Study of Collagen Coating of Titanium Implants for Initial Cell Attachment. *Dental Materilas Journal*. 2002;21(3):250–260.
33. Roessler S, Born R, Scharnweber D, Worch H, Sewing A, Dard M. Biomimetic coatings functionalized with adhesion peptides for dental implants. *Journal of Materials Science Materials in medicine*. 2001;12(10-12):871–7.
34. Shekaran A, Garcia AJ. Nanoscale engineering of extracellular matrix-mimetic bioadhesive surfaces and implants for tissue engineering. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011;1810(3):350–60.
35. Müller R, Abke J, Schnell E, et al. Influence of surface pretreatment of titanium- and cobalt-based biomaterials on covalent immobilization of fibrillar collagen. *Biomaterials*. 2006;27(22):4059–68.
36. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Fibroblasts and their transformations: the connective-tissue cell family. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, eds. *Molecular Biology of the Cell*. 4^o edition. New York, USA; 2002:1300 – 1302.
37. Schoen FJ, Mitchell RN. Cell-Matrix Interaction. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, eds. *Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine*. 2nd ed. San Diego, California, USA; 2004:265 – 267.
38. McAnulty RJ. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007;39(4):666–671.
39. Guillem-Marti J, Delgado L, Godoy-Gallardo M, Pegueroles M, Herrero M, Gil FJ. Fibroblast adhesion and activation onto micro-machined titanium surfaces. *Clinical oral implants research*. 2012:1–11.
40. Knowles GC, McKeown M, Sodek J, McCulloch C a. Mechanism of collagen phagocytosis by human gingival fibroblasts: importance of collagen structure in cell recognition and internalization. *Journal of cell science*. 1991;98 (Pt 4):551–8.

41. Pye AD, Lockhart DEA, Dawson MP, Murray CA, Smith AJ. A review of dental implants and infection. *The Journal of Hospital Infection*. 2009;72(2):104–10.
42. Snauwaert K, Duyck J, Van Steenberghe D, Quirynen M, Naert I. Time dependent failure rate and marginal bone loss of implant supported prostheses: a 15-year follow-up study. *Clinical Oral Investigations*. 2000;4(1):13–20.
43. Tomasi C, Wennström JL, Berglundh T. Longevity of teeth and implants - a systematic review. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2008;35(1):23–32.
44. Pjetursson BE, Brägger U, Lang NP, Zwahlen M. Comparison of survival and complication rates of tooth-supported fixed dental prostheses (FDPs) and implant-supported FDPs and single crowns (SCs). *Clinical Oral Implants Research*. 2007;18(3):97–113.
45. Lang NP, Pun L, Lau KY, Li KY, Wong MCM. A systematic review on survival and success rates of implants placed immediately into fresh extraction sockets after at least 1 year. *Clinical Oral Implants Research*. 2012;23 Suppl 5:39–66.
46. Tonetti MS. Determination of the success and failure of root-form osseointegrated dental implants. *Adv Dent Res*. 1999;13:173–180.
47. Piattelli A, Scarano A, Piattelli M, Vaia E, Matarasso S. A microscopical evaluation of 24 retrieved failed hollow implants. *Biomaterials*. 1999;20(5):485–9.
48. Koldslund OC, Scheie AA, Aass AM. Prevalence of peri-implantitis related to severity of the disease with different degrees of bone loss. *Journal of periodontology*. 2010;81(2):231–8.
49. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical Oral Implants Research*. 2006;17(2):68–81.
50. Myshin HL, Wiens JP. Factors affecting soft tissue around dental implants: a review of the literature. *The Journal of prosthetic dentistry*. 2005;94(5):440–4.
51. Klinge B, Hultin M, Berglundh T. Peri-implantitis. *Dental Clinics of North America*. 2005;49(3):661 – 676.
52. Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *Journal of clinical periodontology*. 2008;35(8 Suppl):286–91.
53. Norowski PA, Bumgardner JD. Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: a review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials*. 2009;88(2):530–43.
54. Mas-Moruno C, Espanol M, Montufar EB, et al. Bioactive Ceramic and Metallic Surfaces for Bone Engineering. In: Taubert A, Mano JF, Rodríguez-Cabello C, eds. *Biomaterials Surface Science*. First. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2013:337 – 374.

55. Yang Y, Oh N, Liu Y, et al. Enhancing Osseointegration Using Surface-Modified Titanium Implants. *Surface Modification in Bioapplications*. 2006;58:71–76.
56. Morra M. Biochemical modification of titanium surfaces: peptides and ECM proteins. *European cells & materials*. 2006;12:1–15.
57. Morra M, Cassinelli C, Cascardo G, et al. Collagen I-coated titanium surfaces: mesenchymal cell adhesion and in vivo evaluation in trabecular bone implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2006.
58. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental materials*. 2007;23(7):844–54.
59. Chen C, Zhang S-M, Lee I-S. Immobilizing Bioactive Molecules onto Titanium Implants to Improve Osseointegration. *Surface and Coatings Technology*. 2012.
60. Deligianni D, Katsala N, Ladas S, Sotiropoulou D, Amedee J, Missirlis Y. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials*. 2001;22(11):1241–51.
61. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clinical oral implants research*. 2009;20 Suppl 4:172–84.
62. Kokubo T. Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body in environment. *Acta Materialia*. 1998;46(I):2519 –2527.
63. Pisarek M, Roguska A, Andrzejczuk M, et al. Effect of two-step functionalization of Ti by chemical processes on protein adsorption. *Applied Surface Science*. 2011;257(19):8196–8204.
64. Porté-Durrieu MC, Guillemot F, Pallu S, et al. Cyclo-(DfKRG) peptide grafting onto Ti-6Al-4V: physical characterization and interest towards human osteoprogenitor cells adhesion. *Biomaterials*. 2004;25(19):4837–46.
65. Rammelt S, Illerta T, Bierbaumb, S. Scharnweber D, Zwippa H, Schneidersa W. coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate. *Biomaterials*. 2006;27(32):5561 – 5571.
66. Schliephake H, Aref A, Scharnweber D, Bierbaumb S, Sewing A. effect of modifications of dual acid etched implant surfaces on peri-implant bone formation. Part I: organic coatings. *Clinical Oral Implants Research*. 2009;20:31 – 37.
67. Chatzinikolaidou M, Lichtinger TK, Müller RT, Jennissen HP. Peri-implant reactivity and osteoinductive potential of immobilized rhBMP-2 on titanium carriers. *Acta biomaterialia*. 2010;6(11):4405–21.

68. Kim SE, Song S-H, Yun YP, et al. The effect of immobilization of heparin and bone morphogenic protein-2 (BMP-2) to titanium surfaces on inflammation and osteoblast function. *Biomaterials*. 2011;32(2):366–73.
69. Michiardi a, H elary G, Nguyen P-CT, et al. Bioactive polymer grafting onto titanium alloy surfaces. *Acta biomaterialia*. 2010;6(2):667–75.
70. Oughlis S, Lessim S, Changotade S, et al. Development of proteomic tools to study protein adsorption on a biomaterial, titanium grafted with poly(sodium styrene sulfonate). *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2011;879(31):3681–7.
71. Rechendorff K. The influence of surface roughness on protein adsorption. PhD Thesis. Department of Physics and Astronomy and Interdisciplinary Nanoscience Center. University of Aarhus, Dinamarca. 2006;(February).
72. Song W, Chen H. Protein adsorption on materials surfaces with nanotopography. *Chinese Science Bulletin*. 2007;52(23):3169–3173. A
73. Adamczak M, Scis łowska-Czarnecka A, Genet MJ, Dupont-Gillain CC, Pamuła E. Surface characterization, collagen adsorption and cell behaviour on poly(L-lactide-co-glycolide). *Acta of Bioengineering and Biomechanics*. 2011;13(3):63–75.
74. Han M, Sethuraman A, Kane RS, Belfort G. Nanometer-Scale Roughness Having Little Effect on the Amount or Structure of Adsorbed Protein. 2003;(36):9868–9872.
75. Cai K, Bossert J, Jandt KD. Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation. *Colloids and Surfaces, B Biointerfaces*. 2006;49(2):136–44.
76. Hanawa T. Biofunctionalization of titanium for dental implant. *Japanese Dental Science Review*. 2010;46(2):93–101.
77. Dohan Ehrenfest DM, Coelho PG, Kang B-S, Sul Y-T, Albrektsson T. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. *Trends in biotechnology*. 2010;28(4):198–206.
78. Dalby MJ. Cellular response to low adhesion nanotopographies. *International journal of nanomedicine*. 2007;2(3):373–81.
79. Lee S-W, Kim S-Y, Lee M-H, Lee K-W, Leesungbok R, Oh N. Influence of etched microgrooves of uniform dimension on in vitro responses of human gingival fibroblasts. *Clinical Oral Implants Research*. 2009;20(5):458–466.
80. Yoshinari M, Matsuzaka K, Inoue T, Oda Y, Shimono M. Effects of multigrooved surfaces on fibroblast behavior. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2003;65(3):359–68.

81. Dean JW, Culbertson KC, D'Angelo AM. Fibronectin and laminin enhance gingival cell attachment to dental implant surfaces in vitro. *Journal of Oral Maxillofacial Implants*. 1995;10(6):721–8.
82. Endo K. Chemical modification of metallic implant surfaces with biofunctional proteins (Part 1). Molecular structure and biological activity of a modified NiTi alloy surface. *Dental Materials Journal*. 1995;14(2):185–98.
83. Zhao B, Yi Z, Lu Z, Tian W, Cui F, Feng H. Improvement of Adhesion and Spreading of Human Gingival Fibroblasts to RGD-grafted Titanium Surface. *Journal of Hard Tissue Biology*. 2006:2–5.
84. Schliephake H, Scharnweber D. Chemical and biological functionalization of titanium for dental implants. *Journal of Materials Chemistry*. 2008;18(21):2404.
85. Ratner BD, Hoffman AS. Physicochemical Surface Modification of Materials Used in Medicine. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, eds. *Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine*. 2nd ed. San Diego, California - USA: Elsevier Academic Press; 2004:201–215.
86. Hanawa T. A comprehensive review of techniques for biofunctionalization of titanium. *Journal of Periodontal and Implant Science*. 2011;41(6):263–72.
87. Csucs G, Michel R, Lussi JW, Textor M, Danuser G. Microcontact printing of novel co-polymers in combination with proteins for cell-biological applications. *Biomaterials*. 2003;24(10):1713–1720.
88. Nanci A, Wuest JD, Peru L, et al. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *Journal of biomedical materials research*. 1998;40(2):324–35.
89. Martin HJ, Schulz KH, Bumgardner JD, Schneider J a. Enhanced bonding of chitosan to implant quality titanium via four treatment combinations. *Thin Solid Films*. 2008;516(18):6277–6286.
90. Yoshinari M, Hayakawa T, Matsuzaka K, et al. Oxygen plasma surface modification enhances immobilization of simvastatin acid. *Biomedical research (Tokyo, Japan)*. 2006;27(1):29–36.
91. Ou K-L, Shih Y-H, Huang C-F, Chen C-C, Liu C-M. Preparation of bioactive amorphous-like titanium oxide layer on titanium by plasma oxidation treatment. *Applied Surface Science*. 2008;255(5):2046–2051.
92. Valencia-Alvarado R, De la Piedad-Beneitez A, López-Callejas R, et al. Oxygen implantation and diffusion in pure titanium by an rf inductively coupled plasma. *Vacuum*. 2009;83:S264–S267.
93. Witucki GL. A Silane Primer: Chemistry and Applications of Alkoxy Silanes. *Journal of Coating Technology*. 1992.

94. Matinlinna JP, Lassila LVJ, Ozcan M, Yli-Urpo A, Vallittu PK. An introduction to silanes and their clinical applications in dentistry. *The International journal of prosthodontics*. 2004;17(2):155–64.
95. Lung CYK, Matinlinna JP. Aspects of silane coupling agents and surface conditioning in dentistry: An overview. *Dental Materials*. 2012;28(5):467–77.
96. Schreiber F. Structure and growth of self-assembling monolayers. *Progress in Surface Science*. 2000;65(5-8):151–257.
97. Iucci G, Battocchio C, Dettin M, Ghezzi F, Polzonetti G. An XPS study on the covalent immobilization of adhesion peptides on a glass surface. *Solid State Sciences*. 2010;12(11):1861–1865.
98. Costa F, Carvalho IF, Montelaro RC, Gomes P, Martins MCL. Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta biomaterialia*. 2011;7(4):1431–40.
99. Chen J, Cao J, Wang J, et al. Biofunctionalization of titanium with PEG and anti-CD34 for hemocompatibility and stimulated endothelialization. *Journal of colloid and interface science*. 2012;368(1):636–47.
100. Arkles B. Hydrophobicity, Hydrophilicity and Silanes. *Paint & Coatings Industry magazine*. 2006;(October).
101. Plueddemann EP. *Silane Coupling Agents*. Ed. Second. New York, USA: Plenum Press; 1991:55, 101, 134.
102. Ege SN. *Organic Chemistry. Structure and Reactivity*. 4th ed. (Stratton R, Warne S, eds.). Boston - New York: Houghton Mifflin Company; 1999.
103. Adam F, Osman H, Hello KM. The immobilization of 3-(chloropropyl)triethoxysilane onto silica by a simple one-pot synthesis. *Journal of colloid and interface science*. 2009;331(1):143–7.
104. Siegfried Wolff B-M, Lothar Rothbiihr H-H, Grewatta C. Silane/filler preparations process for their production and their use. 1981:8–13.
105. Tsiourvas D, Tsetsekou A, Arkas M, Diplas S, Mastrogianni E. Covalent attachment of a bioactive hyperbranched polymeric layer to titanium surface for the biomimetic growth of calcium phosphates. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2011;22(1):85–96.
106. Chen X, Sevilla P, Aparicio C. Surface biofunctionalization by covalent co-immobilization of oligopeptides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013;107:189–197.

107. Salvagni E, Berguig G, Engel E, et al. A bioactive elastin-like recombinamer reduces unspecific protein adsorption and enhances cell response on titanium surfaces. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 2013;114:225–233.
108. Shirosaki Y, Okayama T, Tsuru K, Hayakawa S, Osaka A. Synthesis and cytocompatibility of porous chitosan–silicate hybrids for tissue engineering scaffold application. *Chemical Engineering Journal*. 2008;137(1):122–128.
109. Sayilkan F, Asiltürk M, İçduygu G, Bayri A, Sayilkan H. UV-Light Absorption Properties of Cr-Doped Polyethyleneglycol (PEG)/ γ -Glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS)/Chelated-Titanium Coating Materials Prepared by the Sol–Gel Process. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*. 2005;15(2):281–285.
110. Lazghab M, Saleh K, Guigon P. Functionalisation of porous silica powders in a fluidised-bed reactor with glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS) and aminopropyltriethoxysilane (APTES). *Chemical Engineering Research and Design*. 2010;88(5-6):686–692.
111. Choi S, Choi W, Lee Y, Ju B, Kim B. Effect of Oxygen Plasma Treatment on Anodic Bonding. *Journal of the Korean Physical Society*. 2001;38(3):207–209.
112. MacDonald DE, Rapuano BE, Deo N, Stranick M, Somasundaran P, Boskey a L. Thermal and chemical modification of titanium-aluminum-vanadium implant materials: effects on surface properties, glycoprotein adsorption, and MG63 cell attachment. *Biomaterials*. 2004;25(16):3135–46.
113. Middleton CA, Pendegrass CJ, Gordon D, Jacob J, Blunn GW. Fibronectin silanized titanium alloy : A bioinductive and durable coating to enhance fibroblast attachment in vitro. 2007.
114. Schlecht CA, Maurer JA. Functionalization of glass substrates: mechanistic insights into the surface reaction of trialkoxysilanes. *RSC Advances*. 2011;1(8):1446–48.
115. Chen X, Sevilla P, Aparicio C. Surface biofunctionalization by covalent co-immobilization of oligopeptides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013;107:189–197.
116. González M, Salvagni E, Rodríguez-Cabello JC, et al. A low elastic modulus Ti-Nb-Hf alloy bioactivated with an elastin-like protein-based polymer enhances osteoblast cell adhesion and spreading. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2012:1–8.
117. Tehranian P. Dental Implants Preston Guide. 2011. Available at: <http://freedentalimplantsguide.blogspot.com.es/2011/12/dental-implants-preston-freedom-you.html>.

118. Marino EC. Histología Odontológica. 2008. Available at:
<http://campus.usal.es/~histologia/histologia.htm>.

119. Wikipedia. Aminoacid. 2010. Available at:
http://en.wikipedia.org/wiki/Amino_acid.

120. Wellness Advantage. Primary Structure of a Protein. 2013. Available at:
<http://thewellnessadvantage.us/?brf=7881>.

121. Wikibooks. Structural Biochemistry/Proteins. 2008. Available at:
http://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Proteins.

2

ACTIVACIÓN Y SILANIZACIÓN DE SUPERFICIES DE TITANIO

2.1 INTRODUCCIÓN

El titanio posee una *capa de óxido* que crece sobre él de manera natural y espontánea, en contacto con el aire y con otros medios. Esta capa puede utilizarse para modular las interacciones entre la superficie del titanio y los tejidos que le rodean. Bajo condiciones fisiológicas, las moléculas disueltas en los fluidos extracelulares pueden adsorberse sobre la capa de óxido de titanio debido a interacciones de Van der Waals, en un proceso conocido como *fisisorción*, descrito previamente en el apartado 1.6.1. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el proceso de *fisisorción* es reversible, debido a la fase de equilibrio que se puede dar entre las moléculas adsorbidas y las proteínas del medio cuando el material es implantado.¹

Una posible solución a las desventajas asociadas al proceso de *fisisorción de biomoléculas*, es la adhesión mediante un enlace covalente. El enlace covalente de moléculas sobre superficies de implantes de titanio es un método complicado, que requiere de superficies previamente funcionalizadas.² Como se ha descrito en el capítulo anterior, una forma de funcionalizar la superficie de un material es a través de la *modificación química*, mediante la *adhesión de organosilanos* los cuales pueden reaccionar posteriormente con las funciones ácidas o básicas de las moléculas, obteniendo finalmente enlaces amida estables entre el material y la biomolécula.²⁻⁷

Un paso previo tanto a los procesos de *fisisorción* como a la *silanización* de la superficie es la *limpieza y activación* de la superficie. Con los procesos de *limpieza y activación* se busca eliminar todas las impurezas provenientes de la contaminación atmosférica, que pueden influir en la eficiencia de los tratamientos posteriores, y generar grupos hidroxilo sobre la superficie (Figura 2.1) los cuales son necesarios no sólo para mejorar los procesos de fisisorción de biomoléculas, sino también, para crear un mejor enlace entre la superficie del Ti y los silanos.

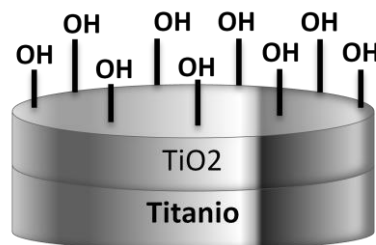


Figura 2.1: Representación esquemática de los grupos hidroxilo generados sobre la capa de óxido natural del titanio comercialmente puro.

En el proceso de la silanización, mediante el uso de una base, estos grupos hidroxilo se convierten en aniones de oxígeno los cuales facilitan el enlace con los grupos alcoxi presentes en uno de los extremos de los silanos. Estos grupos hidroxilo pueden ser generados sobre la superficie mediante dos tratamientos: *plasma de oxígeno* y *ataque químico con piraña* (solución 1:1 de ácido sulfúrico + peróxido de hidrógeno) los cuales se han descrito con detalle en el capítulo anterior (1.6.3-a).

Una vez generado los grupos hidroxilo sobre la superficie, se puede realizar el proceso de *silanización*. Un esquema simple de la reacción entre un organosilano con la superficie de un metal previamente activada con grupos hidroxilo se muestra en la Figura 2.2. También se observa la reacción entre silanos por medio de la unión entre silanoles. El mecanismo de esta reacción se explicó en detalle en el capítulo anterior (1.6.3-b)

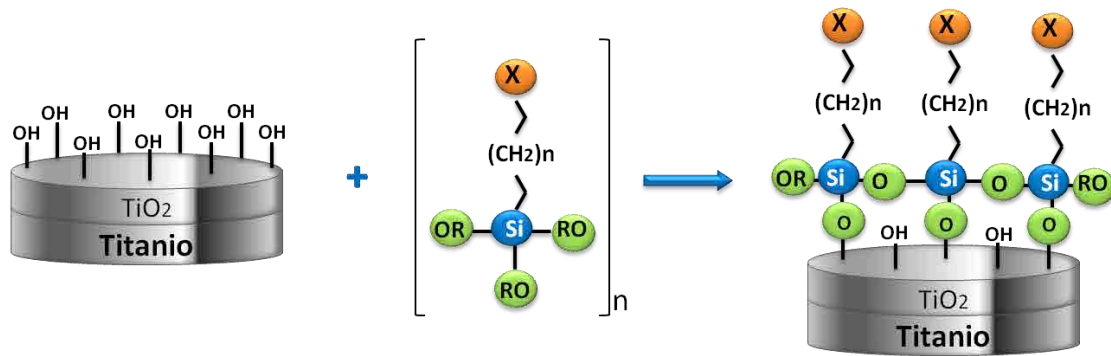


Figura 2.2. Ilustración esquemática de la unión covalente entre un organosilano y los grupos hidroxilos presentes en la superficie del titanio. Se puede observar también la reacción entre moléculas de silano.

Los organosilanos pueden formar varios tipos de capas, cuando reaccionan con el metal. Según Maoz et al 1995 y Stevens 1999, las capas pueden variar en cuanto a la organización. Ambos reportaron que la capa de organosilanos pueden crecer distribuida uniformemente por toda la superficie del sustrato, o en forma de islas dejando espacios de la superficie al descubierto, o de ambas formas simultáneamente, dando lugar a islas de moléculas de silanos con un relativo alineamiento y con una orientación vertical de las cadenas.^{8,9} Factores como la temperatura, la cantidad del agua presente en la reacción y la cantidad de silanos en solución han sido reportados como factores críticos que intervienen en la formación y el crecimiento de dichas capas.

Respecto a la influencia del agua, autores como Ulman et al 1996 reportaron que en ausencia de agua solamente se consigue formar monocapas incompletas, mientras que el exceso de agua provoca la polimerización de de las moléculas de silano en solución y el depósito de una multicapa de polisiloxano.¹⁰ En la práctica se puede producir dos tipos de capas. Si sólo se da lugar a reacciones entre el silano y la superficie del metal (proceso catalizado por agua adsorbida en la

superficie del material) se forma una monocapa linear sobre la superficie (Figura 2.3 a).

Sin embargo, si hay demasiada agua, se puede generar una gruesa capa de silano la cual puede estar compuesta por enlaces Si-O-metal pero también por uniones de silanos enlazados entre sí en una red tridimensional polimerizada, dando lugar a una multicapa (Figura 2.3 b).^{4,11-13} Según otros autores (van Ooij et.al), el espesor de la capa de siloxanos ramificados depende no sólo del agua en superficie, sino también de la concentración de los silanos en solución. Aunque idealmente se busca la formación de una monocapa, en la práctica se suelen formar multicapas de moléculas de silano orientadas al azar.¹²

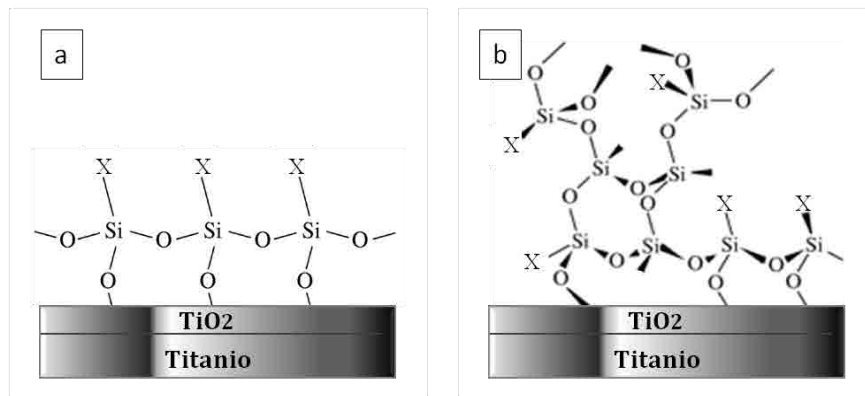


Figura 2.3: Representación esquemática de las posibles capas formadas entre el silano y el sustrato. (a) Monocapa linear de silanos, (b) polimerización del silano

En cuanto al efecto de la temperatura algunos autores, como Ulman 1996 y Schreiber 2000, coinciden en que a bajas temperaturas la superficie silanizada muestra una estructura heterogénea con una alta densidad de recubrimiento, con multitud de islas orientadas en dirección casi vertical. Al incrementar la temperatura la superficie sufre una disminución de la capacidad de ser recubierta completamente y se obtiene un mayor desorden. El valor de la temperatura a la cual se obtiene una monocapa ordenada está en función de la longitud de la cadena alquílica. Cadenas largas requieren una temperatura más elevada.^{3,10}

El éxito de los procesos de activación y silanización, así como su influencia en las propiedades fisicoquímicas de la superficie de titanio, serán estudiados con detalle a lo largo del presente capítulo.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo General

El objetivo del presente Capítulo es el estudio de los procesos de activación y silanización de superficies de titanio, y la caracterización fisicoquímica de las modificaciones superficiales producidas por los distintos tratamientos.

2.2.2 Objetivos Específicos

Este objetivo general, se concreta en una serie de objetivos específicos que se describen a continuación:

1. Obtener la limpieza y la activación de superficies de titanio a través del uso de dos tratamientos distintos: plasma de oxígeno y ataque químico con piraña, con el fin de conseguir una superficie adecuada para el subsiguiente proceso de silanización.
2. Evaluar el cambio de rugosidad producido por los tratamientos de activación
3. Obtener superficies de titanio silanizadas a través del uso de dos silanos diferentes: el 3-cloropropil-trietoxi-silano (CPTES) y el 3-glicidiloxi-propil-trietoxi-silano (GPTES).
4. Evaluar la presencia de grupos hidroxilo y de organosilanos sobre las superficies de titanio modificadas.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Titanio

Se usaron discos de titanio comercialmente puro de grado II (Ti) de 9 mm de diámetro y de entre 2 y 3 mm de espesor (Figura 2.4). Para obtener estos discos, se usó una cortadora con disco de diamante (Strues Accutom). Las variables usadas

fueron 0.110m/s de velocidad de avance del disco cortador, 471.23rad/s de velocidad de rotación y refrigeración con agua.

La superficie fue pulida mecánicamente con papeles de carburo de silicio (SiC) de P240 (tamaño de partícula de 58,5 μm), P400 (35 μm), P600 (25,8 μm), P1200 (15,3 μm) y P4000 (5 μm). El tiempo sobre cada uno de los papeles se determinó observando cada 30 minutos la superficie de las muestras obteniendo tiempos de entre 30 minutos y 1 hora. Para obtener el pulido espejo, las muestras fueron pulidas química y mecánicamente durante 2 horas con una mezcla de silica coloidal con un tamaño de partícula de 0,06 μm y 10% de peróxido de hidrógeno, usando como superficie de pulimiento un paño de terciopelo. Durante este proceso el producto de la reacción entre el peróxido y el titanio es continuamente removido de la superficie de las muestras con la suspensión de silica coloidal, dejando la superficie libre de deformaciones mecánicas.



Figura 2.4: Discos de Titanio comercialmente puro, de 9 mm de diámetro y entre 2 y 3 mm de espesor, obtenidos por corte con disco de diamante.

Después del proceso de pulido, las muestras fueron sumergidas en una solución de hidróxido de sodio (0,5mg/ml) y acetona (75 %) y puestas en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos para remover los residuos de silica coloidal. Para remover las impurezas orgánicas e inorgánicas de las muestras, éstas fueron lavadas 3 veces con ciclohexano en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos. El proceso de limpieza se repitió con isopropanol, etanol, agua desionizada (Mili-Q Plus) y acetona. Finalmente las muestras fueron secadas con N_2 y puestas al vacío.

2.3.2 Limpieza y activación de las superficies de Titanio

a) Plasma de oxígeno

Para el proceso de limpieza y activación por plasma de oxígeno (PL), las muestras se colocaron en un reactor (Harrick Scientific Corporation modelo PDC-002) y se realizó un vacío de 2 minutos para eliminar los gases que componen el aire. Después del vacío, se introdujo dentro de la cámara oxígeno con una velocidad de flujo de 5 Nm³/h y con una presión dentro de la cámara entre 2.66 y 7.99 Pa. El oxígeno se expuso a radiofrecuencia entre 8 y 12 MHz. El tiempo de exposición del tratamiento con plasma de oxígeno fue de 30 segundos por muestra. Después del tratamiento las muestras se pusieron inmediatamente bajo vacío y en N₂ o Ar para impedir la interacción de la superficie con la contaminación ambiental. Las superficies de titanio tratadas con plasma se nombrarán en lo consecutivo como PL (Tabla 2.1).

b) Ataque químico con solución piraña

Para obtener una superficie limpia y activada, en otro grupo de muestras se realizó un ataque químico sumergiendo las muestras durante 1 hora en una solución de piraña con una proporción de 1:1 de H₂SO₄ y H₂O₂ (PH). Antes del ataque químico, las superficies deben estar limpias y completamente libres de solventes orgánico que hayan sido usados en lavados previos. Después del tratamiento las muestras se lavaron 3 veces con abundante agua desionizada, y una vez con acetona. Se secaron con N₂ y se almacenaron inmediatamente al vacío. Las superficies de titanio tratadas con piraña se nombrarán en lo consecutivo como PH (Tabla 2.1).

2.3.3 Silanización de las superficies de titanio activadas

Después del proceso de limpieza y activación los discos de titanio se pusieron dentro de un elermeyer, y se colocó un tapón. Se creó vacío para eliminar todo el aire y a continuación se introdujo N₂. A continuación se introdujo dentro de elermeyer pentano (solvente), N,N-Diisopropil-etil-amina (DIEA) (base), y el correspondiente silano 3-cloropropil-trietoxi-silano (CPTES) o 3-glicidiloxi-propil-trietoxi-silano (GPTES). Cada reactivo fue añadido mediante el uso de una jeringa y

una aguja. La reacción de silanización se dejó actuar durante 1 hora, poniendo el erlenmeyer bajo sonicación cada 10 minutos. Después de transcurrido el tiempo de la reacción, las muestras se lavaron 3 veces con etanol durante un par de minutos. El mismo proceso de limpieza se repitió con isopropanol, agua desionizada y acetona. Finalmente las muestras se secaron con N_2 y se pusieron inmediatamente al vacío para prevenir contaminación. En lo consecutivo para hacer referencia al CPTES y al GPTES se usará la nomenclatura CP y GP respectivamente. Las superficies de titanio tratadas con cada uno de los silanos se nombrarán tal y como aparece en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1: Nomenclatura de las superficies de Titanio modificadas

<i>Nomenclatura</i>	<i>Descripción de la muestra</i>
<i>Ti</i>	<i>Titanio comercialmente puro, pulido</i>
<i>PL</i>	<i>Ti tratado con plasma de oxígeno</i>
<i>PL-CP</i>	<i>PL seguido de silanización con CPTES</i>
<i>PL-GP</i>	<i>PL seguido de silanización con GPTES</i>
<i>PH</i>	<i>Ti tratado con piraña</i>
<i>PH-CP</i>	<i>PH seguido de silanización con CPTES</i>
<i>PH-GP</i>	<i>PH seguido de silanización con GPTES</i>

2.3.4 Caracterización de las superficies

a) Interferometría de luz blanca

Para medir la rugosidad de las superficies se utilizó un interferómetro de luz blanca (Optical Profiling System, Wyko NT1100, Veeco, USA). Esta técnica tiene una resolución vertical de 0,01nm (0,1Å) y un límite de detección lateral de alrededor de 0,35µm. Las mediciones se hicieron en el modo VSI (Vertical Scanning Interferometry). El análisis de imágenes se realizó por medio del software Wyko Vision 32 V2.303 (Veeco Instruments Inc, USA). Para separar el efecto de las ondulaciones y formas del material de la rugosidad real de las superficies, se usó un filtro gaussiano con valor $c=0.25$ mm para las muestras lisas (PL, PL-CP y PL-GP) y un filtro con valor $c=2.5$ mm para las rugosas (PH, PH-CP y PH-GP). Para cada condición se hicieron medidas sobre triplicados y sobre cada muestra se tomaron 3 medidas de rugosidad. En la Tabla 2.2 se muestran los parámetros usados en el estudio.

Tabla 2.2: Parámetros usados en el estudio de rugosidad por Interferometría de luz blanca

Área de estudio	124,4 X 94,6 μm
Medidas por muestra	3
Backscan	5 μm
Scan Length	12 μm
Magnificaciones	50X
Filtros Fourier tipo notch	Low cut off = 5 High cut off = 50

Existen varios parámetros de rugosidad para describir la topografía de una superficie. En este estudio, se seleccionaron los siguientes: (1) parámetros de amplitud, que describen la altura: Ra, Rt, Rq y Rku; (2) parámetros espaciales, que describen el espaciamiento entre las irregularidades topográficas: Sm; (3) parámetros híbridos, con los cuales se combinan las características de amplitud y espacio: índice de área superficial.^{14,15} En la Figura 2.5 se muestra una representación gráfica de algunos de los parámetros de rugosidad más relevantes.

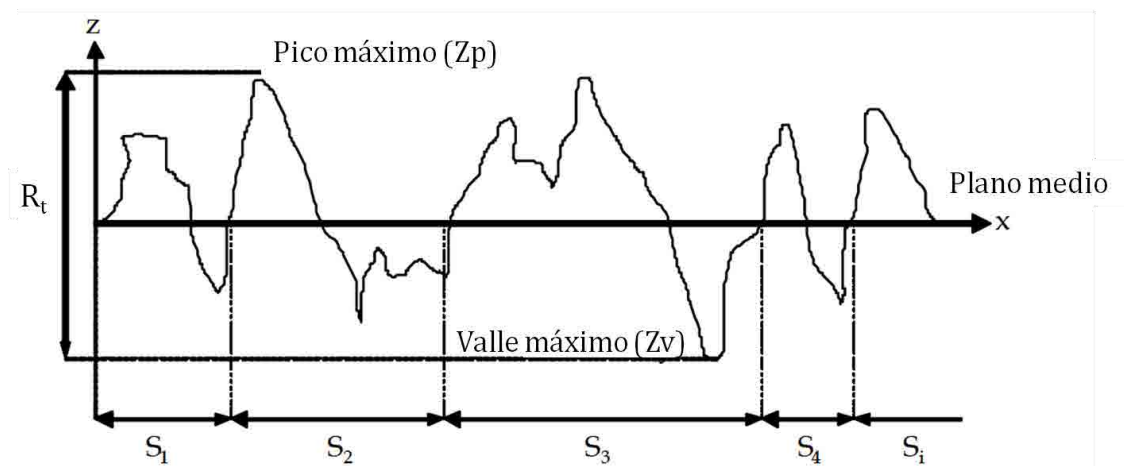


Figura 2.5: Representación gráfica de los parámetros de rugosidad Ra, Rt y Sm.

· Ra (rugosidad promedio): Media aritmética de los valores absolutos de todas las distancias desde el plano medio hasta el perfil de la muestra. El plano medio es un plano de referencia que se usa para calcular todos los parámetros de rugosidad. Es determinado por el método de mínimos cuadrados respecto a la superficie total. La rugosidad promedio es normalmente usada para describir la rugosidad de la superficie.

$$Ra = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |Y_i|$$

· Rq o RMS (Root mean square): Es la desviación estándar de la distribución de la altura. Es la raíz cuadrada de la media aritmética de los valores al cuadrado.

· Rt (Máxima altura entre picos y valles): es la distancia vertical entre el pico más alto y el valle más profundo medidos a lo largo muestra. ($Rt = Zp + Zv$)

· Rku (Kurtosis): describe la distribución de las alturas superficiales respecto al plano medio. Una superficie con distribución Gaussiana tiene un parámetro de curtosis igual a 3. Valores >3 indican una distribución irregular de los picos y los valles (defectos de carácter local) y valores <3 indican una distribución progresiva de picos y valles (defectos de patrón geométrico).

· Sm (Promedio del espacio de línea media): Es la distancia media entre el perfil de los picos medidos a lo largo de la línea media. Es un parámetro horizontal que sirve para controlar el espacio entre picos y valles regulares e irregulares.

$$Sm = \frac{1}{N} \sum_{i=0}^N S_i$$

· SAI (Índice de Área Superficial): Es el área de la superficie en una resolución lateral de la superficie medida en comparación con la de una superficie totalmente lisa. Es normalmente usada para evaluar aplicaciones en donde se ha realizado un recubrimiento sobre la superficie.

b) Ángulo de Contacto Estático: Mojabilidad

La cantidad de OH^- sobre la superficie influye en las características electroquímicas de la superficie. Una de ellas es la denominada mojabilidad, o capacidad de una superficie a ser mojada por un líquido, especialmente el agua. Esta afinidad se da cuando hay interacciones de puentes de hidrógeno. En consecuencia es de esperar que a más cantidad de OH^- , mayor sea la hidrofiliidad de la superficie.

Para determinar el grado de mojabilidad de una superficie se ha usado la técnica del ángulo de contacto. El ángulo de contacto es una técnica cualitativa, simple, rápida y económica por medio de la cual se puede obtener información de los cambios que ocurren sobre una superficie después de un tratamiento químico. Por esta razón es normalmente usada como una técnica de control después de cada proceso de modificación superficial.

Se dice que una superficie se moja si el líquido que entra en contacto con su superficie se extiende de manera uniforme sin formar una gota. Cuando el líquido es agua y se extiende sobre la superficie sin formar una gota se dice que la superficie es hidrofílica. En términos de energía esto implica que las fuerzas asociadas a la interacción del agua con la superficie son mayores que las fuerzas de cohesión asociadas al agua en estado líquido. Las gotas formadas sobre una superficie hidrofóbica implican que las fuerzas de cohesión asociadas al agua son mayores que las fuerzas asociadas a la interacción del agua con la superficie del material. Las interacciones entre la superficie y el agua compiten con una variedad de interacciones internas del agua: enlaces de van de Waals, interacciones dipolares, puentes de hidrógeno e intercambio de protones.

Un método cuantitativo simple para definir el grado relativo de interacción de un líquido con la superficie de un sólido es la medida del ángulo que se forma entre la gota del líquido y la superficie. Si el ángulo de contacto es menor de 30° , la superficie es considerada como hidrofílica. Si el agua se extiende sobre la superficie y el ángulo es menor que 10° , la superficie es considerada como superhidrofílica, siempre y cuando el agua no se absorba o reaccione con la superficie. Sobre superficies hidrofóbicas el agua forma gotas claramente visibles, con ángulos superiores a 90° .

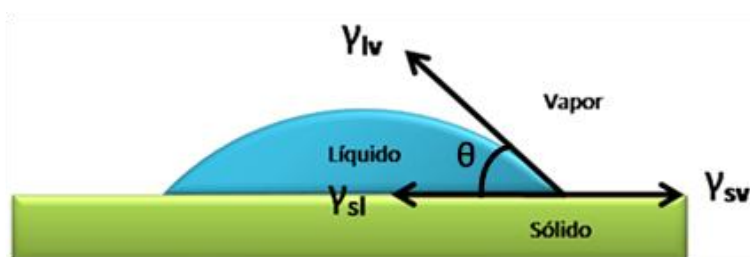


Figura 2.6: Representación esquemática del ángulo de contacto (θ) formado entre el líquido depositado y la superficie del sustrato

Para determinar la mojabilidad de las superficies estudiadas, se realizaron medidas de ángulo de contacto usando el método denominado "Sessile Drop". En este método se deposita una gota de líquido sobre una superficie horizontal y se observa en su sección transversal. El ángulo (θ) formado entre la interfaz líquido/sólido y la interfaz líquido/vapor es el ángulo de contacto, que se determina ópticamente (Figura 2.6).^{16,17}

Para determinar el ángulo de contacto, las muestras fueron introducidas dentro de una cámara saturada de vapor de agua que se encuentra a temperatura ambiente. Luego con una jeringa micrométrica, se generaron gotas de 3 μL de agua Milli-Q estándar (MilliQ, Millipore, Germany). Cada gota generada, se depositó de manera aleatoria sobre la superficie del material. Las imágenes del ángulo formado entre la gota y la superficie del material, fueron obtenidas por medio del sistema de video OCA 15 plus Video-Based Optical Contact Angle Meter. Estas imágenes fueron analizadas mediante el software SCA20 (Dataphysics Instruments GMBH, Germany), mediante el cual se obtiene la medida del ángulo de contacto formado en la interfaz líquido/material. Las medidas del ángulo de contacto fueron tomadas inmediatamente después de depositar la gota. En cada muestra se tomaron 3 medidas y el experimento se realizó por triplicado para cada condición de estudio, obteniéndose un total de 9 medidas para cada tipo de modificación realizada sobre la superficie del material.

c) Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (ToF-SIMS)

Para analizar la composición de las superficies de Ti después de proceso de activación y silanización, las muestras fueron analizadas con ToF SIMS. Las muestras fueron analizadas 3 veces cada una en ubicaciones elegidas aleatoriamente para asegurar la homogeneidad de la superficie. El equipo utilizado fue un TOF-SIMS IV (ION-TOF, Munster, Germany) operado a una presión de 5×10^{-9} mbar. Las muestras fueron bombardeadas con una fuente de iones de bismuto metálico líquido (Bi^{3++}), a una energía de 25 keV. Los iones secundarios que se liberan de la superficie de la muestra se detectaron con el analizador de tiempo de vuelo, una placa multicanal (MCP), y un convertidor de tiempo a digital (TDC). Los datos obtenidos se analizaron mediante el software ION-TOF IonSpec.

d) Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)

Con el fin de obtener información acerca de la composición química de las diferentes superficies de Ti, se analizaron las muestras por medio de XPS antes y después de los tratamientos de activación y de silanización (PL, PH, PL-CP, PL-GP, PH-CP, PH-GP). El análisis por XPS permite obtener un espectro general de la composición química de cada superficie. También nos permite obtener

información detallada de estados de oxidación, electronegatividad y tipos de enlace a través de estudios de alta resolución de los picos correspondientes a cada elemento químico presente en la superficie.

Por ejemplo, a través del estudio de alta resolución del pico del oxígeno, se puede observar como ha sido la formación de los grupos hidroxilo después de los tratamientos de plasma y piraña además de la transformación de la capa de óxido de la superficie. A través del ratio OH^-/O^- se puede determinar qué tratamiento produce un mayor número de grupos hidroxilo en relación con la capa de óxido. De esta manera podemos determinar cuál de los dos tratamientos de activación es más eficiente en términos de cantidad de OH^- generados. Por otra parte, la detección y la evaluación de la deconvolución de los picos asociados al cloro, el silicio, el carbono y el oxígeno, permite identificar la presencia de los silanos sobre la superficie.

Los análisis de XPS se realizaron en un equipo SAGE ESCA System (SPECS, Alemania), en el cual se utilizó un ánodo de Aluminio XR50 operado a 150W y un detector XP Phoibos 150 MCD-9. Los espectros se registraron con una energía de paso de 25 eV a 0.1 eV a una presión por debajo de los $6 \cdot 10^{-9}$ mbar. El estudio fue realizado por triplicado para cada condición.

Los espectros obtenidos se analizaron mediante el software denominado Multipack (v8.2). De los espectros generales se calculó la composición química de cada muestra y del análisis de los espectros de alta resolución de elemento químico, se obtuvo información acerca de las diferentes especies químicas presentes en cada pico y el porcentaje relativo al área de cada uno de ellos. Los procesos de deconvolución de los picos de alta resolución se realizaron usando una sustracción de fondo del tipo Shirley, empleando sumas aritméticas de funciones gaussianas-lorentzianas. Como variables de ajuste se consideró el ancho de pico a media altura, el área del pico y el valor de la energía de cada uno de ellos. Estos análisis tienen una precisión de $\pm 10\%$ y las energías de unión tienen un error en el intervalo de ± 0.1 eV. Teniendo en cuenta que los análisis se realizaron sobre superficies metálicas, lo cual puede generar un desplazamiento de los valores de

energía de enlace de los picos correspondientes a cada elemento químico, los espectros obtenidos fueron calibrados respecto a la energía de enlace del pico de C1s a 284,8eV.

Para el análisis químico de las muestras, las técnicas de XPS y ToF SIMS proporcionan información complementaria. El XPS puede detectar todos los elementos (excepto el H y el He) presentes a profundidades entre 3 y 10nm de la superficie y proporcionar información cuantitativa a cerca de ellos. Por el contrario, análisis cuantitativos mediante ToF SIMS son difíciles de realizar, especialmente cuando se analizan superficies con capas de material orgánico, como es el caso de superficies con colágeno. Sin embargo esta técnica es más sensible que la de XPS, ya que permite detectar todos los elementos e isótopos a profundidades entre 1 y 5nm. Además permite identificar fragmentos enteros de moléculas asociadas a los silanos y a péptidos y/o proteínas.¹⁸⁻²⁰

e) Técnica de sustitución del complejo de Zinc

Para determinar la concentración de los grupos hidroxilo activos presentes sólo en la superficie del material, se realizaron estudios por medio de la técnica de sustitución del complejo de zinc, por medio de la cual se determina de manera indirecta el número de grupos hidroxilo a través del número de iones de Zn que reaccionan con los OH⁻ de la siguiente forma:

- Se preparó una disolución, mezclando una solución de Cloruro de Amonio (4,0M y 50mL) y una solución de Cloruro de Zinc (0,4M y 25ml). El pH de la solución se ajustó a 6,9 con la adición de 30% de hidróxido de amonio. El volumen de la mezcla se ajustó a 100 ml con agua desionizada.
- Las muestras con tratamientos de plasma (PL) y piraña (PH) se sumergieron por separado en recipientes que contenían 30 ml de la solución anterior durante 10 minutos a temperatura ambiente. Durante la inmersión, se forma el complejo de Zinc por medio de la unión de un ion de Zn con 2 grupos hidroxilo (Fig. 2.7 a y b).

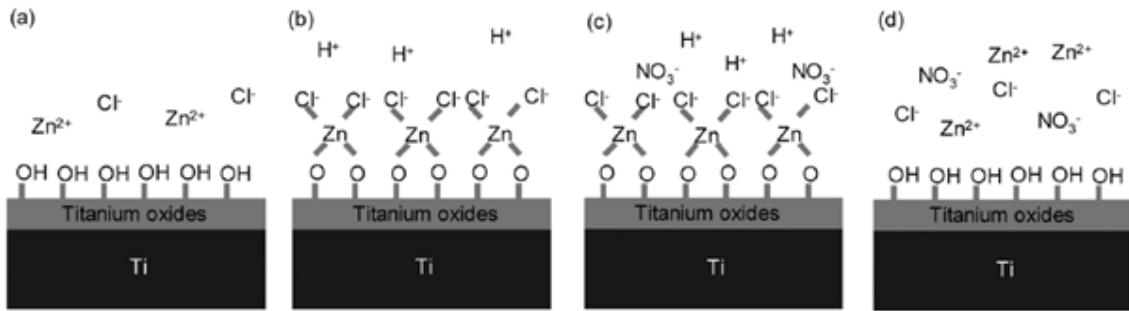


Figura 2.7: Formación y liberación del complejo de Zinc por medio de la interacción de los grupos hidroxilo activos (OH⁻) presentes sobre la superficie de Titanio con el cloruro de Zinc.

- Una vez transcurridos los 10 minutos, las muestras se sumergieron en 30 ml de agua desionizada 2 veces para remover las especies químicas que no reaccionaron con la superficie. Se secaron con N₂ y se pusieron dentro de un desecador durante 1 hora.

- Después de una hora, las muestras se sumergieron en 40 ml de ácido nítrico 2,5M durante 10 minutos. En esta solución los iones de Zinc que han reaccionado con los grupos hidroxilo se liberan (Figura 2.7 c y d). El volumen de la solución con los iones de Zn se ajustó a 50ml con ácido nítrico.

- La concentración de iones Zn (C_{Zn} = partes por millón (ppm) en solución) en la solución se determinó mediante Espectrometría de Emisión Atómica de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP). Finalmente, la concentración normalizada de los grupos hidroxilo (C_{OH}) por unidad de área (nm²) de cada muestra, se calculó de acuerdo a la Ecuación 2.1, donde V es el volumen de ácido nítrico (50ml), N_A es el número de Avogadro (6,02 x 10²³), M_{Zn} es el peso molecular del Zn (62,75) y S es el área de la superficie de la muestra:

$$C_{OH} = 2 \left\{ \frac{C_{Zn} \times 10^{-6} \times V \times N_A}{M_{Zn} \times S} \right\} \quad \text{Ecuación 2.1}$$

- Se analizó también como control positivo una solución de cloruro de zinc y como control negativo una solución de ácido nítrico, que no habían entrado en contacto con ninguna muestra.

f) Análisis Estadístico

El estudio estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante el programa de análisis estadístico ANOVA, con la prueba de comparación múltiple de Fisher en la cual se determinan las diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los diferentes grupos con un valor de $p < 0,05$.

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1 Evaluación del grado de limpieza y activación de las superficies de Ti

a) Rugosidad superficial

La rugosidad es una de las propiedades físicas que influye en las interacciones superficie/molécula y superficie/célula. Además cambios en la rugosidad también influyen en otras propiedades físicas como la mojabilidad, que puede aumentar o disminuir en la misma muestra sólo al cambiar la rugosidad. Por lo tanto es importante evaluar cómo los tratamientos con plasma y con piraña influyen sobre la rugosidad de las superficies, y si estos cambios pueden o no tener influencia sobre la respuesta de la superficie a los tratamientos posteriores que se quieren realizar sobre ella.

Las imágenes y valores de los parámetros de rugosidad de las superficies de titanio tratadas con plasma y con piraña obtenidos por interferometría óptica, se muestran en las Figuras 2.8 y 2.9. El valor de Ra para las muestras tratadas con PH (144,47nm) fue significativamente superior al de las muestras tratadas con PL (17,96nm). Estos resultados se deben al ataque químico generado por la solución piraña, que genera una erosión que cambia la morfología y el área de la superficie. En otros estudios se ha demostrado que, como en este caso, los ataques químicos con soluciones que contienen peróxido de hidrógeno cambian la rugosidad de la superficie del Titanio.²¹⁻²³

En la literatura algunos autores dicen que superficies con valores de Ra < 500nm pueden ser consideradas como superficies lisas.^{16,24} Otros autores establecen 3 rangos de rugosidad dependiendo de la escala de irregularidades de la superficie

del material: superficies macrorugosas (100 μm – milímetros), microrugosas (1 μm - 100 μm), y nanorugosas (< 100nm), lo que pone al valor de las muestras tratadas con PH en el intervalo de superficies microrugosas.²⁵⁻²⁸

Como consecuencia de una mayor rugosidad, el índice de área superficial (SAI) en las muestras tratadas con PH, fue el doble que el reportado para las muestras con PL, lo cual podría afectar a la cantidad de biomoléculas inmovilizadas sobre la superficie y en consecuencia influir en la respuesta celular, como ha sido demostrado en otros estudios.^{29-31 29,32}

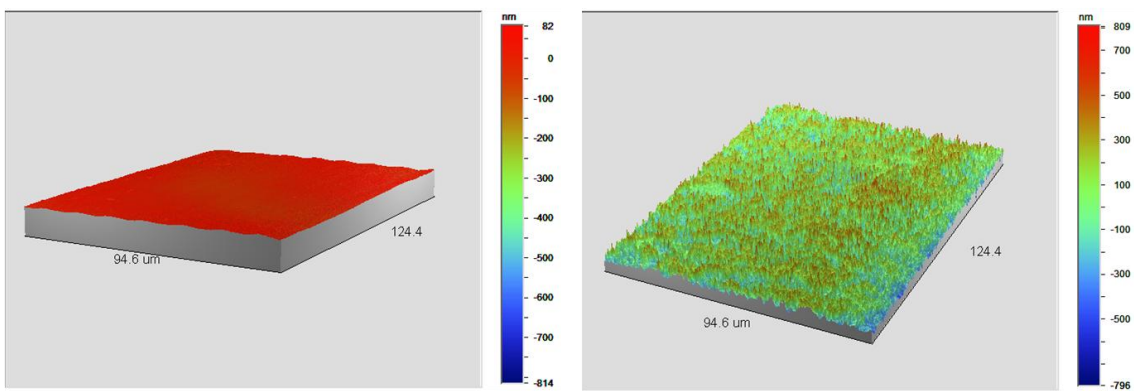


Figura 2.8: Perfiles tridimensionales representativos de las superficies tratadas con plasma (a) y con piraña (b)

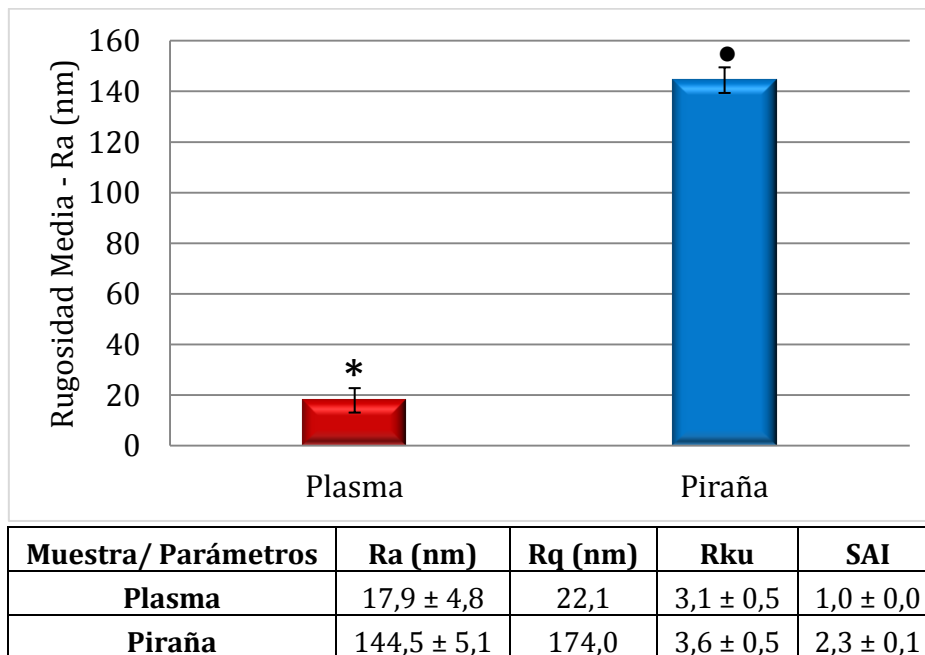


Figura 2.9: Valores de los parámetros de rugosidad determinados sobre superficies de Ti después del tratamiento de plasma y piraña. Los valores de Ra representados en la gráfica presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Finalmente en la Figura 2.9 se observó que ambos tratamientos resultaron en valores de Rku muy cercanos a 3, con lo que se puede concluir que a pesar del cambio de rugosidad sobre las muestras con PH, la distribución es homogénea en todos los casos. Se puede esperar entonces que en el momento de la silanización y la inmovilización de la biomolécula, esta distribución homogénea de la rugosidad, proporcione también una distribución homogénea del silano y posteriormente del colágeno.

b) Ángulo de Contacto

En la Figura 2.10 se representa el ángulo de contacto de las superficies de Ti antes y después de los tratamientos con plasma y piranha. Sobre la muestra de titanio puro se registró un valor de 55,33°, sugiriendo un comportamiento intermedio entre hidrofóbico e hidrofílico debido a la presencia de contaminación por el carbono de la atmosfera. Este valor concuerda con el reportado en la literatura.³³ Después de los tratamientos de PL y PH se observó una reducción muy significativa del ángulo de contacto. Este comportamiento era el esperado debido a la remoción de contaminantes tales como el carbono, y a la generación de grupos hidroxilo sobre la superficie.^{34,35}

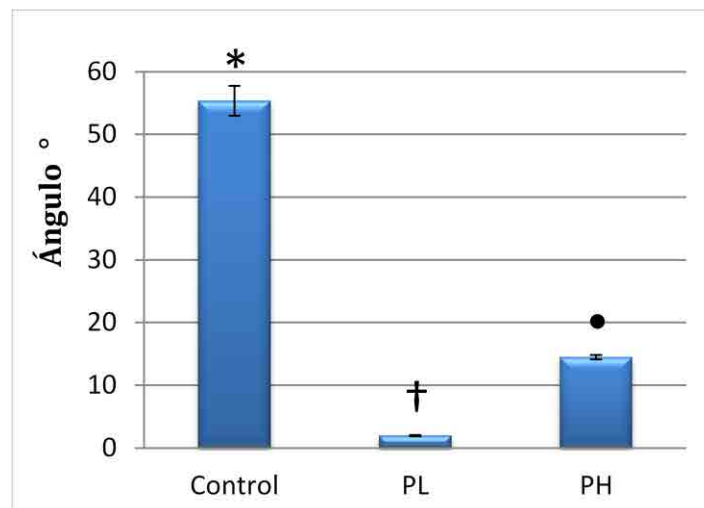


Figura 2.10: Ángulo de contacto, medido sobre las muestras de Ti, PL y PH. Los valores reportados para cada muestra presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Sin embargo, las muestras de PH mostraron un ángulo de contacto superior a las de PL. Esto puede ser debido a varios factores: a) cambios en la rugosidad superficial y b) diferencias en la química de la superficie en cuanto a, eficiencia en

la eliminación de los contaminantes de carbonos alifáticos (C-H y C-C) y/o generación de grupos OH-. En general un aumento de la rugosidad influye en el carácter hidrofílico de las superficies, es decir, si una superficie es hidrofílica un aumento en la rugosidad aumentará su carácter hidrofílico y si es hidrofóbica aumentará su carácter hidrofóbico.³⁶ Sin embargo, en el caso de las superficies de PH se observó lo contrario, mostrando un comportamiento menos hidrofílico que el observado sobre las muestras de PL. Según lo observado, puede ser que el tratamiento de piraña sea menos eficiente que el de plasma en cuanto a la remoción de hidrocarburos y/o la generación de grupos OH-, lo que en consecuencia disminuye el comportamiento hidrofílico de la superficie.

c) ToF-SIMS

Los análisis de espectroscopia de masa realizados sobre muestras de titanio puro proporcionan información de la composición química del sustrato y de sus óxidos.^{37,38} En las Figuras 2.11 a y b se muestran los espectros de los iones identificados sobre muestras de Ti puro (Ti), plasma (PL) y piraña (PH).

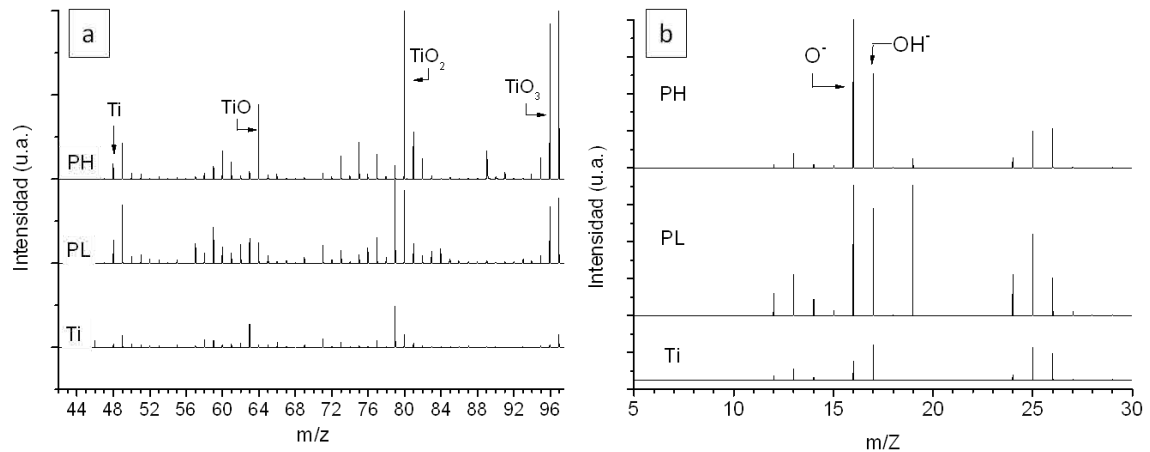


Figura 2.11: Espectros de ToF SIMS de los fragmentos de moléculas presentes sobre las diferentes superficies de titanio antes y después de los tratamientos de limpieza y activación con plasma y piraña. (a) Identificación de picos correspondientes a estados de oxidación del titanio. (b) Identificación de los iones negativos correspondientes a la oxidación de la superficie (O⁻) y a la generación de los grupos hidroxilo (OH⁻) después de los tratamientos de plasma y piraña.

En el espectro de Ti puro (Ti) (Figura 2.11 a) se observaron unos picos máximos que aparecen cerca a valores de masa/carga (m/z) = 48, 64, 80 y 96 correspondientes a las especies iónicas Ti⁺, TiO⁺, TiO₂⁺ y TiO₃⁻ respectivamente.^{39,40}

Otros tipo de óxidos, fueron detectados en diferentes estados químicos tales como Ti_2O^+ , $Ti_2O_2^+$, $Ti_2O_3^+$, TiO_3^- registrados para valores de $m/z = 111.89$, 127.88 y 143.88 . Estas diferencias en las estequiométricas de las superficies oxidadas, pueden ocurrir como resultado de la disociación de agua adsorbida sobre la superficie.^{18,19} Así pues, el oxígeno (O) fue detectado sobre las superficies formando grupos hidróxido y óxido de titanio.

Después de los tratamientos de limpieza y activación por plasma y piraña, los espectros de los iones negativos fueron dominados por la presencia del ion O^- registrado a un valor de $m/z=16$ y del anión OH^- a un valor de $m/z = 17$ (Figura 2.11 b), referenciados para superficies de titanio oxidadas y/o hidroxiladas.^{19,37,41} Es importante destacar que la presencia de estos dos picos sobre la superficie de titanio puro (Ti), fue casi nula (Figura 2.11 b), indicando que sobre esta superficie había una muy baja cantidad de grupos hidroxilo antes de los procesos de activación. Tanto los picos de estas dos especies como los picos de óxido registrados en valores de m/z entre 44 a 96, mostraron un aumento considerable de su intensidad sobre las muestras tratadas al compararlas con las muestras de titanio puro. Esto confirma que después de los tratamientos de limpieza y activación efectuados tanto con plasma como con piraña se producen sobre la superficie grupos hidroxilo y también se genera un aumento de la capa de óxido natural que posee el titanio. Todos estos resultados coinciden con los encontrados en la literatura sobre el titanio.^{18,19,21,37,38} Para evaluar en qué cantidad se han aumentado los grupos OH^- y la capa de óxido, es necesario realizar estudios por XPS en los cuales se puede analizar de manera semicuantitativa el porcentaje atómico que tienen estas dos especies presentes en el espectro de alta resolución del pico de oxígeno.

d) XPS

Los análisis de XPS de los espectros generales de las superficies de titanio antes y después del tratamiento con plasma (PL) y piraña (PH) se resumen en la Tabla 2.3, donde se incluye como control el titanio puro (Ti). En las muestras de titanio puro se observó la presencia de Ti, O y C como componentes principales de la superficie. El pico de carbono fue utilizado como referencia interna a un valor de energía de

enlace de 284,8 eV, para calibrar todos los espectros. Se encontraron varios elementos ajenos a la composición del titanio puro y su superficie. Es importante resaltar que los valores en porcentaje igual o menor que 1, no se han considerado.

Tabla 2.3: Porcentaje atómico de los elementos químicos presentes sobre las muestras de Ti, PL y PH.

Muestra	Elemento químico (% atómico)						
	C 1s	N 1s	O 1s	Si 2p	Cl 2p	Ti 2p	Na 1s
Ti	33,2 ± 3,3	0,1 ± 0,1	27,8 ± 1,6	0,2 ± 0,2	0,0 ± 0,0	3,5 ± 0,3	35,1 ± 1,3
PL	10,0 ± 3,7	1,6 ± 0,4	48,0 ± 2,3	2,1 ± 1,0	0,2 ± 0,1	16,9 ± 0,7	21,4 ± 3,6
PH	18,2 ± 0,1	1,0 ± 0,4	47,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,1 ± 0,2	21,3 ± 0,3	7,4 ± 0,3

El carbono observado sobre la muestra de Ti es debido a la contaminación por compuestos hidrocarbonados.^{16,21,42} Las impurezas de Cl y N se pueden atribuir a productos químicos de limpieza de los recipientes de vidrio en los que se realizó la preparación y limpieza de las muestras. Las cantidades de Si pueden ser atribuidas a los pasos previos de preparación de las muestras en los que se incluyen el proceso de pulido con papel de carburo de silicio y silica coloidal. Finalmente, las cantidades de Na fueron atribuidas a contaminación producida por el uso de NaOH como agente para eliminar los restos silica coloidal de la superficie de las muestras.

Una de las razones para usar los tratamientos de plasma y/o piraña es eliminar los contaminantes atmosféricos que puedan estar presentes sobre la superficie, los cuales reducen la capacidad de respuesta de los grupos activos presentes o generados sobre las superficies, disminuyendo la eficiencia de reacciones posteriores como la silanización y la inmovilización de moléculas. Por tanto es importante determinar cuál de estos dos tratamientos es más eficiente en términos de limpieza de la superficie. Después de los tratamientos de PL y PH, se observó una disminución considerable del porcentaje del pico de C (Ti = 33.2 ± 3.3 → PL = 10.0 ± 3.7 y PH = 18.2 ± 0.1%) y un incremento considerable de los porcentajes de los picos de Ti (Ti = 3.5 ± 0.3 → PL = 16.9 ± 0.7 y PH = 21.3 ± 0.3%) y O (Ti = 27.8 ± 1.6 → PL = 48 ± 2.3 y PH = 47 ± 0.1%) (Tabla 2.3), que se ha atribuido a la remoción de contaminantes.

En la Tabla 2.4 y en la Figura 2.12 se muestran los resultados obtenidos del análisis de los espectros de alta resolución del pico de carbono, que se registró sobre las superficies de titanio antes (Ti) y después de los tratamientos de plasma (PL) y piraña (PH). Es importante considerar que en los espectros de alta resolución de diferentes muestras se observaron pequeños desplazamientos en los niveles de energía de enlace de los picos. Estas variaciones corresponde a las denominadas líneas “shake up” provenientes de los efectos vibracionales de los electrones que se registran en el momento de la lectura. Si estas desviaciones no superan un valor de $\pm 0,5$ eV, se considera que el valor registrado corresponde a la misma especie química o al mismo tipo de enlace.⁴³

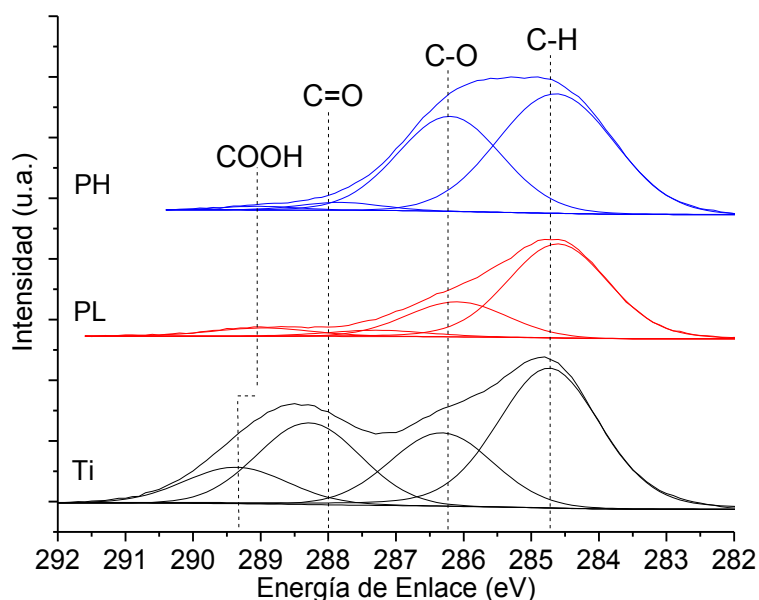


Figura 2.12: Espectros de alta resolución del pico de C1s de las muestras de titanio antes y después de los tratamientos de limpieza y activación, y de los subpicos que lo conforman.

Tabla 2.4: Porcentaje de las especies presentes en el pico de C1s para las muestras de Ti, PL y PH

Deconvolución del pico C 1s			Ti	PL	PH
			Porcentaje general de C 1s		
			33,2	10	18,2
Subpicos	Enlace	EE (eV)	Porcentaje de los subpicos		
1	C-H , C-C	284,6 \pm 0,1	14,7	6,6	9,9
2	C-O	286,2 \pm 0,2	7,1	2,3	7
3	C=O	287,7 \pm 0,5	7,8	0,5	0,8
4	COOH	289,2 \pm 0,2	3,6	0,6	0,5

Al realizar la deconvolución del pico C1s sobre las muestras de Ti, PL y PH, se observaron cuatro contribuciones (subpicos) de diferentes especies (Figura 2.12 y Tabla 2.4) que según la literatura corresponden a:^{5,44-49} (1) carbonos alifáticos (C-H y C-C ubicados a 284,6eV) presentes en mayor medida como contaminantes atmosféricos, los cuales poseen un comportamiento hidrofóbico; (2) C-O ubicados a 286,2 eV; (3) C=O ubicado a 287,7 eV; y (4) COOH ubicado a 289,2 eV. Los últimos 3 picos, corresponden a especies de carbono con carácter un poco más hidrofílico.

Antes de los tratamientos el porcentaje general del pico de carbono (C1s) sobre la superficie de Ti era de $33.2 \pm 3.3\%$ y después paso a un $10.0 \pm 3.7\%$ en el caso del PL y a un $18.2 \pm 0.1\%$ en el caso del PH (Tabla 2.4). Estos resultados confirman que ambos tratamientos tienen la capacidad de reducir parte de las impurezas de la superficie. En el caso del PL esta disminución es mucho mayor, lo que sugiere que este tratamiento es más eficiente respecto a la limpieza de la superficie.

Al analizar por separado cada una de las especies presentes en la deconvolución, se observó que el tratamiento de plasma fue más eficiente en cuanto a la remoción de los 4 tipos de carbonos, en comparación con el tratamiento de piraña. Esta disminución fue más considerable en el caso del pico 1 relacionado con los carbonos alifáticos, el cual pasó de un porcentaje registrado para el Ti de 14.7% a un porcentaje del 6.6% después del plasma (PL) y a un 9.9% después del piraña (PH) (PL/Ti = 55.10% y PH/Ti = 32.65% de reducción). También se observó que en ambas muestras hubo una reducción de los subpicos 3 y 4, reflejando una ruptura de los enlaces C=O y COOH. Lo anterior indica que la tendencia general es que el tratamiento de plasma es más eficiente que el tratamiento de piraña en cuanto a remoción de carbonos asociados con la contaminación atmosférica.

De lo anterior se puede decir que ambos tratamientos permitieron reducir substancialmente la contaminación por carbono, siendo mayor la reducción de todos los tipos de carbono después del tratamiento con plasma. Una mayor eliminación de los carbonos alifáticos después del tratamiento de plasma podría contribuir a una mejor activación. En el caso del tratamiento de piraña, una menor

disminución de la contaminación debida al carbono, explica el porqué esta superficie es un poco menos hidrofílica que la de plasma, como se observó en los resultados de ángulo de contacto (apartado 2.4.1 - b).

Además de la disminución de la contaminación sobre la superficie, los tratamientos de plasma y piraña han sido utilizados en este estudio para aumentar el número de grupos OH⁻ sobre la superficie. Es importante recordar que una mayor cantidad de grupos OH⁻ sobre la superficie favorece a una mayor cantidad de enlaces con el silano.^{50,51} Después de los tratamientos de PL y PH, se observó un incremento considerable en el porcentaje general del pico de O (Ti = 27.8 ± 1.6 → PL = 48 ± 2.3 y PH = $47 \pm 0.1\%$) (Tabla 2.3). Este aumento puede deberse a cambios en la composición de la superficie debido a la disminución o aparición de nuevos enlaces. Por lo tanto es necesario analizar los espectros de alta resolución de este pico para determinar de qué manera actúan cada uno de estos tratamientos sobre la superficie.

En la Figura 2.13 y en la Tabla 2.5 se muestran los resultados obtenidos del análisis de los espectros de alta resolución del pico de O1s, correspondiente a las muestras de Titanio puro (Ti), plasma (PL) y piraña (PH). En el espectro de alta resolución del titanio puro (Ti) (Figura 2.13), se observaron 3 contribuciones, que según la literatura se han asignado a los siguientes tipos de enlaces:^{38,44,52-54} la primera contribución es la de la especie TiO₂, reportada para una energía de enlace de 529,9 eV (el rango de valores de la literatura va desde 528 hasta 530 eV). Un segundo pico aparece a 531eV, atribuido al enlace básico con los grupos hidroxilo Ti-OH y un tercer pico a 532,5 eV atribuido a la unión del titanio con un hidroxilo ácido TiO-H ó al agua de la superficie.

Los mismos 3 picos fueron observados después de los tratamientos de plasma y piraña, Ambos tratamientos mostraron un drástico incremento en la capa de óxido (O²⁻), (Tabla 2.5), indicando que son altamente oxidantes, lo que coincide con lo observado en los resultados de los análisis de ToF SIMS (Figura 2.11 a y b), donde se observó un aumento considerable en la señal del pico correspondiente a los óxidos. Un aumento en la capa de óxido (O²⁻) aumenta la posibilidad de interacción

con las biomoléculas por medio de puentes de hidrógeno, lo cual puede aumentar la cantidad de colágeno fisisorbido.

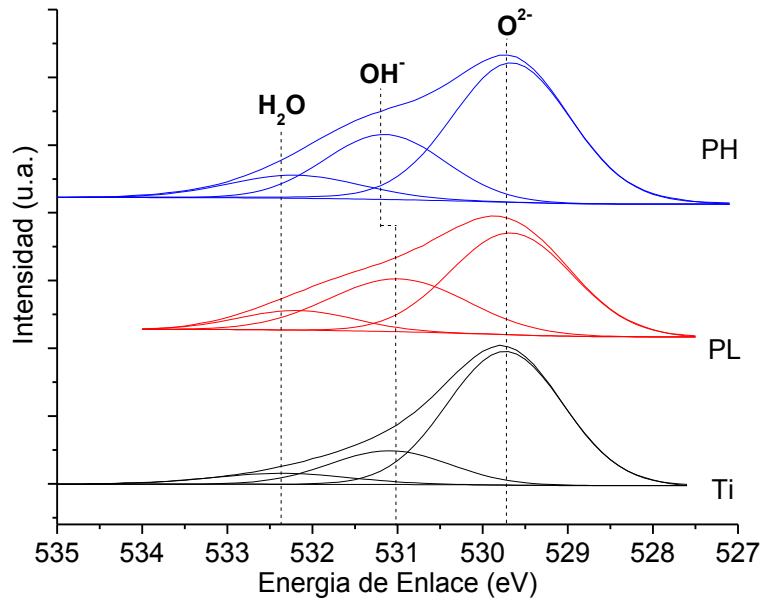


Figura 2.13: Espectros de alta resolución del pico O1s obtenidos en las muestras de Ti, PL y PH

Tabla 2.5: Porcentaje atómico de las especies presentes en el pico de O1s para las muestras de Ti, PL y PH

Deconvolución del pico O 1s			Ti	PL	PH
			Porcentaje general de O 1s		
			27,9	48,0	47,0
			Porcentaje de los subpicos		
O1	O²⁻	529,9 ± 0,4	20,5	25,2	28,8
O2	OH⁻	531,0 ± 0,2	4,0	17,9	13,0
O3	H₂O	532,5 ± 0,4	3,3	4,9	5,2
Eficiencia	OH⁻/O²⁻		0,2	0,7	0,4

En cuanto a los grupos hidroxilo (OH⁻) ubicados a 531 eV (Tabla 2.5), la concentración de estos aumentó considerablemente después de ambos tratamientos, pasando de 4.0% en la muestra de Ti, a un 17.9% en el caso de la muestra de PL y a un 13.0% en el caso de la muestra de PH. Este hecho ha sido atribuido en la literatura a la formación de grupos OH⁻ sobre la superficie de titanio cuando son sometidas a tratamientos de activación con plasma de oxígeno y/o ataque químico con solución piraña.^{42,54-56} De igual forma este resultado coincide con lo observado en los resultados de ToF SIMS de la Figura 2.12-b.

Además, al realizar la ratio $\text{OH}^-/\text{O}^{2-}$ se obtuvo un valor de 0.2 en la muestra de Ti, 0.7 en la muestra de PL y 0.4 en la muestra de PH, lo cual confirma que después de ambos tratamientos se aumentó la cantidad de grupos OH^- sobre la superficie. Se observó que esta ratio fue mayor en la muestra de PL que en la de PH, lo que indica que el tratamiento de plasma es más eficiente en cuanto a la creación de grupos OH^- .

e) Cuantificación de los grupos OH^-

Sobre el Ti puro hay una capa poco cristalina y no estequiométrica de TiO_2 que contiene OH^- y/o agua adsorbida. Sin embargo, parte de esos OH^- pueden estar dentro de la superficie de óxido y pueden estar inactivos. Por consiguiente en este trabajo, el término “grupos hidroxilo activos” se define como los OH^- localizados sobre la capa de óxido, que han sido producidos a través de los tratamientos de plasma o piraña.^{21,44,47}

Por medio del análisis por XPS se detectan ambos tipos de grupos OH^- (pico ubicado a 531eV en la deconvolución del pico de O1s), debido a que se analizan los electrones presentes desde la superficie hasta una profundidad de 10nm. Por lo tanto, para cuantificar sólo los grupos OH^- presentes en la superficie y sólo aquellos que se encuentran activos se ha realizado un análisis por medio de la técnica de sustitución del complejo de Zn como complemento de los resultados obtenidos por XPS. La condición de “activos” para estos grupos cuantificados, se corrobora con la cuantificación de los iones de Zn presentes en la solución, que reaccionan sólo con los grupos OH^- presentes en la superficie.^{44,47,57}

La Figura 2.14 representa la concentración normalizada de los grupos hidroxilo (C_{OH}) por unidad de área (nm^2), cuantificados sobre las muestras de Ti, PL y PH. Se puede observar que el número de grupos hidroxilo “activos” aumentó tanto después del tratamiento de PL ($\text{C}_{\text{OH}}/\text{nm}^2 = 26296,7$) como de PH ($\text{C}_{\text{OH}}/\text{nm}^2 = 17415,8$) al compararlo con el valor obtenido para la muestra sin ningún tratamiento ($\text{C}_{\text{OH}}/\text{nm}^2 = 2931,6$), siendo mayor para el caso del PL. Esto coincide con lo observado en los análisis de XPS de la deconvolución del pico de O1s (Figura

2.13 y Tabla 2.5), donde se observó un porcentaje de OH⁻ (531 eV) mayor sobre la muestra de PL que sobre la muestra de PH.

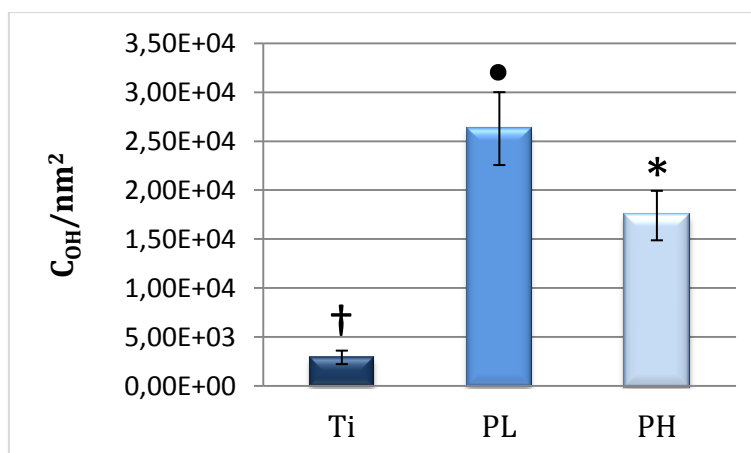


Figura 2.14: Concentración normalizada de los grupos hidroxilo por unidad de área, cuantificados sobre las muestras de Ti, PL y PH. Los valores reportados para cada muestra presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Por otro lado, es importante destacar que por medio de este método, se observó que sobre la muestra de titanio puro (Ti), se cuantificó muy poca cantidad de grupos OH⁻ en comparación con la muestra de PL y PH, coincidiendo con lo observado tanto en los resultados de ToF SIMS (Figura 2.11b) como en los resultados de XPS la deconvolución del pico de O1s (Figura 2.11).

Lo observado en estos resultados sumado con lo obtenido en el análisis de XPS, indica que el tratamiento de plasma genera más grupos OH⁻ sobre la superficie de titanio que el tratamiento de piraña, lo que confirma que la reducción en la hidrofiliidad sobre las muestras de PH observada en los resultados de ángulo de contacto (Figura 2.10), es debida a que este tratamiento elimina en menor proporción la contaminación por carbono, y genera menor número de grupos OH⁻ sobre la superficie de titanio.

2.4.2 Evaluación del grado de silanización de las superficies de Ti

a) Ángulo de Contacto

En la Figura 2.15 se muestran los resultados de las medidas de mojabilidad realizadas sobre las muestras antes (Ti, PL y PH) y después del proceso de silanización (PL-CP, PL-GP, PH-CP y PH-GP). Se observaron diferencias

significativas entre las muestras no silanizadas (con valores por debajo de 20°) y las muestras silanizadas (con un valor medio de 60°). La tendencia a aumentar la hidrofobicidad de las superficies silanizadas es una consecuencia de las cadenas con grupos alquilos que se encuentran en los silanos.^{58,59}

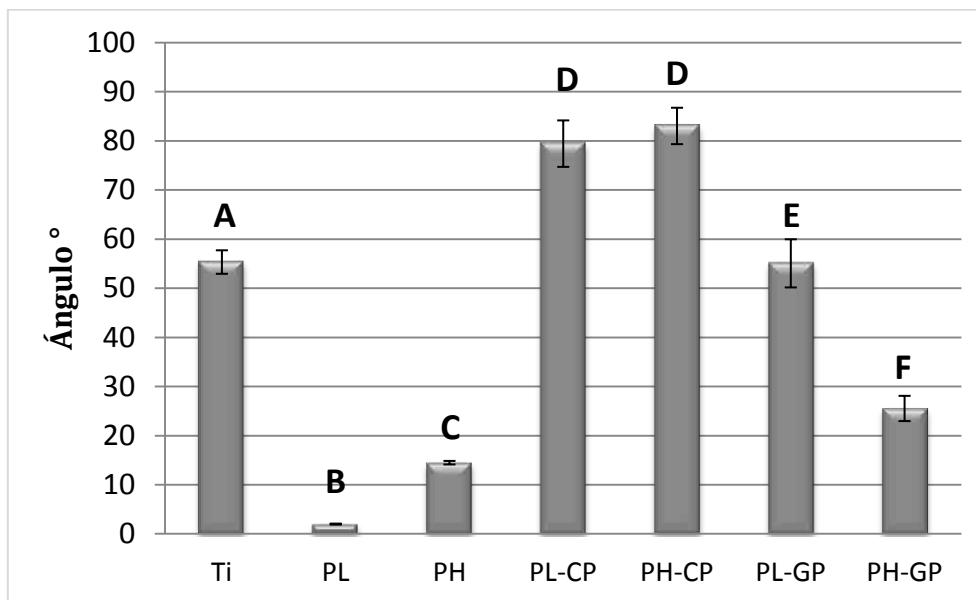


Figura 2.15: Ángulo de contacto, medido con agua sobre las diferentes superficies de titanio antes y después de la silanización. Las muestras que comparten símbolo no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Sin embargo, se observaron algunas diferencias entre las muestras tratadas con los distintos silanos, siendo más hidrofóbicas las muestras silanizadas con CPTES (PL-CP y PH-CP) que las muestras silanizadas con GPTES (PL-GP y PH-GP). Esto es debido a que el carácter hidrofóbico de un silano depende de factores como: grupos reactivos del silano con el sustrato, las condiciones de deposición y adhesión del silano, la capacidad del silano de formar una monocapa o una capa polimerizada y la naturaleza del grupo organofuncional.⁶⁰

En el caso del grupo funcional o de sustitución orgánico, estos puede ser hidrofílicos u hidrofóbicos y/o ser o no polares, alterando el comportamiento hidrofóbico del silano.⁶⁰ En nuestro caso, el Cl que se encuentra en el CPTES tiene un carácter hidrofóbico, mientras que el grupo epoxi presente en el GPTES puede tener un carácter más hidrofílico, debido a que tiene un oxígeno que puede generar puentes de hidrógeno con el agua que se deposita sobre la superficie.

En cuanto a la cantidad de silano adherido en cada caso, si todos los grupos hidroxilo disponibles reaccionan con los silanos, se obtiene una superficie más hidrofóbica. Sin embargo, si no todos los grupos OH^- reaccionan con los silanos, dejando al descubierto sitios con grupos OH^- y/o óxidos metálicos, capaces de interaccionar con el agua por medio de puentes de hidrógeno, el resultado es un aumentando de la hidrofiliidad. Es posible que, en el caso del GPTES, la menor hidrofobicidad se deba a ambos factores. Esto se podrá analizar con más detenimiento en los análisis realizados mediante XPS, donde se podrá determinar la cantidad de silano enlazado sobre cada superficie.

b) ToF-SIMS

En las Figuras 2.16 a - d, se muestran los espectros obtenidos mediante los análisis por ToF SIMS de las muestras antes y después del tratamiento de silanización. En las muestras silanizadas tanto con CPTES como con GPTES se detectó la presencia de dos picos típicos atribuidos a los silanos, el SiO_2 en un valor $m/z = 60$, y el Si_3H_9 en un valor $m/z=73$ (Figura 2.16 a y b).^{61,62} En la superficie de las muestras hidroxiladas (PL y PH) se observaron picos relacionados con el silicio pero con intensidades muy bajas, que se pueden atribuir a la contaminación de sílica coloidal tal como se observó en los resultados de XPS.

Por otro lado, en la superficie silanizada con CPTES se observaron dos picos con alta intensidad a $m/z = 35$ y 37 , atribuidos al Cl presente en el CPTES (Figuras 2.16 c y d), confirmando la presencia de este silano sobre la superficie. De igual forma este pico aparece sobre las muestras control y hidroxiladas, pero con una intensidad mucho menor que la registrada para la muestra silanizada ($\text{Ti puro} = 0.6 \cdot 10^4$, $\text{PH} = 0.8 \cdot 10^4$, $\text{CP} = 3 \cdot 10^4$). En estas muestras la presencia de Cl ha sido atribuida a contaminación del equipo.

Finalmente se pudo observar que la intensidad de los picos ubicados a $m/z = 16$ y 17 atribuidos a los óxidos y los grupos OH^- , disminuye después de la silanización, indicando la presencia de una nueva capa sobre la superficie, y sugiriendo el enlace entre las moléculas de silano y los grupos OH^- de la superficie.

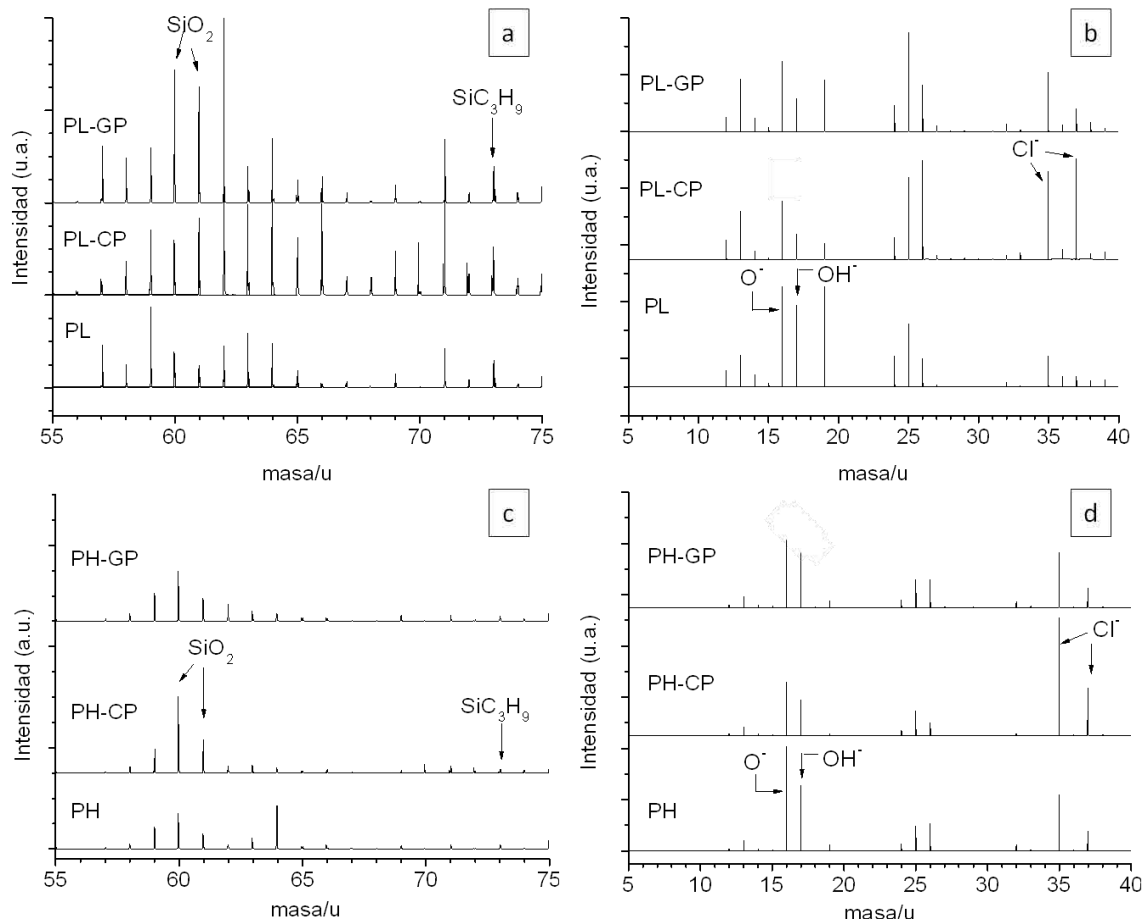


Figura 2.16: Espectros de ToF SIMS de los fragmentos de moléculas presentes sobre las superficies de titanio después de los tratamientos de activación y silanización. Presencia de fragmentos atribuidos a los silano, sobre las muestras silanizadas, previamente tratadas con plasma (PL-CP y PL-GP) (a) y piraña (PH-CP y PH-GP) (c). Presencia del ión cloro sobre las muestras silanizadas con CPTES, previamente activadas con plasma (b) y con piraña (d).

c) XPS

En la Tabla 2.6, se muestra un resumen de los porcentajes de los elementos químicos detectados en los espectros generales de las muestras silanizadas (PL-CP, PL-GP, PH-CP y PH-GP). De igual forma, se han puesto los elementos detectados sobre las muestras sin silanizar (Ti, PL y PH), con el fin de comparar como varían los porcentajes de los elementos químicos después del proceso de silanización. Al comparar los espectros de las muestras silanizadas con los obtenidos en las muestras sin silanizar, se observó una disminución del pico de titanio (Ti2p), sugiriendo que después del proceso de silanización hay una nueva capa sobre la superficie.

Tabla 2.6: Porcentaje atómico de los elementos presentes sobre las muestras antes (blanco) y después (gris) del proceso de silanización

Muestra	Elemento (at %)						
	C1s	N1s	O1s	Si2p	Cl2p	Ti2p	Na1s
Ti	33,2 ± 3,3	0,1 ± 0,1	27,9 ± 1,6	0,2 ± 0,2	0,0 ± 0,0	3,5 ± 0,3	35,1 ± 1,3
PL	10,0 ± 3,7	1,6 ± 0,4	48,0 ± 2,3	2,0 ± 1,0	0,2 ± 0,1	16,9 ± 0,7	21,5 ± 3,6
PL-CP	21,6 ± 2,0	0,6 ± 0,4	49,5 ± 0,6	5,4 ± 0,3	2,3 ± 0,1	11,3 ± 1,3	9,5 ± 0,6
PL-GP	15,6 ± 2,8	0,8 ± 0,4	53,9 ± 0,8	3,4 ± 0,6	0,4 ± 0,0	13,4 ± 1,3	12,4 ± 2,8
PH	18,2 ± 0,1	1,0 ± 0,4	47,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,2 ± 0,2	21,3 ± 0,3	7,4 ± 0,3
PH-CP	23,7 ± 1,3	0,0 ± 0,0	55,4 ± 1,1	4,0 ± 0,3	3,1 ± 0,2	13,8 ± 0,5	0,0 ± 0,0
PH-GP	21,4 ± 1,7	0,0 ± 0,0	56,4 ± 2,3	2,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0	20,2 ± 0,4	0,0 ± 0,0

Por otro lado se observó un aumento en los picos de silicio, oxígeno y carbono en todas las muestras silanizadas. Como se ha descrito antes, el silicio es el principal componente de los silanos, por lo tanto el aumento del pico Si2p confirma la presencia de la nueva capa de silanos sobre la superficie.⁶³ Se observó que la cantidad de Si fue mayor sobre las muestra silanizadas con CPTES (PL-CP = 5,4 y PH-CP = 4,0) que con GPTES (PL-GP = 3,4 y PH-GP = 2,0), lo que sugiere que hay mayor cantidad de CPTES sobre las superficies. La presencia del Cl2p en las muestras de PL-CP y PH-CP observado alrededor de 200eV, corresponde a la presencia del cloropropil del CPTES. En general se observó una composición química muy similar en todas las superficies silanizadas, tanto las previamente tratadas con plasma como con piraña, lo que indica que la rugosidad producida por el tratamiento de piraña no influyó de manera significativa en la silanización. Para determinar la cantidad de silanos y de qué manera están enlazados a la superficie, es necesario analizar con detalle los espectros de alta resolución de los picos de O1s y C1s.

En las Figuras 2.17 a y b y en las Tablas 2.7 a y b, se muestran los picos y los porcentajes correspondientes a la deconvolución de los espectros de alta resolución del O1s, detectados sobre las muestras antes y después de la silanización. Lo primero que se puede observar, es la disminución de los picos ubicados \approx 530 eV y 531 eV correspondientes al óxido de titanio (O^{2-}) y a los grupos hidroxilo (OH^-) que se encuentran en la superficie antes del proceso de silanización.

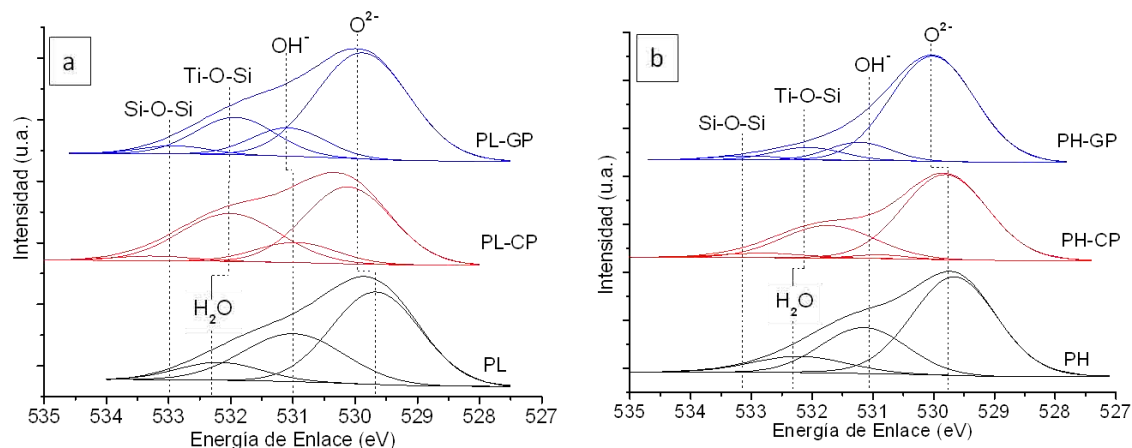


Figura 2.17: Espectros de alta resolución del pico O1s obtenidos en las muestras de plasma (a) y de piraña (b), antes y después del proceso de silanización

Tabla 2.7: Porcentaje atómico de las especies presentes en el pico O1s del grupo de muestras tratadas con plasma (a) y con piraña (b) antes y después del proceso de silanización

(a) Deconvolución del pico O 1s del grupo de muestras de plasma			PL	PL-CP	PL-GP
Porcentaje general del O1s					
			48	49,5	53,9
Porcentaje de los subpicos					
1	O²⁻	529,9 ± 0,2	25,2	24,8	34,5
2	OH⁻	531,0 ± 0,1	17,9	5,0	7,2
3	H₂O / Ti-O-Si	532,2 ± 0,2	4,9	17,4	10,3
4	Si-O-Si	533,2 ± 0,1	0	2,3	1,9
3+4/1+2			-----	0,7	0,3

(b) Deconvolución del pico O 1s del grupo de muestras de piraña			PH	PH-CP	PH-GP
Porcentaje general del O1s					
			47	55,4	56,4
Porcentaje de los subpicos					
1	O²⁻	529,9 ± 0,2	28,8	37,3	45,0
2	OH⁻	531,0 ± 0,1	13,0	1,0	5,7
3	H₂O / Ti-O-Si	532,2 ± 0,2	5,2	15,1	4,4
4	Si-O-Si	533,2 ± 0,1	0,0	2	1,3
3+4/1+2			-----	0,5	0,1

Se observó un aumento del pico ubicado cerca a 532 eV, que según la literatura se atribuye a la superposición de la señal del enlace Ti-O-Si sobre la señal del pico de H₂O observada en las muestras sin silanizar.^{48,63,64} El hecho de que la señal del H₂O y el enlace con el silano no se puedan deconvolucionar por separado, se debe a que

comparten energías de enlace (eV) muy cercanas. Por otro lado, se debió introducir un nuevo pico a 533eV, que según la literatura se ajusta a la presencia del enlace Si-O-Si que se da entre las moléculas de los silanos después del proceso de hidrólisis (Figs. 2.17 a y b y Tabla 2.7).^{13,45,63-65} Con la presencia de estos dos últimos tipos de enlaces, podemos asegurar que los silanos no solo están presentes sobre la superficie, sino que además se encuentran unidos a la superficie del titanio de manera covalente a través del oxígeno proveniente de los OH⁻ creados previamente sobre la superficie. Esto confirma que el proceso de silanización con ambos tipos de silanos ha sido exitoso.

Al analizar los porcentajes atómicos de cada especie presente en el pico O1s (Tablas 2.7), podemos ver que las muestras silanizadas con CPTES presentan mayor porcentaje de las especies Ti-O-Si y Si-O-Si (relacionada con la cantidad de silano sobre la superficies) que las silanizadas con GPTES. De igual forma al realizar la ratio de los picos 3 y 4 asociados a la presencia del silano, sobre los picos 1 y 2 correspondientes con la disminución de los porcentajes de los óxidos de titanio y los grupo hidroxilo después de la silanización ($3+4/1+2$), se observó que esta ratio es mayor sobre las muestras silanizadas con CPTES que con GPTES, tanto las previamente tratadas con plasma (PL-CP = 0.7 > PL-GP = 0.3) como las previamente tratadas con piraña (PH-CP = 0.5 > PH-GP = 0.1). Lo anterior coincide con lo observado en la Tabla 2.7 donde el porcentaje atómico del Si2p es mayor en las muestras silanizadas con CPTES que con GPTES: PL-CP = 5,4±0.3% > PL-GP = 3,4±0.6% y PH-CP = 4,0±0.3% > PH-GP = 2,0±0.5%.

Por otro lado, el hecho de que el porcentaje del pico correspondiente a los grupos hidroxilo (≈ 531 eV) haya disminuido pero no en su totalidad, indica que sobre la superficie quedan grupos OH⁻ que no reaccionaron con el silano, y que por lo tanto el proceso de silanización con ambos silanos no tiene una eficiencia del 100%. Sin embargo se observó que el porcentaje de grupos es menor en las muestras silanizadas con CPTES que con GPTES (PL-CP = 5 < PL-GP = 7,2% y PH-CP = 1 < PH-GP = 5,7%), confirmando nuevamente que la silanización con este silano es más eficiente.

En las Figuras 2.18 a y b y en las Tabla 2.8, se muestran los picos y los porcentajes correspondientes a la deconvolución de los espectro de alta resolución del C1s, detectados sobre las muestras antes y después de la silanización.

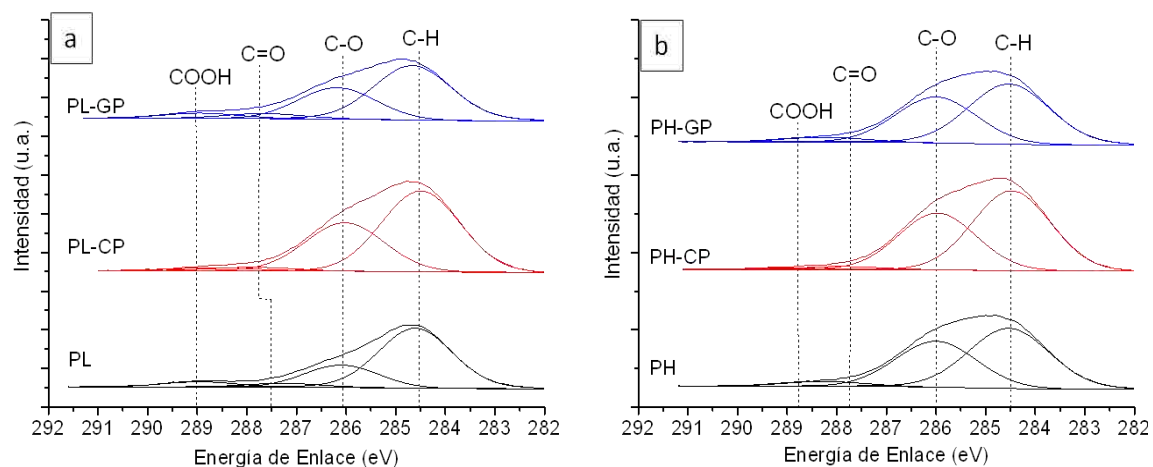


Figura 2.18: Espectros de alta resolución del pico C1s obtenidos en las muestras de plasma(a) y piraña (b) antes y después del proceso de silanización

Tabla 2.8: Porcentaje atómico de las especies presentes en el pico C1s del grupo de muestras tratadas con plasma (a) y con piraña (b) antes y después del proceso de silanización

(a) Deconvolución del pico C 1s del grupo de muestras de plasma			PL	PL-CP	PL-GP
Porcentaje general de C 1s					
			10	21,6	15,6
Porcentaje de los subpicos					
Subpicos	Enlace	EE (eV)			
1	C-H , C-C	284,6 ± 0,06	6,6	14,0	9,1
2	C-O	286,1 ± 0,17	2,3	6,3	4,9
3	C=O	287,7 ± 0,49	0,5	0,6	1,2
4	COOH	289,2 ± 0,16	0,6	0,7	0,4

(b) Deconvolución del pico C 1s del grupo de muestras de piraña			PH	PH-CP	PH-GP
Porcentaje general de C 1s					
			18,2	23,7	21,4
Porcentaje de los subpicos					
Subpicos	Enlace	EE (eV)			
1	C-H , C-C	284,6 ± 0,06	9,3	13,4	11,7
2	C-O	286,1 ± 0,17	6,8	9,6	7,8
3	C=O	287,7 ± 0,49	1,3	0,5	1,4
4	COOH	289,2 ± 0,16	0,8	0,2	0,5

En el pico ubicado a 284,6eV, correspondiente a los enlaces C-H y C-C se observó un incremento después de la silanización, debido a las cadenas hidrocarbonadas presentes en la estructura de los silanos. También se observó, un incremento en

los picos ubicados a $\approx 286, 288$ y 289 eV, que se han atribuido a especies químicas presentes en ambos silanos.^{5,45,47,66} Se observó además que el incremento fue mayor sobre el pico ubicado a $284,6$ eV, correspondiente a la cadena hidrocarbonada de los silanos sobre las muestras silanizadas con CPTES que con GPTES (PL-CP = $14,0\%$ > PL-GP = $8,9\%$ y PH-CP = $13,4\%$ > PH-GP = $11,7\%$), confirmando nuevamente que hay mayor cantidad de silano sobre las superficies CP, como se observó en la deconvolución del pico de O1s.

Lo observado en la deconvolución del pico de O1s y C1s, y en el porcentaje general del pico de Si2p, donde se observó menos cantidad de silano adherido en las superficies silanizadas con GPTES y más cantidad de OH⁻ libres, explica el por qué las superficies silanizadas con GPTES mostraron un comportamiento menos hidrofóbico (ángulo medio < 50°) que las silanizadas con CPTES (ángulo medio > 80°) en los resultados de ángulo de contacto (Figura 2.15).

Es importante considerar que una menor cantidad de silano sobre la superficie y un carácter menos hidrofóbico, pueden ser factores que influyan en la cantidad de biomolécula que se pueda inmovilizar. Por un lado, algunos autores han reportado que las biomoléculas se adsorben en mayor cantidad sobre superficies hidrofóbicas.⁶⁷⁻⁶⁹ Por otro lado, un menor número de moléculas de silano, implica un menor número de sitios disponibles a los cuales se pueda enlazar la biomolécula, y esto puede conllevar a una menor cantidad de proteína adherida. El posible efecto que estas características puedan tener sobre la inmovilización de biomoléculas, se discutirán en más profundidad en el próximo capítulo donde analizaremos la inmovilización del colágeno tipo I sobre las diferentes superficies de titanio estudiadas.

2.5 CONCLUSIONES

Limpieza y activación de las superficies de titanio:

1) Las muestras tratadas con PH mostraron un incremento en la rugosidad ($R_a \approx 144$ nm) al compararla con las muestras tratadas con PL ($R_a \approx 18$ nm). Esta diferencia produce un incremento notorio en el área superficial, la cual es el doble en las muestras tratadas con PH.

2) El tratamiento que reduce en mayor cantidad los contaminantes en la superficie es el plasma, como demuestra la disminución del carbono determinada mediante el estudio de la deconvolución del espectro de XPS del pico correspondiente al C 1s.

3) Las muestras tratadas con plasma presentaron mayor número de grupos OH⁻. La cantidad de grupos hidroxilo activos sobre las superficies, se identificó de manera semicuantitativa a través de la deconvolución del espectro del pico de O 1s, donde la ratio de OH⁻/O₂⁻ fue mayor en el caso de la muestra de PL. La mayor cantidad de grupos hidroxilo en las muestras de PL, fue confirmada a través de la técnica de sustitución del complejo de zinc.

Silanización de las superficies de titanio:

1) La presencia de de los picos correspondientes al silicio y a los fragmentos típicos que acompañan a este elemento en los espectros obtenidos por ToF-SIMS y XPS, confirman la eficiencia del método de silanización de las superficies de titanio propuesto. Se pudo confirmar la formación del enlace covalente entre los silanos y la superficie del titanio, mediante la identificación del enlace Ti-O-Si, que se atribuyó al aumento del pico ubicado a 532 eV de la deconvolución del espectro de alta resolución del pico de O1s.

2) Utilizando el CPTES se logró enlazar una mayor cantidad de moléculas de silano, que con el GPTEs. Esto se comprobó a través de los estudios de XPS donde se realizó un análisis semicuantitativo de la cantidad de silicio enlazado, respecto a los OH⁻ disponibles sobre las superficie, obteniéndose una ratio Ti-O-Si + Si-O-Si/OH⁻ + O₂⁻ mayor para las muestras de silanizadas con CPTES, tanto previamente tratadas con plasma como con piraña. Asimismo, se observó una mayor cantidad de C1s (especialmente hidrocarburos) y una mayor de Si2p sobre las muestras silanizadas con CPTES, confirmando una mayor cantidad de silanos sobre estas superficies.

3) En las muestras silanizadas no se observaron diferencias significativas en la composición química de las superficies previamente tratadas con plasma en comparación con las previamente tratadas con piraña.

4) Una mayor adhesión de silano sobre las superficie, tiene como efecto una superficie más hidrofóbica, como se comprobó en los resultados de ángulo de contacto donde las muestras silanizadas con CPTES mostraron un comportamiento altamente hidrofóbico, mientras que en las muestras silanizadas con GPTES la hidrofobicidad fue inferior debido probablemente a los grupos OH⁻ que no reaccionaron con este silano y/o a la posible generación de puentes de hidrógeno entre el grupo epoxi del GPTES y el agua.

2.6 REFERENCIAS

1. Schuler M, Trentin D, Textor M, Tosatti SGP. Biomedical interfaces: titanium surface technology for implants and cell carriers. *Nanomedicine*. 2006;1(4):449-463.
2. Chen C, Zhang S-M, Lee I-S. Immobilizing Bioactive Molecules onto Titanium Implants to Improve Osseointegration. *Surface and Coatings Technology*. 2012.
3. Schreiber F. Structure and growth of self-assembling monolayers. *Progress in Surface Science*. 2000;65(5-8):151-257.
4. Schliephake H, Scharnweber D. Chemical and biological functionalization of titanium for dental implants. *Journal of Materials Chemistry*. 2008;18(21):2404.
5. Iucci G, Battocchio C, Dettin M, Ghezzi F, Polzonetti G. An XPS study on the covalent immobilization of adhesion peptides on a glass surface. *Solid State Sciences*. 2010;12(11):1861-1865.
6. Costa F, Carvalho IF, Montelaro RC, Gomes P, Martins MCL. Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta biomaterialia*. 2011;7(4):1431-40.
7. Chen J, Cao J, Wang J, et al. Biofunctionalization of titanium with PEG and anti-CD34 for hemocompatibility and stimulated endothelialization. *Journal of colloid and interface science*. 2012;368(1):636-47.
8. Maoz R, Sagiv J. Hydrogen-bonded multilayers of self-assembling silanes: structure elucidation by combined Fourier transform infra-red spectroscopy and X-ray scattering techniques. *Supramolecular Science*. 1995;2(1):9-24.

9. Stevens MJ. Thoughts on the Structure of Alkylsilane Monolayers. *Langmuir*. 1999;15(13):2773-2778.
10. Ulman A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chemical reviews*. 1996;96(4):1533-1554.
11. Ratner BD, Hoffman AS. Physicochemical Surface Modification of Materials Used in Medicine. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, eds. *Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine*. 2nd ed. San Diego, California - USA: Elsevier Academic Press; 2004:201-215.
12. van Ooij WJ, Sabata A. Characterization of films of organofunctional silanes by TOF SIMS and XPS. In: Mittal KL, ed. *Silanes and Other Coupling Agents*. 2nd ed. Netherlands; 2000:323-343.
13. Matinlinna JP, Ozcan M, Lassila LVJ, Vallittu PK. The effect of a 3-methacryloxypropyltrimethoxysilane and vinyltriisopropoxysilane blend and tris(3-trimethoxysilylpropyl)isocyanurate on the shear bond strength of composite resin to titanium metal. *Dental materials*. 2004;20(9):804-13.
14. Cohen D. 3D Surface Texture Parameters. In: *Glossary of Surface Texture Parameters*. Livonia, Michigan, USA: Michigan Metrology, LLC; 2002:1 - 39.
15. Group VM. Surface Parameters. In: Group VM, ed. *Interferometry Manual - WYKO NT1100*. Tucson. Arizona; 1999:1 - 23.
16. Pegueroles M, Gil F, Planell J, Aparicio C. The influence of blasting and sterilization on static and time-related wettability and surface-energy properties of titanium surfaces. *Surface and Coatings Technology*. 2008;202(15):3470-3479.
17. Kolasińska M, Warszyński P. The effect of support material and conditioning on wettability of PAH/PSS multilayer films. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*. 2005;66(1-2):65-70.
18. Cacciafesta P. Visualisation of human plasma fibrinogen adsorbed on titanium implant surfaces with different roughness. *Surface Science*. 2001;491(3):405-420.
19. Weber M, Vasella A, Textor M, Spencer N. Glycosylidene Carbenes. Part 27. Glucosidation of titanium dioxide with 1-aziglucoses: Preparation and characterization of modified titanium-dioxide surfaces. *Helvetica Chimica Acta*. 1998;81(5-8):1359-1372.
20. Zreiqat H, Howlett CR. Titanium substrata composition influences osteoblastic phenotype: In vitro study. *Journal of biomedical materials research*. 1999;47(3):360-6.
21. Nanci A, Wuest JD, Peru L, et al. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *Journal of biomedical materials research*. 1998;40(2):324-35.

22. MacDonald DE, Rapuano BE, Deo N, et al. Thermal and chemical modification of titanium-aluminum-vanadium implant materials: effects on surface properties, glycoprotein adsorption, and MG63 cell attachment. *Biomaterials*. 2004;25(16):3135-46.
23. Middleton CA, Pendegrass CJ, Gordon D, Jacob J, Blunn GW. Fibronectin silanized titanium alloy: A bioinductive and durable coating to enhance fibroblast attachment in vitro. 2007.
24. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clinical oral implants research*. 2009;20 Suppl 4:172-84.
25. Price RL, Waid MC, Haberstroh KM, Webster TJ. Selective bone cell adhesion on formulations containing carbon nanofibers. *Biomaterials*. 2003;24(11):1877-1887.
26. Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, et al. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000;51(3):475 - 483.
27. Bacakova L, Grausova L, Vacik J, Fraczek A, Blazewicz S. Improved adhesion and growth of human osteoblast-like MG 63 cells on biomaterials modified with carbon nanoparticles. *Diamond & Related Materials*. 2007;16:2133-2140.
28. Vagaská B, Bacáková L, Filová E, Balík K. Osteogenic cells on bio-inspired materials for bone tissue engineering. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2010;59(3):309-22.
29. Rechendorff K. The influence of surface roughness on protein adsorption PhD Thesis. Department of Physics and Astronomy and Interdisciplinary Nanoscience Center. University of Aarhus, Dinamarca. 2006;(February).
30. Song W, Chen H. Protein adsorption on materials surfaces with nanotopography. *Chinese Science Bulletin*. 2007;52(23):3169-3173.
31. Adamczak M, Scisłowska-Czarnecka A, Genet MJ, Dupont-Gillain CC, Pamuła E. Surface characterization, collagen adsorption and cell behaviour on poly(L-lactide-co-glycolide). *Acta of Bioengineering and Biomechanics*. 2011;13(3):63-75.
32. Bacakova L, Filova E, Parizek M, Ruml T, Svorcik V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances*. 2011;29(6):739-767.
33. Aparicio Bádenas C. Tratamientos de superficie sobre titanio comercialmente puro para la mejora de la osteointegración de los implantes dentales. Tesis Doctoral. Departamento de Materiales e Ingeniería Metalúrgica. Universidad Politécnica de Cataluña. 2005.

34. Choi S-woo, Choi W-beom, Lee Y-hi, Ju B-kwon, Kim B-ho. Effect of Oxygen Plasma Treatment on Anodic Bonding. *Journal of the Korean Physical Society*. 2001;38(3):207-209.
35. Serro A, B.Saramago. Influence of sterilization on the mineralization of titanium implants induced by incubation in various biological model fluids. *Biomaterials*. 2003;24(26):4749-4760.
36. Mas-Moruno C, Espanol M, Montufar EB, et al. Bioactive Ceramic and Metallic Surfaces for Bone Engineering. In: Taubert A, Mano JF, Rodríguez-Cabello C, eds. *Biomaterials Surface Science*. First. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2013:337 - 374.
37. Adden N, Gamble LJ, Castner DG, et al. Synthesis and characterization of biocompatible polymer interlayers on titanium implant materials. *Biomacromolecules*. 2006;7(9):2552-9.
38. Viornerly C, Chevolut Y, Léonard D, et al. Surface Modification of Titanium with Phosphonic Acid To Improve Bone Bonding: Characterization by XPS and ToF-SIMS. *Langmuir*. 2002;18(7):2582-2589.
39. Hennessy KM, Pollot BE, Clem WC, et al. The effect of collagen I mimetic peptides on mesenchymal stem cell adhesion and differentiation, and on bone formation at hydroxyapatite surfaces. *Biomaterials*. 2009;30(10):1898-909.
40. Sargeant TD, Rao MS, Koh C-Y, Stupp SI. Covalent functionalization of NiTi surfaces with bioactive peptide amphiphile nanofibers. *Biomaterials*. 2008;29(8):1085-98.
41. Takeda S. Surface OH group governing adsorption properties of metal oxide films. *Thin Solid Films*. 1999;339(1-2):220-224.
42. Kilpadi DV, Raikar GN, Liu J, et al. Effect of surface treatment on unalloyed titanium implants: spectroscopic analyses. *Journal of biomedical materials research*. 1998;40(4):646-59.
43. Moulder JF, Stickle WF, Sobol PE. *Hanbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy*. 1992.
44. Sakamoto H, Hirohashi Y, Saito H, et al. Effect of active hydroxyl groups on the interfacial bond strength of titanium with segmented polyurethane through gamma-mercapto propyl trimethoxysilane. *Dental materials journal*. 2008;27(1):81-92.
45. Xiao SJ, Textor M, Spencer ND, Sigrist H. Covalent attachment of cell-adhesive, (Arg-Gly-Asp)-containing peptides to titanium surfaces. *Langmuir*. 1998;14(19):5507-5516.

46. Landoulsi J, Genet MJ, Kirat KE, et al. Silanization with APTES for Controlling the Interactions Between Stainless Steel and Biocomponents: Reality vs Expectation. 2010.
47. Tanaka Y, Saito H, Tsutsumi Y, et al. Active Hydroxyl Groups on Surface Oxide Film of Titanium, 316L Stainless Steel and Cobalt-Chromium-Molybdenum Alloy, and its Effects on the Immobilization of Poly(Ethylene Glycol). *Materials Transactions*. 2008;49(4):805 - 811.
48. Mekhalif Z, Cossement D, Hevesi L, Delhalle J. Electropolymerization of pyrrole on silanized polycrystalline titanium substrates. *Applied Surface Science*. 2008;254:4056-4062.
49. Chen X, Sevilla P, Aparicio C. Surface biofunctionalization by covalent co-immobilization of oligopeptides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013;107:189-197.
50. Lori J a., Hanawa T. Characterization of adsorption of glycine on gold and titanium electrodes using electrochemical quartz crystal microbalance. *Corrosion Science*. 2001;43(11):2111-2120.
51. Iucci G, Dettin M, Battocchio C, et al. Novel immobilizations of an adhesion peptide on the TiO₂ surface: An XPS investigation. *Materials Science and Engineering: C*. 2007;27(5-8):1201-1206.
52. Azoulay A. The initial interactions of oxygen with polycrystalline titanium surfaces. *Surface Science*. 1997;370(1):1-16.
53. Feng Q. Controlled crystal growth of calcium phosphate on titanium surface by NaOH-treatment. *Journal of Crystal Growth*. 1999;200(3-4):550-557.
54. Lu G, Bernasek SL, Schwartz J. Oxidation of a polycrystalline titanium surface by oxygen and water. *Surface Science*. 2000;458(1-3):80-90.
55. Bertoti I, Mohai M, Sullivan J, Saied S. Surface characterisation of plasma-nitrided titanium: an XPS study. *Applied Surface Science*. 1995;84(4):357-371. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0169433294005451>. Accessed February 15, 2011.
56. Martin HJ, Schulz KH, Walters KB. Piranha Treated Titanium Compared to Passivated Titanium as Characterized by XPS. *Surface Science Spectra*. 2008;15(1):23.
57. Hanawa T, Kon M, Doi H, et al. Amount of hydroxyl radical on calcium-ion-implanted titanium and point of zero charge of constituent oxide of the surface-modified layer. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1998;9(2):89-92.

58. Arkles B, Pan Y, Kim YM. The Role of Polarity in the Structure of Silanes Employed in Surface Modification. In: Koninklijke Brill NV L, ed. *Silanes and Other Coupling Agents*. Vol 5. Vol. 5. Morrisville, Pensilvania; 2009:51 - 64.
59. Hozumi A, Cheng DF, Yagihashi M. Hydrophobic/superhydrophobic oxidized metal surfaces showing negligible contact angle hysteresis. *Journal of colloid and interface science*. 2011;353(2):582-7.
60. Arkles B. Hydrophobicity, Hydrophilicity and Silanes. *Paint & Coatings Industry magazine*. 2006;(October).
61. Bexell U. Surface Characterisation Using ToF-SIMS, AES and XPS of Silane Films and Organic Coatings Deposited on Metal Substrates. *Science And Technology*. 2003.
62. Aoyagi S, Moritani K, Mochiji K. Evaluation of immobilized polypeptides with different C-terminal residues using argon gas-cluster SIMS. *Surface and Interface Analysis*. 2011;43(1-2):344-349.
63. Tsiourvas D, Tsetsekou A, Arkas M, Diplas S, Mastrogianni E. Covalent attachment of a bioactive hyperbranched polymeric layer to titanium surface for the biomimetic growth of calcium phosphates. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2011;22(1):85-96.
64. Martin H, Schulz K, Bumgardner J, Walters K. An XPS study on the attachment of triethoxysilylbutyraldehyde to two titanium surfaces as a way to bond chitosan. *Applied Surface Science*. 2008;254(15):4599-4605.
65. Mani G, Feldman MD, Oh S, Agrawal CM. Surface modification of cobalt-chromium-tungsten-nickel alloy using octadecyltrichlorosilanes. *Applied Surface Science*. 2009;255(11):5961-5970.
66. Sevilla P, Godoy M, Salvagni E, Rodríguez D, Gil FJ. Biofunctionalization of titanium surfaces for osseointegration process improvement. *Journal of Physics: Conference Series*. 2010;252:012009.
67. Llopis-Hernández V, Rico P, Ballester-Beltrán J, Moratal D, Salmerón-Sánchez M. Role of surface chemistry in protein remodeling at the cell-material interface. *PloS one*. 2011;6(5):e19610.
68. Keselowsky BG, Collard DM, García AJ. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 2003;66(2):247-59.
69. Elliott JT, Woodward JT, Umarji A, Mei Y, Tona A. The effect of surface chemistry on the formation of thin films of native fibrillar collagen. *Biomaterials*. 2007;28(4):576-85.

3

INMOVILIZACIÓN DE COLÁGENO SOBRE LAS SUPERFICIES DE TITANIO MODIFICADAS

3.1 INTRODUCCIÓN

En el capítulo 2 se describieron los tratamientos de activación y de silanización de superficies de titanio y se caracterizaron las superficies desde un punto de vista físico-químico con el fin de determinar la cantidad y el tipo de iones y/o moléculas presentes sobre dichas superficies. En el presente capítulo se da un paso más, al inmovilizar colágeno sobre las superficies de titanio previamente activadas y silanizadas con el fin de obtener una superficie bioactiva. Con la inmovilización del colágeno tipo I se busca acelerar los procesos de sellado biológico, ya que se ha demostrado que el colágeno tipo I favorece la respuesta de las células del tipo fibroblasto, que son responsables de los procesos de curación de los tejidos de la encía que rodean el cuello del implante.¹⁻⁴

Es sabido que uno de los factores que más influye en la inmovilización de las moléculas sobre superficies, es la química de dicha superficie. Antes de inmovilizar

la molécula, estos factores fueron analizados para determinar la cantidad y el tipo de iones y/o moléculas presentes en la superficie que influirán en la inmovilización del colágeno. En estos estudios se estableció que el plasma era el tratamiento más eficiente para la remoción de la contaminación y la generación de OH^- sobre la superficie, y que el CPTES era el silano que se adhería en mayor cantidad sobre las superficies. Los silanos son capaces de generar enlaces de tipo covalente con péptidos y/o moléculas,⁵⁻⁹ por lo tanto la finalidad de su uso en este estudio es generar un enlace más estable entre éstos y la molécula, que el obtenido mediante el proceso de fisisorción.

Con el fin de analizar el efecto de los diferentes cambios generados por los tratamientos de activación y el tratamiento de silanización con los dos silanos, se decidió estudiar todos los tipos de superficies, para determinar cuál de ellos es el más efectivo en cuanto cantidad y estabilidad del colágeno inmovilizado. Para esto se comparará la fisisorción del colágeno sobre las muestras activadas con plasma y con piraña con la inmovilización del colágeno a través del uso de los silanos, en este caso a través del CPTES y el GPTES.

Es importante destacar que en el proceso de inmovilización de moléculas que se encuentran en solución hay diferentes variables que intervienen en dicho proceso, dentro de las cuales se pueden destacar el tiempo de adhesión, el pH de la solución, la concentración de la solución y las características físico-químicas de la superficie. Por lo tanto en nuestros estudios se analizarán como estos factores influyen en la eficiencia del proceso de inmovilización de colágeno propuesto.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo General

El objetivo general de este capítulo es obtener superficies de titanio biofuncionalizadas con colágeno y caracterizar dichas superficies desde un punto de vista físico y químico.

3.2.2 Objetivos Específicos

Este objetivo general, se concreta en una serie de objetivos específicos que se describen a continuación:

1. Optimizar el proceso de disolución del colágeno para su posterior uso en la biofuncionalización. Obtener un protocolo de inmovilización sobre las diferentes superficies de titanio modificadas.
2. Caracterizar las superficies de titanio biofuncionalizadas desde un punto de vista físico-químico.
3. Comparar el efecto de la activación de la superficie de titanio, mediante plasma o por ataque químico con piraña, en la inmovilización del colágeno.
4. Comparar el efecto de la silanización con dos tipos de silanos, el CPTES y el GPTES, en la inmovilización del colágeno.
5. Comparar la estabilidad del colágeno fisisorbido y del colágeno inmovilizado sobre las diferentes superficies silanizadas.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Disolución del Colágeno

El colágeno (col) utilizado a lo largo de esta investigación ha sido facilitado por el Dr. Eduardo Jorge Herrero de los Servicio de Cirugía Experimental, de la Clínica Puerta de Hierro, Madrid – España. Éste se obtiene a partir de tejido de pericardio bovino, el cual se somete a una digestión enzimática que separa el colágeno del resto del tejido y posteriormente el colágeno que queda en suspensión es sometido a una precipitación salina. La descripción completa del protocolo utilizado se describe en Herrero et al., 1999.¹⁰

En este estudio el colágeno se disolvió en ácido acético 0.05M en una proporción 1:1 (1mg de colágeno en 1 ml de CH₃COOH) obteniéndose un pH inicial de 3. Con el fin de favorecer la unión entre los grupos funcionales del colágeno y con las superficies de titanio modificadas, el pH de la solución debió incrementarse, para favorecer el ataque nucleófilo de los grupos funcionales del colágeno sobre los grupos organofuncionales de los silanos. Para ello se añadió hidróxido de sodio 0.01M. La adición de NaOH se realizó gota a gota mientras toda la solución se mantenía en continua agitación para obtener una solución lo más homogénea posible y evitar una precipitación del colágeno. Se prepararon soluciones de pH 5, 6, y 7 con el fin de analizar cuál era el pH más alto que se podía utilizar sin que el colágeno sufriera una precipitación. La concentración final obtenida del colágeno en la solución de ácido acético más hidróxido de sodio fue de 150ug/ml. Esta concentración fue utilizada en todos los estudios realizados a lo largo de este trabajo.

3.3.2 Inmovilización del colágeno sobre la superficie de titanio modificadas

Una vez obtenidas las diferentes soluciones de colágeno, los diferentes tipos de muestras se sumergieron en éstas durante 16 horas. Después las muestras se sacaron de las soluciones y se lavaron 2 veces con ácido acético 0.05 M con el fin de eliminar el exceso de colágeno que no se adhirió.

Tabla 3.1: Nomenclatura de las superficies de titanio modificadas

Nomenclatura	Descripción de la muestra	Inmovilización del colágeno
Ti	Ti Comercialmente puro, pulido	
PL-col	Ti tratado con plasma de oxígeno	Colágeno fisisorbido sobre PL
PH-col	Ti tratado con H ₂ SO ₄ :H ₂ O ₂	Colágeno fisisorbido sobre PH
PL-CP-col	PL silanizado con CPTES	Colágeno unido covalentemente sobre PL-CP
PL-GP-col	PL silanizado con GPTES	Colágeno unido covalentemente sobre PL-GP
PH-CP-col	PH silanizado con CPTES	Colágeno unido covalentemente sobre PH-CP
PH-GP-col	PH silanizado con GPTES	Colágeno unido covalentemente sobre PH-GP

En la Tabla 3.1, se resumen las distintas superficies obtenidas después de la inmovilización del colágeno. Se obtuvieron un total de 6 tipos de superficies de titanio modificadas con colágeno aplicando diferentes tratamientos: a) fisisorción del colágeno sobre las muestras previamente tratadas con plasma y con piranha

(PL-col) (PH-col) y b) inmovilización del colágeno sobre las muestras previamente tratadas con plasma y piraña y silanizadas con CPTES y con GPTES (PL-CP-col, PL-GP-col, PH-CP-col, PH-GP-col).

3.3.3 Caracterización de las superficies

a) Visualización del colágeno inmovilizado por fluorescencia

Para visualizar el colágeno presente sobre las superficies de titanio se utilizó una molécula fluorófora denominada CBQCA [3-(4carboxybenzoyl)quinoline- 2-carboxaldehyde]. Esta molécula no es fluorescente por sí sola, pero al reaccionar con las aminas primarias presentes en el colágeno en presencia de cianuro, ésta produce fluorescencia visible dentro del rango verde del espectro visible ($\lambda = 494$ a 520 nm) (Figura 3.1).

Esto permite visualizar el colágeno sobre la superficie por medio de un microscopio óptico de fluorescencia. Mediante esta técnica se busca realizar un análisis semicuantitativo de la cantidad de colágeno inmovilizado en cada tipo de muestra, ya que el nivel de intensidad de la fluorescencia se puede medir en cada imagen a través del uso del software Image J (Version 1.41o, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

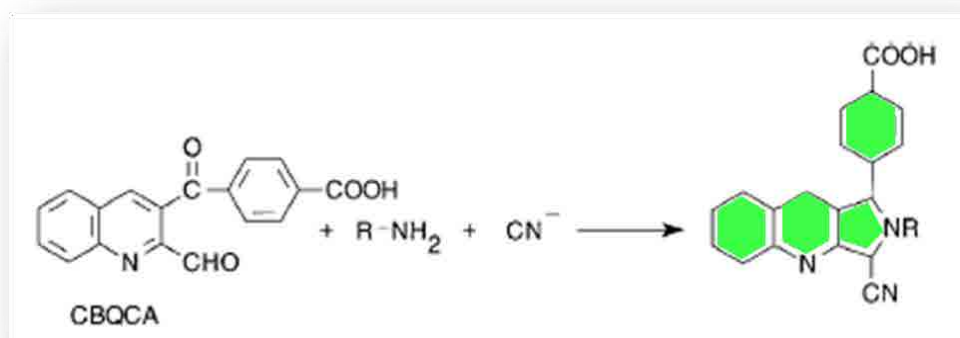


Figura 3. 1: Representación esquemática de la fluorescencia producida por la reacción entre el CBQCA y las aminas primarias presentes en las proteínas

Para visualizar el colágeno por medio de esta técnica, se preparó una solución 1mM CBQCA en 1L de metanol (MeOH) y una solución 2mM KCN en un 1L de H₂O. Se colocó cada una de las muestras dentro de una placa de pocillos. Posteriormente se puso sobre cada una de las muestras 300 μ l de la solución de KCN, que actúa

como catalizador de la reacción. Finalmente, se añadió 300 µl de la solución de CBQCA en cada muestra. Esta mezcla se dejó actuar durante 1 hora. Una vez transcurrida la hora, se retiraron los reactivos y se lavaron las muestras con H₂O/MeOH 1:1. Una vez realizado el protocolo, se obtuvieron imágenes de las superficies mediante un Microscopio óptico (Nikon, E600). Las imágenes fueron obtenidas a 10 aumentos, con luz fluorescente dentro del rango verde del espectro visible ($\lambda = 494$ a 520 nm) con un tiempo de exposición de 400ms. Las imágenes obtenidas se analizaron a partir del software Image J, mediante el cual se cuantificó la intensidad de la fluorescencia obtenida en cada imagen.

Como se ha expuesto anteriormente, para que el colágeno se pueda adherir a los silanos debe encontrarse en solución a un pH no excesivamente ácido, debido a que la reacción con los silanos es más favorable entre un pH neutro-básico. Por otra parte, es conocido que a valores de pH excesivamente básicos el colágeno tiende a precipitar, dificultando la reacción con las superficies. Por lo tanto, para optimizar el proceso de inmovilización del colágeno, se prepararon varias soluciones partiendo de un pH = 5, para determinar hasta qué pH se obtenían soluciones estables, evitando la precipitación. Para evaluar a qué pH se conseguía fijar más colágeno a la superficie, el colágeno inmovilizado a diferentes pH fue teñido con CBQCA y analizado mediante imágenes obtenidas por microscopia óptica de fluorescencia.

b) Ángulo de Contacto

Las condiciones bajo las cuales se realizaron las medidas de mojabilidad son las mismas que se describieron en el apartado 2.3.5.

c) Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry: ToF-SIMS

Después del proceso de inmovilización del colágeno sobre las diferentes superficies de titanio modificadas, se utilizó la técnica de ToF SIMS para identificar los fragmentos correspondientes a aminoácidos asociados con la presencia de colágeno sobre las superficies. Se analizaron triplicados de cada una de las condiciones estudiadas. A su vez, cada una de las muestras fue analizada 3 veces en ubicaciones elegidas aleatoriamente para asegurar la homogeneidad de la

superficie. Las condiciones bajo las cuales se realizaron estos estudios son las mismas que se describieron en el apartado 2.3.6.

d) Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X: XPS

Con el fin de comprobar la presencia del colágeno sobre las diferentes superficies de titanio estudiadas, se realizaron análisis por XPS. El estudio fue realizado por triplicado para cada una de las condiciones descritas en la Tabla 3.1. Las condiciones bajo las cuales se realizaron estos estudios son las mismas que se describieron en el apartado 2.3.4-d. Los espectros obtenidos fueron analizados a través del software denominado Multipack (v8.2).

e) Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy: OWLS

A fin de determinar la cantidad de colágeno enlazada sobre cada una de las superficies de titanio modificadas, se realizaron estudios por OWLS. Esta técnica se basa en el acoplamiento de un laser de He-Ne dentro de un chip de guía de onda después de pasar a través de una rejilla óptica (Figura 3.2).

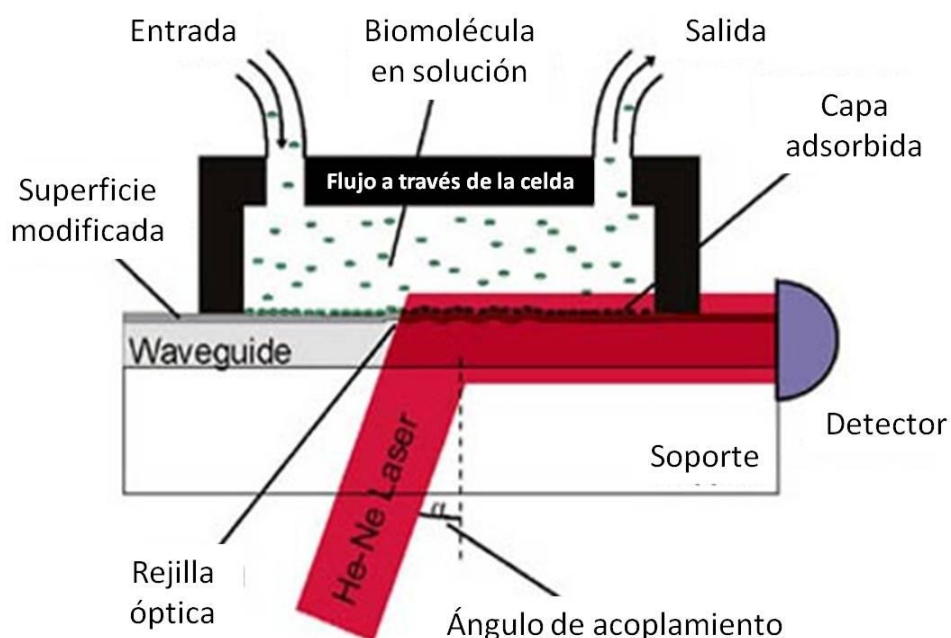


Figura 3.2: Diagrama descriptivo de la detección de campo evanescente de los procesos sobre superficies transparentes de tipo óxido metálico por medio de Espectroscopia Óptica de Guía de onda en modo de luz (Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy-OWLS)

Este acoplamiento sólo ocurre a 2 ángulos bien definidos, los cuales son sensibles a cambios en los índices de refracción de la luz dentro del campo evanescente generado sobre la superficie. Estos ángulos de acoplamiento son monitorizados cambiando continuamente el ángulo de incidencia del laser, midiendo la intensidad de la luz y los cambios del índice de refracción con un fotodetector que está ubicado en un borde del chip.

Usando los cambios del índice de refracción medidos, se puede calcular la masa adsorbida sobre la superficie a través de la formula de Feijter:

$$M = \frac{n_A - n_C}{dn/dc} \cdot d_A$$

M = masa absorbida en ng/cm²
dA = espesor óptico de la capa
n_A, n_C = índice de refracción de la molécula absorbida y del medio
Dn, dc = incrementos en el índice de refracción

Este método tiene una alta sensibilidad, de hasta unos pocos cientos de nanómetros sobre la superficie de la guía de ondas (1ng/cm²). Por otra parte, el tiempo de medida (cada 3 segundos) permite realizar un estudio en tiempo real de la cinética de adsorción de la molécula sobre la superficie en ambiente líquido.

Para realizar este estudio se requiere de una muestra especial que permita el paso de la luz a través de ella. Esta muestra, llamada chip de guía de luz (OW 2400, MicroVacuum Ltd.- Budapest, Hungría), consiste en un sustrato base de SiO₂ con un recubrimiento de TiO₂ realizado mediante “sputtering” o pulverización catódica. Bajo estas condiciones se obtiene una capa de TiO₂ de ~ 12 nm de espesor la cual es considerada como suficientemente gruesa para evitar que las propiedades del SiO₂ intervengan en el proceso de adhesión de moléculas pero a su vez lo suficientemente delgada para no alterar la sensibilidad del detector.¹¹

Al tener la guía de luz recubierta con TiO₂, ésta se puede tratar de la misma forma que la superficie de un sustrato de titanio, permitiendo realizar sobre ella los procesos de activación y silanización. Sin embargo, no se pudo realizar sobre ésta el proceso de activación por piraña, ya que al ser un ataque químico agresivo

podría eliminar parte de la superficie y dejar al descubierto zonas donde quede expuesto el SiO₂. Por este motivo se realizó únicamente la activación por plasma. Los experimentos de adsorción se realizaron a 25°C. Una vez colocado el chip dentro de la celda de flujo, se hizo circular una solución buffer de 10 mM HEPES suplementado con 150 mM de NaCl para simular fuerza iónica fisiológica, a una velocidad de 200µl/min mediante el uso de una bomba peristáltica que mantiene en flujo continuo. El HEPES es una sal que solubilizada en agua permite obtener una solución tampón, es decir, una solución que mantiene un pH estable dentro de ciertos límites, a pesar de variaciones de concentraciones de iones hidrogeno [H⁺] o de hidroxilo [OH⁻]. La solución buffer se dejó actuar sobre la superficie durante unos minutos hasta alcanzar estabilidad en la medida. Esta estabilidad es definida cuando el valor de la variación en los ng/cm² es <1. De esta manera se obtuvo una línea base a partir de la cual se comenzó a cuantificar la cantidad de proteína adsorbida. El HEPES se pone como línea base por dos motivos: 1) el equipo tiene en su programa los valores del índice de refracción del HEPES, con lo cual es más fácil calcular los cambios de los índices de refracción que ocurre en la superficie y 2) para ver como la proteína adsorbida responde en un entorno parecido al fisiológico.

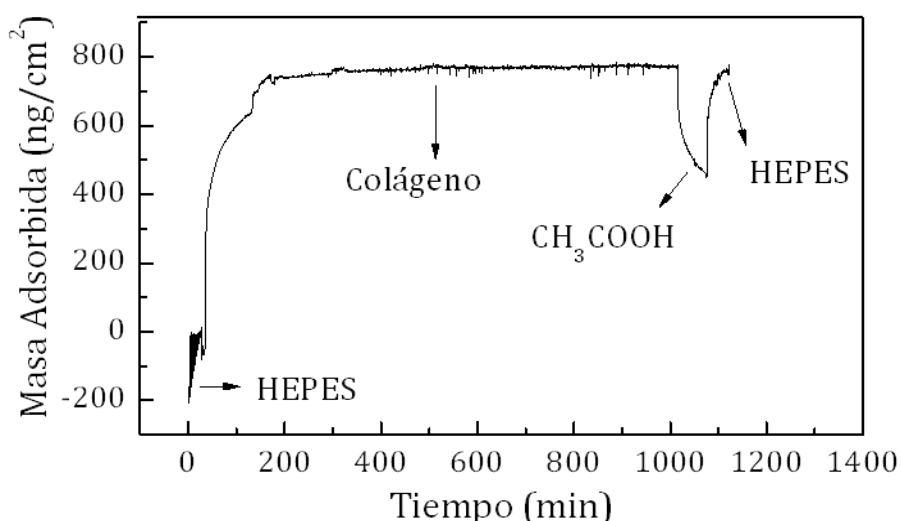


Figura 3.3: Grafica de la evolución del proceso de cuantificación del colágeno adsorbido sobre las superficies de titanio modificadas, mediante análisis por OWLS

Una vez obtenida la línea base, se bombeó dentro de la celda la solución de colágeno a una velocidad de 58.3 µl/min y se dejó en circulación durante 16 horas, siguiendo el protocolo definido anteriormente (3.3.2). Después de la adsorción, se

hizo circular una solución de ácido acético, para eliminar el exceso de colágeno no adherido o enlazado de manera débil. Este lavado se realizó durante 1 hora hasta alcanzar una línea estable. A continuación, se realizó un segundo lavado con la solución buffer de HEPES, dejándola actuar entre 45 min y 1 hora hasta alcanzar una línea estable de medida de la masa adsorbida. Cuando se obtuvo la estabilidad, se tomó nota de la cantidad final de molécula que quedo adherida después de los dos lavados. Un resumen de las distintas etapas del proceso experimental seguido, se muestra en la Figura 3.3.

f) Análisis Estadístico

El estudio estadístico de los resultados obtenidos se realizo mediante el programa de análisis estadístico ANOVA, con la prueba de comparación múltiple de Fisher en la cual se determinan las diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los diferentes grupos con un valor de $p < 0,05$.

3.3.4 Análisis de Estabilidad del colágeno inmovilizado

Para evaluar la estabilidad de la capa de colágeno inmovilizada, las muestras fueron sumergidas en agua y sonicadas en un baño de ultrasonidos durante 120 minutos. Previamente a la sonicación, el colágeno fue teñido con CBQCA. Se realizaron medidas de la intensidad de la fluorescencia después de 0, 30, 60 y 120 minutos de sonicación. Durante el experimento, las muestras fueron protegidas de la luz para prevenir la degradación del CBQCA. Mediante esta técnica se pudo obtener una valoración indirecta de la cantidad de molécula que permanece adherida después del tratamiento de sonicación.

Un segundo estudio de de estabilidad se realizó sumergiendo las muestras en una solución de PBS. Las muestras fueron colocadas dentro de un agitador en el cual se dejaron en agitación durante 16 horas, a una temperatura de 37°C y una velocidad de agitación de 150 rpm. Mediante este método se buscó simular mejor las condiciones fisiológicas. Una vez sometidas las muestras al tratamiento, se evaluaron mediante XPS, con el fin de determinar de manera cuantitativa la estabilidad de la molécula sobre cada una de las superficies.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 Visualización del colágeno por fluorescencia

a) Optimización del protocolo de disolución del colágeno

Para determinar el pH más adecuado para la inmovilización del colágeno sobre las superficies, se evaluaron pHs de 5, 6 y 7, y se usaron como muestras las superficies activadas por piraña (PH) y superficies silanizadas con CPTES (PH-CP). Sólo se evaluaron estos dos tipos de superficie, ya que en este caso se quería analizar el pH óptimo al que se podía inmovilizar el colágeno sin que precipitara.

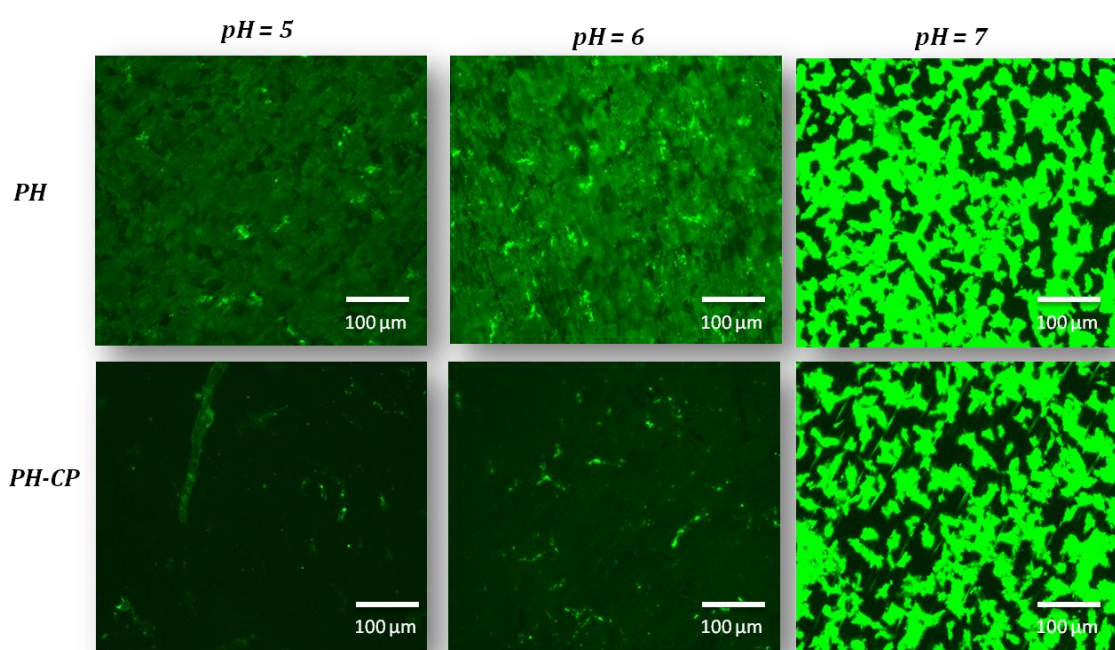


Figura 3.4: Imágenes de fluorescencia del colágeno inmovilizado sobre muestras activadas con piraña (PH) y silanizadas con CPTES (PH-CP) y posteriormente sumergidas en soluciones de colágeno a pH = 5, 6 y 7 obtenidas a 10 aumentos.

En la Figura 3.4 se muestran las imágenes de fluorescencia obtenidas para muestras de PH y de PH-CP, que fueron sumergidas en soluciones de colágeno a pH = 5, 6 y 7. Se observó que a partir de pH 7, el colágeno tiende a aglomerarse sugiriendo una precipitación de la molécula. El punto isoeléctrico del colágeno está entre 7 y 7,8 y es sabido que soluciones alcalinas provocan cambios estructurales en la molécula ¹². Por lo tanto se estableció que el pH más alto al cual se puede diluir el colágeno para que no precipite sobre las superficies es el de 6.

b) Evaluación de la inmovilización del colágeno sobre las diferentes superficies

Una vez definido el pH óptimo de la solución del colágeno para su inmovilización, es necesario definir cuál de los tratamientos de activación (plasma o piraña) y cuál de los dos silanos (CPTES o GPTES) es más eficiente en la inmovilización de la molécula. En la Figura 3.5, se muestra las imágenes de fluorescencia y en la Figura 3.6 la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia de dichas imágenes. Cuando comparamos el efecto de inmovilizar el colágeno directamente sobre el titanio sin ningún tratamiento, con el efecto producido con los diferentes tratamientos, es evidente que la cantidad de colágeno inmovilizado es mucho mayor cuando se realiza algún tratamiento sobre la superficie. La cantidad de colágeno inmovilizado sobre la muestra de titanio puro (Ti) fue tan poca que no se pudo cuantificar la intensidad de la fluorescencia.

Lo primero que se observó en todas las imágenes (excepto en la de Ti puro) es que hay zonas con una intensidad de fluorescencia mayor que otras, lo que nos puede llevar a pensar que no hay una capa continua de colágeno. Sin embargo las zonas más oscuras también emitieron fluorescencia confirmando la presencia del colágeno en dichas zonas. La visualización de la fluorescencia del fondo se dificultó, debido a que hay zonas en las que se acumuló más colágeno emitiendo más fluorescencia que el colágeno que se encuentra en el fondo. Para evaluar si la capa de colágeno es continua o no, se realizaron estudios de XPS, en los cuales se analizaron triplicados de cada tipo de superficie y se analizaron varias zonas de la cada muestra. Los resultados obtenidos de este estudio se discuten más adelante en el apartado 3.4.4.

Un segundo aspecto que se observó es que hay una mayor cantidad de colágeno sobre el grupo de muestras tratado con piraña (PH-col= 66.0, PH-CP-col=75.2 y PH-GP-col = 70.0 %) que sobre el grupo tratado con plasma (PL-col = 2.1, PL-CP-col= 8.1 y PL-GP-col= 5.0%). Es evidente que la diferencia más destacada entre estos dos grupos de muestras es la rugosidad, que fue mucho mayor en las muestras tratadas con piraña ($R_a = 144.5\text{nm}$) que en las tratadas con plasma ($R_a = 17.9\text{nm}$). Es conocido que cambios en la rugosidad aumentan el área superficial del

material, y a su vez esto aumenta el espacio disponible para la adhesión de las moléculas en solución.¹³⁻¹⁵

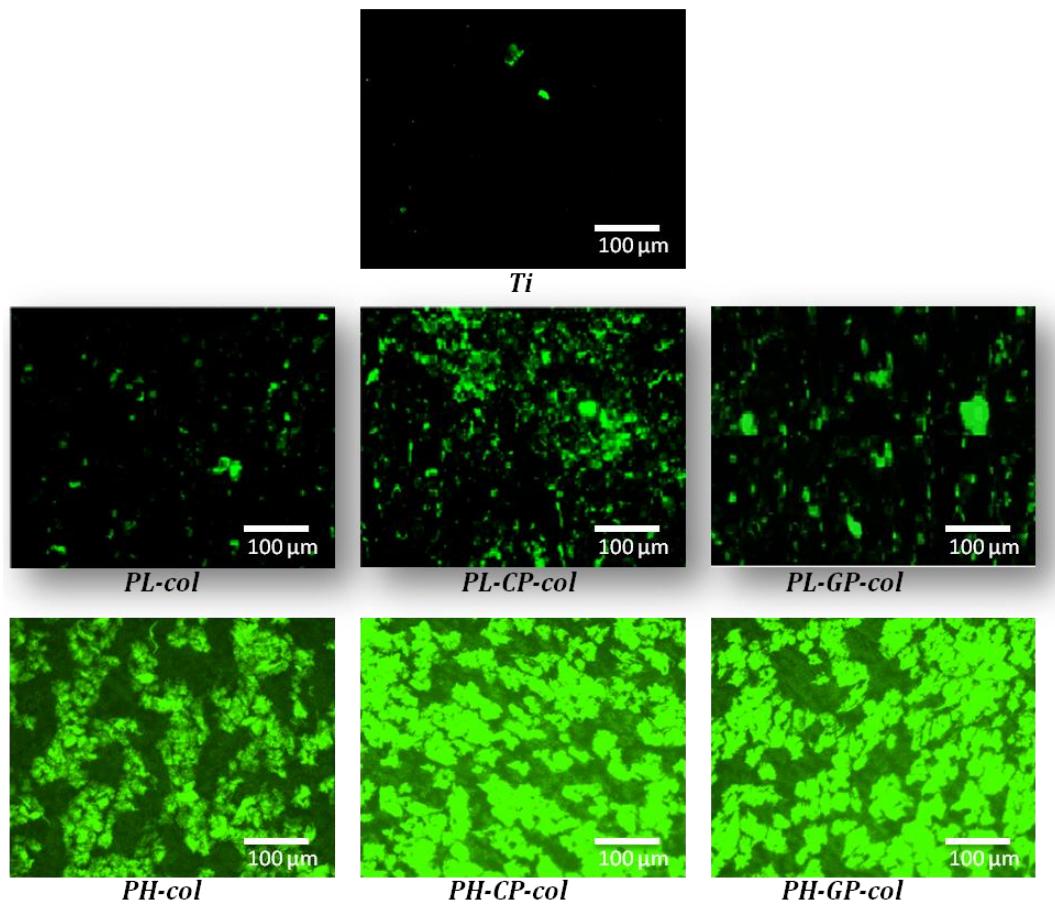


Figura 3.5: Imágenes de fluorescencia del colágeno fisisorbido (PL-col, PH-col) y el enlazado covalentemente (PL-CP-col, PL-GP-col, PH-CP-col y PH-GP-col), obtenidas a 10 aumentos.

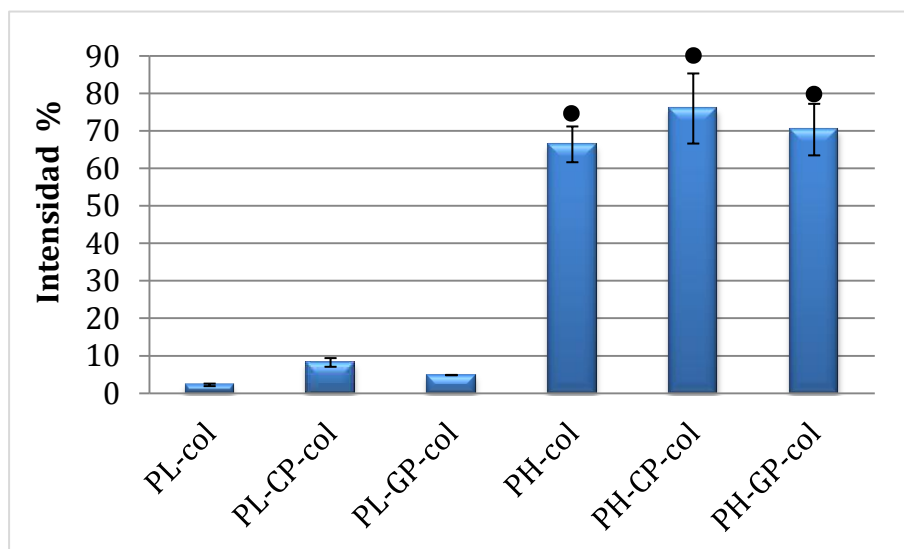


Figura 3.6: Cuantificación de la fluorescencia del colágeno fisisorbido (PL-col, PH-col) y el enlazado covalentemente (PL-CP-col, PL-GP-col, PH-CP-col y PH-GP-col). Las muestras que comparten símbolo no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En el caso de las superficies tratadas con PH el área superficial es el doble que la de las superficies tratadas con PL, lo que puede explicar la mayor cantidad de colágeno inmovilizado sobre estas superficies. Autores como Rechendorff et al. demostraron que con un aumento a escala nanométrica de la rugosidad de la superficie del tántalo, la cantidad de de fibrinógeno aumentó en un 70%, aunque el aumento en el área superficial sólo fue de aproximadamente un 20%, lo cual evidentemente indicó que la cantidad de proteína adsorbida se vio influenciada por la rugosidad de la superficie.¹⁶ Ellos atribuyeron este fenómeno, a un cambio en la geometría de las moléculas de fibrinógeno sobre la superficie.

Cuando se compararon las muestras donde el colágeno había sido sólo fisisorbido (PL-col y PH-col), se observó que hay una mayor cantidad de colágeno fisisorbido sobre las muestras tratadas con piraña (PH-col= 66%) que sobre las muestras tratadas con plasma (PL-col = 2,1%), a pesar de que se esperaba una mayor cantidad de colágeno fisisorbido sobre las muestras de PL debido a que este tratamiento presentó una mayor cantidad de grupos OH⁻, como se observó en los estudios de XPS (2.4.1 - d) y de sustitución del complejo de zinc (2.4.1 - e) del capítulo 2.

En la literatura, la hidrofobicidad de la superficie ha sido considerada como uno de los factores que pueden influir en la adsorción de moléculas.¹⁷⁻²⁰ Sin embargo Dufrière et al, observaron que cambios en estas propiedades producen sólo ligeras variaciones en cuanto a la cantidad de molécula adherida. En el caso de la hidrofobicidad reportada dentro en nuestros estudios (apartado 2.4.1 - b, del capítulo 2), se observó que el valor del ángulo de contacto para la muestra de PH (ángulo = 14°) fue mayor que en el caso del PL (ángulo ≈ 0°). Sin embargo ambas muestras pueden considerarse altamente hidrofílicas y por lo tanto se puede considerar que este parámetro influye de igual manera sobre la cantidad de molécula adherida. Por lo tanto, lo anterior confirma que prevalece el efecto de la rugosidad.

Al comparar el efecto de inmovilizar el colágeno mediante fisisorción o mediante el uso de silanos, se observó una mayor cantidad de colágeno sobre las muestras

silanizadas que en las fisisorbidas, tanto en las muestra previamente tratadas con plasma ($PL = 2.3 \pm 0.3 < PL-GP = 4.9 \pm 0.1$ y $< PL-CP = 8.2 \pm 1.2$ %), como en las muestras previamente tratadas con piraña ($PH = 66.4 \pm 4.8 < PH-GP = 70.4 \pm 6.9$ y $< PH-CP = 76.0 \pm 9.3$ %). Sin embargo estas diferencias sólo fueron estadísticamente significativas en el caso de las muestras previamente tratadas con plasma (Figura3.6).

Algunos autores han descrito que el proceso de inmovilización de péptidos y/o moléculas mediante el uso de silanos es mucho más efectivo cuando se compara con procesos de simple fisorción, ya que con la silanización se logran enlaces covalentes entre la proteína y la superficie del material, mientras que en los procesos de fisorción de proteínas sobre el titanio se dan enlaces de carácter más débil.^{6,7,21-24} En nuestro caso, se espera que sobre las muestras activadas con PL y con PH se dé una fisorción por la interacción del colágeno con los OH^- generados sobre la superficie, mientras que sobre las muestras silanizadas se espera un enlace covalente entre el colágeno y los silanos adheridos a la superficie del titanio. Para comprobar lo antes descrito, se realizaron estudios de estabilidad sometiendo las muestras a ultrasonidos, en los cuales se compararon los tratamientos previos a la inmovilización del colágeno en términos de estabilidad,

Una segunda diferencia entre las superficies estudiadas es la mojabilidad. Hay estudios que confirman que proteínas como la fibronectina y el colágeno se adhieren en mayor cantidad sobre superficies hidrofóbicas que hidrofílicas.^{5,25-27} En nuestro caso, las superficies activadas son altamente hidrofílicas mientras que las silanizadas son hidrofóbicas, y por lo tanto era de esperar que sobre éstas últimas se adhiriera más cantidad de molécula, como realmente ha ocurrido.

Al comparar los dos tipos de silanos, se observó una mayor cantidad de colágeno sobre las muestras silanizadas con CPTES (PL-CP-col y PH-CP-col) que con GPES (PL-GP-col y PH-GP-col), pero en el caso de las muestras previamente tratadas con piraña estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, probablemente debido al efecto de la rugosidad.

Un tercer aspecto que influye en la inmovilización de biomoléculas, es que a mayor cantidad de silanos adherido sobre el sustrato, también será mayor la cantidad de molécula adherida,²² por lo tanto es coherente que haya mayor cantidad de molécula inmovilizada sobre las muestras silanizadas con CPTES, ya que en los análisis realizados con XPS sobre las muestras silanizadas se observó una mayor cantidad de CPTES que de GPTES (apartado 2.4.2. - c). Por otro lado, como se discutió anteriormente, las muestras más hidrofóbicas presentan una mayor adhesión de moléculas. En el caso de las muestras silanizadas con GPTES, la hidrofobicidad fue menor que la del CPTES (apartado 2.4.2-a), debido por un lado a que sobre las superficies silanizadas con CPTES (PL-CP y PH-CP) se observaron más silanos y en segunda estancia porque sobre las muestras silanizadas con GPTES (PL-GP y PH-GP) se observaron mas grupo OH⁻ que no reaccionaron con el silano.

Otro aspecto que habría que tener en cuenta es que la eficiencia con la que el GPTES reacciona con el colágeno, podría ser menor que en el caso del CPTES, debido a que el grupo epoxi que tiene el GPTES como grupo organofuncional (responsable del enlace silano-biomolécula) es susceptible a hidrolizarse con agua en medio ácido²⁸ (Figura 3.7). En nuestro caso la reacción entre los silanos y el colágeno se da a un pH \approx 6 en solución acuosa (pH de las solución del colágeno), por lo tanto es posible que durante el proceso de inmovilización algunas moléculas del GPTES reaccionen con el colágeno, pero en otras sus grupos epoxi sufran una hidrólisis, lo que conllevaría por un lado al aumento de los grupos hidroxilo de la superficie y por otro a la disminución de la cantidad de colágeno inmovilizado. El CPTES por el contrario no es susceptible de sufrir este tipo de hidrólisis.

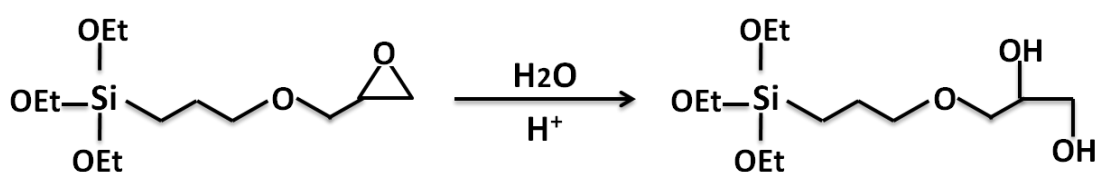


Figura 3.7: Representación esquemática de la reacción de hidrólisis en ambiente ácido del grupo epoxi presente en el GPTES

3.4.2 Ángulo de contacto

En la Figura 3.8 se muestran los valores de ángulo de contacto obtenidos después de inmovilizar colágeno sobre las diferentes superficies de titanio modificadas. Después de la inmovilización de colágeno, el aumento del ángulo de contacto en las muestras activadas y su reducción en las muestras silanizadas, indica la presencia de la proteína sobre la superficie.

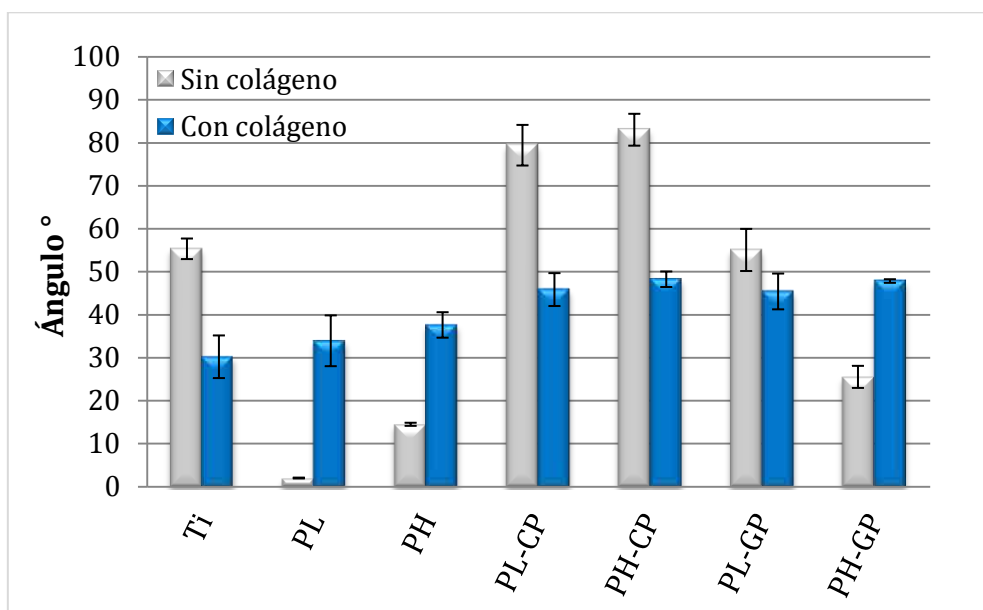


Figura 3.8: Ángulo de contacto medido con agua desionizada sobre las superficies de Ti modificadas antes y después de la inmovilización de colágeno.

Se puede observar que los valores obtenidos son intermedios entre los valores observados para las muestras activadas y las muestras silanizadas. Esto es debido a la intervención por un lado de las cadenas hidrocarbonadas del colágeno que poseen un carácter hidrofóbico y por otro lado a que algunos de los grupos funcionales presentes en los aminoácidos tienen un carácter hidrofílico.¹³

3.4.3 ToF SIMS

En la Figura 3.9 a y b se muestran los espectros de las muestras recubiertas con colágeno, donde se pueden observar picos que contienen nitrógeno relativos a las fragmentos típicos pertenecientes a los aminoácidos del colágeno. Estudios previos han mostrado que el ToF SIMS es una elección adecuada para la identificación de proteínas adsorbidas en la superficie debido a su capacidad de fragmentar los aminoácidos que las componen según patrones específicos.^{8,29,30}

La presencia de aminoácidos como la Glicina ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$, $m/z=75$), alanina ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$, $m/z=89$) y prolina ($\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$, $m/z=115$) que se observaron con mayor intensidad, y la serina ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_3$, $m/z=105$) y la lisina ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_2$, $m/z=146$) con menor intensidad confirman la presencia del colágeno ya que éstos son los principales aminoácidos presentes en esta molécula.^{29,31-33}

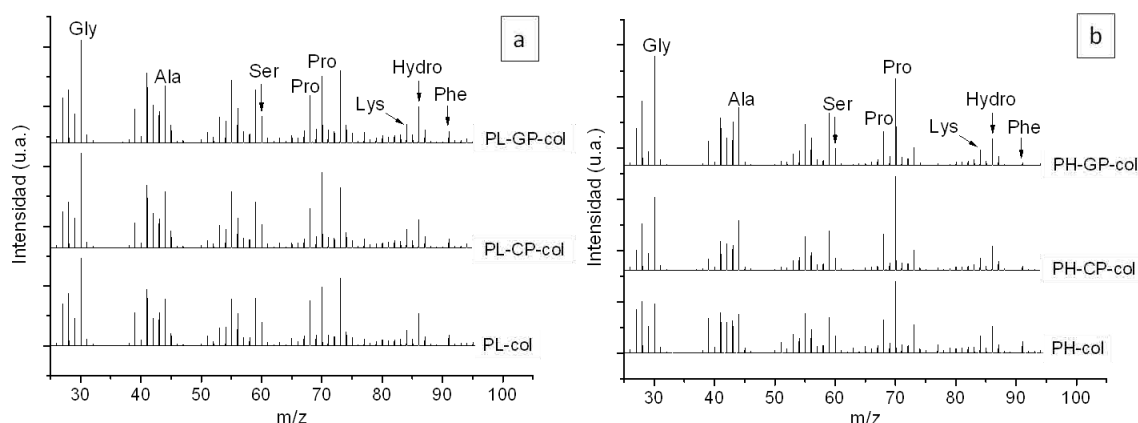


Figura 3.9: Espectros de los picos relativos a los principales aminoácidos presentes en el colágeno inmovilizados sobre muestras previamente tratadas con plasma (a) PL-col, PL-CP-col y PL-GP-col, y con piraña (b) PH-col, PH-CP-col y PH-GP-col.

Otros fragmentos característicos de los demás aminoácidos reportados en la literatura como pertenecientes al colágeno, también se observaron con menor intensidad en el espectros de todas las muestras recubiertas con colágeno,^{30,32,34} confirmando la presencia de éste sobre las diferentes superficies de titanio modificadas. Dentro de estos se destacan: CH_3N_2 , $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}_3$, $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}_3$, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}_3$, $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_3$ y $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{N}_4$ de la Arginina detectados a $m/z = 43, 73, 100, 101, 112$ y 127 respectivamente, $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}$ de Ile/ Leu a $m/z = 86$, $\text{C}_4\text{H}_4\text{NO}_2$ del Asn a $m/z = 98$ y $\text{C}_5\text{H}_8\text{N}_3$ del His a $m/z = 110$.

Estos resultados demuestran la presencia de colágeno, pero no dan información acerca de la manera como se encuentra enlazado sobre la superficie, ni acerca de sobre qué superficie hay mayor cantidad de molécula, y por tanto qué superficie es más eficiente en la inmovilización de colágeno. Por lo tanto, es necesario recurrir a otras técnicas de apoyo que puedan brindar esta información, como el XPS y el OWLS.

3.4.4 XPS

En la Tabla 3.2 se muestran los porcentajes de cada uno de los elementos químicos detectados mediante el análisis por XPS, sobre las muestras de titanio modificadas, después de someterlas al proceso de inmovilización de colágeno. Una vez inmovilizado el colágeno se observó en general para todas las superficies una disminución en los picos de titanio, silicio, cloro y oxígeno, y un aumento importante en los picos de nitrógeno y carbono. Adicionalmente se observó que para la mayoría de los elementos detectados, la dispersión de los valores fue pequeña, lo que sugiere que se ha formado una capa continua de colágeno sobre las superficies. Esto confirma que en los resultados de fluorescencia parte del colágeno que se encontraba en el fondo no se pudo visualizar debido a las aglomeraciones de colágeno observadas en algunas zonas.

Tabla 3.2: Porcentaje atómico de los elementos encontrados sobre las diferentes superficies de titanio modificadas antes y después de la inmovilización del colágeno.

Muestra	Elemento (% atómico)						
	C1s	N1s	O1s	Si2p	Cl2p	Ti2p	Na1s
PL	10,0 ± 3,7	1,6 ± 0,4	48,0 ± 2,3	2,1 ± 1,0	0,2 ± 0,1	16,9 ± 0,7	21,5 ± 3,6
PL-col	51,2 ± 1,7	15,9 ± 0,3	29,1 ± 0,4	2,0 ± 0,7	0,0 ± 0,0	1,1 ± 0,0	0,5 ± 0,2
PL-CP	21,6 ± 2,0	0,6 ± 0,4	49,5 ± 0,6	4,8 ± 0,3	2,3 ± 0,1	11,4 ± 1,3	9,5 ± 0,6
PL-CP-col	55,6 ± 0,4	15,7 ± 0,6	26,1 ± 0,5	1,5 ± 0,2	0,6 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,2
PL-GP	15,6 ± 2,8	0,8 ± 0,4	53,9 ± 0,8	3,4 ± 0,6	0,4 ± 0,0	13,4 ± 1,3	12,4 ± 2,8
PL-GP-col	52,2 ± 1,1	15,8 ± 0,2	28,7 ± 0,5	2,3 ± 0,5	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,0 ± 0,0
PH	18,2 ± 0,1	1,0 ± 0,4	47,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,21 ± 0,2	21,3 ± 0,3	7,4 ± 0,3
PH-col	55,6 ± 0,7	16,3 ± 0,1	26,2 ± 0,5	0,4 ± 0,3	0,1 ± 0,1	1,3 ± 0,2	0,3 ± 0,2
PH-CP	23,7 ± 1,3	0,0 ± 0,0	55,4 ± 1,1	4,0 ± 0,3	3,1 ± 0,2	13,8 ± 0,5	0,0 ± 0,0
PH-CP-col	56,0 ± 1,1	16,1 ± 0,2	25,6 ± 0,7	0,6 ± 0,3	0,4 ± 0,1	1,1 ± 0,3	0,3 ± 0,2
PH-GP	21,4 ± 1,7	0,0 ± 0,0	56,4 ± 2,3	2,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0	20,2 ± 0,4	0,0 ± 0,0
PH-GP-col	57,6 ± 0,3	15,8 ± 0,4	25,2 ± 0,5	0,5 ± 0,1	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,3	0,2 ± 0,1

En el caso del pico de titanio, esta disminución fue drástica en todos los casos, obteniendo valores ≤ 1 , lo que sugiere que la mayor parte de la superficie está recubierta por una capa. En cuanto el aumento del pico de nitrógeno (N1s), este paso de un 1% a un valor medio de $\pm 16\%$ sobre todas las superficies (Tabla 3.2). El aumento en el porcentaje de este pico se debe a la presencia de este elemento en los aminoácidos que conforman el colágeno, formando distintos tipos de enlace con el carbono como por ejemplo grupos amina (C-NH₂), guanidina (C=NH), amida

(O=C-N), y enlaces internos con grupos carboxilo.^{29,34-37} Así mismo, como era de esperar, se observó un aumento en el porcentaje del pico de carbono (C1s) sobre todas las superficies, pasando de un valor promedio de ± 18.4 a $\pm 54.7\%$.

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en cuanto a los porcentajes de C1s y N1s (Tabla 3.2) presentes sobre las distintas superficies con colágeno inmovilizado. Este resultado parece entrar en contradicción con los datos obtenidos en los análisis de fluorescencia de la Figura 3.6, donde la intensidad de la fluorescencia del colágeno detectada, fue significativamente mayor sobre el grupo de muestras tratadas con piraña (PH-col, PH-CP-col y PH-GP-col). No obstante, es importante recordar que el límite de detección del XPS, es de 10nm de profundidad. Es posible que durante el proceso de inmovilización del colágeno sobre las superficies, en el cual las muestras se sumergieron durante 16 horas, se hayan adherido múltiples capas de colágeno con un espesor mayor que el que puede ser detectado por XPS, y por lo tanto esta técnica no nos permite discernir sobre cuál de estas superficies se adhirió más cantidad de colágeno.

Adicionalmente, al analizar los valores del porcentaje del pico de Ti y del Si después de la inmovilización del colágeno, se observó un valor medio $\leq 1\%$ para el Ti en todas las muestras y que algunos valores del porcentaje de Si también son $\leq 1\%$ sobre algunas muestras (Tabla 3.2). Valores de porcentaje menores o iguales a 1% no son considerados significativos. La imposibilidad de obtener el porcentaje de titanio y de silicio que hay por debajo del colágeno a través de XPS y la baja desviación estándar que tienen estos datos, sugiere nuevamente la presencia de una capa continua y que dicha capa tiene un espesor mayor de 10nm, lo que explica el porqué no podemos observar diferencias significativas entre las diferentes superficies.

Algunos autores, como Textor et al. e Iucci et al., han utilizado el aumento en el porcentaje de los picos de N1s y C1s (relacionados con la presencia de proteínas y/o péptidos) y la disminución del porcentaje del Ti2p y el Si2p (relacionados con la presencia de una nueva capa sobre la señal del metal y del silano respectivamente), para realizar una medida cuantitativa de la cantidad de

proteínas en una superficie a través de los ratios de Ni/Ti, C/Ti, Ni/Si y C/Si.^{36,38} Sin embargo en nuestro caso estas ratios no aportan información significativa debido a los bajos porcentajes de Ti y Si que se detectaron.

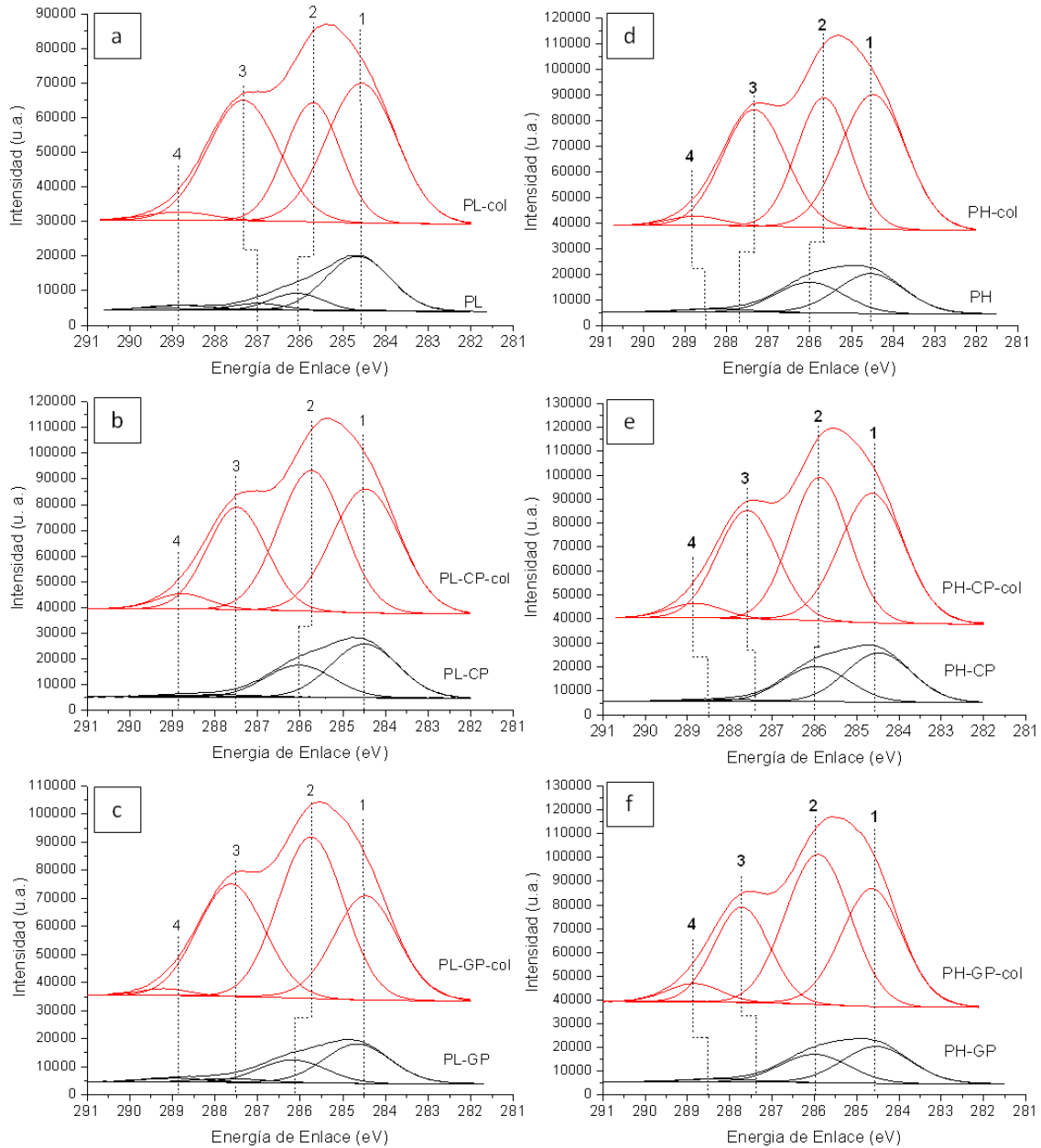


Figure 3.10: Espectros de alta resolución de la deconvolución del pico de C1s antes y después de la inmovilización de colágeno. (a, b y c) Muestras previamente tratadas con plasma (PL-col, PL-CP-col y PL-GP-col). (d, e y f) Muestras previamente tratadas con piraña (PH-col, PH-CP-col y PH-GP-col).

Tabla 3.3: Porcentaje atómico de las especies químicas presentes en el pico de C1s antes y después de la inmovilización de colágeno.

a) Muestras previamente tratadas con plasma.

			PL	PL-col	PL-CP	PL-CP-col	PL-GP	PL-GP-col
			% Área total					
			10,0	51,2	21,6	55,6	15,6	52,2
Pico	Especies Químicas	EE (eV)	% Área subpicos					
1	C-H , C-C	284,6	5,9	19,8	14,7	16,1	9,1	14,4
2	CH ₂ N, CH ₂ O	286,0	3,3	14,2	6,1	22,4	4,9	21,0
3	O=C-N	287,5	0,4	16,1	0,4	14,7	1,2	14,6
4	NH-C(=NH)-NH ₂	289,0	0,3	1,0	0,5	2,4	0,4	2,1

b) Muestras previamente tratadas con piraña.

			PH	PH-col	PH-CP	PH-CP-col	PH-GP	PH-GP-col
			% Área total					
			18,2	55,6	23,7	56,0	21,4	57,6
Pico	Especies Químicas	EE (eV)	% Área subpicos					
1	C-H , C-C	284,6	9,2	20,7	13,4	16,3	11,7	18,7
2	CH ₂ N, CH ₂ O	286,0	8,4	17,5	9,5	22,6	7,8	21,9
3	O=C-N	287,5	0,5	16,2	0,5	14,7	1,4	14,7
4	NH-C(=NH)-NH ₂	289,0	0,2	1,1	0,2	2,4	0,5	2,2

Mediante los análisis de alta resolución, se estudiaron con más detalle las deconvoluciones de los picos de C1s y O1s, con el fin de identificar la presencia de nuevas especies químicas una vez se inmoviliza el colágeno, las cuales generalmente están asociadas al aumento o al cambio en el porcentaje atómico de cada subpico. En la Figura 3.10 y en la Tabla 3.3, se muestra los espectros de alta resolución y los porcentajes de las especies químicas que conforman el pico de C1s, antes y después de la inmovilización del colágeno.

Al realizar la deconvolución pico de C1s (Tablas 3.3a y b), se pudieron introducir 4 picos con energías de enlaces asociadas con los aminoácidos presentes en péptidos y proteínas^{29,34,37,39-44}: (1) hidrocarburos C-H (284.6 ± 0.2 eV), (2) aminas CH₂N y/o grupos alcoxi CH₂O (286 ± 0.3 eV), (3) grupos amida y/o enlace peptídico O=C-N (287.5 ± 0.3 eV) y (4) grupos carboxilo (O=C-OH) y/o guanidina [NH-C(=NH)-NH₂] (289 ± 0.4 eV), éste último asociado generalmente a la presencia de la arginina. El incremento de la intensidad de los picos en el rango de energía de 286-289 eV refleja el éxito del proceso de inmovilización del colágeno.^{15,42}

Como se ha mencionado anteriormente el aumento de los picos ubicados a 287.5 y 289 eV, se ha atribuido a la presencia de enlaces del tipo peptídico ($O=C-N$) y a la especie guanidina ($NH-C(=NH)-NH_2$), los cuales confirman la presencia del colágeno sobre las superficies. En general se observó que los porcentajes de los 4 picos aumentan sobre todas las superficies. Sin embargo, los picos 1 y 2 también están relacionados con la presencia de contaminación atmosférica la cual fue detectada incluso en las muestras sin ningún tipo de tratamiento. Por lo tanto, afirmaciones cuantitativas sobre los rendimientos de las reacciones posteriores, son difíciles o imposibles de realizar^{36,38} y en consecuencia no se pueden realizar ratios entre los diferentes picos encontrados en la deconvolución de carbono, para establecer sobre qué superficie hay mayor cantidad de colágeno.

En el caso del pico de $O1s$, se observó que el porcentaje de oxígeno disminuye después de la inmovilización del colágeno (Tabla 3.2), probablemente debido a que el colágeno recubre especies químicas que contienen oxígeno como el óxido de titanio (O^{2-}), los grupos OH^- y los silanos enlazados al metal ($Ti-O-Si$ y $Si-O-Si$). En la Figura 3.11 a-f y en la Tabla 3.4, se muestran los espectros de alta resolución y los porcentajes de las especies químicas que conforman el pico de $O1s$, de las superficies antes y después de la inmovilización del colágeno. En todos ellos, se puede observar que los picos correspondientes a las especies químicas que conforman el pico general, cambian después de la inmovilización del colágeno, debido a que en el colágeno también existen especies químicas con oxígeno.

El pico (1) correspondiente a la capa de óxido (O^{2-}) ubicado cerca a 530 eV, disminuyó de manera considerable sobre todas las superficies, lo que sugiere la presencia de una nueva capa sobre la superficie. En el caso de las muestras previamente activadas con plasma y con piraña (Figura 3.11 a y d y Tabla 3.4 a y b) se observó un aumento en el segundo pico ubicado a ≈ 531 eV, relacionado con la superposición del enlace del tipo carboxilo $COOH$ presente en el colágeno, sobre la señal de los grupos OH^- de la superficie activada, y un aumento en el pico ubicado a ≈ 532.5 eV, relacionado con la superposición del enlace del tipo amida $O=C-N$ sobre la señal del agua.^{37,45}

En el caso de las muestras silanizadas (Figuras 3.11 b, c, e y f), los picos ubicados a 531 y 532 eV aumentan debido a la superposición de enlaces del tipo carboxilo sobre la señal de OH⁻ y la superposición de la función amida y/o el enlace peptídico O=C-N sobre la señal de Ti-O-Si, respectivamente.^{36-38,45}

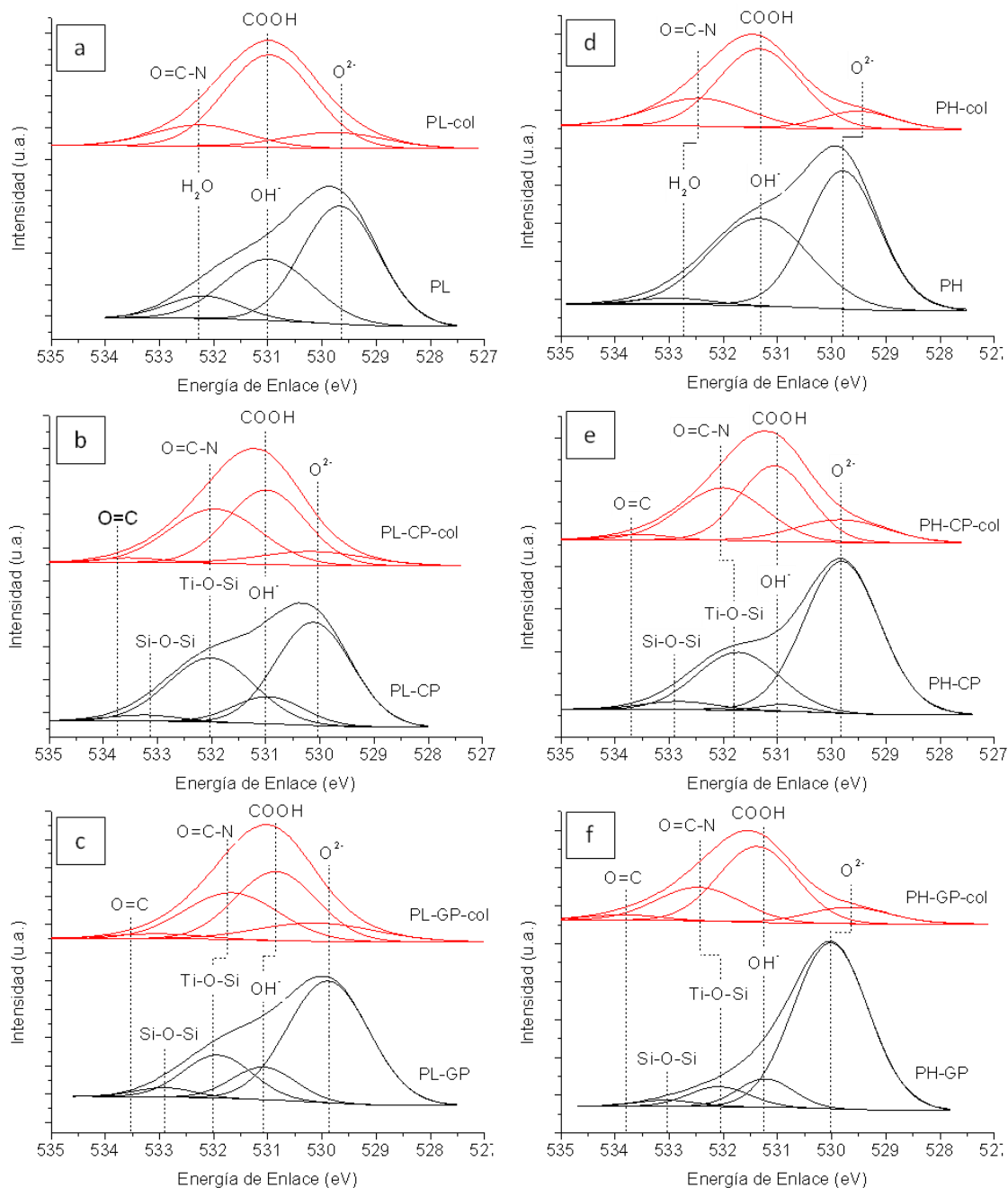


Figure 3.11: Espectros de alta resolución del pico de O1s antes y después de la inmovilización de colágeno. (a, b y c) Muestras previamente tratadas con plasma (PL-col, PL-CP-col y PL-GP-col). (d, e y f) Muestras previamente tratadas con piraña (PH-col, PH-CP-col y PH-GP-col).

Tabla 3.4: Porcentajes atómicos de las especies químicas presentes en el espectro de alta resolución del O 1s, observadas después de la inmovilización del colágeno.

a) Muestras previamente tratadas con plasma.

			PL	PL-col	PL-CP	PL-CP-col	PL-GP	PL-GP-col
			% Área total					
			48,0	29,1	49,5	26,2	53,9	28,7
Pico	Especies Químicas	EE (eV)	% Área subpicos					
1	O ²⁻	529,5	52,6	13,6	50,2	12,8	65,2	17,0
2	OH ⁻ / COOH	530,9	37,2	69,2	10,1	40,1	9,1	44,5
3	Ti-O-Si / O=C-N	532,5	10,2	17,3	35,1	43,6	16,8	35,0
4	Si-O-Si → C=O	533 → 533,8			4,7	3,5	8,9	3,5

b) Muestras previamente tratadas con piraña.

			PH	PH-col	PH-CP	PH-CP-col	PH-GP	PH-GP-col
			% Área total					
			47,0	26,2	55,4	25,6	56,4	25,2
Pico	Especies Químicas	EE (eV)	% Área subpicos					
1	O ²⁻	529,5	53,0	12,4	67,4	17,2	79,9	13,1
2	OH ⁻ / COOH	530,9	44,4	61,8	1,8	43,7	10,0	56,2
3	Ti-O-Si / O=C-N	532,5	2,6	25,7	27,2	36,6	7,8	27,7
4	Si-O-Si → C=O	533 → 533,8			3,5	2,6	2,4	3,0

Adicionalmente, el pico que estaba ubicado a 533eV en las muestras silanizadas, se desplazó a una energía de enlace de 533.8eV después de la inmovilización del colágeno. La presencia de este pico está relacionada según la literatura con la presencia de enlaces del grupo carbonilo (C=O), que se encuentran también en varios aminoácidos del colágeno.³⁷ Es importante resaltar que este último pico sólo se observó sobre las muestras silanizadas (no se observó sobre las muestras sólo activadas de PL-col y PH-col), lo cual sugiere que el colágeno se adhiere a los silanos a través del enlace C=O, es decir a través de la unión del carbono presente en uno de los extremos de la molécula del silano con grupos funcionales del colágeno que contengan oxígeno, como por ejemplo los grupos OH⁻. Esto puede ser un indicio de que la interacción del colágeno con la superficie es distinta en las muestras activadas y en las silanizadas.

Con la disminución de los picos de Ti2p y Si2p, así como con el incremento significativo de las áreas de los picos de N1s, C1s (en especial los picos ubicados a 288 y 289 eV, en el caso de C1s) y de los picos ubicados a 531 y 532,5 eV en el pico de O1s, atribuidos a la presencia de la presencia de especies como la guanidina, los carboxilos y amida presentes en el colágeno, se confirma la presencia del colágeno sobre las diferentes superficies.

En estos estudios no se observaron diferencias significativas entre los porcentajes obtenidos de los picos de Ti, N, C y O para cada muestra, por lo cual no podemos determinar con exactitud sobre qué superficie hay más colágeno inmovilizado. Aunque, los porcentajes generales del pico de C1s son ligeramente mayores y los de O1s ligeramente menores (Tabla 3.2), sobre las muestras previamente tratadas con piraña (PH-col, PH-CP-col, PH-GP-col) que con plasma (PL-col, PL-CP-col, PL-GP-col), sugiriendo una mayor cantidad de colágeno sobre estas superficies, lo que coincide con lo observado en los estudios de fluorescencia (3.4.1-b), lo cierto es que las diferencias observadas en XPS no fueron estadísticamente significativas. Un aspecto interesante es la aparición de un nuevo pico cerca a 533,8eV en el pico de O1s de las muestras silanizadas, lo que sugiere un enlace entre los silanos y el colágeno del tipo C=O, que es de carácter covalente, y por lo tanto se espera que sobre estas superficies el colágeno inmovilizado sea mucho más estable que el adherido sobre las muestras simplemente activadas (PL-col y PH-col).

3.4.5 Análisis por OWLS

En la Figura 3.12 a y b se muestran los resultados del experimento de inmovilización de colágeno sobre las diferentes superficies de titanio modificadas. La cantidad de masa inmovilizada aumenta sobre las muestras silanizadas en comparación con las muestras tratadas sólo con plasma, confirmando que la inmovilización de colágeno mediante el uso de silanos es más eficiente en comparación con la fisorción generada con los grupos OH⁻ de las muestras activadas por PL. La cantidad de colágeno inmovilizado sobre las muestras tratadas con CPTES ($1110 \pm 25,0$ ng/cm²) fue muy superior a la adherida sobre las tratadas con GPTES ($760 \pm 17,4$ ng/cm²) y las activadas con PLASMA ($660 \pm 10,0$ ng/cm²).

Esto puede estar relacionado con la menor cantidad de silanos detectados por XPS en la muestra de PL-GP-col (apartado 2.4.2-c), lo que conlleva a una menor cantidad de moléculas de silano disponibles para reaccionar con la proteína. Por otro lado, hay estudios que indican que el aumento de la cantidad de proteína adherida (fibronectina y colágeno), es directamente proporcional al incremento del carácter hidrofóbico de las superficies.^{5,19,25-27} En este caso, las muestras de PL son altamente hidrofílicas en comparación con las silanizadas, razón por la cual se observó menor cantidad de colágeno inmovilizado sobre estas. En cuanto a las muestras silanizadas, las muestras de PL-CP mostraron un comportamiento altamente hidrofóbico mientras que en las muestras de PL-GP el carácter hidrofóbico fue menor debido a la menor cantidad de silano enlazado, lo que a su vez deja más grupos OH⁻ libres que aumentan el carácter hidrofílico de la superficie. Finalmente, un tercer aspecto que puede reducir la eficiencia en la reacción colágeno-GPTES, puede ser la hidrólisis del grupo epoxi del GPTES, tal como se discutió en el apartado 3.4.1.2 de este capítulo.

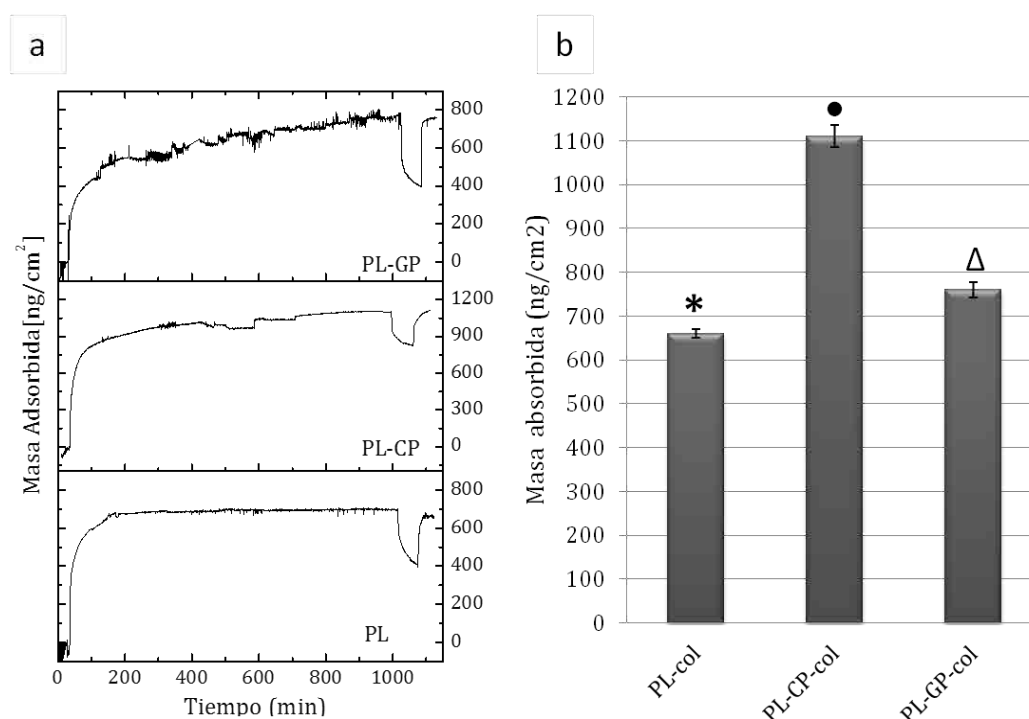


Figura 3.12: Masa de colágeno fisisorbido (PL-col) y de colágeno enlazado mediante el uso de silanos (PL-CP-col y PL-GP-col). (a) Espectros de OWLS, donde se muestra la evolución del proceso de inmovilización del colágeno sobre las diferentes superficies. (b) Cantidad final registrada en los espectros de OWLS, correspondiente a la cantidad de la masa de colágeno inmovilizado sobre todas las superficies. Todas las muestras tienen diferencias estadísticamente ($p < 0,05$).

En cuanto a la eficiencia de la silanización como método para aumentar la cantidad de colágeno inmovilizado, nuestros resultados son consistentes con los reportados en la literatura. Bajo condiciones de adsorción estática, partiendo de una solución de colágeno en PBS de 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Denis et al, lograron inmovilizar entre 400 y 800 ng/cm^2 de colágeno sobre muestras de TiO_2 recubiertas con oro y funcionalizadas con SAMs de alcano-etiol terminados en CH_3 o grupos OH .¹⁸

Cantidades similares de colágeno fueron inmovilizadas bajo condiciones estáticas sobre otro tipo de superficies. Dupont-Guillain et al, lograron inmovilizar 600 y 1000 ng/cm^2 sobre poliestireno (PS), partiendo de soluciones de colágeno en PBS de 4 y 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente. En este caso el tiempo de adsorción fue de 2 horas. Sobre polietilen-tereftalato (PET), lograron inmovilizar una cantidad similar a la obtenida en este estudio sobre la muestra de PL, de 650 ng/cm^2 partiendo de una solución de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.^{46,47} Con un tiempo de inmersión de 24 horas, mucho mayor al utilizado en este estudio, Pamula et al, lograron inmovilizar sobre poliestireno y poliestireno tratado con plasma de oxígeno, 1100 y 900 ng/cm^2 de colágeno respectivamente. La adsorción se hizo en condiciones estáticas a 37°C, partiendo de una solución en PBS (pH \sim 7.2) de 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$.⁴⁸

En nuestro caso, se logró inmovilizar 650, 760 y 1100 ng/cm^2 sobre las muestras de PL-col, PL-GP-col y PL-CP-col respectivamente, partiendo de una solución de 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Sin embargo, el método utilizado en este estudio se diferencia de los reportados en la literatura en que la inmovilización del colágeno se hizo bajo un flujo constante, por lo tanto se podría decir que los métodos de modificación con silanos empleados en este estudio mejoran la eficiencia en la inmovilización del colágeno.

3.4.6 Análisis de estabilidad del colágeno inmovilizado

a) Microscopia Óptica de Fluorescencia

Las Figuras 3.13 y 3.14 muestran los resultados de estabilidad del colágeno inmovilizado sobre las diferentes superficies de titanio modificadas, después de someter a cada una de las muestras a diferentes tiempos de sonicación en un baño de ultrasonidos a temperatura ambiente. Estos resultados corresponden a las

medidas de intensidad de fluorescencia realizadas sobre cada una de las imágenes del CBQCA enlazado al colágeno, por medio del software Image J.

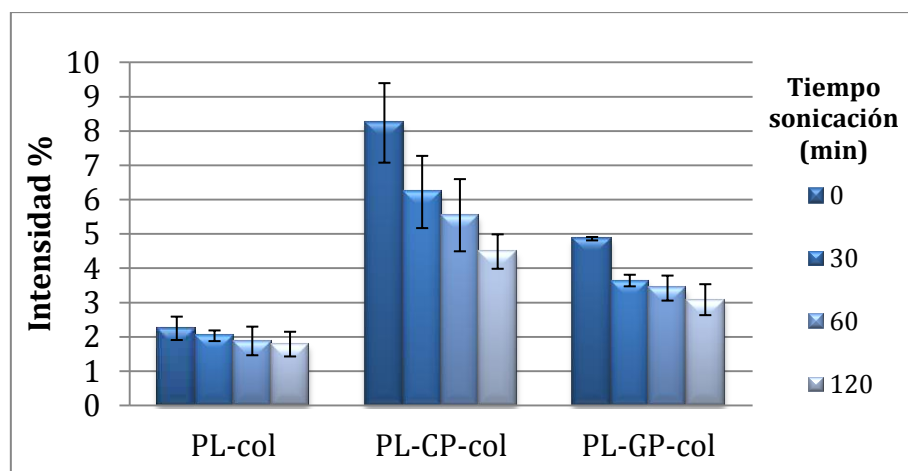


Figura 3.13: Evolución de la intensidad de la fluorescencia con el tiempo de sonicación, del colágeno fisisorbido y enlazado covalentemente sobre muestras con tratamientos previos de plasma (PL, PL-CP y PL-GP)

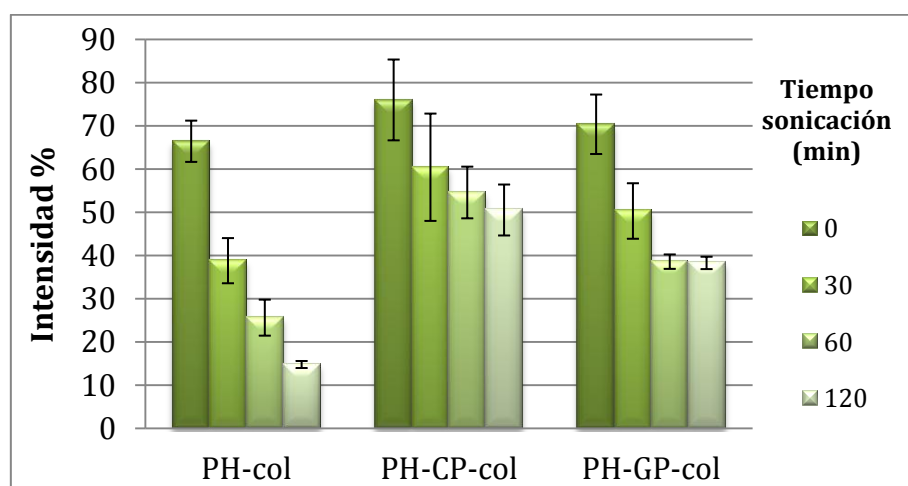


Figura 3.14: Evolución de la intensidad de la fluorescencia con el tiempo de sonicación, del colágeno fisisorbido y enlazado covalentemente sobre muestras con tratamientos previos de piraña (PH, PH-CP y PH-GP)

Tal y como se discutió en los estudios de visualización del colágeno en el apartado 3.4.1-b, a tiempo cero de sonicación se observó una mayor cantidad sobre las muestras previamente tratadas con piraña (PH-col, PH-CP-col y PH-GP-col) donde los valores de intensidad inicial están entre 60 y 80% (Figura .3.14), mientras que en las muestras previamente tratadas con plasma (PL-col, PL-CP-col y PL-GP-col) los valores son menores a 10% (Figura 3.13). También se observó una mayor cantidad sobre las muestras silanizadas, en especial sobre las tratadas con CPTES, tanto sobre las muestras previamente tratadas con plasma (PL-CP-col) como con

piraña (PH-CP-col). Es importante resaltar que los valores obtenidos para las muestras de PL-col están por debajo de los límites de detección de la técnica, por lo tanto su evaluación no se considera significativa, y no se tendrá en cuenta en el análisis de este estudio.

En la Figura 3.15 se muestra la tasa de reducción del colágeno que permanece inmovilizado después de someter a las muestras al tratamiento de sonicación durante 120 minutos ($[\text{Intensidad}_{120 \text{ minutos}} / \text{Intensidad}_{0 \text{ minutos}}] * 100$), excepto para la muestra de PL-col. En el grupo de muestras previamente tratado con plasma, al desestimar los valores obtenidos en la muestra de PL-col, se puede decir que el porcentaje de reducción fue menor sobre las muestras silanizadas (PL-CP-col y PL-GP-col). Por otro lado, en el grupo de las muestras previamente tratadas con piraña, al comparar la tasa de reducción del colágeno fisisorbido (PH-col) con el inmovilizado mediante los silanos (PH-CP-col y PH-GP-col), se observó nuevamente que el porcentaje de reducción fue mucho menor sobre las muestras silanizadas, lo que indica que el enlace de la proteína y el silano fue más estable. Estos resultados concuerdan con otros estudios, en los cuales se ha descrito que el proceso de biofuncionalización por medio del uso de silanos proporciona una mayor estabilidad al inmovilizar proteínas cuando es comparado con el proceso de fisisorción.^{6,7,18,21-24}

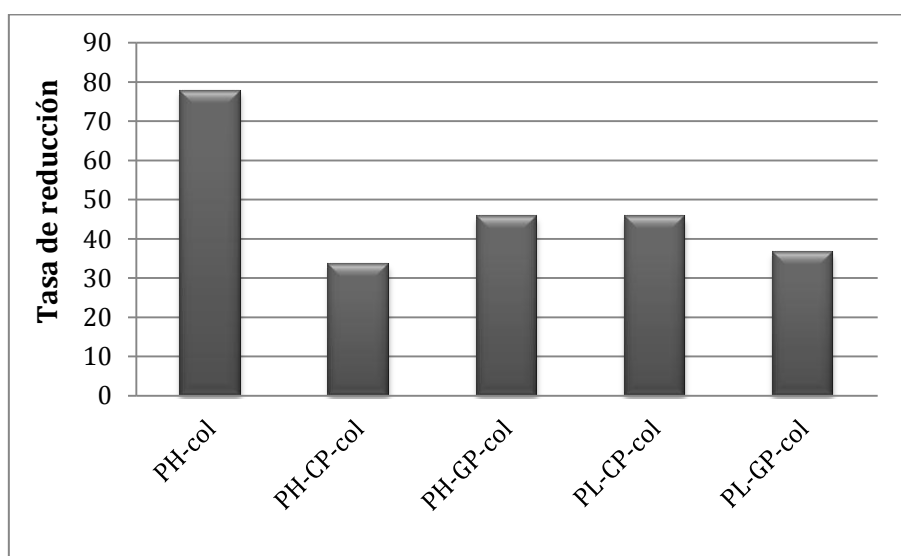


Figura 3.15: Tasa de reducción del colágeno que permanece inmovilizado sobre las diferentes superficies de titanio después de ser sometidas al tratamiento de sonicación en agua destilada durante 120 minutos.

Cuando comparamos el efecto de los dos tipos de silanos (PL-CP vs PL-GP y PH-CP vs PH-GP), el porcentaje de reducción de colágeno inmovilizado fue similar para todas las muestras, con valores de entre 35 y 45 %. Siendo un poco menor en PL-GP (36,5%) en comparación con PL-CP (45,5%) y por el contrario un poco menor en PH-CP (33,5%) que en PH-GP (43,5%). Esto indica que el enlace del colágeno con el grupo organofuncional de ambos silanos es casi igual de estable, a pesar de que inicialmente se haya observado una mayor cantidad de colágeno inmovilizado sobre las superficies silanizadas con CPTES, y sugiere que parte del colágeno cuantificado antes del proceso de estabilidad se encontraba fisisorbido.

b) Análisis de Estabilidad mediante XPS

En la Tabla 3.5, se muestran los porcentajes de los picos detectados en los espectros generales de las muestras biofuncionalizadas con colágeno antes (pre) y después (post) de someterlas al tratamiento de sonicación (150 rpm) durante 16 horas, a una temperatura de 37°C y en presencia de PBS.

Tabla 3.5: Porcentaje atómico de los elementos encontrados sobre las diferentes superficies de titanio modificadas y recubiertas con colágeno antes (pre) y después (post) del tratamiento de estabilidad.

Muestra		C1s	N1s	O1s	Si2p	Cl2p	Ti2p	Na1s
PL-col	pre	51,2 ± 1,7	15,9 ± 0,3	29,1 ± 0,4	2,0 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,5 ± 0,2
	post	29,3 ± 0,1	4,6 ± 0,2	44,9 ± 0,7	2,1 ± 0,6	0,9 ± 0,1	4,7 ± 0,3	13,5 ± 0,9
PL-CP-col	pre	55,6 ± 0,4	15,7 ± 0,6	26,1 ± 0,5	1,5 ± 0,2	0,6 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,2
	post	39,2 ± 6,0	7,8 ± 2,7	34,0 ± 2,3	3,8 ± 0,4	3,1 ± 1,4	1,5 ± 0,2	10,6 ± 4,3
PL-GP-col	pre	52,2 ± 1,1	15,8 ± 0,2	28,7 ± 0,5	2,3 ± 0,5	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,0 ± 0,0
	post	34,5 ± 2,8	6,7 ± 2,5	40,8 ± 3,6	3,0 ± 0,7	1,2 ± 0,4	2,8 ± 0,3	11,0 ± 2,4
PH-col	pre	55,6 ± 0,7	16,3 ± 0,1	26,2 ± 0,5	0,4 ± 0,3	0,1 ± 0,1	1,3 ± 0,2	0,3 ± 0,2
	post	18,7 ± 2,9	2,3 ± 1,6	47,6 ± 2,3	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,6	11,3 ± 1,0	18,9 ± 2,0
PH-CP-col	pre	56,0 ± 1,1	16,1 ± 0,2	25,6 ± 0,7	0,6 ± 0,3	0,4 ± 0,1	1,1 ± 0,3	0,3 ± 0,2
	post	33,1 ± 5,1	4,4 ± 2,1	41,0 ± 2,8	1,1 ± 0,5	1,0 ± 0,4	6,4 ± 1,3	13,0 ± 2,4
PH-GP-col	pre	57,6 ± 0,3	15,8 ± 0,4	25,2 ± 0,5	0,5 ± 0,1	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,3	0,2 ± 0,1
	post	30,2 ± 1,9	4,0 ± 1,2	43,1 ± 1,3	0,8 ± 0,2	0,2 ± 0,2	6,8 ± 0,9	12,3 ± 1,3

El porcentaje de los picos de Si, Cl, Ti y Na, aumentó sobre todas las superficies después del tratamiento de estabilidad, sugiriendo el desprendimiento de alguna capa que los cubría. En el apartado 3.4.4, la presencia del colágeno sobre la superficie se determinó principalmente por el gran aumento del pico de nitrógeno

y de carbono, y por el cambio en el espectro del pico de oxígeno, ya que estos elementos se encuentran en todos los aminoácidos, por lo tanto serán los elementos de mayor interés en este estudio. En el caso de los picos de nitrógeno (N1s) y carbono (C1s), estos disminuyeron en todas las muestras y el porcentaje de oxígeno (O1s) aumentó (Tabla 3.5), indicando el desprendimiento de parte del colágeno.

Para determinar la estabilidad del colágeno sobre las distintas superficies, es necesario realizar una ratio del porcentaje antes y después del tratamiento (pre/post). En la Tabla 3.6 se muestran las ratios de los porcentajes del N1s, C1s y O1s antes (pre) y después (post). Al analizar la ratio de N pre/N post (Tabla 3.6), se observó que los valores fueron menores sobre las muestras silanizadas que sobre las activadas, tanto en el grupo de muestras tratado con plasma (PL-CP-col= 2.0 y PL-GP-col= 2.4 > PL-col= 3.5) como con piraña (PH-CP-col= 3.7 y PH-GP-col= 4,0 > PH-col= 7.1). Esto coincide con lo observado en los resultados de estabilidad por fluorescencia y confirma que el colágeno es más estable cuando se inmoviliza a través de los silanos.

Tabla 3.6: Ratio del porcentaje de N1s, C1s y O1s, detectados sobre las muestras antes (pre) y después (post) del tratamiento de estabilidad.

Muestra	Grupo plasma			Grupo piraña		
	PL-col	PL-CP-col	PL-GP-col	PH-col	PH-CP-col	PH-GP-col
%N pre / %N post	3,5	2,0	2,4	7,1	3,7	4,0
%C pre / %C post	1,8	1,4	1,5	2,9	1,7	1,9
%O post / %O pre	1,5	1,3	1,4	1,8	1,6	1,7

Al comparar los dos grupos de muestras, se observó que los valores de la ratio son en general menores sobre el grupo tratado con plasma (PL-col = 3.5, PL-CP-col = 2.0 y PL-GP-col = 2.4) que con piraña (PH-col = 7.1, PH-CP-col = 3.7 y PH-GP-col = 4.0), lo cual indica una menor estabilidad del colágeno sobre las muestras previamente tratadas con piraña. Esto puede ser debido a que parte de la cantidad del colágeno inmovilizado sobre las superficies previamente tratadas con piraña, este más influenciada por el efecto de la rugosidad que por la cantidad de grupos funcionales disponibles para reaccionar con el colágeno.

Finalmente, al comparar los dos tipos de silanos, a diferencia de lo observado en los resultados de estabilidad por fluorescencia donde no se pudo establecer con cuál de los silanos es más estable el colágeno, la ratio del N1s obtenida por XPS fue menor sobre las muestras silanizadas con CPTES (PL-CP-col y PH-CP-col) que con GPTES (PL-GP-col y PH-GP-col), confirmando una mayor estabilidad al usar el CPTES.

En el caso de las ratios del C1s y del O1s, las diferencias de los valores de las ratios son menos marcadas que las observadas en N1s. Esto es debido a que el N1s sólo es detectado después de la inmovilización del colágeno, mientras que el porcentaje del C1s y el O1s además de ser atribuido a la presencia de colágeno, también fue detectado sobre las muestras sin colágeno, siendo atribuido a contaminación sobre la muestra de titanio puro en el caso del carbono, y a la presencia de grupos OH⁻ en las muestras activadas y al enlace Ti-O-Si en las muestras silanizadas.

A pesar de lo anterior, se observó que los valores de las ratios del C1s y del O1s cumplen las mismas condiciones observadas para el caso de las ratios de N1s: i) ratios menores en muestras silanizadas que activadas. Por lo tanto mayor estabilidad del colágeno sobre muestras silanizadas; ii) ratios menores en el grupo de muestras tratado con plasma que con piraña. Por lo tanto mayor estabilidad sobre muestras tratadas con plasma; iii) Ratios menores en el caso de las muestras silanizadas con CPTES que con GPTES. Por lo tanto mayor estabilidad sobre las muestras silanizadas con CPTES.

Por otro lado, un estudio detallado del espectro de alta resolución del C1s y del O1s, nos permitió analizar de qué manera cambió el pico después de que parte del colágeno se desprendiera. En el caso del N1s, como este sólo fue detectado mediante XPS cuando se inmovilizó el colágeno, cualquier cambio en su porcentaje, fue atribuido en su totalidad a desprendimiento de colágeno, y por tal motivo no se realizó la deconvolución de este pico.

En la Figura 3.16 y en la Tabla 3.7, se muestra los espectros y los porcentajes obtenidos de la deconvolución del pico de C1s antes y después del tratamiento de

estabilidad. En general, se observó sobre todas las muestras una disminución del porcentaje de los 4 picos observados antes del tratamiento, en algunas de ellas en mayor o menor proporción.

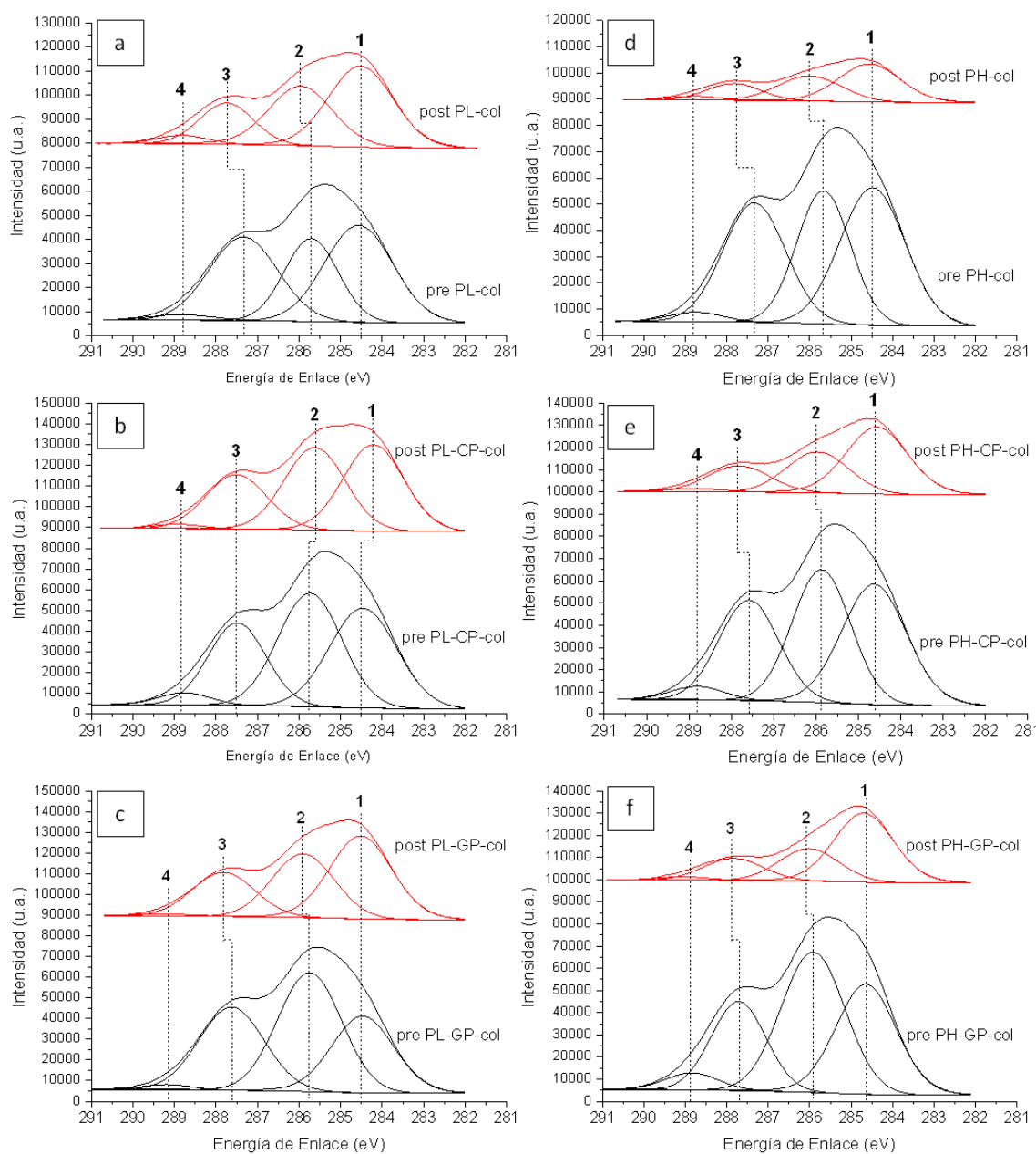


Figura 3.16: Espectros de alta resolución del C1s, obtenidos sobre las muestras con colágeno inmobilizado antes (pre) y después (post) del tratamiento de estabilidad. (a, b y c) Muestras previamente tratadas con plasma (PL-col, PL-CP-col y PL-GP-col). (d, e y f) Muestras previamente tratadas con piraña (PH-col, PH-CP-col y PH-GP-col).

Tabla 3.7: Porcentaje atómico de las especies químicas que conforman el espectro de alta resolución del C1s.

a) Muestras previamente tratadas con plasma.

C 1s			PL-col		PL-CP-col		PL-GP-col	
			pre	post	pre	post	pre	post
Pico	Especies Químicas	EE (eV)	51,2	29,0	55,6	38,9	52,2	34,2
1	C-H , C-C	284,6 ± 0,2	19,8	13,5	16,1	14,9	14,6	14,9
2	CH ₂ N, CH ₂ O	286,0 ± 0,1	14,2	9,1	22,4	14,1	21,0	11,2
3	O=C-N	287,9 ± 0,1	16,1	5,4	14,7	9,3	14,4	7,7
4	COOH, NH-C(=NH)-NH ₂	289,0 ± 0,1	2,0	0,9	2,4	0,6	2,1	0,4

b) Muestras previamente tratadas con piraña.

C 1s			PH-col		PH-CP-col		PH-GP-col	
			pre	post	pre	post	pre	post
Pico	Especies Químicas	EE (eV)	55,6	18,7	56,0	33,1	57,6	30,2
1	C-H , C-C	284,6 ± 0,2	20,7	8,9	16,3	16,6	18,7	16,8
2	CH ₂ N, CH ₂ O	286,0 ± 0,1	17,5	8,9	22,6	9,7	21,9	7,6
3	O=C-N	287,9 ± 0,1	16,2	5,8	14,7	6,2	14,7	5,2
4	COOH, NH-C(=NH)-NH ₂	289,0 ± 0,1	1,1	3,3	2,4	0,7	2,2	0,6

Lo anterior sumado al hecho de que parte del carbono también es atribuido a contaminación, no nos permite realizar una ratio entre los porcentajes de los subpicos detectados, y por lo tanto fue posible determinar a través del estudio del carbono, sobre cual superficie quedo mas colágeno inmovilizado después del tratamiento. No obstante, es importante resaltar que a pesar de la reducción de todos los porcentajes sobre todas las superficies, los picos ubicados a 288 y 289 eV no desaparecieron después del tratamiento, confirmando la presencia de colágeno sobre la superficie.

Sin embargo al analizar los porcentajes generales del C1s de la Tabla 3.5, después del tratamiento de estabilidad (post) se observó un mayor porcentaje de C1s sobre las muestras silanizadas que sobre las activadas, tanto en el grupo de plasma (PL-CP-col=38,9 y PL-GP-col= 34,2 > PL-col= 29,0%) como en el de piraña (PH-CP-col=33,1 y PH-GP-col= 30,1 > PH-col= 18,7%). A su vez los porcentajes fueron mayores sobre el grupo de muestras tratado con plasma. Comparando los dos tipos de silanos, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, el porcentaje de C después del tratamiento (post) es mayor en las muestras silanizadas con CPTES (PL-CP y PH-CP).

En cuanto al pico de oxígeno (O1s), después del tratamiento (post) el porcentaje general de éste aumenta sobre todas las muestras (Tabla 3.5), posiblemente porque al desprenderse el colágeno pueden quedar al descubierto especies químicas que contienen oxígenos como los óxidos metálicos, los grupos hidroxilo generados sobre la superficie y los silanos enlazados a la superficie metálica (Ti-O-Si y Si-O-Si).

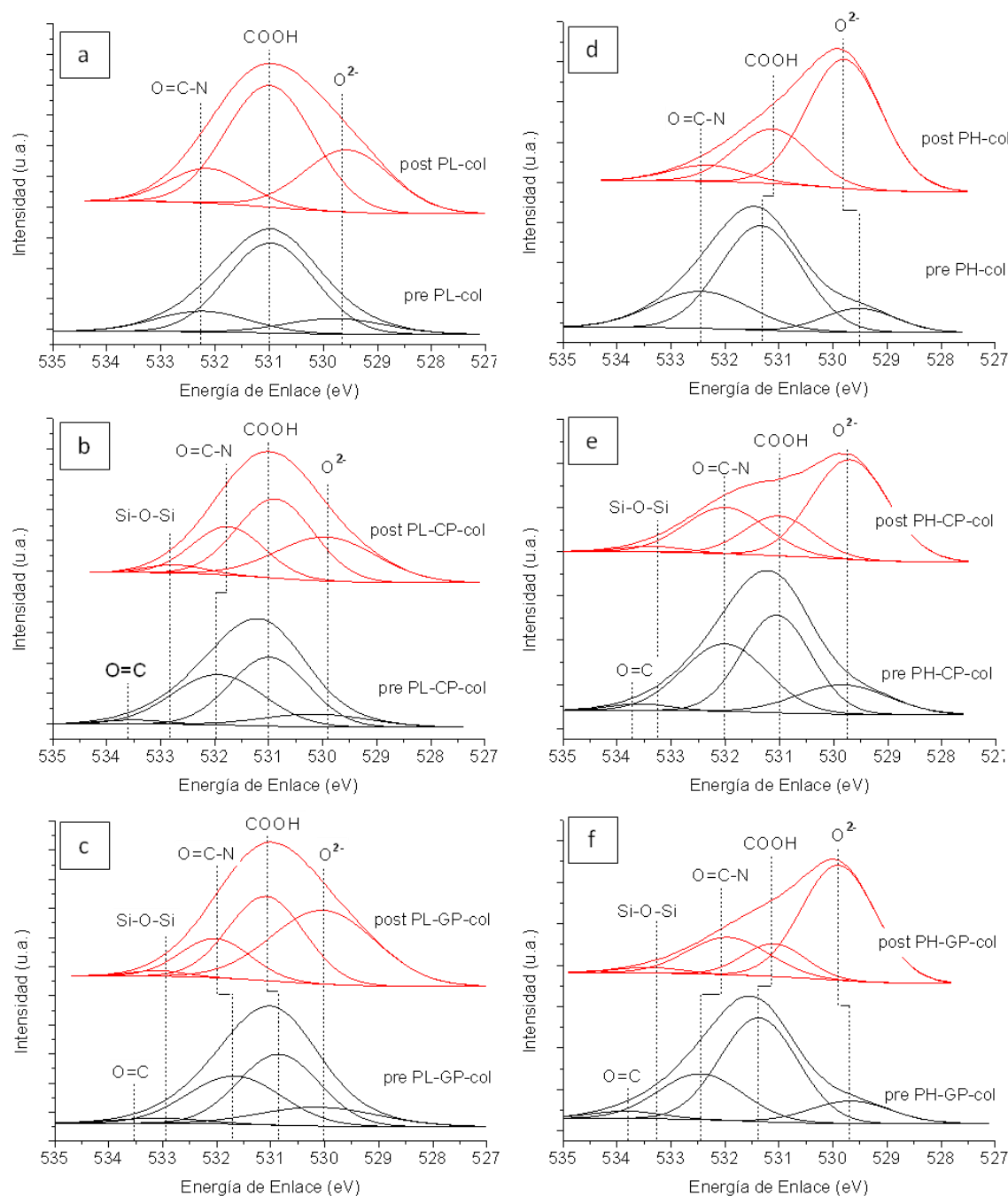


Figura 3.17: Espectro de alta resolución del O1s, obtenidos sobre las muestras con colágeno inmovilizado antes (pre) y después (post) del tratamiento de estabilidad. (a, b y c) Muestras previamente tratadas con plasma (PL-col, PL-CP-col y PL-GP-col). (d, e y f) Muestras previamente tratadas con piraña (PH-col, PH-CP-col y PH-GP-col).

Tabla 3.8: Porcentaje atómico de las especies químicas que conforman el espectro de alta resolución del O1s.

a) Muestras previamente tratadas con plasma.

O 1s			PL-col		PL-CP-col		PL-GP-col	
			pre	pos	pre	pos	pre	pos
Pico	Especies Químicas	EE (eV)	29,1	44,9	26,2	34,0	28,7	40,8
1	O ²⁻	530	13,6	29,3	12,8	30,6	17,0	45,0
2	COOH / (OH ⁻)	531	69,2	56,3	40,1	39,1	44,5	37,3
3	O=C-N / (H ₂ O ó Ti-O-Si)	532	17,3	14,4	43,6	26,9	35,0	16,0
4	C=O → Si-O-Si	533,9 → 533			3,5	3,4	3,5	1,7

b) Muestras previamente tratadas con piraña.

O 1s			PH-col		PH-CP-col		PH-GP-col	
			pre	pos	pre	pos	pre	pos
Pico	Especies Químicas	EE (eV)	26,2	47,6	25,6	41,0	25,2	43,1
1	O ²⁻	530	12,4	64,9	17,2	52,6	13,1	61,3
2	COOH / (OH ⁻)	531	61,8	27,1	43,7	18,9	56,2	14,7
3	O=C-N / (H ₂ O ó Ti-O-Si)	532	25,7	8,0	36,6	25,9	27,7	21,6
4	C=O → Si-O-Si	533,9 → 533			2,6	2,5	3,0	2,4

En los espectros de alta resolución del O1s (Figura 3.17 a -f y Tablas 3.8 a y b) se observó que los picos varían de forma diferente y en cantidades diferentes dependiendo del tratamiento de activación previo (PL ó PH) y del silano utilizado (CP ó GP). En todos los espectros previo al tratamiento de estabilidad (pre), se observó que la intensidad de los picos correspondientes al óxido de titanio (~530eV) es baja, probablemente debido a la presencia del colágeno que actúa de pantalla, como se observó en el apartado 3.4.4. Después de someter las muestras al tratamiento de estabilidad (post), se observó sobre todas las muestras un aumento de este pico y una disminución en el pico 2 (COOH - 531eV) (Tabla 3.8 a y b), lo que indica un desprendimiento de parte de colágeno que se encontraba fisisorbido y dejando al descubierto los óxidos y los grupos OH⁻ presentes en las superficies, respectivamente. El pico 3 (532 eV) también disminuyó sobre todas las superficies, indicando desprendimiento del colágeno. Sin embargo, este pico es atribuido a diferentes especies dependiendo del tratamiento realizado sobre la superficie antes de la inmovilización del colágeno. Por una parte, en las muestras activadas

(PL-col y PH-col) este pico está relacionado con la superposición de la señal del enlace O=C-N sobre la señal de H₂O que había antes en la superficie. Por el contrario en el caso de las muestras silanizadas, este pico está relacionado con la superposición del mismo enlace (O=C-N) pero sobre la señal del silano enlazado a la superficie del metal (Si-O-Ti). Por lo tanto no podemos comparar ratios de disminución entre muestras activadas y silanizadas, pero si podemos hacer una comparación entre PL y PH y entre CP y GP.

En las Tablas 3.9 a y b se muestran las ratios realizadas de los cambios observados en los porcentajes de cada uno de los subpicos que conforman el espectro del O1s antes (pre) y después (post) del tratamiento de estabilidad. El cálculo de la ratio del pico 4 ubicado 533,9 eV antes del tratamiento no se realizó, ya que este pico no sólo cambió en porcentaje, si no que se desplazó cerca a 533,3 eV, indicando que parte de la especie carbonilo (C=O) se desprendió dejando a la vista parte de los silanoles (Si-O-Si).³⁷

Tabla 3.9: Ratios de los porcentajes de las especies químicas que conforman el espectro de alta resolución del O1s.

a) Muestras previamente tratadas con plasma.

Pico	EE (eV)	Ratios	PL-col	PL-CP-col	PL-GP-col
1	530	O ²⁻ post / O ²⁻ pre	2,2	2,4	2,6
2	531	COOH pre / COOH post	1,2	1,0	1,2
3	532	O=C-N pre / O=C-N post	-----	1,6	2,2

b) Muestras previamente tratadas con piraña.

Pico	EE (eV)	Ratios	PH-col	PH-CP-col	PH-GP-col
1	530	O ²⁻ post / O ²⁻ pre	5,2	3,1	4,7
2	531	COOH pre / COOH post	2,3	2,3	3,8
3	532	O=C-N pre / O=C-N post	-----	1,3	1,4

Al comparar los grupos de muestras se observó que, en las muestras previamente tratadas con piraña (PH-col, PH-CP-col y PH-GP-col) los valores de las ratios de los picos 1 y 2 son mucho mayores que en las muestras de plasma (PL-CP y PL-GP), indicando que sobre el grupo previamente tratado con piraña hay un mayor desprendimiento de colágeno fisisorbido. Al comparar sólo los dos tratamientos de activación (PL-col y PH-col), se observó que la ratio del pico 1 y el pico 2 son mucho mayores sobre las muestras de PH-col. Esto puede deberse a que sobre las

muestras de piraña al haber menos grupos OH⁻ y una alta cantidad de superficie oxidada (como se observó en el apartado 2.4.1. d y e del capítulo 2), la interacción entre el colágeno y esta superficie se dio en mayor medida con los óxidos. Además, en el caso de las muestras de PL-col se observó que el pico 2 disminuyó poco (Tabla 3.8 a), indicando que parte del colágeno sigue adherido sobre la superficie a través de la interacción con los grupos OH⁻. Finalmente en el caso de las muestras previamente tratadas con piraña y silanizadas (PH-CP-col y PH-GP-col), el aumento del de las ratios de los picos 1 y 2 es mucho mayor que en las muestras de plasma (PL-CP-col y PL-GP-col), indicando que sobre las previamente tratadas con piraña hay mas parte del colágeno fisisorbido antes del tratamiento y por lo tanto éste se desprende en mayor cantidad. A su vez, esto puede ser debido a que sobre las muestras previamente tratadas con piraña, se observó menos silanos adheridos que sobre las muestras tratadas previamente con plasma (apartado 2.4.2 c del capítulo 2), lo que también influye en la estabilidad del colágeno inmovilizado.

Al comparar el efecto de los silanos, se observó que las ratios de los 3 picos son menores sobre las muestras silanizadas con CPTES que con GPTES, tanto sobre el grupo previamente tratado con plasma como con piraña, indicando una mayor estabilidad del colágeno sobre las muestras silanizadas con CPTES. Este resultado no concuerda con lo observado en los resultados de estabilidad por fluorescencia, donde se observó una estabilidad muy similar en todas las superficies silanizadas. Sin embargo, los datos obtenidos por XPS tienen una mayor fiabilidad al tratarse de una técnica semicuantitativa que se realiza directamente sobre las superficies. Por el contrario, la fluorescencia es una forma indirecta de medir la cantidad de colágeno a través de un fluoróforo que se adhiere al colágeno. Además, es posible que debido a los aglomerados que presentan una mayor fluorescencia, parte de la fluorescencia de capas que estén por debajo no sea registrada.

Como se observó en los resultados de XPS y del complejo de zinc del capítulo 2 (apartado 2.4.1 d y e) el proceso de activación con plasma genera mayor cantidad de OH⁻, lo que puede explicar la mayor estabilidad del colágeno sobre estas muestras, en comparación con el proceso de activación por piraña. Por otra parte, sobre las muestras tratadas con plasma se enlazaron más moléculas de silano,

aumentando los posibles sitios de enlace con el colágeno. De la misma manera, las muestras silanizadas con GPTES tanto previamente tratadas con plasma como con piraña (PL-GP y PH-GP) mostraron menor porcentaje de silicio en comparación con las silanizadas con CPTES (PL-CP y PH-CP) (apartado 2.4.2 c). Además, existe la posibilidad de que el GPTES se haya hidrolizado durante la inmovilización del colágeno, disminuyendo la estabilidad.

En resumen, estos resultados coinciden con los observados en las imágenes obtenidas del análisis de estabilidad mediante microscopia de fluorescencia. Ambos análisis coinciden en que el colágeno es más estable sobre las muestras tratadas con piraña y silanizadas (PH-CP-col y PH-GP-col) que sobre las muestras solo activadas con piraña (PH-col). En el caso de las muestras previamente tratadas con plasma, el resultado observado por XPS, confirman que lo observado en el apartado anterior sobre las muestras de PL-col, era debido a que nos encontrábamos en el límite de detección de la fluorescencia, y por lo tanto podemos confirmar que el colágeno es más estable sobre las muestras silanizadas (PL-CP-col y PL-GP-col) que sobre la muestra solo activada con plasma (PL-col). Estos resultados demuestran que después del tratamiento sigue habiendo colágeno sobre todas las superficies pero en mayor cantidad sobre las superficies silanizadas y por lo tanto se puede hablar de un enlace más estable.

3.5 CONCLUSIONES

Del estudio de la inmovilización del colágeno sobre las diferentes superficies estudiadas se puede concluir que:

- 1) El colágeno fue inmovilizado satisfactoriamente sobre las superficies de titanio mediante el método de biofuncionalización propuesto. La inmovilización de la molécula se logró tanto mediante fisisorción como mediante el uso de silanos. La presencia del colágeno sobre las diferentes superficies se confirmó a través de los estudios de microscopía de fluorescencia, ToF SIMS y XPS.

2) A través de los estudios de microscopia de fluorescencia se observó que la rugosidad generada sobre el grupo de muestras tratado con piraña aumentó la cantidad de colágeno en comparación con la observada sobre el grupo de muestras tratado con plasma. Sin embargo en los resultados de XPS no se observaron diferencias significativas entre los porcentajes obtenidos de los picos de Ti, N, C y O para cada muestra, y por lo tanto no se pudo determinar sobre cuál de las superficies había más cantidad de colágeno. Finalmente el estudio de OWLS determino una mayor cantidad de colágeno inmovilizado sobre las muestras de PL-CP-col seguido por las muestras de PL-GP-col y una menor cantidad sobre las muestras sólo tratadas con plasma (PL-col).

3) Debido a que los valores de los porcentajes atómicos de los elementos obtenidos en el análisis de XPS presentaron una baja dispersión, se puede concluir que se obtuvo una capa continua de colágeno sobre todas las superficies de titanio modificadas. Dicha capa es continua, pero no es homogénea ya que en los análisis de fluorescencia se observaron zonas con aglomeraciones de colágeno.

4) Los tratamientos previos a la silanización generan grupos hidroxilo y una capa de óxido que influyen en la cantidad de silano inmovilizado y por lo tanto en la cantidad de proteína adherida. En este caso, el tratamiento de plasma presenta un comportamiento más óptimo en cuanto a cantidad de silanos sobre la superficie y por lo tanto mejora la estabilidad de la proteína.

5) Los análisis de microscopia óptica por fluorescencia y XPS realizados antes y después de someter las muestras a tratamientos de estabilidad permitieron determinar que la inmovilización del colágeno se mejora en mayor medida mediante la silanización de las superficies de titanio, ya que sobre estas superficies hay una mayor cantidad inicial de colágeno inmovilizado y hay una menor pérdida del colágeno cuando se compara con las muestras donde el colágeno esta fisisorbido.

6) En los estudios de estabilidad del colágeno inmovilizado, se confirmó que, aunque las diferencias son pequeñas, la estabilidad del colágeno es mayor sobre las muestras silanizadas con CPTES que con GPTES.

3.6 REFERENCIAS

1. Gullberg D, Gehlsen KR, Turner DC, et al. Analysis of $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$ integrins in cell-collagen interactions: identification of conformation dependent $\alpha 1\beta 1$ binding sites in collagen type I. *EMBO Journal*. 1992;11(11):3865 - 3873.
2. Knight CG, Morton LF, Peachey AR, et al. Recognize the Same Specific Amino Acid Sequence, GFOGER, in Native (Triple-helical) Collagens. *Biochemistry*. 2000;275(1):35-40.
3. Yamamoto, M., Yamato, M., Aoyagi, M., Yamamoto K. Identification of integrins involved in cell adhesion to native and denatured type I collagens and the phenotypic transition of rabbit arterial smooth muscle cells. *Experimental Cell Research*. 1995;219:249 - 256.
4. Shekaran A, Garcia AJ. Nanoscale engineering of extracellular matrix-mimetic bioadhesive surfaces and implants for tissue engineering. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011;1810(3):350-60.
5. Chen C, Zhang S-M, Lee I-S. Immobilizing Bioactive Molecules onto Titanium Implants to Improve Osseointegration. *Surface and Coatings Technology*. 2012.
6. Schreiber F. Structure and growth of self-assembling monolayers. *Progress in Surface Science*. 2000;65(5-8):151-257.
7. Schliephake H, Scharnweber D. Chemical and biological functionalization of titanium for dental implants. *Journal of Materials Chemistry*. 2008;18(21):2404.
8. Iucci G, Battocchio C, Dettin M, Ghezzi F, Polzonetti G. An XPS study on the covalent immobilization of adhesion peptides on a glass surface. *Solid State Sciences*. 2010;12(11):1861-1865.
9. Costa F, Carvalho IF, Montelaro RC, Gomes P, Martins MCL. Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta biomaterialia*. 2011;7(4):1431-40.
10. Herrero J, Fernández P, Turnay J, et al. Influence of different chemical cross-linking treatments on the properties of bovine pericardium and collagen. *In Vivo*. 1999;20:539-545.

11. Vörös J. The density and refractive index of adsorbing protein layers. *Biophysical journal*. 2004;87(1):553-61.
12. Highberber JH. The Isoelectric Point of Collagen. 1938;852(1924):1938-1939.
13. Rechendorff K. The influence of surface roughness on protein adsorption PhD Thesis. Department of Physics and Astronomy and Interdisciplinary Nanoscience Center. *University of Aarhus, Dinamarca*. 2006;(February).
14. Song W, Chen H. Protein adsorption on materials surfaces with nanotopography. *Chinese Science Bulletin*. 2007;52(23):3169-3173.
15. Adamczak M, Scisłowska-Czarnecka A, Genet MJ, Dupont-Gillain CC, Pamuła E. Surface characterization, collagen adsorption and cell behaviour on poly(L-lactide-co-glycolide). *Acta of Bioengineering and Biomechanics*. 2011;13(3):63-75.
16. Rechendorff K, Hovgaard MB, Foss M, Zhdanov VP, Besenbacher F. Enhancement of protein adsorption induced by surface roughness. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. 2006;22(26):10885-8.
17. Dufrêne YF, Marchal TG, Rouxhet PG. Influence of Substratum Surface Properties on the Organization of Adsorbed Collagen Films: In Situ Characterization by Atomic Force Microscopy. 1999;(22):2871-2878.
18. Denis FA, Hanarp P, Sutherland DS, et al. Protein Adsorption on Model Surfaces with Controlled Nanotopography and Chemistry. *Langmuir*. 2002;18:819-828.
19. Ying P, Jin G, Tao Z. Competitive adsorption of collagen and bovine serum albumin—effect of the surface wettability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2004;33(3-4):259-263.
20. Sethuraman A, Han M, Kane RS, Belfort G. Effect of surface wettability on the adhesion of proteins. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. 2004;20(18):7779-88.
21. Bagno A, Piovan A, Dettin M, et al. Human osteoblast-like cell adhesion on titanium substrates covalently functionalized with synthetic peptides. *Bone*. 2007;40(3):693-9.
22. Müller R, Abke J, Schnell E, et al. Influence of surface pretreatment of titanium- and cobalt-based biomaterials on covalent immobilization of fibrillar collagen. *Biomaterials*. 2006;27(22):4059-68.
23. Sargeant TD, Rao MS, Koh C-Y, Stupp SI. Covalent functionalization of NiTi surfaces with bioactive peptide amphiphile nanofibers. *Biomaterials*. 2008;29(8):1085-98.

24. Middleton CA, Pendegrass CJ, Gordon D, Jacob J, Blunn GW. Fibronectin silanized titanium alloy: A bioinductive and durable coating to enhance fibroblast attachment in vitro. 2007.
25. Llopis-Hernández V, Rico P, Ballester-Beltrán J, Moratal D, Salmerón-Sánchez M. Role of surface chemistry in protein remodeling at the cell-material interface. *PloS one*. 2011;6(5):e19610.
26. Elliott JT, Woodward JT, Umarji A, Mei Y, Tona A. The effect of surface chemistry on the formation of thin films of native fibrillar collagen. *Biomaterials*. 2007;28(4):576-85.
27. Keselowsky BG, Collard DM, García AJ. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 2003;66(2):247-59.
28. Ege SN. *Organic Chemistry. Structure and Reactivity*. 4th ed. (Stratton R, Warne S, eds.). Boston - New York: Houghton Mifflin Company; 1999.
29. Tidwell CD, Castner DG, Golledge SL, et al. Static time-of-flight secondary ion mass spectrometry and x-ray photoelectron spectroscopy characterization of adsorbed albumin and fibronectin films. *Surface and Interface Analysis*. 2001;31(8):724-733.
30. Dambach S, Fartmann M, Kriegeskotte C, et al. ToF-SIMS and laser-SNMS analysis of apatite formation in extracellular protein matrix of osteoblasts in vitro. *Surface and Interface Analysis*. 2004;36(8):711-715.
31. Mantus D, Ratner B, Carlson B, Moulder J. Static secondary ion mass spectrometry of adsorbed proteins. *Analytical chemistry*. 1993;65(10):1431-8.
32. Wagner M, Castner D. Analysis of adsorbed proteins by static time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Applied Surface Science*. 2004;231-232:366-376.
33. Sevilla P, Godoy M, Salvagni E, Rodríguez D, Gil FJ. Biofunctionalization of titanium surfaces for osseointegration process improvement. *Journal of Physics: Conference Series*. 2010;252:012009.
34. Deligianni D, Katsala N, Ladas S, et al. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials*. 2001;22(11):1241-51.
35. Tsiourvas D, Tsetsekou A, Arkas M, Diplas S, Mastrogianni E. Covalent attachment of a bioactive hyperbranched polymeric layer to titanium surface for the biomimetic growth of calcium phosphates. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2011;22(1):85-96.

36. Xiao SJ, Textor M, Spencer ND, et al. 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(12):867-72.
37. Wang Y-Y, Lü L-X, Shi J-C, et al. Introducing RGD peptides on PHBV films through PEG-containing cross-linkers to improve the biocompatibility. *Biomacromolecules*. 2011;12(3):551-9.
38. Iucci G, Dettin M, Battocchio C, et al. Novel immobilizations of an adhesion peptide on the TiO₂ surface: An XPS investigation. *Materials Science and Engineering: C*. 2007;27(5-8):1201-1206.
39. Viornerly C, Chevolut Y, Léonard D, et al. Surface Modification of Titanium with Phosphonic Acid To Improve Bone Bonding: Characterization by XPS and ToF-SIMS. *Langmuir*. 2002;18(7):2582-2589.
40. Kingshott P, McArthur S, Thissen H, Castner DG, Griesser HJ. Ultrasensitive probing of the protein resistance of PEG surfaces by secondary ion mass spectrometry. *Biomaterials*. 2002;23(24):4775-85.
41. Mani G, Feldman MD, Oh S, Agrawal CM. Surface modification of cobalt-chromium-tungsten-nickel alloy using octadecyltrichlorosilanes. *Applied Surface Science*. 2009;255(11):5961-5970.
42. Morra M, Cassinelli C, Cascardo G, et al. Surface engineering of titanium by collagen immobilization. Surface characterization and in vitro and in vivo studies. *Biomaterials*. 2003;24(25):4639-4654.
43. Morra M. Biochemical modification of titanium surfaces: peptides and ECM proteins. *European cells & materials*. 2006;12:1-15.
44. Pisarek M, Roguska A, Andrzejczuk M, et al. Effect of two-step functionalization of Ti by chemical processes on protein adsorption. *Applied Surface Science*. 2011;257(19):8196-8204.
45. Xiao SJ, Textor M, Spencer ND, Sigrist H. Covalent attachment of cell-adhesive, (Arg-Gly-Asp)-containing peptides to titanium surfaces. *Langmuir*. 1998;14(19):5507-5516.
46. Dupont-Gillain CC, Pamula E, Denis F a, et al. Controlling the supramolecular organisation of adsorbed collagen layers. *Journal of materials science. Materials in medicine*. 2004;15(4):347-53.
47. De Cupere VM, J VW, Rouxhet PG. Nanoscale organization of collagen and mixed collagen-pluronic adsorbed layers. *Langmuir*. 2003;19:6957 - 6967.
48. Pamula E, De Cupere V, Dufrêne YF, Rouxhet PG. Nanoscale organization of adsorbed collagen: Influence of substrate hydrophobicity and adsorption time. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004;271(1):80-91.

4

INFLUENCIA DEL COLÁGENO INMOVILIZADO SOBRE LA RESPUESTA DE FIBROBLASTOS

4.1 INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas los estudios referentes a la integración de los implantes dentales con los tejidos circundantes se han centrado principalmente en la mejora de la osteointegración.¹ Dentro de estos estudios el efecto que posee el colágeno tipo I inmovilizado sobre superficies de titanio se han centrado en la respuesta de células osteoblásticas,¹⁻⁵ pero es poco lo que se ha probado en cuanto al comportamiento de los demás tipos de células.⁵⁻⁷

Sin embargo, la formación y la unión del tejido conectivo de la encía alrededor del cuello del implante, denominado como *sellado biológico*, también es un factor determinante para evitar el paso de bacterias y gérmenes a través de la interfaz implante-tejido, lo cual previene el posterior aflojamiento del implante debido a la interacción de las bacterias con los tejidos óseos que rodean al implante.⁸ La rapidez con la que se den los procesos de recuperación de los tejidos blandos

alrededor del implante, también es un factor determinante para disminuir el riesgo de fallo.^{9,10} Es aquí donde las células fibroblásticas juegan un papel relevante ya que son las células más abundantes (65%) en los tejidos que se encuentran en la encía, cuya función principal es sintetizar diversos tipos de fibras del tejido conectivo entre ellas el colágeno tipo I, que son las que actúan como agentes ligantes entre la encía y el cuello del diente,¹¹ y en nuestro caso particular entre la encía y el cuello del implante.

Es bien sabido que la matriz extracelular es quien brinda el soporte necesario a las células para que puedan adherirse, comunicarse entre ellas e interactuar. Diferentes estudios han indicado que el colágeno de tipo I promueve la adhesión de las células del tipo fibroblasto, al poseer secuencias GFOGER (glicina-fenilalanina-hidroxiprolina-glicina-glutamato-arginina), las cuales son reconocidas principalmente por las integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ presentes en los fibroblastos -proteínas que actúan como receptores de las células y que participan en la unión de las células con la matriz extracelular-.¹²⁻¹⁶ En base a lo anterior, en este estudio se busca favorecer la respuesta de las células fibroblásticas, mediante la inmovilización de colágeno tipo I sobre la superficie del titanio y así mejorar y/o acelerar la unión de los tejidos de la encía al implante.

Después de la colocación de un implante dental, tiene lugar un proceso de cicatrización, que en los tejidos blandos está ligado a la respuesta de las células fibroblásticas. En este proceso, los fibroblastos son reclutados en el sitio de la herida y se activan a un estado transitorio, dando lugar a los llamados miofibroblastos. Una vez activados, los miofibroblastos expresan el gen alfa actina de músculo liso (α -SMA), un marcador característico de las células de músculo liso que confiere contractilidad al citoesqueleto, y sintetizan y remodelan la matriz extracelular (MEC) hasta que resuelven la herida.^{17,18} El nivel de activación de los fibroblastos puede ser determinado a través de la detección y cuantificación de la expresión del gen α -SMA (α -smooth muscle actin).

Además, se pueden cuantificar otros marcadores relacionados con la expresión de genes asociados a la síntesis y secreción de moléculas de la MEC, dentro de las que

se incluyen el colágeno y la fibronectina¹⁹ o marcadores de genes relacionados con las metaloproteinasas (MMPs), que son unas enzimas secretadas por los fibroblastos activados para llevar a cabo el proceso de remodelación de la MEC.^{20,21} Las MMPs son sintetizadas en una forma latente llamada pro-MMP. Estas proenzimas inactivas son secretadas en el espacio extracelular donde se activan y reconocen secuencias específicas de proteínas de la MEC.^{9,22} Las MMPs se dividen en varios grupos, entre los cuales están: las gelatinasas (MMP2 y MMP9) que degradan gelatinas y colágeno, así como estromelisininas (MMP3 y MMP7) que digieren una amplia gama de sustratos tales como colágeno, proteoglicanos, laminina, gelatinas, y la fibronectina.⁹ En este estudio se seleccionaron las MMP2, MMP3 y la MMP9, porque se consideran marcadores de la activación de los fibroblastos.

La finalidad de este capítulo es estudiar el efecto del colágeno inmovilizado sobre el titanio, sobre los procesos de adhesión, proliferación y activación de los fibroblastos. Los análisis realizados se centraron en comparar el efecto de la cantidad de colágeno adherido y de las características físicas de la superficie como la rugosidad, la hidrofobicidad y la composición química, sobre la eficiencia con la que se dan los procesos de adhesión, proliferación, activación y secreción de componentes de la MEC, así como la secreción de enzimas remodeladoras de dicha matriz.

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Objetivo general

El objetivo general de este capítulo es evaluar la respuesta celular *in vitro* de fibroblastos dérmicos humanos sobre superficies de titanio recubiertas con colágeno tipo I.

4.2.2 Objetivos específicos

Este objetivo general se concreta en una serie de objetivos específicos que se describen a continuación:

1. Analizar la adhesión de los fibroblastos, a través de la cuantificación del número y el área de las células adheridas.
2. Analizar la proliferación de los fibroblastos sobre las diferentes superficies.
3. Cuantificar la expresión génica de marcadores de activación, síntesis y remodelación fibroblástica, para determinar el grado de activación de las células.

4.3 MATERIALES Y METODOS

4.3.1 Preparación de las muestras

Cada muestra se preparó de acuerdo a los protocolos de activación, silanización e inmovilización de proteína descritos en los capítulos anteriores. El resumen de las muestras evaluadas en todos los ensayos se muestra en la Tabla 4.1. Se prepararon triplicados de cada condición. Las muestras control se describirán en cada uno de los apartados correspondientes.

Tabla 4.1: Nomenclatura y descripción de las muestras utilizadas en los ensayos celulares

Nomenclatura	Descripción de la muestra
PL	Ti tratado con plasma de oxígeno
PL-col	Colágeno fisisorbido sobre PL
PL-CP	PL seguido por silanización con CPTES
PL-CP-col	Colágeno adherido covalentemente sobre PL-CP
PL-GP	PL seguido por silanización con GPTES
PL-GP-col	Colágeno adherido covalentemente sobre PL-GP
PH	Ti tratado con H ₂ SO ₄ :H ₂ O ₂
PH-col	Colágeno fisisorbido sobre PH
PH-CP	PH seguido por silanización con CPTES
PH-CP-col	Colágeno adherido covalentemente sobre PH-CP
PH-GP	PH seguido por silanización con GPTES
PH-GP-col	Colágeno adherido covalentemente sobre PH-GP

Antes de realizar los cultivos celulares, las muestras fueron sumergidas durante 30 minutos en una solución de fosfato salino (PBS) con un 1% de albumina de suero

bovino (BSA) (PBS-BSA1%). Con este procedimiento se busca adsorber la albumina en las áreas de la superficie que no están recubiertas por colágeno y de esta forma impedir la adsorción no específica de proteínas presentes en el medio de cultivo²³ y asegurar que la respuesta de las células sea sólo debida al colágeno presente sobre las superficies.²⁴ Una vez transcurridos los 30 minutos, las muestras se sumergieron en etanol al 70% durante 10 minutos a temperatura ambiente, con el fin de esterilizarlas.²⁵ Finalmente se realizaron 3 lavados con PBS.

4.3.2 Fibroblasto dérmicos humanos (HDF)

Para los ensayos *in vitro* realizados sobre las diferentes superficies de titanio modificadas, se utilizaron fibroblastos dérmicos humanos primarios (HDF), proporcionados por PromoCell (Heidelberg, Alemania). En todos los experimentos se usaron células entre los pases 4 y 6.

Tabla 4.2: Medio de cultivo utilizado en los cultivos celulares.

Producto	Casa Comercial	Concentración
DMEM GlutaMAX piruvato	Invitrogen	95%
Penicilina/Estreptomicina		1%
L-glutamina		1%

El medio de cultivo utilizado en todos los experimentos es el descrito en la Tabla 4.2. En el momento de sembrar las células sobre las superficies de estudio, el medio se preparó sin suero (FBS) para evitar que la respuesta celular fuese debida a las proteínas presentes en él y asegurarnos que sólo responden al colágeno inmovilizado sobre dichas superficies. Después de transcurridas 4 horas de cultivo para todos los ensayos, se cambió el medio de cultivo suplementado con 5% de FBS (Fetal Bovine Serum, Invitrogen).

4.3.3 Cultivo celular

Para descongelar y expandir las células, éstas fueron resuspendidas en medio de cultivo suplementado con FBS durante 4 días en una atmósfera estéril con un 5% CO₂ y 95% de humedad a 37°C. Una vez expandidas, las células en subconfluencia fueron tripsinizadas mediante TrypLE (Invitrogen), centrifugadas y resuspendidas en medio de cultivo sin suero.

Para todos los ensayos, las muestras de titanio se colocaron dentro de una placa de cultivo de 48 pocillos. Sobre cada muestra se añadieron 500µl de medio sin suero (FBS) con la concentración de células requerida para cada tipo de ensayo. La incubación se realizó en atmósfera estéril con 5% CO₂ y 95% de humedad a 37°C. La concentración celular y los tiempos de incubación para cada tipo de ensayo se detallarán en los apartados correspondientes.

4.3.4 Estudio de adhesión celular

Para el ensayo de adhesión se utilizó como control titanio puro pulido y sometido al tratamiento de limpieza descrito en el apartado 2.3.1 (Ti), preincubado con FBS durante 16 horas (Ti-FBS), bloqueado con BSA durante 30 minutos, esterilizado con etanol y lavado con PBS. Las muestras estudio son las descritas en el apartado 4.3.1. Se prepararon triplicados de cada condición.

Las células se sembraron directamente sobre las diferentes superficies de titanio modificadas (con y sin colágeno) y sobre la muestra control, en una concentración de $25,5 \times 10^3$ células/cm², con medio sin suero y un tiempo de incubación de 4 horas. Una vez transcurridas las 4 horas de incubación de las células sobre las muestras, se retiró el medio y con él se extrajeron las células no adheridas a la superficie del material, y se lavaron las muestras con PBS. Finalmente, se añadió nuevamente PBS para mantener las células en un ambiente líquido.

Para evaluar la morfología, el número y el área de las células adheridas, éstas se tiñeron con marcadores fluorescentes. Se retiró el PBS de las células y se fijaron las células, añadiendo a cada muestra paraformaldheido (Sima-Aldrich, Madrid-Spain) diluido previamente en PBS al 4%, dejándolo actuar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS/Gly 20nM (solución de lavado). Las células se permeabilizaron añadiendo Triton-X100 (Sigma-Aldrich, Madrid-Spain) diluido previamente en PBS al 0,1%, que se dejó actuar durante 15 minutos. Se realizaron lavados con la solución de lavado. Se añadió 1 ml de BSA-PBS/Gly- al 1% (0,1 g de BSA en 10 ml de PBS/Gly) sobre cada muestra, y se dejó actuar durante 60 minutos. Se realizaron lavados con la solución de lavado. Como anticuerpo primario se utilizó *Mouse Anti-human vinculin*

(Invitrogen) en una solución 1:100 en BSA -PBS/Gly 1%, que se dejó actuar durante 60 minutos a 37°C. Se realizaron lavados con la solución de lavado. Se preparó una solución 1:200 de *TRITC-Faloidina* (Invitrogen) en PBS/Gly 20nM. A esta solución se le agregó el volumen necesario de anticuerpo secundario (*Alexa-Fluor 488 - Goat Anti-mouse IgGs*, Invitrogen) para obtener una concentración 1:200. Esta mezcla se dejó actuar sobre las muestras durante 60 minutos a 37°C. Se realizaron lavados con la solución de lavado. Se añadió una solución 1:100 de *DAPI* en PBS/Gly, y se dejó actuar durante 2 minutos, evitando el contacto con la luz. Finalmente se añadió PBS/Gly para mantener las células en un ambiente líquido.

Para obtener las imágenes de las células, se utilizó un microscopio láser confocal de barrido (CLSM, Leica TCS SP5). Las imágenes obtenidas fueron analizadas a través del software Image J (Versión 1.41o, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA), mediante el cual se realizó una cuantificación del número de células adheridas y se realizó un análisis del grado de extensión de las células.

4.3.5 Análisis de proliferación celular

Para este ensayo se usó como control titanio puro, pulido y sometido al tratamiento de limpieza (Ti) sin ningún tipo de recubrimiento, esterilizado con etanol y lavado con PBS. Las muestras evaluadas fueron las descritas en la Tabla 4.1, excepto aquellas que no fueron biofuncionalizadas con colágeno. Las muestras fueron sumergidas durante 30 minutos en BSA, antes del cultivo (excepto la muestra de Ti). Se prepararon triplicados de cada uno de los tipos de superficies descritos.

Se sembraron $3,2 \times 10^3$ células/cm². En el proceso de adhesión inicial, las células se sembraron con medio sin suero y se dejaron en incubación durante 4 horas. Una vez transcurridas 4 horas, se retiró el medio sin suero, eliminando las células no adheridas y se añadió medio con suero. El medio de cultivo se cambió cada dos días. Los tiempos de evaluación fueron 1, 3 y 7 días.

Para medir el nivel de proliferación de los fibroblastos sobre cada una de las diferentes superficies de titanio una vez transcurrido el tiempo a evaluar, se cuantificó la cantidad de células mediante un análisis colorimétrico usando el “Kit

de detección de LDH” (Roche Applied Science) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El Lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima presente en todas las células, la cual reduce el exceso de NAD^+ en NADH y produce la oxidación de lactato a piruvato. El kit lleva lactato, NADH y sales de tetrazolio. A partir del LDH se da una reacción de oxido-reducción en la cual las sales de tetrazolio se reducen a formazán (Figura 4.1).

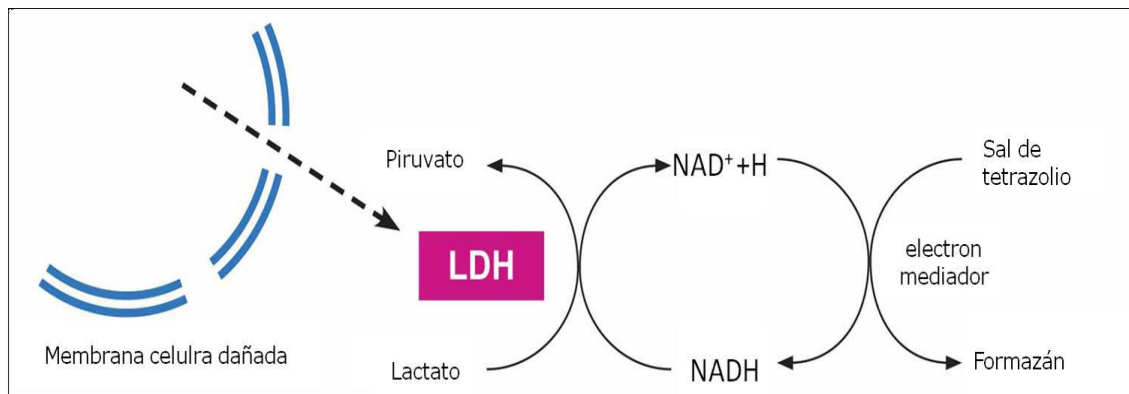


Figura 4.1: Mecanismo de la reacción de oxido reducción que se da entre el LDH con el lactato de sodio y con las sales de tetrazolio.

Para que se dé la reacción las células deben ser sometidas a un tratamiento de “lisis” mediante el cual se rompe la membrana celular y se libera el LDH. El formazán obtenido de la reacción emite color y por lo tanto se puede cuantificar mediante una medida de espectrofotometría de absorbancia a una longitud de onda de 490 nm.

En nuestro caso, se llevó a cabo una lisis de las células adheridas sobre las muestras, permitiendo así hacer una cuantificación de la cantidad de células, relacionándolas con la intensidad de la absorbancia obtenida mediante el uso del kit. La cuantificación se hizo a partir de una recta patrón, con el fin de obtener una grafica de concentración (2, 5, 10, 15, 20, 30, y 40 X 10^3 células) en función de la absorbancia.

Para obtener las medidas de absorbancia del LDH, se retiró de cada muestra el medio de cultivo. Se realizaron 3 lavados con PBS para eliminar los residuos de medio y las células muertas. Para lisis las células, se añadió M-PER sobre cada uno de los pocillos con las muestras y se pusieron a -80°C . Las muestras se

descongelaron, y se extrajeron 100µl de sobrenadante de cada pocillo, que se traspasó a una placa de 96 pocillos donde se realizó posteriormente la medida de absorbancia.

Aparte se preparó una mezcla de catalizador (mezcla diaforasa/NAD⁺) con tinte (lactato de sodio y de INT), en una proporción de 1:45. En cada uno de los pocillos que contiene los 100µl de células en M-PER, se añadieron 100µl de esta mezcla y se dejó actuar durante 15 minutos, a temperatura ambiente y protegiendo las muestras de la luz. Se añadieron 50µl de la solución que detiene la reacción. Finalmente, se realizó la medición de absorbancia a una longitud de onda de 490nm.

4.3.6 Estudio de expresión génica

Para este ensayo se usó como control titanio puro, pulido y sometido al tratamiento de limpieza (Ti) sin ningún tipo de recubrimiento, esterilizado con etanol y lavado con PBS. Las muestras evaluadas fueron las descritas en la Tabla 4.1, excepto aquellas que no fueron biofuncionalizadas con colágeno. Las muestras fueron sumergidas durante 30 minutos en BSA, antes del cultivo (excepto la muestra de Ti). Se prepararon triplicados de cada uno de los tipos de superficies descritos.

Se sembraron $6,4 \times 10^3$ células/cm². En el proceso de adhesión inicial, las células se sembraron con medio sin suero y se dejaron en incubación durante 4 horas. Una vez transcurridas 4 horas, se retiró el medio sin suero, eliminando las células no adheridas y se añadió medio con suero. El medio de cultivo se cambió cada dos días. Los tiempos de evaluación fueron 4, 24 y 72 horas.

Para analizar el grado de activación de las células se evaluó la expresión génica de un grupo de genes implicados en la activación de los fibroblastos, mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (real time-PCR). Esta técnica permite amplificar los productos del DNA complementario obtenido de la retrotranscripción del mRNA y de esta manera cuantificar la expresión de genes.

Después de cada tiempo de cultivo, el RNA de las células fue extraído mediante el uso del “Mini Kit RNeasy®” (Qiagen Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA total fue cuantificado usando un espectrofotómetro (NanoDrop Technologies, Montchanin, DE, USA). Se tomaron 100 ng de RNA para retranscribirlo en DNA copia (cDNA) usando el “Kit QuantiTect de Transcripción Reversible” (Qiagen). El producto obtenido de cDNA se diluyó y usó para realizar la RT-PCR. Los cebadores (primers) usados fueron escogidos basándonos en la información documentada en Guillem-Martí et al, 2012,²¹ donde se amplifican algunos genes específicos para adhesión, síntesis y remodelación de la matriz extracelular. La descripción de cada uno de ellos se encuentra en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3: Secuencias de DNA de los “primers” utilizados en el estudio de RT-PCR para cuantificar los genes seleccionados.

Función Relativa	Símbolo del Gen	Nombre del Gen	Secuencia DNA (5’_3’)	Tamaño amplicón
Control endógeno	ACTB	Áctina, beta	fw: AGAGCTACGAGCTGCCTGAC rv: CGTGGATGCCACAGGACT	114
Marcador - Miofibroblasto	ACTA2	Áctina, alfa2, músculo liso, aorta (α -SMA)	fw: CTGTTCCAGCCATCCTTCAT rv: TCATGATGCTGTTGTAGGTGGT	70
Componente de MEC	COL1A1	Colágeno tipo I, α 1	fw: AGGTCCCCTGGAAAGAA rv: AATCCTCGAGCACCTGA	96
Componente de MEC	FN1	Fibronectina 1	fw: GAACTATGATGCCGACCAGAA rv: GGTTGTGCAGATTCCTCGT	67
Remodelador de MEC	MMP2	Metalopeptidasa 2 (gelatinasa A)	fw: CGGTTTTCTCGAATCCATGA rv: GGTATCCATCGCCATGCT	76
Remodelador de MEC	MMP3	Metalopeptidasa 3 (estromelina 1, progelatinasa)	fw: GCAAGGACCTCGTTTTTCATT rv: CTCTTGGGTATCCAGCTCGT	81
Remodelador de MEC	MMP9	Metalopeptidasa 9 (gelatinasa B)	fw: GAACCAATCTCACCGACAGG rv: GCCACCCGAGTGTAACCATA	67

Todas las muestras fueron normalizadas usando como referencia (control endógeno) los niveles de expresión del gen β -actina (ACTB). Los análisis de RT-PCR fueron realizados usando el “Kit QuantiTect SYBR Green” (Qiagen) en el equipo Step One Plus-Real Time PCR System (Applied Biosystems). La expresión relativa (ER) de cada gen se calculó respecto a la respuesta sobre la muestra de Ti después de 4 horas (Ecuación 4.1):²⁶

$$ER = (E_{gen\ diana}^{\Delta Cq\ blanco\ (Ti4h-superficie)}) / (E_{referencia}^{\Delta Cq\ referencia\ (Ti4h-superficie)})$$

Ecuación 4.1

Donde C_q es el valor medio para el ciclo de cuantificación para el triplicado de cada muestra y E es la Eficiencia de amplificación la cual se determina a partir de la pendiente de la porción logarítmica-lineal de la curva de calibración donde $E = 10^{[1/pendiente]}$.²⁷

4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1 Adhesión celular

En la Figura 4.2 se muestran las imágenes de fluorescencia de los fibroblastos adheridos sobre las diferentes superficies de titanio estudiadas, después de un tiempo de incubación de 4 horas. En estas imágenes se muestra la tinción del citoesqueleto de actina en rojo y de los núcleos en azul. En las Figuras 4.3 y 4.4 se muestra la cuantificación del área y el número de dichas células. Un proceso de adhesión celular exitoso es seguido por el proceso de extensión de las células, en el cual las células reorganizan su citoesqueleto resultando en un estiramiento de la célula.²⁸ En la Figura 4.2 se observa que tanto el número, como el área de las células adheridas fue mucho mayor sobre las muestras recubiertas con colágeno que sin colágeno. Así mismo, el número de células es mayor sobre las muestras recubiertas con colágeno que sobre las muestras control de Ti-FBS. Sin embargo el área de las células en ambos casos es muy similar.

Al analizar sólo las superficies sin colágeno, se observó que tanto el número de células fue casi nulo, sobre las muestras silanizadas con CPTES en comparación con las muestras de GPTES y las activadas con plasma y piraña, sugiriendo que las superficies silanizadas con CPTES presentan un grado de citotoxicidad. Esto puede ser debido a que el CPTES posee como grupo funcional un Cl el cual es tóxico para las células. Por el contrario el anillo epóxido del GPTES y los grupos OH⁻ generados con el plasma y el piraña no son tóxicos para las células. La baja adhesión celular en el caso de las superficies silanizadas con CPTES (sin colágeno) representa una ventaja, ya que nos permite identificar el efecto positivo del colágeno sobre las células después de que éste es inmovilizado sobre la superficie.

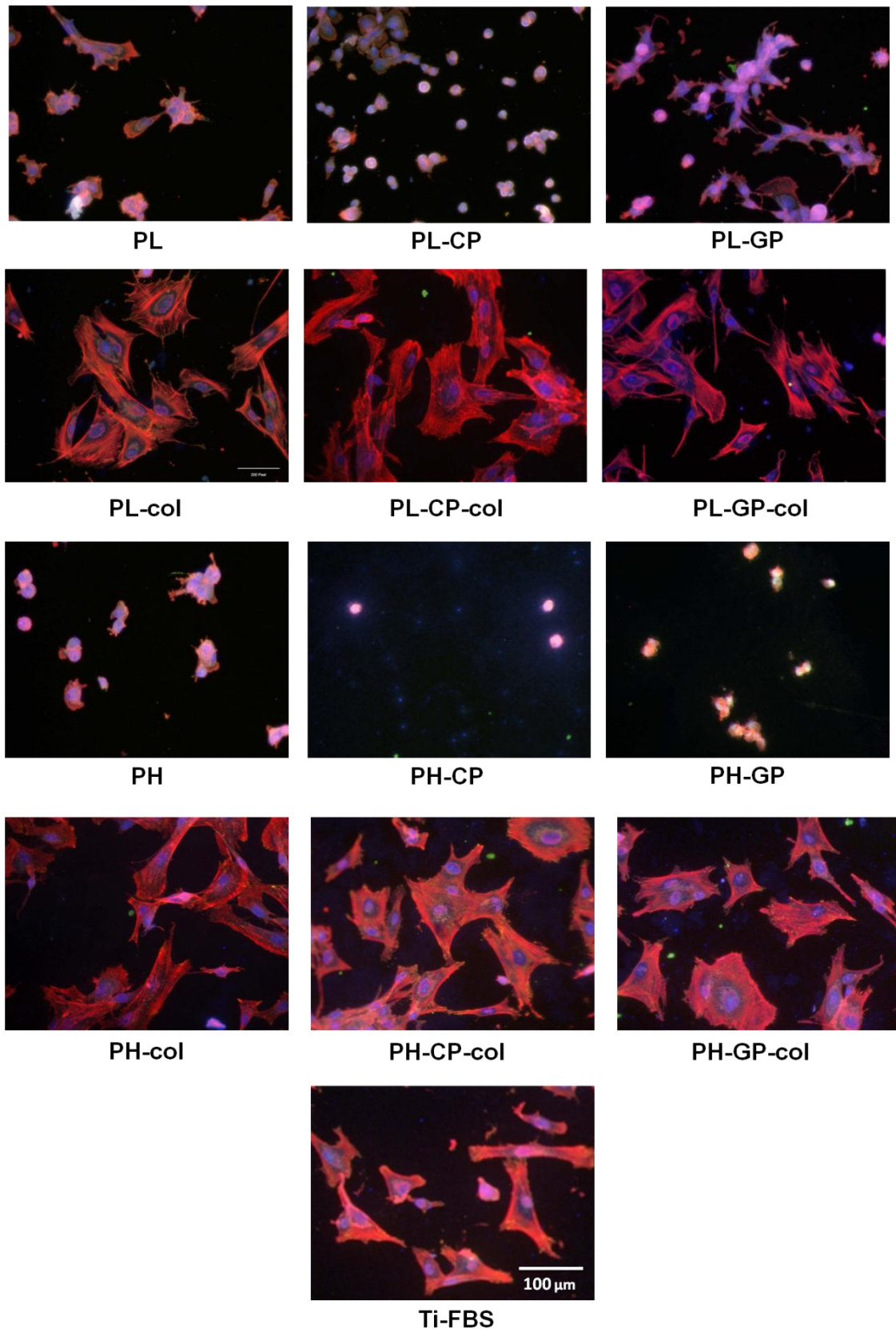


Figura 4.2: Imágenes de tinción fluorescente (citoesqueleto de actina en rojo y núcleos en azul) de los fibroblasto cultivados sobre las distintas muestras después de 4 horas de incubación. Imágenes obtenidas a 20 aumentos. La barra de escala es la misma para todas las imágenes.

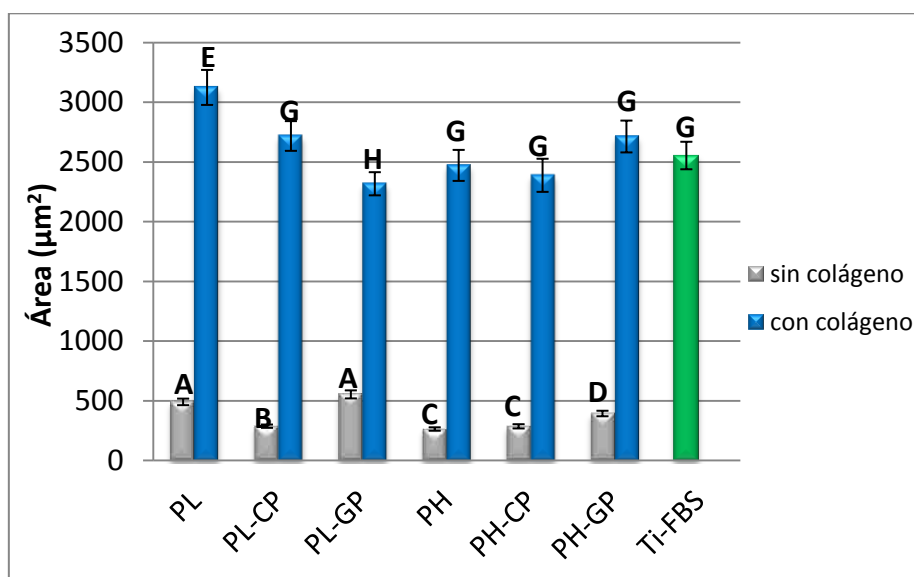


Figura 4.3: Área de las células adheridas a 4 horas de incubación. Las barras de error corresponden al error estándar. Las muestras que comparten letra, no tienen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

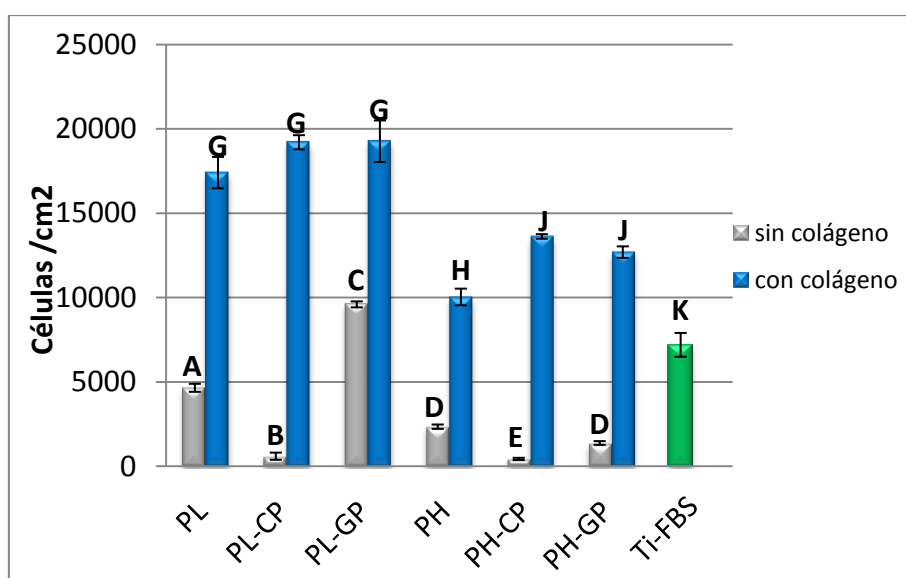


Figura 4.4: Número de células adheridas a 4 horas de incubación. Las barras de error corresponden al error estándar. Las muestras que comparten letra, no tienen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En las imágenes de la fluorescencia de la faloidina conjugada enlazada al citoesqueleto de actina (rojo) de los fibroblastos adheridos sobre las superficies (Figura 4.2), se observaron numerosas fibras de actina en las células cultivadas sobre muestras biofuncionalizadas con colágeno, indicando una mejor extensión de las células después de las 4 horas de cultivo. Por el contrario, las células sobre

las muestras que no tenían colágeno, tenían una forma circular. Estos resultados son consistentes con la cuantificación del área de las células que se muestran en la Figura 4.3. Sin embargo, no se observaron diferencias muy marcadas en cuanto al grado de extensión de las células adheridas sobre las distintas superficies recubiertas con colágeno. Al analizar las muestras previamente tratadas con plasma, se observó que hay diferencias significativas entre las 3 muestras (PL-col, PL-CP-col, PL-GP-col). Se observó que el tamaño de las células fue mayor en la muestra de PL-col que en las silanizadas, y que entre las silanizadas, es mayor en el caso de la muestra de PL-CP-col que para PL-GP-col. Al analizar sólo las muestras tratadas previamente con piraña (Figura 4.3), se observó que no hay diferencias significativas entre ellas en cuanto al área de las células.

A pesar de que hay diferencias en cuanto a la cantidad de colágeno adherido sobre cada una de las superficies y en cuanto a la rugosidad observada sobre el grupo de muestras tratado con plasma (PL-col, PL-CP-col y PL-GP-col) y el de piraña (PH-col, PH-CP-col y PH-GP-col), parece ser que estos aspectos no tienen una gran influencia sobre la extensión de las células. Hay estudios que han demostrado que las moléculas adoptan una conformación diferente dependiendo de la química de la superficie y esto a su vez puede influir en la respuesta celular.²⁹⁻³¹ Es probable que en nuestro caso el colágeno este adoptando una conformación diferente sobre cada una de las superficies.

En la Figura 4.4, se observa que el número de células sobre las superficies biofuncionalizadas con colágeno es significativamente mayor que sobre las superficies sin recubrimiento de colágeno, y también es mayor comparada con la muestra control de titanio puro preconditionada con FBS. En estudios previos se ha demostrado que la rápida respuesta de los fibroblastos sobre muestras con recubrimientos de colágeno tipo I, es debida al reconocimiento de las secuencias GFOGER presentes en el colágeno a través de sus integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ y no a las secuencias RGD, debido a que en la estructura del colágeno en forma de triple hélice estas secuencias no son accesibles para las células. Para que las secuencias RGD queden expuestas, es necesario que el colágeno se encuentre gelatinizado o desnaturalizado, es decir que haya perdido su conformación en triple hélice.^{2,12-15}

Por otra parte, además de la presencia de colágeno inmovilizado sobre las superficies, hay otros parámetros que pueden influir en la respuesta de las células, como es el caso de la rugosidad.³²⁻³⁴ Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo las muestras tratadas previamente con piraña tienen una rugosidad mucho mayor ($R_a = 144,47\text{nm}$) comparada con la de las muestras previamente tratadas con plasma ($R_a = 17,96\text{ nm}$). En la Figura 4.4 se observa que el número de células es significativamente mayor sobre el grupo de muestras previamente tratadas con plasma (PL, PL-CP y PL-GP) que sobre el previamente tratado con piraña (PH, PH-CP y PH-GP), tanto si tienen o no colágeno sobre su superficie.

Estos resultados concuerdan con estudios previos en los que otros autores comparan muestras de titanio lisas con muestras con cambios a nivel nanotopográfico, encontrando una mayor afinidad de los fibroblastos por superficies lisas.^{35,36} Takamori et al., estudiaron el efecto de la rugosidad en la adhesión de fibroblastos sembrados sobre poliestireno ($R_a = 0.09\text{ }\mu\text{m}$), titanio c.p. ($R_a = 0.88\text{ }\mu\text{m}$) y zirconia cerámica ($R_a = 30.93\text{ }\mu\text{m}$), observando que la adhesión era mejor sobre la muestra con menor rugosidad.³⁷ Zhao et al. compararon la adhesión de fibroblastos en muestras lisas y rugosas de Ti c.p. y de Ti-6Al-4V y para ambos casos encontraron un mayor número de células adheridas sobre las muestras lisas.³⁸

En el caso de las muestras previamente tratadas con plasma, al comparar el efecto de cada uno los silanos, a pesar de que se observó una cantidad de colágeno diferente sobre cada una de las muestras silanizadas (apartado 3.4.5, capítulo 3), no se observaron diferencias significativas en cuanto al número de células adheridas. Como se discutió en los análisis del área de las células, puede ser que el colágeno este adoptando una conformación diferente dependiendo del silano utilizado.

En resumen se puede decir que:

- La adhesión celular fue mejor sobre muestras biofuncionalizadas con colágeno que sobre el titanio preconditionado con FBS, en concordancia con otros estudios similares en los cuales se comprobó que el colágeno

estimula la adhesión celular sobre varios materiales.^{38,39} En todas las superficies biofuncionalizadas con colágeno aumentó el área de extensión celular, siendo la muestra PL-col la que presentó una mayor extensión de las células.

- El número de fibroblastos adheridos en las superficies biofuncionalizadas con colágeno, fue superior en superficies lisas tratadas con plasma (PL-col, PL-CP-col, PL-GP-col) que en superficies rugosas obtenidas tras el tratamiento de piraña (PH-col, PH-CP-col y PH-GP-col). La misma tendencia se observó en las superficies activadas y/o silanizadas en ausencia de colágeno.
- La cantidad de colágeno adherido no influyó en la cantidad de células adheridas ni en su grado de extensión, cuando se compararon superficies activadas con silanizadas o cuando se compararon los dos silanos (CPTES y GPTES), con lo cual se deben contemplar otros factores como por ejemplo la conformación de la proteína sobre dichas superficies o la rugosidad de la superficie.

4.4.2 Proliferación celular

En la Figura 4.5 se muestran los resultados de cuantificación de la proliferación celular mediante el método de detección de LDH. Ninguna de las superficies presentó citotoxicidad, ya que las células proliferaron con el paso del tiempo. Por otro lado, en cada uno de los tiempos de incubación, la proliferación celular sobre las muestras biofuncionalizadas con colágeno fue mayor que en la muestra control de titanio puro, con lo que podemos asegurar que este recubrimiento mejora la respuesta celular. En general los fibroblastos sembrados sobre las muestras con colágeno inmovilizado sobre su superficie mostraron curvas de proliferación similares durante los tiempos analizados.

Después del primer día de cultivo, se observó una baja cantidad de células presentes sobre las muestras, menor que la cantidad de células que se sembraron (5000 células/cm²). Sobre las muestras de titanio puro sin ningún recubrimiento

(Ti) sólo se cuantificaron 500 cel/cm². Después del tercer día, se observó que sobre casi todas las muestras el número de células se duplicó, excepto sobre la muestra de PH-col, donde el número de células aumentó en menor cantidad. Después de 7 días de incubación, se observó una alta proliferación en todas las muestras biofuncionalizadas con colágeno en comparación con la muestra control de titanio puro (Ti), lo que indica que el colágeno es reconocido por las células, promoviendo los procesos de proliferación celular.^{2-4,12-16,42,43}

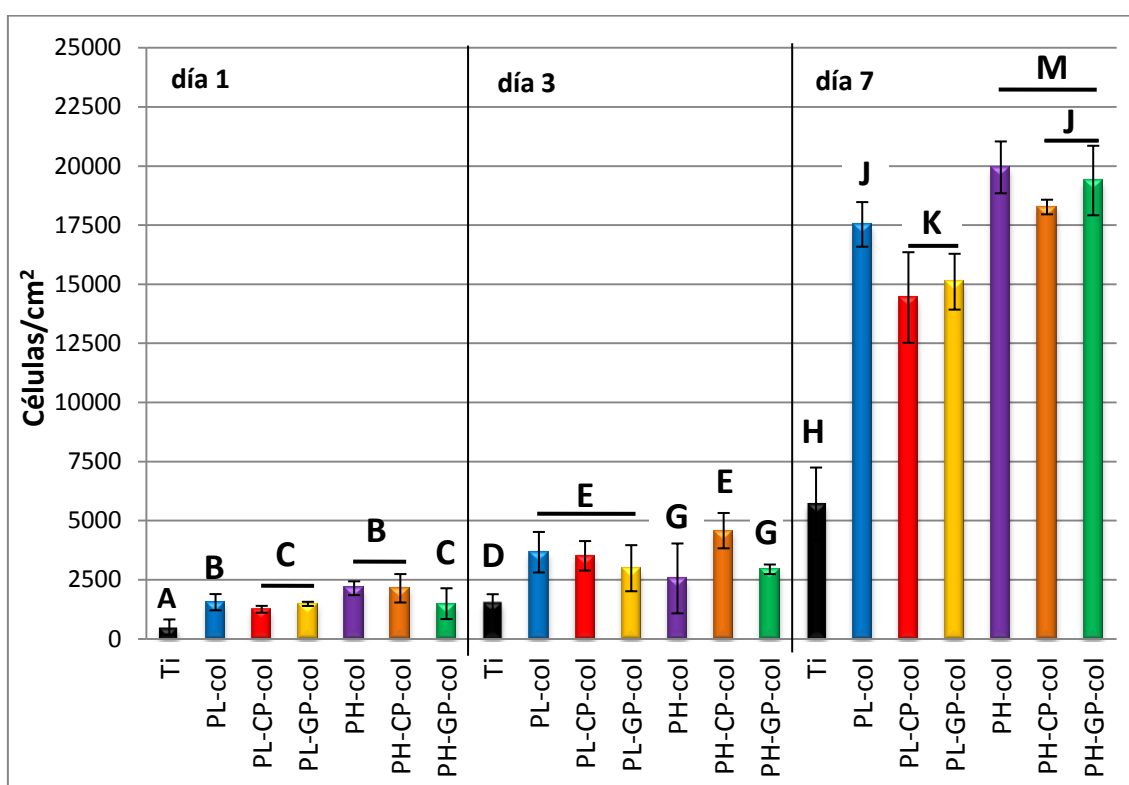


Figura 4.5: Numero de células/cm² cuantificado a través del método de detección de LDH, en cada una de las muestras biofuncionalizadas con colágeno, a 1, 3 y 7 días de cultivo. Las muestras que comparten letra, no tienen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Al comparar los efectos de los procesos previos de activación y silanización sobre la proliferación de los fibroblastos, se observó que después del día 7 las muestras con tratamientos previos de piraña (PH-col, PH-CP-col y PH-GP-col) presentaron una mayor cantidad de células que las muestras con tratamientos previos de plasma (PL-col, PL-CP-col y PL-GP-col), a pesar de que sobre las previamente tratadas con piraña se adhirieron menos células en tiempos cortos, como se observó en los resultados de adhesión (4.4.1). Pero una buena extensión celular si es un prerequisite para que se inicien los proceso de proliferación y activación celular,^{44,45} por lo cual todas las muestras presentaron una buena proliferación.

Los procesos de proliferación y diferenciación celular son inversos, es decir, cuando las células se encuentran en un estado de proliferación es poco el grado de diferenciación que pueden presentar, y viceversa. En el caso de los fibroblastos, al tratarse de células ya diferenciadas, una baja tasa de proliferación puede ser consecuencia del inicio de activación celular, en el cual la célula comienza a secretar MEC y a reorganizar dicha matriz, con el fin de ir construyendo tejido alrededor del implante.^{40,41} Estas posibles causas se discutirán más adelante al analizar los resultados de expresión génica.

4.4.3 Expresión génica

En las Figuras 4.6 a 4.10, se muestran los resultados del análisis de expresión génica (RT-qPCR) de los genes α -SMA (marcador de activación de los miofibroblastos), colágeno I α 1 (COL1A1) y fibronectina 1 (FN) (componentes de la MEC) y MMP3 y MMP2 (enzimas remodeladoras la MEC) expresados por los fibroblastos sembrados sobre cada una de las superficies de titanio biofuncionalizadas con colágeno, en tiempos de cultivo de 4, 24 y 72 horas. Los resultados fueron normalizados respecto a los niveles de expresión del gen endógeno de referencia β -actina y son representados como la Expresión Relativa (ER) respecto a las células sembradas sobre la muestra de titanio puro sin ningún recubrimiento (Ti) a 4 horas de cultivo (como se explicó el apartado 4.3.6).

La tendencia general observada fue que en el grupo de las superficies pretratadas con plasma (PL-col, PL-CP-col y PL-GP-col) hubo una sobreexpresión y un avance de los genes relacionados con la activación de los fibroblastos (α -SMA) (Figura 4.6) y con los genes relacionados con la secreción de colágeno I α 1 (Figura 4.7) y fibronectina (Figura 4.8), en concordancia con la mayor adhesión de las células sobre las superficies lisas de plasma (Figura 4.4 y 4.5). Así, mientras en las muestras no tratadas (Ti) o en las tratadas con piraña (PH-col, PH-CP-col y PH-GP-col), el máximo en la expresión génica de estos tres genes se observó a las 24 horas, en las muestras pretratadas con plasma la expresión de estos genes se anticipó a las 4 horas, siendo además más intensa. La expresión de estos genes a 4 horas fue casi nula sobre las muestras previamente tratadas con piraña en comparación con la muestra de titanio sin ningún recubrimiento (Ti), confirmando

nuevamente el efecto negativo de la rugosidad sobre la activación de los fibroblastos.

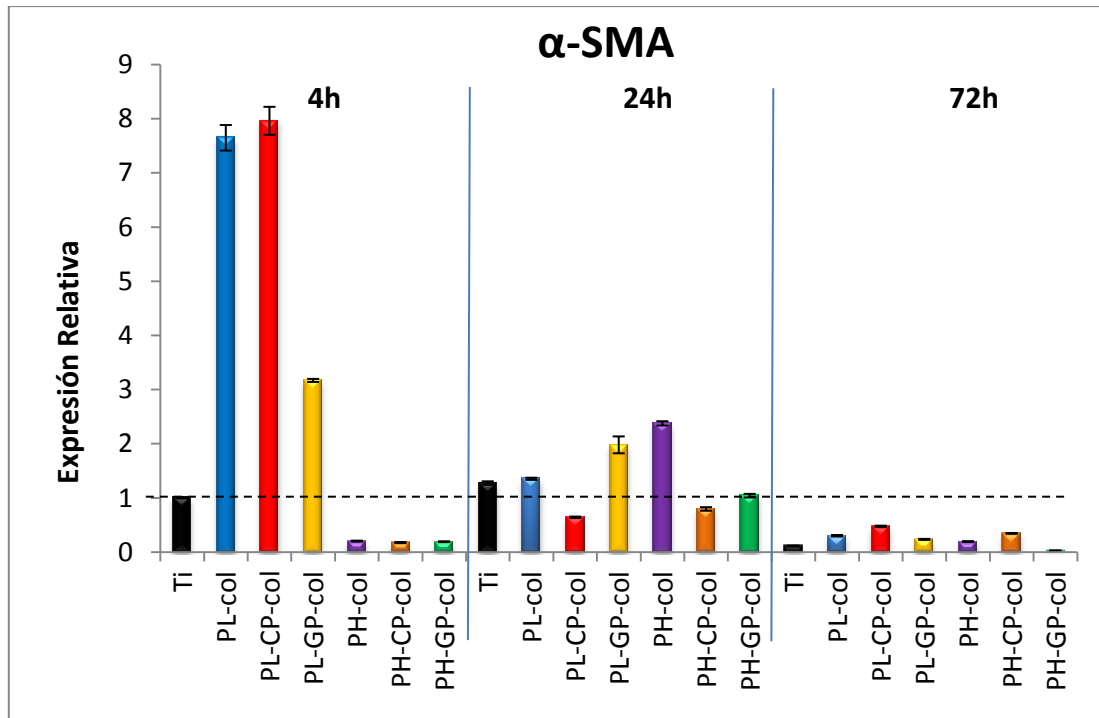


Figura 4.6: Análisis de la expresión del gen marcador de miofibroblastos α -SMA (alpha smooth muscle actin). Todas las muestras tienen diferencias estadísticamente significativas en cada tiempo ($p < 0,05$).

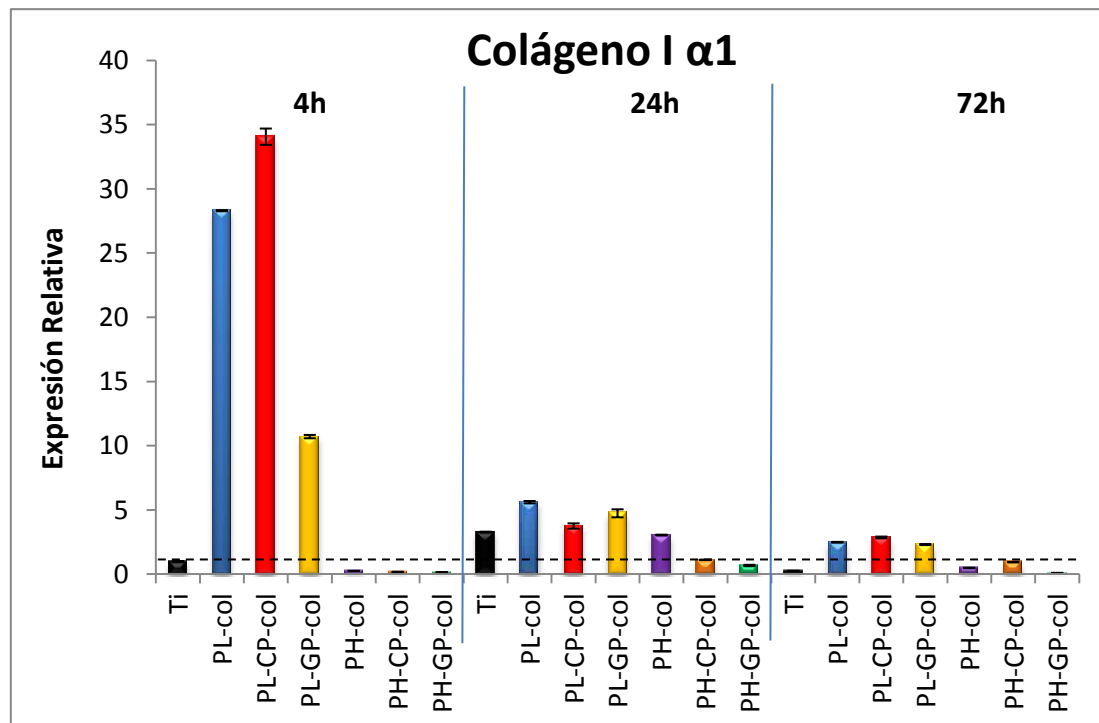


Figura 4.7: Análisis de la expresión del gen de secreción de **Colágeno I α 1** (componente de la matriz extracelular). Todas las muestras tienen diferencias estadísticamente significativas en cada tiempo ($p < 0,05$).

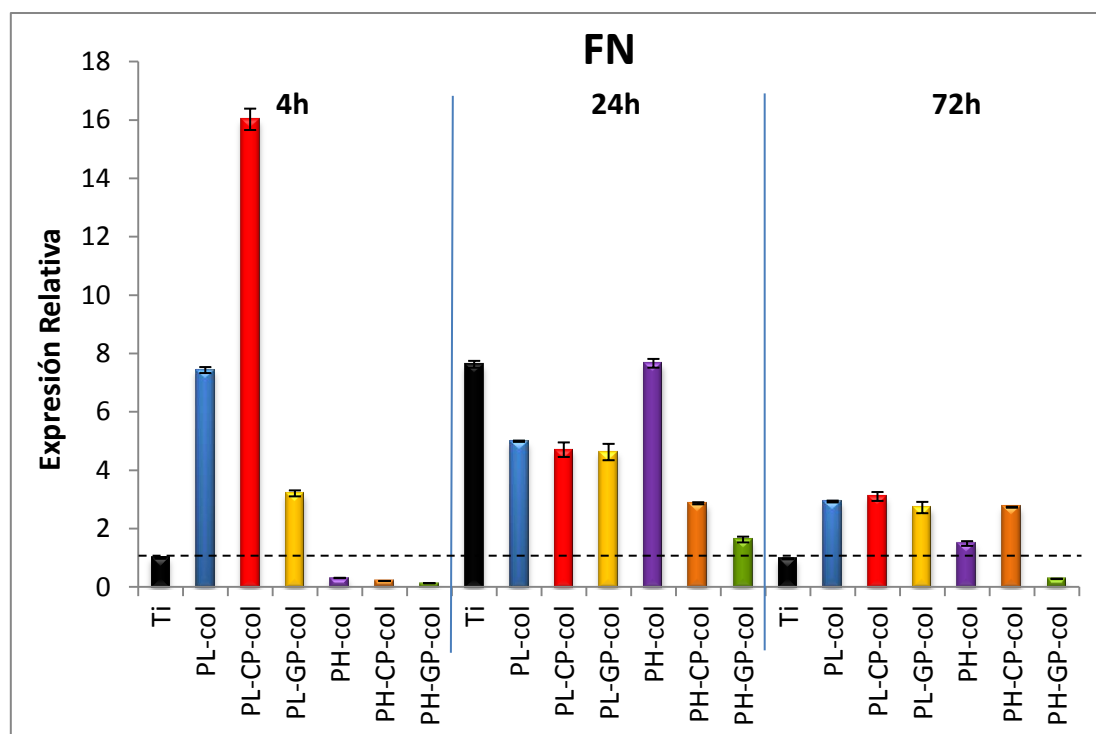


Figura 4.8: Análisis de la expresión del gen de secreción de **Fibronectina** (componente de la matriz extracelular). Todas las muestras tienen diferencias estadísticamente significativas en cada tiempo ($p < 0,05$).

Por otra parte, en las muestras tratadas con plasma se observaron diferencias significativas entre los distintos modos de inmovilizar el colágeno. Para los tres genes de activación estudiados (α -SMA, col I a1 y FN) se observó que la muestra de PL-CP-col presentó una mayor expresión en comparación con la muestra de PL-GP-col y también con la muestra con el colágeno fisorbido (PL-col). Esto puede estar relacionado con la mayor cantidad de colágeno inmovilizado sobre esta superficie. Por otra parte, la química de las tres superficies es totalmente diferente. Es sabido que la química de la superficie puede influir en la conformación de las moléculas, y por lo tanto influir en los aminoácidos que puedan quedar expuestos para interactuar con las células.⁴⁶⁻⁴⁸ Además la interacción del colágeno con la superficie de PL-col, es a través de los grupos OH⁻, los cuales son enlaces de carácter más débil que los generados con los silanos.^{16,42,49-52}

Algunos autores han descrito que después del proceso de resolución (curación) de una herida, la forma activada de los fibroblastos (miofibroblastos) va desapareciendo, principalmente a través de vías de apoptosis inducidas por la carga mecánica de la MEC reconstruida.⁵³ La disminución de la expresión de estos

genes con el tiempo (α -SMA, col I a1 y FN) sobre todas las muestras, puede ser un indicativo de la desaparición de la forma activada de los fibroblastos, lo cual indica que no se ha producido una inflamación crónica. Adicionalmente, es bueno que la expresión génica del col I a1 disminuya con el tiempo, ya que se ha establecido que una producción excesiva de colágeno es característica de trastornos fibróticos de varios tejidos.⁵⁴⁻⁵⁶ En cuanto a la expresión del gen de la FN, éste está estrechamente relacionado con la activación de los fibroblastos a través de la expresión del gen α -SMA y suceden al mismo tiempo.⁵⁷ Por lo tanto, su expresión es indicativa de un exitoso proceso de adhesión. La sobreexpresión de FN en las células presentes sobre las muestras pretratadas con plasma concuerda con la mayor cantidad de células adheridas a las 4 horas (Figura 4.4), en comparación con las pretratadas con piraña o con el titanio sin tratar (Ti).

Otra manera de analizar el nivel de activación de los fibroblastos es a través de la expresión de algunos genes correspondientes a las MMPs. En las Figuras 4.9 y 4.10, se muestran los resultados del análisis expresión génica de dos de las enzimas remodeladoras de la MEC: MMP2 y MMP3. Por otro lado no se obtuvo una cantidad suficiente de la expresión génica de la MMP9, por lo cual no se presentan los resultados. Se ha demostrado en estudios celulares de diferentes tipos de fibroblastos, que la MMP9 es la metaloproteasa que menos se expresa.⁹ Además, la expresión de la MMP9 está relacionada con procesos inflamatorios,⁵⁸ lo cual podría generar un aflojamiento posterior del implante, por lo tanto es positivo no detectar expresión de este gen.

El proceso de remodelación de la MEC suele tener lugar después del proceso de deposición de componentes de la matriz extracelular, por lo tanto en principio sería de esperar que la expresión génica ligada a las MMPs fuera posterior a la de las proteínas de la MEC. Sin embargo, sobre las muestras previamente tratadas con plasma (PL-col, PL-CP-col y PL-GP-col), se observó que los genes MMP2 y MMP3 se sobreexpresaron desde las 4 horas de cultivo, (Figuras 4.9 y 4.10), con valores de *Expresión Relativa* cercanos a 10 en ambos genes. Esto puede ser debido a que las células responden al colágeno que se encuentra previamente inmovilizado sobre estas muestras. A pesar de que sobre las muestras de piraña (PH-col, PH-CP-col y

PH-GP-col) también había colágeno inmovilizado antes de realizar los cultivos celulares, la expresión génica de las MMPs fue casi nula, incluso menor que la observada sobre la muestra de Ti.

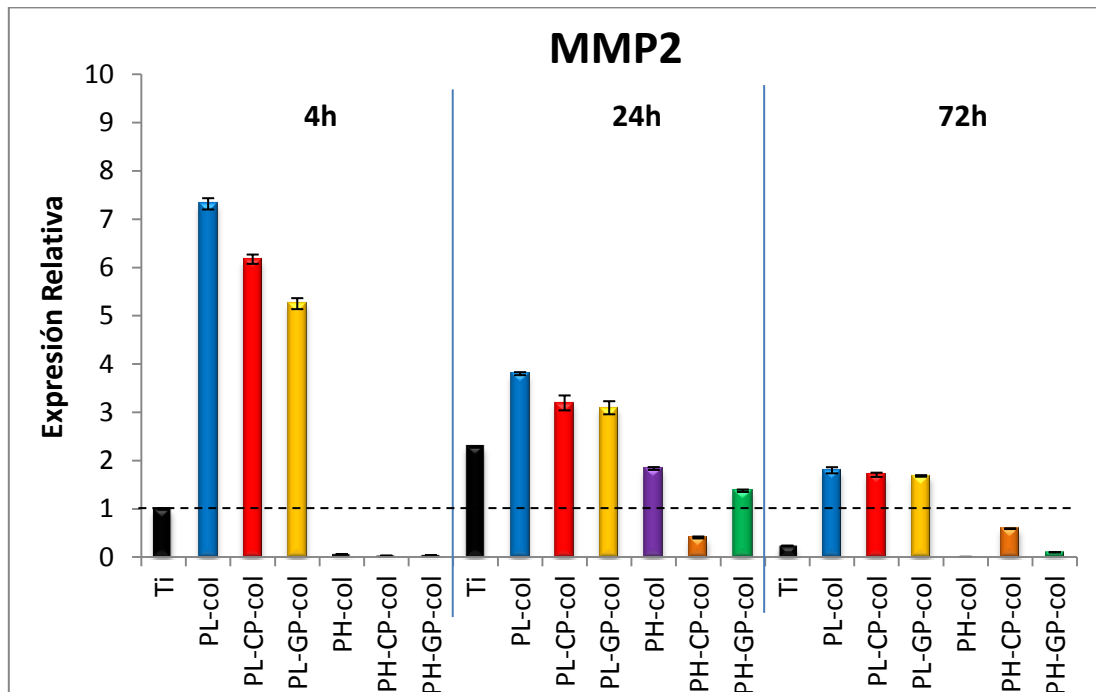


Figura 4.9: Análisis de la expresión del gen de secreción de las enzimas remodeladoras de la matriz extracelular MMP2 (Gelatinasa A). Todas las muestras tienen diferencias estadísticamente significativas en cada tiempo ($p < 0,05$).

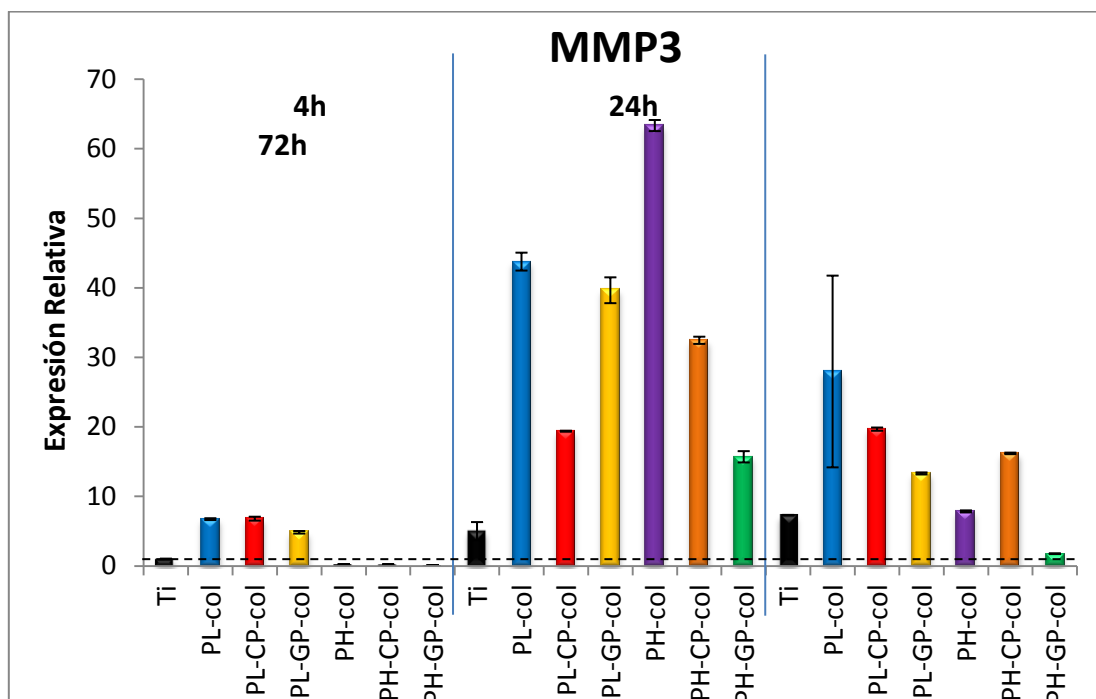


Figura 4.10: Análisis de la expresión del gen de secreción de las enzimas remodeladoras de la matriz extracelular MMP3 (estromelisin 1, progelatinasa). Todas las muestras tienen diferencias estadísticamente significativas en cada tiempo ($p < 0,05$).

En el caso del gen relativo a la metaloproteasa MMP2 (Figura 4.9), sobre las muestras previamente tratadas con plasma (PL-col, PL-CP-col y PL-GP-col) se observó una disminución de la sobreexpresión del gen con el paso del tiempo (24 y 72 horas). En el caso de las muestras previamente tratadas con piraña (PH-col, PH-CP-col y PH-GP-col), se observó que este gen se expresó a partir de 24 horas de cultivo. Sin embargo, los niveles de expresión siguen siendo menor que los observados sobre las muestras de plasma a 4 horas, indicando que la rugosidad de la superficie sigue afectando la respuesta de las células. Finalmente, la expresión de este gen comenzó a disminuir también sobre las muestras de piraña y Ti con el paso del tiempo, pero después de 72 horas.

En cuanto a la expresión del gen MMP3 (Figura 4.10), se observó un aumento drástico de la sobreexpresión sobre todas las muestras (excepto Ti) a las 24 horas, en comparación con los niveles observados a 4 horas de cultivo. Finalmente, se observó que los niveles de expresión de este gen disminuyeron después de 72 horas de cultivo, igual que se observó con las MMP2.

La expresión de las MMPs confirma que las células han entrado en un estado de remodelación de la matriz, lo cual puede conllevar a la remodelación de tejido.^{59 18} Además, se ha establecido que la activación de las MMPs es necesaria en la etapa final de remodelación de los tejidos, proceso denominado resolución, para prevenir la fibrosis.⁶⁰

Por otro lado, algunos autores han determinado que un exceso de expresión de los genes relacionados con secreción de MMPs, puede ser indicativa de un proceso negativo de remodelación excesiva que da lugar a una degradación excesiva de la MEC, lo cual puede derivar en la patología de varias enfermedades inflamatorias, degenerando en el aflojamiento y en la pérdida del implante.^{9 21} Por lo tanto, la disminución con el tiempo de la expresión de los genes relacionados con la remodelación de la MEC, es un factor que determina una adecuada respuesta por parte de los fibroblastos sembrados sobre las muestras con colágeno inmovilizado sobre su superficie.

4.5 CONCLUSIONES

Adhesión celular:

1) A tiempos cortos (4 horas) las células de tipo fibroblasto se adhirieron en mayor cantidad sobre superficies de titanio biofuncionalizadas con colágeno (tanto colágeno fisisorbido como el enlazado por medio de silanos) que sobre superficies sin colágeno. El número de fibroblastos adheridos fue mayor sobre las muestras biofuncionalizadas previamente tratadas con plasma que con piraña, lo que se puede atribuir a la menor rugosidad de dichas superficies.

2) Las muestras silanizadas con CPTES sin colágeno sobre su superficie, generan una respuesta citotóxica sobre las células, disminuyendo notablemente el número de células adherido sobre estas superficies.

3) No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al número de células adherido sobre el grupo de muestras tratado con plasma (PL-col, PL-CP-col y PL-GP-col) a pesar de que hay diferencias en la cantidad de colágeno adherido sobre cada una de ellas. Por el contrario en el caso de las muestras previamente tratadas con piraña, se observó un mayor número de células adheridas en las muestras silanizadas (PH-CP-col y PH-GP-col) que en las muestras sólo tratadas con piraña (PH-col), coincidiendo con una mayor cantidad de colágeno inmovilizado sobre las primeras.

4) A pesar de que la cantidad de colágeno inmovilizado era mayor en las superficies silanizadas con CPTES (tanto en las muestras tratadas con plasma como con piraña), no se observaron diferencias significativas en la cantidad de células adheridas sobre dichas muestras en comparación con las silanizadas con GPTES.

5) La extensión celular fue mayor en todas las superficies biofuncionalizadas con colágeno, siendo la muestra PL-col la que presentó una mayor extensión de las células. El grado de extensión de las células no se vió

fuertemente influenciado por la cantidad de colágeno adherido sobre las superficies, ni por la rugosidad generada con el tratamiento de piraña.

Proliferación celular:

1) Se observó proliferación sobre todas las muestras biofuncionalizadas con colágeno, lo que indica que las superficies no son citotóxicas. A todos los tiempos de incubación, todas las muestras biofuncionalizadas con colágeno mostraron una proliferación celular mayor que las muestras control de titanio puro.

2) Después de 7 días de incubación, el número de células sobre las muestras previamente tratadas con plasma (PL-col, PL-CP-col y PL-GP-col) fue menor que el de las previamente tratadas con piraña (PH-col, PH-CP-col y PH-GP-col), a pesar de que inicialmente se adhirieron menor cantidad de células sobre las muestras con piraña.

3) No se observaron diferencias significativas en la proliferación de las células sobre las muestras silanizadas con CPTES o con GPTES.

Expresión génica:

1) Se observó una sobreexpresión y una anticipación de la expresión de los genes de activación (α -SMA) y de los genes asociados a la secreción de COL1A1 y FN en las muestras que fueron previamente tratadas con plasma (PL-col, PL-CP-col y PL-GP-col). El orden de mayor a menor de esta sobreexpresión y anticipación fue PL-CP-col > PL-col > PL-GP-col.

2) Se observó una sobreexpresión y una anticipación de la expresión de la MMP2 en las muestras que fueron previamente tratadas con plasma.

3) Se observó una mayor expresión de las MMP3 a 4 horas en las muestras que fueron previamente tratadas con plasma, y a 24 horas tanto en las tratadas con plasma como con piraña.

4) La disminución con el tiempo de la expresión de los marcadores de activación de los fibroblastos (α -SMA), y de la secreción (col1 A1 y FN) y remodelación de la MEC (MMP2 y MMP3), sobre las superficies de titanio biofuncionalizadas con colágeno (especialmente las de plasma) sugiere que los fibroblastos no permanecen en una etapa profibrótica.

4.6 REFERENCIAS

1. Cranin AN, Lemons JE. Dental Implantation. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, eds. *Biomaterials Science*. 2nd ed. Seattle, USA; 2004:555 - 570.
2. Nagai M, Hayakawa T, Fukatsu A, et al. In vitro Study of Collagen Coating of Titanium Implants for Initial Cell Attachment. *Dental Materilas Journal*. 2002;21(3):250-260.
3. Roessler S, Born R, Scharnweber D, et al. Biomimetic coatings functionalized with adhesion peptides for dental implants. *Journal of materials science. Materials in medicine*. 2001;12(10-12):871-7.
4. Schoen FJ, Mitchell RN. Tissue Response to Injury. In: Ratner BD, Hoffmann A, Schoen FJ, Lemons JE, eds. *Biomaterials Science*. 2nd ed. San Diego, California, USA; 2004:272 - 274.
5. Hanawa T. Biofunctionalization of titanium for dental implant. *Japanese Dental Science Review*. 2010;46(2):93-101.
6. Chatzinikolaidou M, Lichtinger TK, Müller RT, Jennissen HP. Peri-implant reactivity and osteoinductive potential of immobilized rhBMP-2 on titanium carriers. *Acta biomaterialia*. 2010;6(11):4405-21.
7. Dohan Ehrenfest DM, Coelho PG, Kang B-S, Sul Y-T, Albrektsson T. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. *Trends in biotechnology*. 2010;28(4):198-206.
8. Welander M, Abrahamsson I, Linder E, Liljenberg B, Berglundh T. Soft tissue healing at titanium implants coated with type I collagen. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*. 2007;34:452 -458.
9. Lindner D, Zietsch C, Becher PM, et al. Differential expression of matrix metalloproteases in human fibroblasts with different origins. *Biochemistry research international*. 2012;2012:875742.
10. Abrahamsson I, Zitzmann NU, Berglundh T, et al. The mucosal attachment to titanium implants with different surface characteristics: an experimental study in dogs. *Journal of clinical periodontology*. 2002;29(5):448-55.

11. Lindhe J. *Textbook of Clinical Periodontology*. 2 Ed. Copenhagen: Munksgaard Blackwell; 1995:648.
12. Gullberg D, Gehlsen KR, Turner DC, et al. Analysis of $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$ integrins in cell-collagen interactions: identification of conformation dependent $\alpha 1\beta 1$ binding sites in collagen type I. *EMBO Journal*. 1992;11(11):3865 - 3873.
13. Knight CG, Morton LF, Peachey AR, et al. Recognize the Same Specific Amino Acid Sequence, GFOGER, in Native (Triple-helical) Collagens. *Biochemistry*. 2000;275(1):35-40.
14. Yamamoto, M., Yamato, M., Aoyagi, M., Yamamoto K. Identification of integrins involved in cell adhesion to native and denatured type I collagens and the phenotypic transition of rabbit arterial smooth muscle cells. *Experimental Cell Research*. 1995;219:249 - 256.
15. Shekaran A, Garcia AJ. Nanoscale engineering of extracellular matrix-mimetic bioadhesive surfaces and implants for tissue engineering. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1810(3):350-60.
16. Müller R, Abke J, Schnell E, et al. Influence of surface pretreatment of titanium- and cobalt-based biomaterials on covalent immobilization of fibrillar collagen. *Biomaterials*. 2006;27(22):4059-68.
17. Kessler D, Dethlefsen S, Haase I, et al. Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a “synthetic” phenotype. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(39):36575-36585.
18. Chambers RC, Leoni P, Kaminski N, Laurent GJ, Heller R a. Global expression profiling of fibroblast responses to transforming growth factor-beta1 reveals the induction of inhibitor of differentiation-1 and provides evidence of smooth muscle cell phenotypic switching. *The American journal of pathology*. 2003;162(2):533-46.
19. Wang L, Luo J, He S. Induction of MMP-9 release from human dermal fibroblasts by thrombin: involvement of JAK/STAT3 signaling pathway in MMP-9 release. *BMC cell biology*. 2007;8:14.
20. McAnulty RJ. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007;39(4):666-671.
21. Guillem-Marti J, Delgado L, Godoy-Gallardo M, et al. Fibroblast adhesion and activation onto micro-machined titanium surfaces. *Clinical oral implants research*. 2012:1-11.
22. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research*. 2006;69(3):562-73.

23. Jain R, Von Recum AF. Fibroblast attachment to smooth and microtextured PET and thin cp-Ti films. *Journal of biomedical materials research. Part A.* 2004;68(2):296-304.

24. Borsari V, Giavaresi G, Fini M, et al. Comparative in vitro study on a ultra-high roughness and dense titanium coating. *Biomaterials.* 2005;26(24):4948-55.

25. Secchi AG, Grigoriou V, Shapiro IM, et al. RGDS peptides immobilized on titanium alloy stimulate bone cell attachment, differentiation and confer resistance to apoptosis. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2006;83A(3):577-584.

26. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research.* 2001;29(9):e45.

27. Rasmussen R. Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K, eds. *Rapid Cycle Real Time -PCR, methods and applications.* Springer Press, Heidelberg; 2001:21-34.

28. Bacakova L, Filova E, Parizek M, Ruml T, Svorcik V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances.* 2011;29(6):739-767.

29. Dufrêne YF, Marchal TG, Rouxhet PG. Influence of Substratum Surface Properties on the Organization of Adsorbed Collagen Films: In Situ Characterization by Atomic Force Microscopy. 1999;(22):2871-2878.

30. Salmerón-Sánchez M, Rico P, Moratal D, et al. Role of material-driven fibronectin fibrillogenesis in cell differentiation. *Biomaterials.* 2011;32(8):2099-105.

31. Morra M, Cassinelli C, Cascardo G, et al. Surface engineering of titanium by collagen immobilization. Surface characterization and in vitro and in vivo studies. *Biomaterials.* 2003;24(25):4639-4654.

32. Gough JE, Notingher I, Hench LL. Osteoblast attachment and mineralized nodule formation on rough and smooth 45S5 bioactive glass monoliths. *Journal of biomedical materials research. Part A.* 2004;68(4):640-50.

33. Zinger O, Anselme K, Denzer A, et al. Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. *Biomaterials.* 2004;25(14):2695-711.

34. Anselme K, Bigerelle M. Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion. *Acta biomaterialia.* 2005;1(2):211-22.

35. Könönen, M., Hormia, M., Kivilahti, J. H, J. & Thesleff I. Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival

fibroblasts on titanium. *Journal of Biomedical Material Research*. 1992;26:1325–1341.

36. Kramer PR, Janik Keith A, Cai Z, Ma S, Watanabe I. Integrin mediated attachment of periodontal ligament to titanium surfaces. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*. 2009;25(7):877-83.

37. Takamori ER, Cruz R, Gonçalves F, et al. Effect of roughness of zirconia and titanium on fibroblast adhesion. *Artificial organs*. 2008;32(4):305-9.

38. Zhao B, Yi Z, Lu Z, et al. Improvement of Adhesion and Spreading of Human Gingival Fibroblasts to RGD-grafted Titanium Surface. *Journal of Hard Tissue Biology*. 2006:2-5.

39. Bellincampi LD, Dunn MG. Effect of crosslinking method on collagen fiber-fibroblast interactions. *Journal of Applied Polymer Science*. 1997;63(11):1493-1498.

40. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Fibroblasts and their transformations: the connective-tissue cell family. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al., eds. *Molecular Biology of the Cell*. 4^o ed. New York, USA; 2002:1300 - 1302.

41. Fernández B, Bodega G, Suárez I, Muñoz E. *Biología celular*. 1st ed. Madrid-España: Editorial Sintesis; 2007.

42. Bagno A, Piovan A, Dettin M, et al. Human osteoblast-like cell adhesion on titanium substrates covalently functionalized with synthetic peptides. *Bone*. 2007;40(3):693-9.

43. Rammelt S, Schulze E, Bernhardt R, et al. Coating of titanium implants with type-I collagen. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2004;22(5):1025-34.

44. Yang Y, Tian J, Deng L, Ong JL. Morphological behavior of osteoblast-like cells on surface-modified titanium in vitro. *Biomaterials*. 2002;23(5):1383-9.

45. Zhao Y, Yao Y, Liu W, Zheng C, Li S. Fibroblast Adhesion and Proliferation on a New β Type Ti-39Nb-13Ta-4 . 6Zr Alloy for Biomedical Application. 2006;22(2):205-210.

46. Gray JJ. The interaction of proteins with solid surfaces. *Current opinion in Structural Biology*. 2004;14(1):110 - 115.

47. Xu H, Zhao X. Orientation of a monoclonal antibody absorbed at the solid/solution interface: A combined study using Atomic Force Microscopy and Neutron Reflectivity. *Langmuir*. 2006;22(14):6313 - 6320.

48. Rabe M, Verdes D. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advance in Colloid and Interface Science*. 2011;162(1-2):87 - 106.

49. Sargeant TD, Rao MS, Koh C-Y, Stupp SI. Covalent functionalization of NiTi surfaces with bioactive peptide amphiphile nanofibers. *Biomaterials*. 2008;29(8):1085-98.
50. Schliephake H, Scharnweber D. Chemical and biological functionalization of titanium for dental implants. *Journal of Materials Chemistry*. 2008;18(21):2404.
51. Schreiber F. Structure and growth of self-assembling monolayers. *Progress in Surface Science*. 2000;65(5-8):151-257.
52. Middleton CA, Pendegrass CJ, Gordon D, Jacob J, Blunn GW. Fibronectin silanized titanium alloy: A bioinductive and durable coating to enhance fibroblast attachment in vitro. 2007.
53. James J. Tomasek, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2002;3(5):349-363.
54. Trojanowska M, LeRoy EC, Eckes B, Krieg T. Pathogenesis of fibrosis: type I collagen and the skin. *Journal of Molecular Medicine*. 1998;76(3-4):266-74.
55. Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatric nephrology*. 2000;15(3-4):290-301.
56. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(2):209-218.
57. Dugina V, Fontao L, Chaponnier C, Vasiliev J, Gabbiani G. Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors. *Journal of Cell Science*. 2001;114(18):3285-96.
58. Kridel SJ, Chen E, Kotra LP, et al. Substrate hydrolysis by matrix metalloproteinase-9. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(23):20572-8.
59. Xia H, Diebold D, Nho R, et al. Pathological integrin signaling enhances proliferation of primary lung fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. 2008;205(7).
60. Mutsaers SE, Bishop JE, McGrouther G, Laurent GJ. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1997;29(1):5-17.

5

ESTUDIO DE LA CONFORMACIÓN DEL COLÁGENO INMOVILIZADO. EFECTO SOBRE LA RESPUESTA DE CÉLULAS FIBROBLÁSTICAS

5.1 INTRODUCCIÓN

Los resultados discutidos en los capítulos anteriores mostraron diferencias significativas en la cantidad de colágeno inmovilizado con los tratamientos previos de activación (PL y PH) y entre la fisisorción y el enlace del colágeno a través del uso de los silanos. Además, fue poca la diferencia observada entre los dos silanos (CPTES y GPTES). De igual manera en los estudios sobre el efecto a la respuesta de los fibroblastos, se observaron diferencias entre los dos tratamientos previos de activación, pero no entre los dos tipos de silanos.

Las técnicas de caracterización utilizadas permitieron determinar la cantidad de colágeno inmovilizado sobre cada una de las diferentes superficies y su estabilidad. Sin embargo no proporcionaron información directa sobre la

distribución espacial y conformación del colágeno tras su inmovilización. Por lo tanto, se decidió realizar estudios de AFM para comparar la morfología que adopta el colágeno sobre las diferentes superficies de titanio estudiadas, para poder determinar de qué manera la química de cada uno de los silanos influye en la forma en que el colágeno interacciona con las superficies. Al mismo tiempo se buscó evaluar cómo estas diferencias de conformación y concentración del colágeno influyen en la respuesta celular.

Existen pocos métodos experimentales disponibles para estudiar la conformación de proteínas adsorbidas sobre superficies. El AFM posee capacidad para ser operado en ambientes diferentes (en aire o en líquido), lo que lo convierte en una herramienta ideal para examinar muestras biológicas. En particular, diversas proteínas inmovilizadas en distintas superficies han podido ser examinadas por AFM, entre las que se incluye la albúmina, la actina,¹ la laminina,² la inmunoglobulinas,³ la fibronectina,^{4,5} el fibrinógeno⁶ y el colágeno.⁷⁻⁹

Para realizar análisis de la conformación de proteínas sobre superficies por AFM, se necesitan unas condiciones especiales con el fin de generar imágenes adecuadas en las que se pueda diferenciar la molécula adsorbida del sustrato. Una de ellas es que el sustrato debe poseer una topografía muy lisa, ya que superficies con una rugosidad del mismo orden de magnitud que la proteína adsorbida (~10 nm) dificultan su visualización.² Este capítulo se centra por tanto en las muestras activadas con plasma, debido a que las muestras previamente tratadas con piraña presentan una rugosidad ($R_a = 144$ nm) que dificulta la visualización de la proteína adsorbida.

Una vez obtenidos los resultados de la conformación del colágeno sobre las distintas superficies, se realizó una cuantificación de la cantidad de colágeno inmovilizado por medio de OWLS. Asimismo, se evaluó la respuesta de células fibroblásticas en las distintas superficies estudiadas.

5.2 OBJETIVOS

5.2.1 Objetivo General

El objetivo general del presente capítulo es analizar la morfología adoptada por el colágeno tipo I inmovilizado sobre superficies de titanio modificadas químicamente, y su efecto sobre la respuesta de células del tipo fibroblasto dérmico humano.

5.2.2 Objetivos Específicos

Los objetivos específicos planteados para concretar el objetivo general son:

1. Caracterizar las muestras de titanio biofuncionalizadas por medio de análisis por AFM con el fin de evaluar la distribución y la conformación del colágeno inmovilizado sobre las diferentes superficies de titanio modificadas.

Específicamente se busca:

a) Comparar la morfología del colágeno fisisorbido y el colágeno inmovilizado a través de los silanos.

b) Comparar el efecto de dos tipos de organosilanos sobre la conformación y distribución del colágeno:

CPTES: 3-Cloropropiltriétoxissilano

GPTES: 3-Glicidiloxipropil (dimetoxi) metilsilano

c) Analizar el efecto de la variación de la concentración de la solución de colágeno sobre su conformación y distribución en las diferentes superficies de titanio estudiadas.

2. Cuantificar la cantidad de colágeno inmovilizado por medio de OWLS, sobre cada una de las superficies estudiadas.

3. Evaluar la adhesión de fibroblastos sobre superficies de titanio biofuncionalizadas, para analizar el efecto de los cambios de conformación del colágeno inmovilizado sobre el comportamiento celular.

5.3 MATERIALES Y METODOS

5.3.1 Preparación de las muestras

En este capítulo las muestras se activaron mediante el plasma de oxígeno. Las muestras se prepararon siguiendo los pasos descritos en los apartados 2.3.2-a del capítulo 2. La silanización de las muestras activadas con plasma se realizó tal y como se describió en el apartado 2.3.3. Las muestras tratadas con plasma sin recubrimiento de colágeno (PL), al igual que las de titanio puro sin ningún tratamiento (Ti) fueron usadas como control.

Tabla 5.1: Nomenclatura y descripción de las muestras evaluadas en este capítulo.

Nomenclatura	Descripción de la muestra
Ti	Titanio comercialmente puro, pulido
PL	Ti tratado con plasma de oxígeno
PL-CP	PL seguido por silanización con CPTES
PL-GP	PL seguido por silanización con GPTES
PL-col	colágeno fisisorbido sobre PL
PL-CP-col	colágeno adherido covalentemente sobre PL-CP
PL-GP-col	colágeno adherido covalentemente sobre PL-GP

Para la inmovilización del colágeno sobre las superficies antes descritas, este se preparó tal y como se describe en el apartado 3.3.1. Se prepararon soluciones con diferentes concentraciones de colágeno, manteniendo el mismo pH ($\text{pH} \approx 6$). El tiempo de inmovilización del colágeno sobre las superficies se redujo a 10 minutos, ya que a tiempos más largos de inmersión se generan multicapas de moléculas, que dificultan la visualización por medio de AFM de la evolución de la conformación del colágeno sobre cada superficie, tal y como se ha observado en otros estudios de adhesión de moléculas sobre otros tipo de superficies.^{2,10,11} En la Tabla 5.1 se muestran las distintas superficies evaluadas con los códigos utilizados.

Se partió de concentraciones de colágeno en solución lo más bajas posibles (2 a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se fueron aumentando hasta obtener la concentración mínima a la cual se podía visualizar al mismo tiempo el colágeno y la superficie del metal. Al fijar el tiempo e ir aumentando la concentración, se puede evaluar de una manera más controlada la dinámica de adsorción del colágeno, que la que se obtiene fijando la concentración y variando el tiempo de adsorción.¹² Finalmente, se aumentó tanto

la concentración de colágeno como el tiempo de inmersión hasta 150µg/ml - 16 horas, para observar la conformación del colágeno cuando partimos de la concentración de colágeno estudiada a lo largo de los capítulos 3 y 4 de esta tesis.

5.3.2 Métodos de Caracterización

a) Microscopía de fuerza atómica: AFM

Se usó un AFM del tipo NanoScope III (Santa Barbara, CA, USA) operando en modo de contacto intermitente (*tapping mode*) en aire, para analizar la evolución de la adsorción del colágeno y la morfología de la capa de molécula. Las puntas de las micropalancas (*cantilever*) usadas fueron de Si de Veeco (Manchester, UK) con una fuerza constante de 2,8N/m y una frecuencia de resonancia libre de 75 kHz. La frecuencia de resonancia con que se hicieron las medidas fue de 5 a 10% menor que la libre. La amplitud de punto de referencia (*amplitude set-point*) era de 0.650 V. La relación entre la amplitud de punto de referencia y la amplitud libre (*free amplitude*) se mantuvo igual a 0,7. Las imágenes de AFM fueron analizadas usando el programa NanoScope - versión 1.4 del 2010.

b) OWLS

Una vez obtenidas las concentraciones mínimas a las cuales se podía observar por medio de AFM el colágeno inmovilizado sobre cada una de las superficies de Ti estudiadas, se procedió a hacer un análisis de OWLS de dichas concentraciones para evaluar la cantidad inmovilizada sobre dichas superficies. También se analizaron las superficies después de ser sumergidas todas en una solución de colágeno con una concentración de 25 µg/ml. Estos análisis se realizaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.3-e.

5.3.3 Estudio de adhesión celular

a) Cultivo Celular

Las muestras se sumergieron en PBS-BSA al 1% durante 30 minutos, para bloquear la superficie. Se cultivaron fibroblastos dérmicos humanos (HDF), con una concentración de 13×10^3 células/cm², sobre las muestras con medio sin suero (DMEM, glutamina, penicilina sin FBS) y fueron incubadas durante 4 horas. La adhesión celular fue evaluada por tinción por inmunofluorescencia.

b) Inmunofluorescencia

Después de las 4 horas de cultivo, se retiró el medio y se lavaron las muestras con PBS para eliminar las células no adheridas. Las células fueron fijadas con paraformaldehído en PBS al 1% durante 30 minutos a 4^oC y se lavaron 3 veces con PBS. Se permeabilizaron con “*permeabilising buffer*” durante 5 min a temperatura ambiente (Ta); se bloquearon con DPBS/BSA 1% a Ta durante 30 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario durante 1h en vaivén: para el análisis de vinculina el anticuerpo primario fue antivinculina obtenida en ratón (mouse anti-vinculin, SIGMA) 1:400 en DPBS/BSA 1% y para el análisis de fibronectina el anticuerpo primario fue antifibronectina obtenida en conejo (rabbit anti-human fibronectin, SIGMA) 1:400 en DPBS/BSA 1%. Se hicieron 2 lavados con DPBS/Tween 20, y se incubaron con el anticuerpo secundario contra ratón (Cy3 – antimouse, red. Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.) y contra conejo (Cy3 – conjugated affini pure goat anti-rabbit IgG, red. Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.), junto con faloidina (Phalloidin - Bodipy® FL, green. Selectively stains F-actin. Invitrogen) 1:100 durante 1h en vaivén. Se realizaron 3 lavados con DPBS/Tween 20 y finalmente se realizó un montaje con DAPI (Vectashield® Mounting Medium with DAPI). Las células fueron visualizadas y fotografiadas en un microscopio de fluorescencia Nikon. Se tomaron como mínimo 3 imágenes representativas de cada condición experimental, y para cada condición se prepararon triplicados. Las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el software Image J (Versión 1.41o, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4.1 Caracterización superficial

a) AFM

En la Figura 5.1 se muestra un conjunto de imágenes representativas obtenidas por AFM tomadas a diferentes magnificaciones, de superficies de titanio pulidas, activadas con plasma (PL) y silanizadas con CPTES y GPTES (PL-CP y PL-GP). El aspecto general de las superficies es bastante regular a lo largo de las

diferentes escalas analizadas ($2\mu\text{m}$, $1\mu\text{m}$ y 500nm). Sólo se observaron sobre todas las superficies, características topográficas en forma de valles debidos a deformaciones y/o arañazos producidos por el proceso de pulido del titanio (2 y $1\mu\text{m}$) (Figura 5.1-a, b, d, e, g y h).¹³ Estos valles pueden ser considerados como macro-rugosidades^{14,15} y por lo tanto no afectarán en la visualización de la proteína. Por otra parte, aunque las muestras se limpiaron después de los proceso de pulido y silanización, a 500 nm se observaron diminutas bolitas sobre las muestras silanizadas (Figura 5.1-f y i, señaladas con flechas), que podrían ser atribuidas a la presencia del silano sobre la superficie, ya que éstas no se observaron sobre la muestra de plasma (Figura 5.1-c).

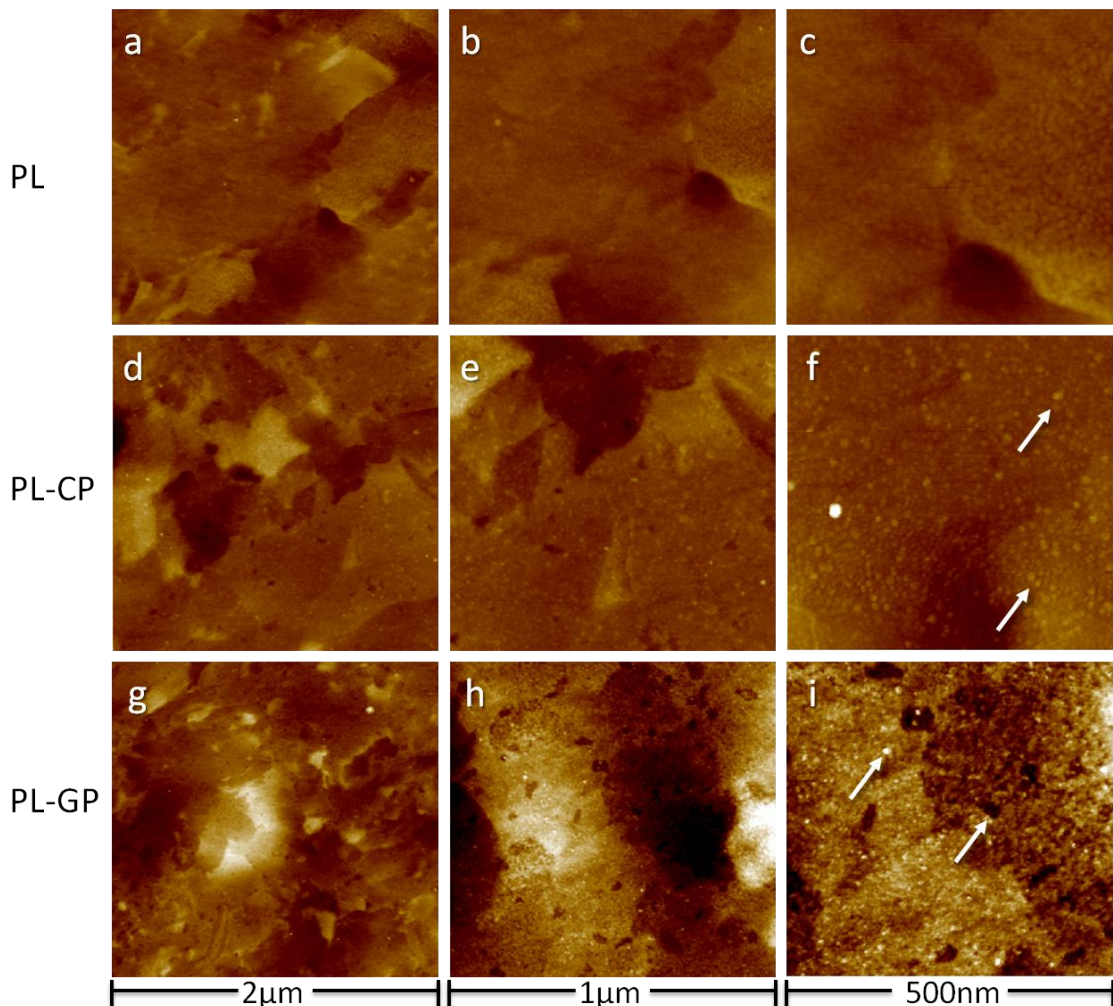


Figura 5.1: Imágenes obtenidas por AFM a varias escalas de longitud (2 , $1\mu\text{m}$ y 500 nm), de las superficies de titanio activadas por plasma (**PL**) (a, b y c) y silanizadas con CPTES (**PL-CP**) (d, e y f) y con GPTES (**PL-GP**) (g, h y i), sin recubrimiento de colágeno. Las flechas señalan lo que posiblemente pueda ser silano sobre las superficies, ya que sobre la muestra de plasma no se observan.

Una vez obtenidas las imágenes de las superficies, se procedió a realizar el análisis de cómo cambia el aspecto de cada superficie una vez se realiza la inmovilización del colágeno a distintas concentraciones durante 10 minutos. En las Figuras 5.2, 5.3 y 5.4 se muestran las imágenes obtenidas de las superficies de PL, PL-CP y PL-GP respectivamente, con diferentes concentraciones de colágeno sobre su superficie. Se debe encontrar la concentración del colágeno en solución que permita ver al mismo tiempo el colágeno sobre la superficie y el metal, para asegurar que lo que se observa en las imágenes de AFM corresponde a colágeno inmovilizado sobre la superficie.

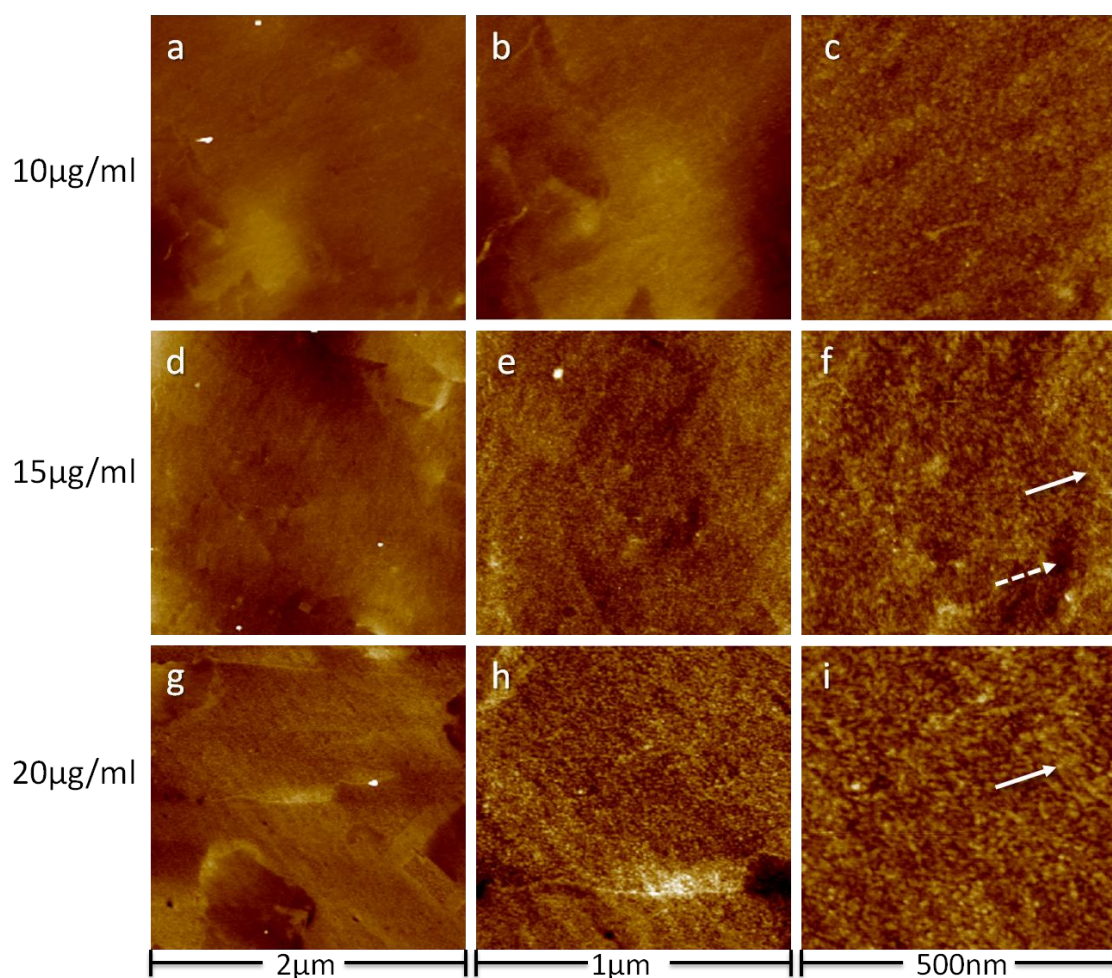


Figura 5.2: Imágenes obtenidas por AFM a varias escalas de longitud (2, 1 μm y 500 nm), de las superficies de **plasma** con colágeno inmovilizado (**PL-col**) a concentraciones de 10 (a, b y c), 15 (d, e y f) y 20 (g, h y i) $\mu\text{g/ml}$, durante 10 minutos. Las flechas solidas señalan algunas de las fibrillas de colágeno que se observan sobre la superficie. Las flechas punteadas, señalan una de las zonas donde se aprecia el sustrato sin recubrimiento.

En el caso de las muestras de PL-col (Figura 5.2), partiendo de una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ (a, b y c), se observó que dicha concentración era demasiado baja, ya

que no se podía observar con claridad el colágeno adsorbido. Al subir la concentración en solución a $15\mu\text{g/ml}$ manteniendo el tiempo de inmersión de las muestras en 10 minutos (d, e y f), comienza a verse el colágeno en forma de fibrillas muy delgadas entrecruzadas (flecha solida), pero se puede seguir viendo el titanio (flecha punteada) (Figura 5.2-f). Cuando la concentración de la solución de colágeno se subió a $20\mu\text{g/ml}$ se observó que el número de fibrillas entrecruzadas aumentó hasta tal punto que impidió la visualización de la superficie del metal (Figura 5.2-i).

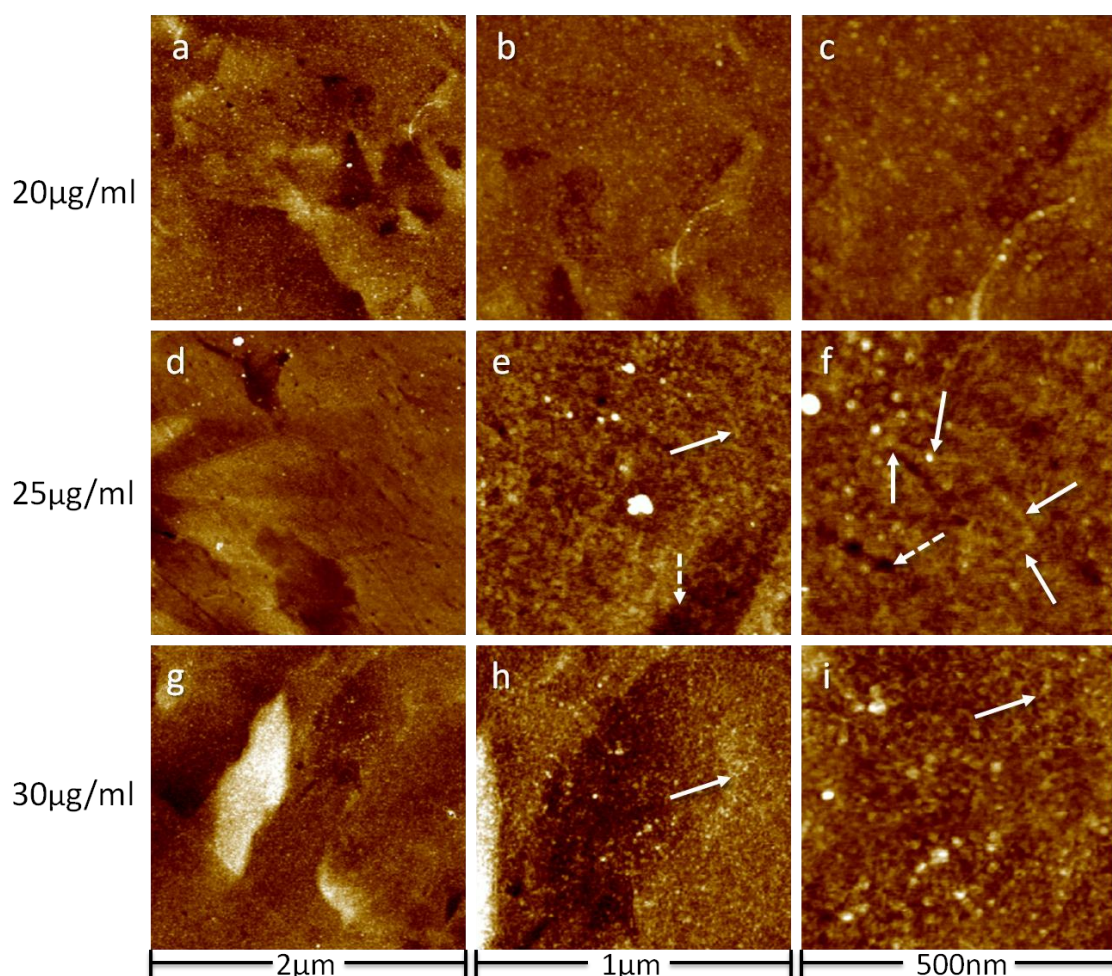


Figura 5.3: Imágenes obtenidas por AFM a varias escalas de longitud (2, $1\mu\text{m}$ y 500nm), de las superficies silanizadas con **CPTES** con colágeno inmovilizado (**PL-CP-col**) a concentraciones de 20 (a, b y c), 25 (d, e y f) y 30 (g, h y i) $\mu\text{g/ml}$, durante 10 minutos. Las flechas solidas señalan algunas de las fibrillas de colágeno que se observan sobre la superficie. Las flechas punteadas, señalan una de las zonas donde se aprecia el sustrato sin recubrimiento.

Para las muestras de PL-CP-col, utilizando de una concentración de colágeno en solución de $10\mu\text{g/ml}$ no se pudo observar colágeno sobre la superficie, igual que en el caso de las muestras de PL-col. En este caso, la concentración debió subirse

hasta $25\mu\text{g/ml}$ para poder apreciar claramente la formación de fibrillas de colágeno entrecruzadas tanto a $1\mu\text{m}$ como a 500nm (flecha solida) y al mismo tiempo poder observar la superficie del metal (flecha punteada) (Figura 5.3 e y f). Al subir la concentración hasta $30\mu\text{g/ml}$, igual que en el caso de las muestras de plasma, las fibrillas comienzan a ser más marcadas pero comienza a dificultarse la visualización del metal (Figura 5.3 h y i).

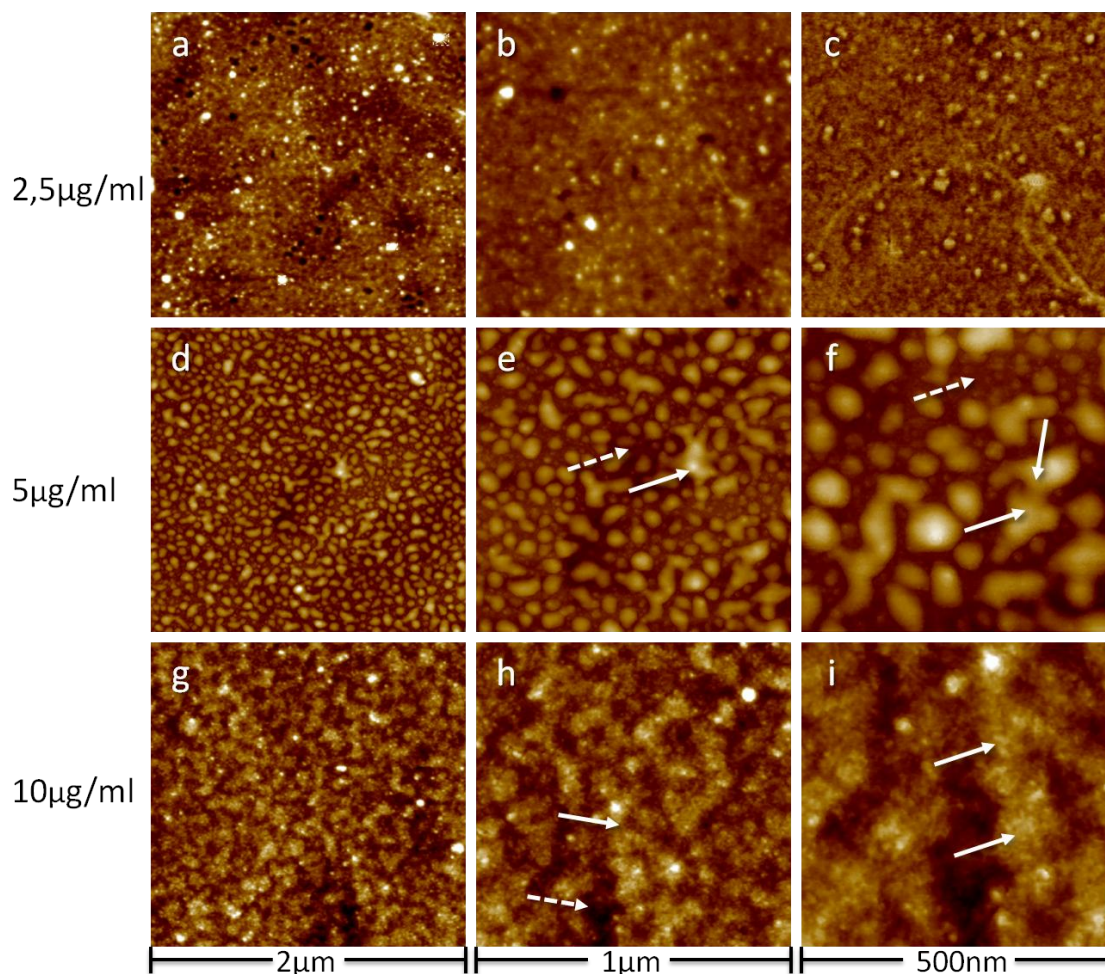


Figura 5.4: Imágenes obtenidas por AFM a varias escalas de longitud (2 , $1\mu\text{m}$ y 500nm), de las superficies silanizadas con **GPTES** con colágeno inmovilizado (**PL-GP-col**) a concentraciones de 2.5 (a, b y c), 5 (d, e y f) y 10 (g, h y i) $\mu\text{g/ml}$, durante 10 minutos. Las flechas solidas señalan algunos de los aglomerados de colágeno que se observan sobre la superficie. Las flechas punteadas, señalan una de las zonas donde se aprecia el sustrato sin recubrimiento.

En el caso de las muestras de PL-GP-col, contrariamente a lo observado en las otras dos superficies, fue necesario bajar la concentración de la solución de colágeno para poder observar simultáneamente el colágeno y la superficie del metal. A una concentración de $5\mu\text{g/ml}$ se pudo observar con claridad el titanio (flechas

punteadas) y el colágeno (flechas solidas), en este caso el colágeno está adsorbido en forma de glóbulos alargados (Figura 5.4-e y f). Por debajo de esta concentración, se dificultó la visualización del colágeno (Figura 5.4-a, b y c), mientras que por encima, el número de glóbulos aumentó conectándose entre sí, lo que provocó un aumento en su espesor y longitud (flechas solidas) (Figura 5.4-i) llegando a cubrir casi toda la superficie del metal (flecha punteada) (Figura 5.4-h). Una vez analizadas diversas concentraciones (Figuras 5.2 a 5.4), se determinó que las concentraciones mínimas para poder observar tanto el titanio como la conformación y distribución del colágeno adsorbido eran: 15 μ g/ml para las muestras tratadas con plasma (PL), 25 μ g/ml para las muestras silanizadas con CPTES (PL-CP) y 5 μ g/ml para las muestras silanizadas con GPTES (PL-GP).

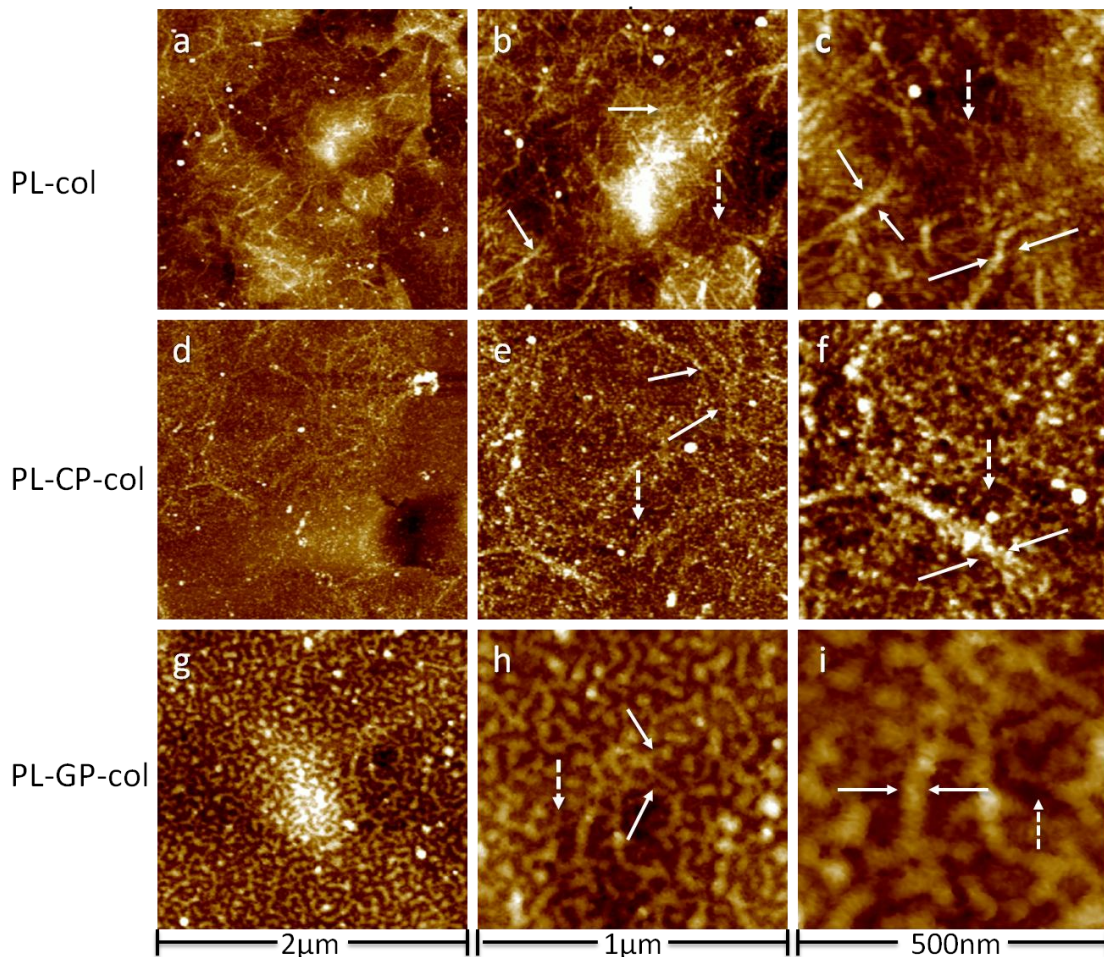


Figura 5.5: Imágenes obtenidas por AFM a varias escalas de longitud (2, 1 μ m y 500 nm), de las superficies de plasma y silanizadas con CPTES y GPTES, con colágeno inmovilizado (**PL-col**, **PL-CP-col** y **PL-GP-col**) a una concentración de 150 μ g/ml durante 16 horas. Las flechas solidas señalan algunas de las fibrillas (PL-col y PL-CP-col) o de los aglomerados (PL-GP-col) de colágeno que se observan sobre la superficie. Las flechas punteadas, señalan una de las zonas donde se aprecia el sustrato sin recubrimiento.

Finalmente, en la Figura 5.5 se muestran las imágenes de la conformación del colágeno cuando se parte de una solución de colágeno de $150\mu\text{g}/\text{ml}$ y un tiempo de inmersión de 16 horas sobre todas los tipos de superficies estudiados, que son las condiciones utilizadas en los estudios de los capítulos anteriores (capítulos 3 y 4). Al aumentar la concentración de la solución de colágeno y el tiempo de inmersión de las muestras, en las muestras tratadas con plasma (PL-col) y en las silanizadas con CPTES (PL-CP-col) se observó un incremento en la longitud y espesor de las fibras (flechas solidas) (Figura 5.5 c y f) en comparación con las fibras observadas a menor concentración (Figura 5.2-i y 5.3-i). En el caso de las muestras silanizadas con GPTES (PL-GP-col) los glóbulos se alargaron y entrecruzaron (Figura 5.5 i).

Partiendo de las concentraciones mínimas necesarias para visualizar al mismo tiempo el colágeno sobre las superficies y el titanio, se observó que al ir aumentando la concentración de colágeno en solución (Figuras 5.2 a 5.4), la superficie del metal se va recubriendo progresivamente hasta cubrir casi toda la superficie, y al aumentar aún más la concentración hasta $150\mu\text{g}/\text{ml}$, sigue aumentando la adsorción de colágeno dando lugar a la formación de múltiples capas de cada una de las conformaciones observadas (flechas punteadas) (Figura 5.5).

En un estudio realizado por Yinli Li et. al., describieron que la morfología que adoptan el colágeno tipo I fisisorbido sobre superficies de Tántalo, depende del flujo hidrodinámico con el que se deposita la molécula sobre la superficie. En este estudio observaron diferencias entre la inmovilización de la proteína con y sin flujo, obteniendo una disposición de las fibras en paralelo cuando la adsorción se realizaba en presencia de un flujo constante y por el contrario una disposición de las fibras en red en ausencia de flujo.¹⁶ En nuestro caso, el colágeno se depositó sumergiendo la muestra en la solución, por lo tanto la formación del colágeno en forma de red sobre las muestras de PL-col y PL-CP-col, puede ser debido a la falta de flujo hidrodinámico a la hora de preparar las muestras.

Aunque hay otros parámetros que influyen en la conformación que las proteínas adopten sobre los sustratos, hemos observado que la hidrofobicidad es uno de los

parámetros que más varía en nuestras superficies. Es importante recordar que la hidrofobicidad a su vez se vio influenciada por los grupos funcionales presentes sobre cada una de las superficies estudiadas, como se observó en los resultados de ángulo de contacto del capítulo 2 (Figura 2.15). A partir de valores intermedios de hidrofobicidad, como es el caso de la superficie silanizada con GPTES (a.c. $\approx 55^\circ$, Figura 2.15, capítulo 2), se observó que la interacción entre los dominios del colágeno y la superficie del sustrato mantiene a la proteína en una conformación globular, mientras que en superficies altamente hidrofílicas como la de PL (a.c. $\approx 0^\circ$, Figura 2.15, capítulo 2) ó altamente hidrofóbicas como la de PL-CP (a.c. $\approx 80^\circ$, Figura 2.15, capítulo 2) se forma una red entrecruzada de fibras de colágeno.

En el caso de las muestras de PL-CP-col, las fibras entrecruzadas parecen estar formadas a su vez por diminutos agregados globulares alargados, mientras que sobre las muestras de PL-col las fibrillas no presentan estos agregados. Este efecto ha sido descrito en otros estudios en los que se observaron los mismos agregados globulares en las fibrillas de colágeno tipo I cuando este fue inmovilizado sobre superficies hidrofóbicas en comparación con superficies hidrofílicas.¹⁷⁻²¹

En el caso de las muestras silanizadas con GPTES, el colágeno adoptó una conformación en forma de agregados globulares, los cuales se van alargando con una tendencia a recubrir toda la superficie al aumentar la concentración. Un comportamiento similar se obtuvo en otros estudios donde se evaluó la conformación de proteínas como la fibronectina y el colágeno tipo IV sobre superficies en las que variaban la hidrofobicidad. En estos estudios se observó que la conformación de estas proteínas variaba de fibrilar sobre las superficies más hidrofóbicas a agregados globulares sobre superficies con valores intermedios de hidrofobicidad (a.c. $\approx 50^\circ$).^{5,22,23}

Por otro lado, en un estudio realizado por Adamczak et al., compararon la inmovilización de colágeno tipo I sobre superficies de poliestireno (PS) y de un copolímero de ácido láctico y ácido glicólico (poly(L-lactide-co-glycolide)-PLG), estas últimas menos hidrofóbicas que superficies de PS, observando que el colágeno adoptó una forma granular sobre las superficies de PLG, y por el

contrario adoptó una forma alargada sobre el PS.⁸ Otro estudio de la conformación del colágeno tipo I inmovilizado sobre superficies de silicio recubiertas con una mezcla de monocapas autoensambladas de alcalinotioles terminados en $-\text{CH}_3$ y $-\text{OH}$, con variaciones en su hidrofobicidad por cambios en la concentración de grupo OH , también reveló una conformación diferente dependiendo de la hidrofobicidad de la superficie.²¹ Ellos observaron una gran densidad de fibrillas grandes sobre las superficies con un ángulo de contacto por encima de 83° (concentración = 75% CH_3 / 25% OH), mientras que sobre superficies con valores de ángulo de contacto por debajo de 63° (concentración = 50% CH_3 / 50% OH), observaron una distribución dispersa de manera ocasional de algunas fibrillas más pequeñas. En ninguna de las superficies, observaron una conformación globular. A medida que disminuyeron la concentración de grupos OH sobre la superficie con alcalinotioles terminados en CH_3 -lo cual a su vez fue aumentando la hidrofobicidad-, observaron que el grosor y la densidad de las fibrillas del colágeno aumentó. Por el contrario en nuestro caso, las imágenes obtenidas por AFM del colágeno inmovilizado sobre las muestras de PL-CP con un ángulo de contacto de 80° , muestran unas fibrillas más similares a las observadas en el estudio de Elliot sobre las superficies con valores por debajo de 63° donde las superficies tenían una concentración de 50% CH_3 / 50% OH . Lo anterior nos lleva a pensar que sobre las superficies silanizadas con CPTES hay una alta concentración de grupos OH en comparación con la concentración del silano, lo cual influye en el tamaño de las fibrillas de colágeno observadas.

b) OWLS

En las Figuras 5.6 y 5.7 se muestran los resultados de la cuantificación del colágeno adsorbido después de 10 minutos sobre las superficies de titanio modificadas con PL, PL-CP y PL-GP, partiendo de soluciones de colágeno con la misma concentración y con distintas concentraciones, respectivamente.

Partiendo de una concentración inicial igual para todas las muestras de $25\mu\text{g/ml}$ -10min (Figura 5.6), se observó una mayor cantidad de colágeno adherido sobre las muestras de PL-GP-col ($216,3 \pm 7,5 \text{ ng/cm}^2$), seguidas por las muestras de PL-col ($186,9 \pm 4,8 \text{ ng/cm}^2$) y PL-CP-col ($143,1 \pm 4,2 \text{ ng/cm}^2$). En el caso donde se

evaluaron las concentraciones mínimas, determinadas en los estudios previos de AFM, que permitían la visualización simultánea del colágeno y de la superficie del sustrato (Figura 5.7), se observó que la cantidad de colágeno adherido sobre las muestras tratadas con plasma fue de $138,5 \pm 3,4$ ng/cm², sobre las muestra silanizada con CPTES de $143,1 \pm 4,2$ ng/cm², y sobre las muestras silanizadas con GPTES de $134,5 \pm 5,2$ ng/cm², lo que indica una cantidad similar de colágeno adherido sobre las tres superficies aunque se parta de concentraciones iniciales diferentes. Sin embargo las diferencias son estadísticamente significativas, con lo cual a estas concentraciones la cantidad de colágeno adherido de mayor a menor fue PL-CP-col > PL-col > PL-GP-col.

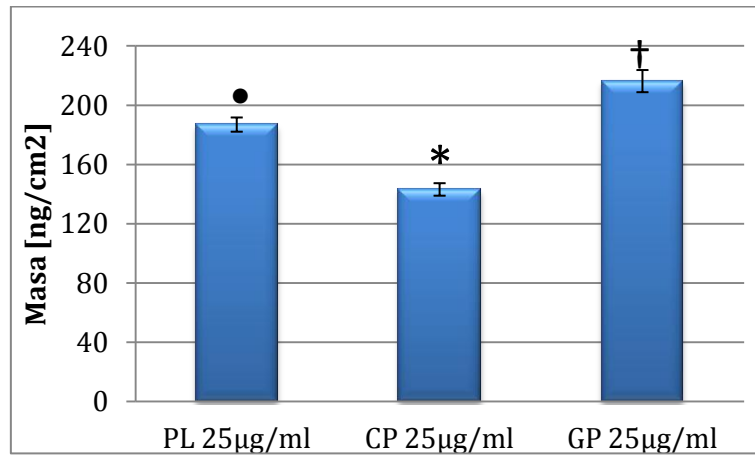


Figura 5.6: Nanogramos de colágeno adherido sobre las superficies de PL, PL-CP, PL-GP, partiendo de una concentración en solución de 25µg/ml para todas las muestras. Los símbolos sobre cada uno de las barras, representan la existencia de diferencias estadísticamente significativas (p -valor <0,05) entre las superficies.

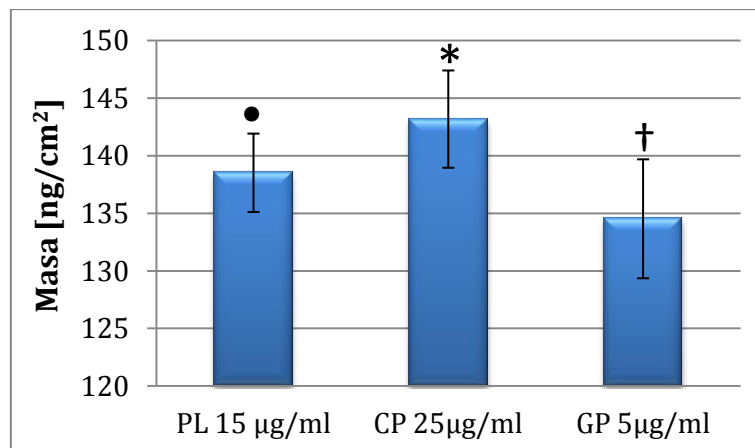


Figura 5.7: Nanogramos de colágeno adherido sobre las superficies de PL, PL-CP, PL-GP, partiendo de unas concentraciones en solución del 15µg/ml para PL, 25µg/ml para PL-CP y 5µg/ml para PL-GP. Los símbolos sobre cada uno de las barras, representan la existencia de diferencias estadísticamente significativas (p -valor <0,05) entre las superficies.

Estos resultados sugieren que la reacción del colágeno con las muestras silanizadas es más eficiente con el GPTES, ya que estas superficies requirieron de una concentración en solución mucho menor para lograr la inmovilización de la misma cantidad de proteína que sobre las muestras silanizadas con CPTES y a igual concentración inicial se inmovilizó más cantidad de colágeno sobre GPTES que sobre CPTES.

Es importante considerar que cada uno de los silanos (CPTES y GPTES) requiere de condiciones de pH en un rango entre neutro a básico, para obtener un ataque nucleófilo sobre sus grupos organofuncionales. Sin embargo, la solución de colágeno utilizada tenía un pH ligeramente ácido (pH = 6) para evitar su precipitación. Bajo estas condiciones de pH, el GPTES resultó ser más eficiente que el CPTES, sugiriendo que su grupo funcional, que es un anillo epoxi, reaccionó más fácilmente que el grupo organofuncional del CPTES que es un Cl. En el caso del grupo epoxi, la reacción con el colágeno se da a través de una adición nucleófila, en la cual el anillo se abre, mientras que en el caso del Cl del CPTES, la reacción es de sustitución nucleófila, en donde se requiere romper el enlace del Cl, para liberarlo.²⁴ Adicionalmente, sólo en el caso del CPTES, la reacción de sustitución nucleófila da lugar a la generación de H-Cl, que disminuye el pH de la solución. A pHs ácidos, los grupos nucleófilos del tipo amina y alcohol presentes en el colágeno estarán protonados, lo cual impide el ataque nucleófilo sobre el silano. Por lo tanto es de esperar, que la eficiencia del CPTES a pH 6 sea más baja que la del GPTES.

Estos resultados contrastan con los obtenidos al sumergir las muestras en una solución con una concentración mayor de colágeno de 150µg/ml por un tiempo de inmersión de 16 horas, donde se observó una mayor cantidad de colágeno adherido sobre la muestra de PL-CP-col (1110 ± 25 ng/cm²) que sobre la muestra de PL-GP-col (760 ± 17 ng/cm²) (Figura 3.13, capítulo 3). Esto puede ser debido a varios factores. Por un lado, puede ser debido a que a tiempos largos de inmersión, el grupo epoxi del GPTES es susceptible a hidrolizarse en medio ácido, lo que conlleva a una reducción del colágeno adherido, como ya se ha discutido antes (Figura 3.7 del capítulo3). Por otro lado, es importante recordar que el aumento de

proteína adherida es directamente proporcional al aumento de la hidrofobicidad, como ha sido descrito en el estudio de Elliot et al., donde observaron que a medida que aumentaba la hidrofobicidad de las superficies, la cantidad de colágeno tipo I aumentó.²¹ En nuestro caso las superficies de CPTES fueron mucho más hidrofóbicas que las de GPTES (Figura 2.15, capítulo 2).

5.4.2 Respuesta celular

En las Figuras 5.8 a 5.14 se muestran los resultados de los estudios de adhesión (número, área y circularidad de las células, así como expresión de vinculina y fibronectina) de los fibroblastos tras 4 horas de incubación, que se realizaron sobre superficies con colágeno inmovilizado, bajo las tres 3 condiciones escogidas en los estudios de AFM:

Condición 1: concentraciones mínimas de colágeno en solución necesaria para visualizar el colágeno en cada superficie: PL= 15µg/ml, PL-CP = 25µg/ml y PL-GP = 5µg/ml (concentración final de colágeno adherido: PL-col= 138.5±3.4 ng/cm², PL-CP-col= 143.1±4.2ng/ cm², PL-GP-col= 134.5±5.2 ng/ cm²).

Condición 2: Todas las superficies tratadas con una concentración inicial de colágeno en solución de 25 µg/ml durante 10 minutos (concentración final de colágeno adherido: PL-col= 186.9±4.8 ng/cm², PL-GP-col= 216.3±7.5 ng/ cm², PL-CP-col= 143.1±4.2 ng/ cm²).

Condición 3: Todas las superficies tratadas con una concentración inicial de colágeno en solución de 150 µg/ml durante 16 horas (concentración final de colágeno adherido: PL-col= 660±10 ng/cm², PL-GP-col= 760±17.4 ng/ cm², PL-CP-col= 1110±25 ng/ cm²).

a) Adhesión y extensión celular

En la Figura 5.8, donde se muestran las imágenes de inmunofluorescencia de las muestras preparadas bajo la *condición 1*. Se observaron más células redondas que extendidas sobre los 3 tipos de superficies (PL-col, PL-CP-col y PL-GP-col), lo cual es atribuido a la baja cantidad de proteína adsorbida. Esto se confirma cuando vamos aumentando la concentración de colágeno, ya que a medida que tenemos más colágeno adherido sobre la superficie, van disminuyendo la cantidad de células redondas (Figuras 5.9 y 5.10).

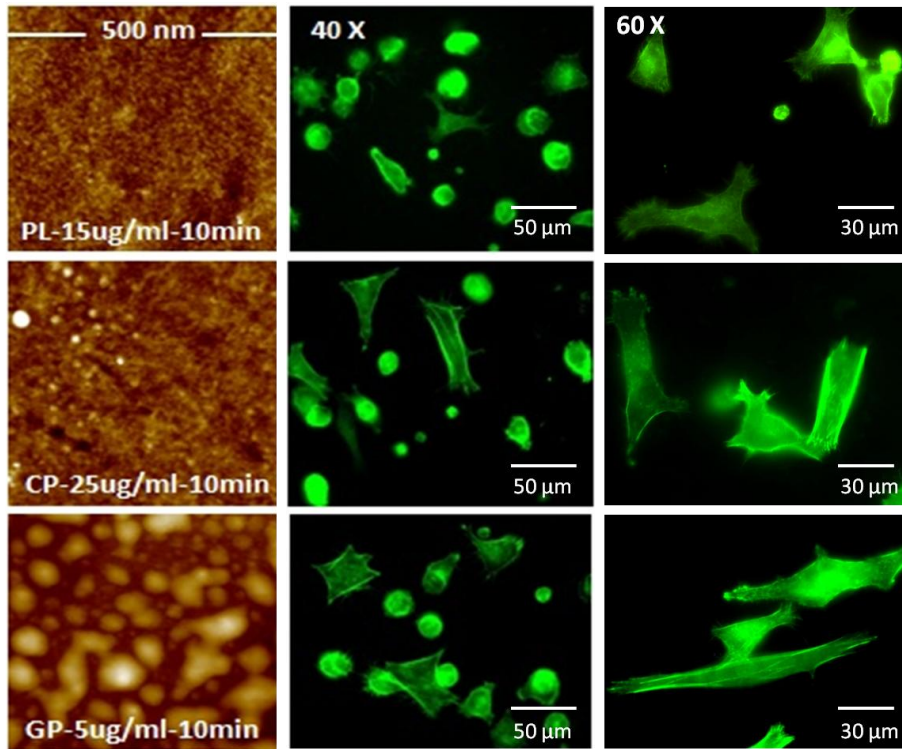


Figura 5.8: Imágenes de tinción fluorescente del citoesqueleto (verde) de los fibroblastos sembrados sobre las superficies con las concentraciones de colágeno mínimas: PL-15 $\mu\text{g/ml}$, CP-25 $\mu\text{g/ml}$, GP-5 $\mu\text{g/ml}$. La columna de la izquierda corresponde a las imágenes de AFM de las superficies funcionalizadas con colágeno.

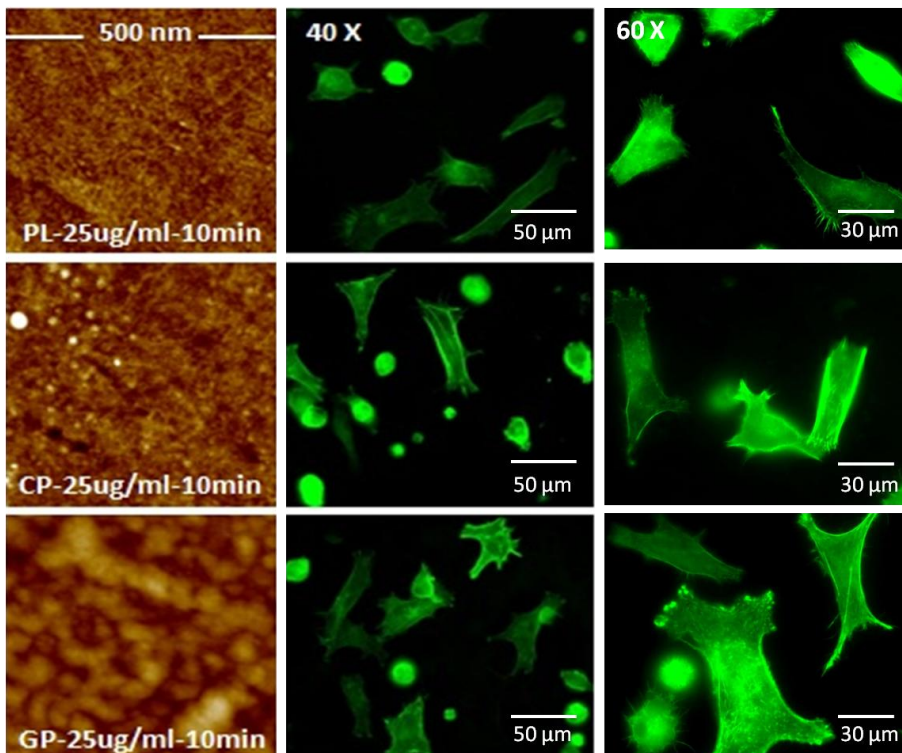


Figura 5.9: Imágenes de tinción fluorescente del citoesqueleto (verde) de los fibroblastos sembrados sobre las superficies con una concentración de colágeno inicial de 25 $\mu\text{g/ml}$. La columna de la izquierda corresponde a las imágenes de AFM de las superficies funcionalizadas con colágeno.

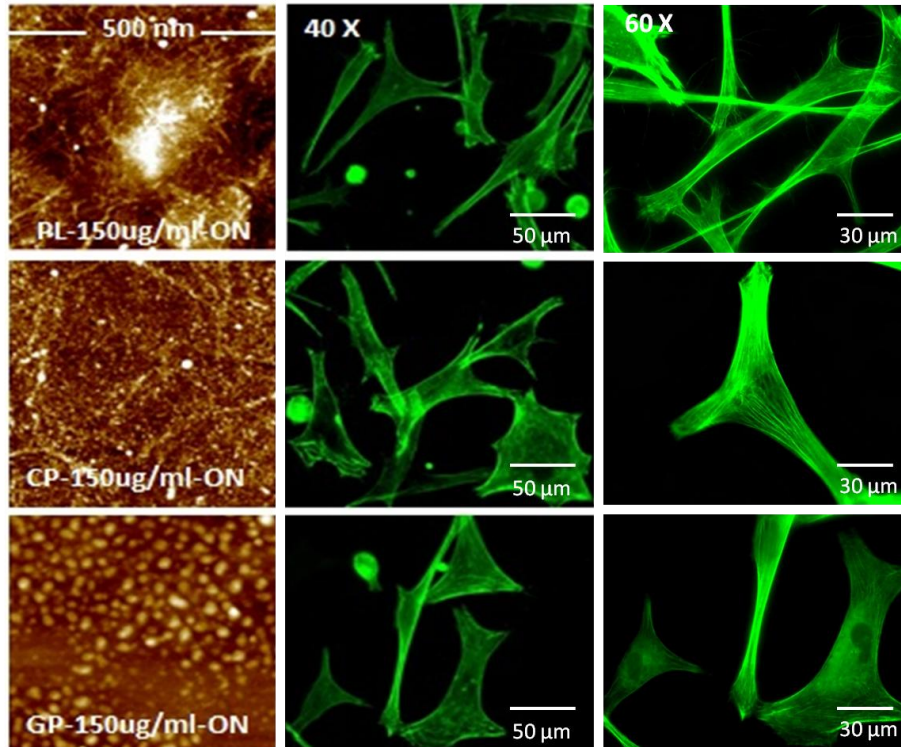


Figura 5.10 Imágenes de tinción fluorescente del citoesqueleto (verde) de los fibroblastos sembrados sobre las superficies con una concentración de colágeno inicial de 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La columna de la izquierda corresponde a las imágenes de AFM de las superficies funcionalizadas con colágeno.

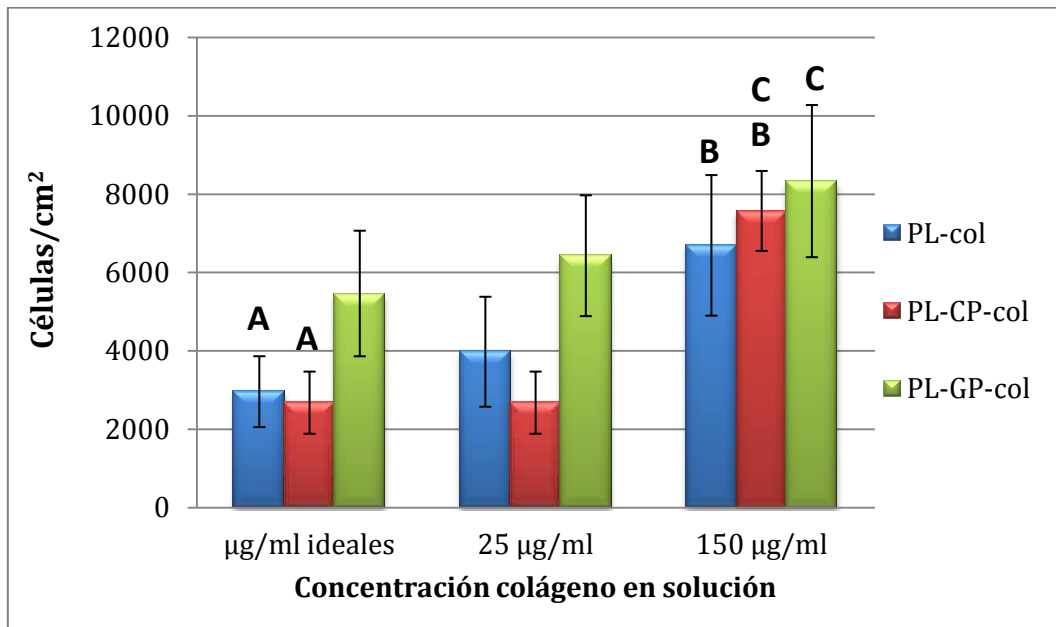


Figura 5.11: Número de fibroblastos adheridos a 4 horas, sobre superficies de titanio modificadas con cada una de las concentraciones de colágeno estudiadas por AFM. Los datos que tiene la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

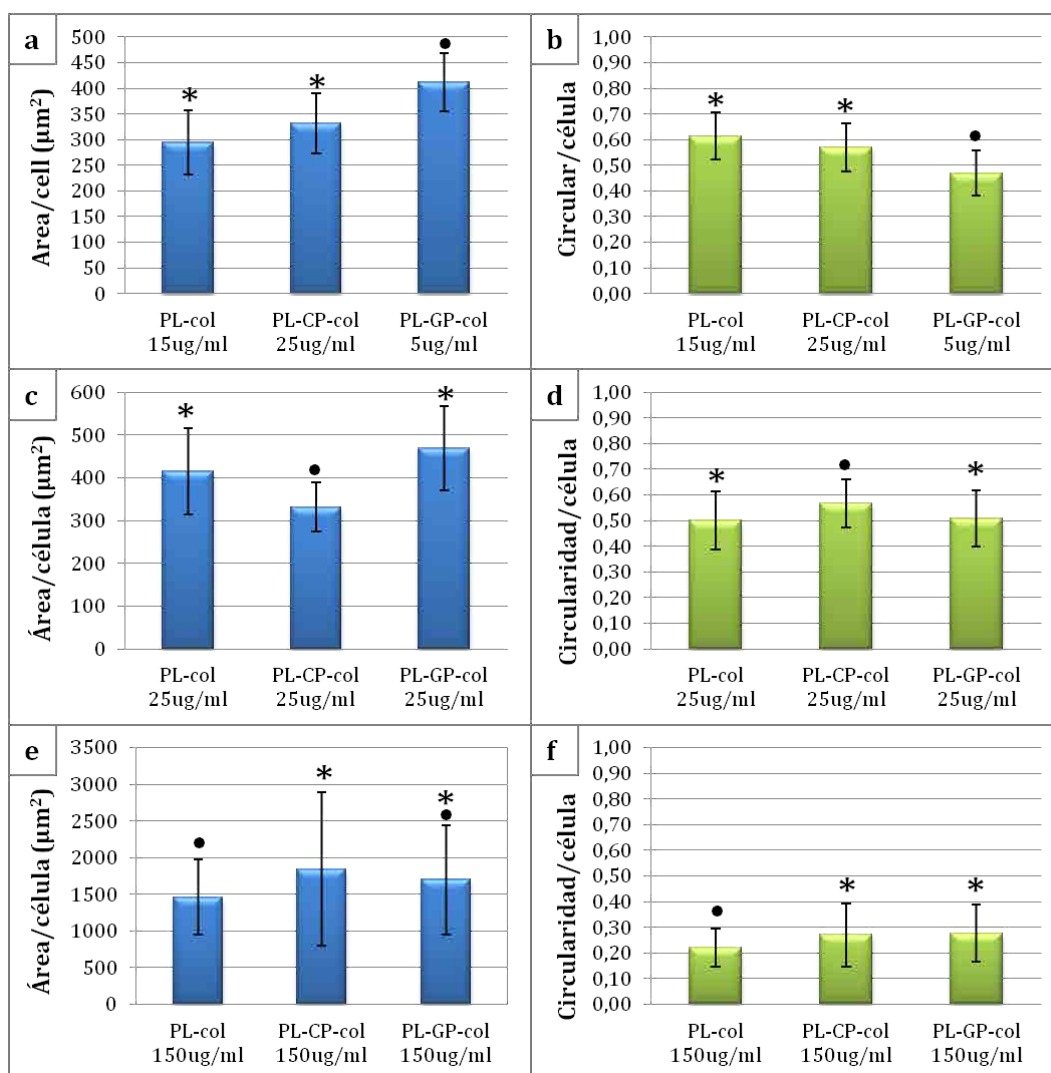


Figura 5.12: Área y Circularidad del citoesqueleto de los fibroblastos adheridos sobre superficies de titanio biofuncionalizadas con colágeno. Concentración de colágeno en solución: concentraciones mínimas-10min (a, b), 25 µg/ml-10min (c, d) y 150 µg/ml-16h (e, f). Los datos con el mismo símbolo no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En las Figuras 5.11 y 5.12 se muestra el número de células y la extensión y circularidad de las mismas, para los distintos sustratos estudiados. En las muestras preparadas bajo la *condición 1*, se observó un mayor número de células adheridas sobre las superficies de PL-GP-col, así como una mayor área y menor circularidad de las mismas (Figuras 5.8 y 5.12a y b) que sobre las muestras de PL-CP-col y las de PL-col. Esto coincide con lo observado en la Figura 5.8, donde se observó un inicio de formación de filamentos de actina sólo sobre las muestras de PL-GP-col. Entre las muestras de PL-CP-col y PL-col no se encontraron diferencias significativas en cuanto al número, el área y la circularidad de las células adheridas (Figuras 5.11, 5.12 a y b), ni se observaron filamentos de actina dentro su

citoesqueleto (Figura 5.8). Bajo estas condiciones, la concentración final de colágeno adherido sobre PL-GP-col era ligeramente menor ($134,5 \pm 5,2$ ng/cm²) que sobre las muestras de PL-col ($138,5 \pm 3,4$ ng/cm²) y PL-CP-col ($143,1 \pm 4,2$ ng/cm²). Además, sólo sobre PL-GP-col la conformación del colágeno fue en forma de agregados globulares, lo que sugiere que a bajas concentraciones, predomina la influencia de la morfología que adopta el colágeno.

En el caso de las muestras con una concentración de colágeno en solución de 25µg/ml, también se observó un mayor número de células adheridas en las muestras de PL-GP-col (Figura 5.11) que sobre las muestras de PL-CP-col y PL-col. El grado de extensión de las células en PL-GP-col fue mayor que en PL-CP-col pero igual a PL-col (Figuras 5.9 y 5.12 c y d), coincide con las muestras con mayor cantidad de colágeno inmovilizado, como se muestra en las Figura 5.6. Nuevamente la morfología que adopta el colágeno en forma globular sobre las muestras de PL-GP-col, pareció favorecer la adhesión de los fibroblastos.

El efecto de la conformación de diversas proteínas sobre la respuesta celular, se ha puesto de relieve en distintos estudios. Llopis-Hernández et al., reportaron que la conformación de la fibronectina en forma de agregados globulares, promueve la respuesta de células del tipo osteoblasto (MC3T3-E1).²³ Sin embargo, Gugutkov et al., observaron una mejor extensión de las células que fueron cultivadas sobre fibronectina con una conformación fibrilar.⁵ En el caso del colágeno tipo I, Adamczak et al, reportaron una respuesta similar en fibroblastos sembrados sobre muestras de PS y PLG recubiertas con colágeno, aunque sobre cada una de estas superficies el colágeno adopto una conformación diferente.⁸ Sin embargo, en este estudio no se discutió la cantidad de colágeno inmovilizado sobre cada una de las superficies, lo cual también influye en el número y en la extensión de las células. Elliot et al., reportaron que el área de células de musculo liso (smooth muscle cell-SMC) sembradas sobre superficies con colágeno tipo I, fue mejor sobre superficies con alcalinotioles terminados en OH⁻, donde el colágeno se adhirió formando un película lisa con sólo algunas pequeñas fibrillas, que sobre superficies con alcalinotioles terminados en CH₃ en las que se formaron fibras más largas con pequeñas ramificaciones de fibrillas más pequeñas.²¹ En nuestro caso, parece ser

que a bajas concentraciones de colágeno en solución, la conformación del colágeno tipo I en forma globular favorece la adhesión y la respuesta de los fibroblastos, lo que se confirmó con el alto número de células adherido (Figura 5.11) y un mayor desarrollo del citoesqueleto sobre estas superficies (Figuras 5.8 y 5.12 a y b). Después de la inmovilización, las proteínas pueden sufrir cambios en su conformación dependiendo de la química de la superficie, lo que altera su estructura nativa.^{25,26} Esto puede influir en las secuencias de aminoácidos expuestas a las integrinas de las células, y por lo tanto influir en la respuesta celular.

Sin embargo, a bajas concentraciones (entre 5 y 25 $\mu\text{g/ml}$ – 10 minutos), no sólo la conformación del colágeno influye en la respuesta de las células. También debe considerarse que hay sitios donde no hay colágeno, en los cuales las características del sustrato influirán en la respuesta celular. Dentro de las características de cada una de las superficies, puede destacarse el efecto de los silanos presentes en las superficies, para los cuales se observó que tanto el número de células como el área de las mismas fue mucho menor sobre las superficies silanizadas con CPTES (sin colágeno) que sobre las muestras silanizadas con GPTES (sin colágeno) (Figuras 4.3 y 4.4 del capítulo 4). Otra característica que cambia sobre cada una de las superficies es la hidrofobicidad. De acuerdo con lo observado por Miranda-Coelho et al, 2010, valores de hidrofobicidad intermedios parecen favorecer la adhesión celular.²² Esto concuerda con lo observado en nuestros resultados, donde se observó que a bajas concentraciones hay una mejor respuesta celular sobre las superficies de PL-GP, que mostraron un ángulo de contacto $\approx 50^\circ$ (Figura 2.15, capítulo 2).

Finalmente, cuando se analizó la influencia de la concentración de 150 $\mu\text{g/ml}$ -16h sobre la respuesta celular, se observó que el número de células, y el grado de extensión fue muy similar sobre todas las muestras (Figura 5.10, 5.11 y 5.12 e y f), siendo ligeramente mayor sobre las superficies donde se inmoviliza el colágeno mediante los silanos (PL-CP-col y PL-GP-col) que sobre la muestra donde el colágeno está fisisorbido (PL-col), tal y como se observó en los resultados de adhesión del capítulo anterior donde se evaluó esta misma concentración de

colágeno en solución, aunque en este caso se evaluó un número de células menor que el evaluado en los ensayos de adhesión del capítulo 4 (Figura 4.4, capítulo 4). Bajo esta condición, no se observaron diferencias significativas en la respuesta celular sobre las dos superficies silanizadas (Figura 5.12 e y f) a pesar de que hay diferencias en cuanto a la conformación que adopta el colágeno sobre cada una de ellas. Esto puede ser debido a que la gran cantidad de colágeno adherido sobre las superficies, enmascara el efecto de la diferente conformación y distribución que adopta el colágeno sobre cada superficie, o también a un mejor recubrimiento de la superficie, eliminándose el efecto de las diferentes propiedades de la superficie inherentes a los diferentes sustratos.

Este mayor recubrimiento de la superficie puede explicar también el hecho de que el área de las células cultivadas sobre estas muestras, fue 3 veces mayor que la de las células sembradas sobre muestras con una menor concentración ($\leq 25\mu\text{g/ml}$ -10min) (Figura 5.12 e). Paralelamente, la circularidad se vio reducida notablemente (Figura 5.12 f) como se observó en la Figura 5,10, donde las células están bastante extendidas y todas presentan filamentos de actina en su citoesqueleto. Esto nos indica que, al alcanzar una cierta concentración, las células parecen responder mejor en términos de adhesión y de extensión. Es importante recordar que la extensión de las células es uno de los parámetros que influyen en los siguientes procesos celulares como la proliferación, la activación celular, y la producción y remodelación de la matriz extracelular.²⁷⁻²⁹ Por lo tanto, el uso de una mayor concentración de colágeno y un mayor tiempo de inmersión de las muestras, se justifica ya que esto mejora la respuesta celular.

b) Formación de adhesiones focales y secreción de Fibronectina

En las Figura 5.13 y 5.14 se muestran las imágenes a 60 aumentos de la inmunofluorescencia de vinculina y fibronectina, donde se compara el efecto de cada una de las 3 concentraciones de colágeno en solución estudiadas a lo largo de este capítulo: concentraciones mínimas (PL $15\mu\text{g/ml}$, CP $25\mu\text{g/ml}$, GP $5\mu\text{g/ml}$ - 10min) (Figura 5.13 y 5.14 a, b y c), $25\mu\text{g/ml}$ -10min sobre todas las superficies (Figura 5.13 y 5.14 d, e y f) y $150\mu\text{g/ml}$ -16h sobre todas las superficies (Figura 5.13 y 5.14 g, h y i).

Cuando se analizó la influencia de las concentraciones mínimas (Figuras 5.13 a, b, c y 5.14 a, b, c), se observó expresión de puntos focales sólo en las superficies con colágeno inmovilizado sobre PL-GP-col (Figura 5.13-c) y en muy pocas células. De igual forma, se observó un comienzo de formación de pequeñas fibrillas alargadas en los filopodios de las células (flechas) sólo en las células cultivadas sobre las muestras de PL-GP-col (Figura 5.14 c), que según la literatura se pueden atribuir a una secreción y organización temprana de fibronectina.^{5,23,30} Por el contrario, en las superficies de PL-col y PL-CP-col, se observaron diminutos puntos distribuidos por el citoplasma dentro de la célula, que son atribuidos a una expresión de fibronectina pero sin organizar. Lo anterior, confirma nuevamente que la conformación del colágeno en forma de agregados globulares tiene un efecto importante sobre la respuesta celular.

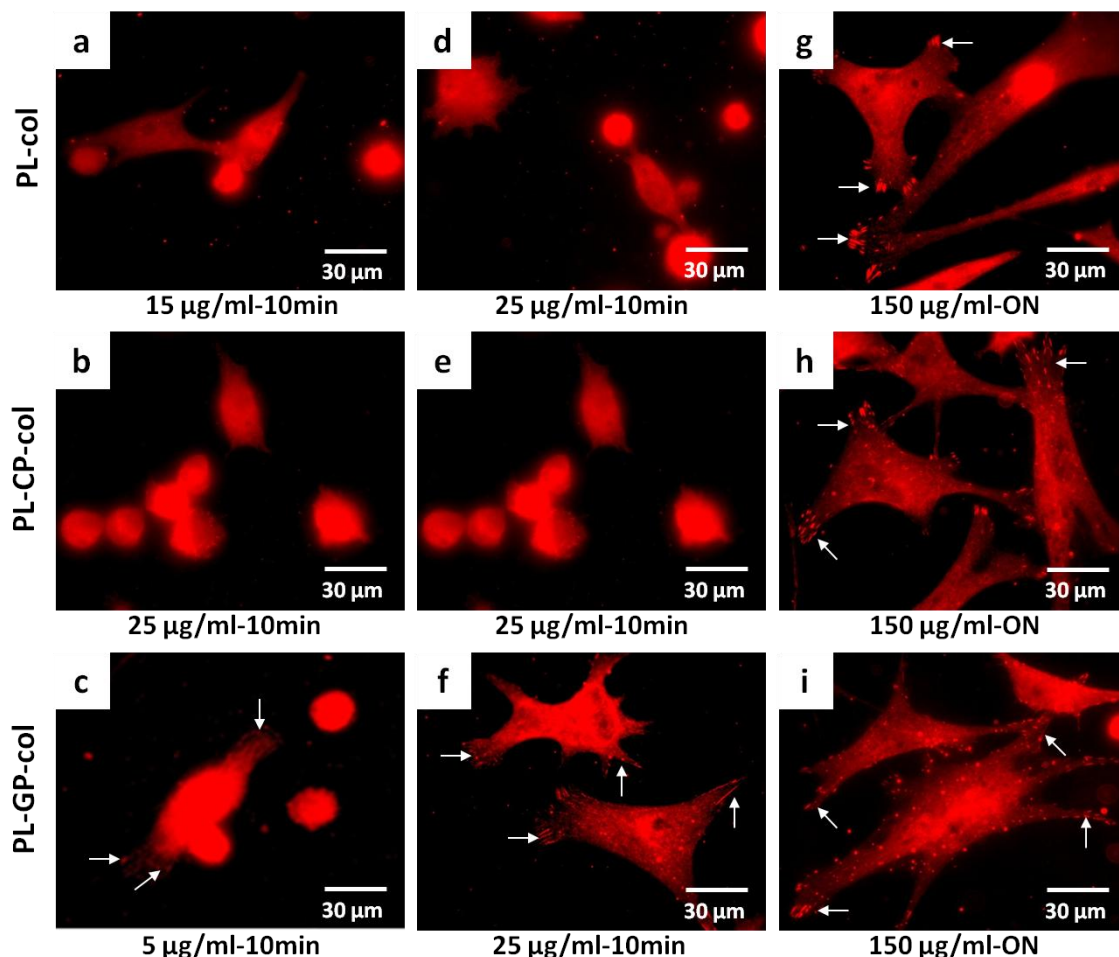


Figura 5.13: Imágenes de inmunofluorescencia de la vinculina (flechas), de fibroblastos sembrados sobre muestras de titanio biofuncionalizadas (PL-col, PL-CP-col y PL-GP-col) con concentraciones de colágeno en solución (a, b, c) ideales (15µg/ml, 25µg/ml y 5µg/ml), (d, e, f) 25 µg/ml sobre todas las muestras y (g, h, i) 150 µg/ml para todas las superficies.

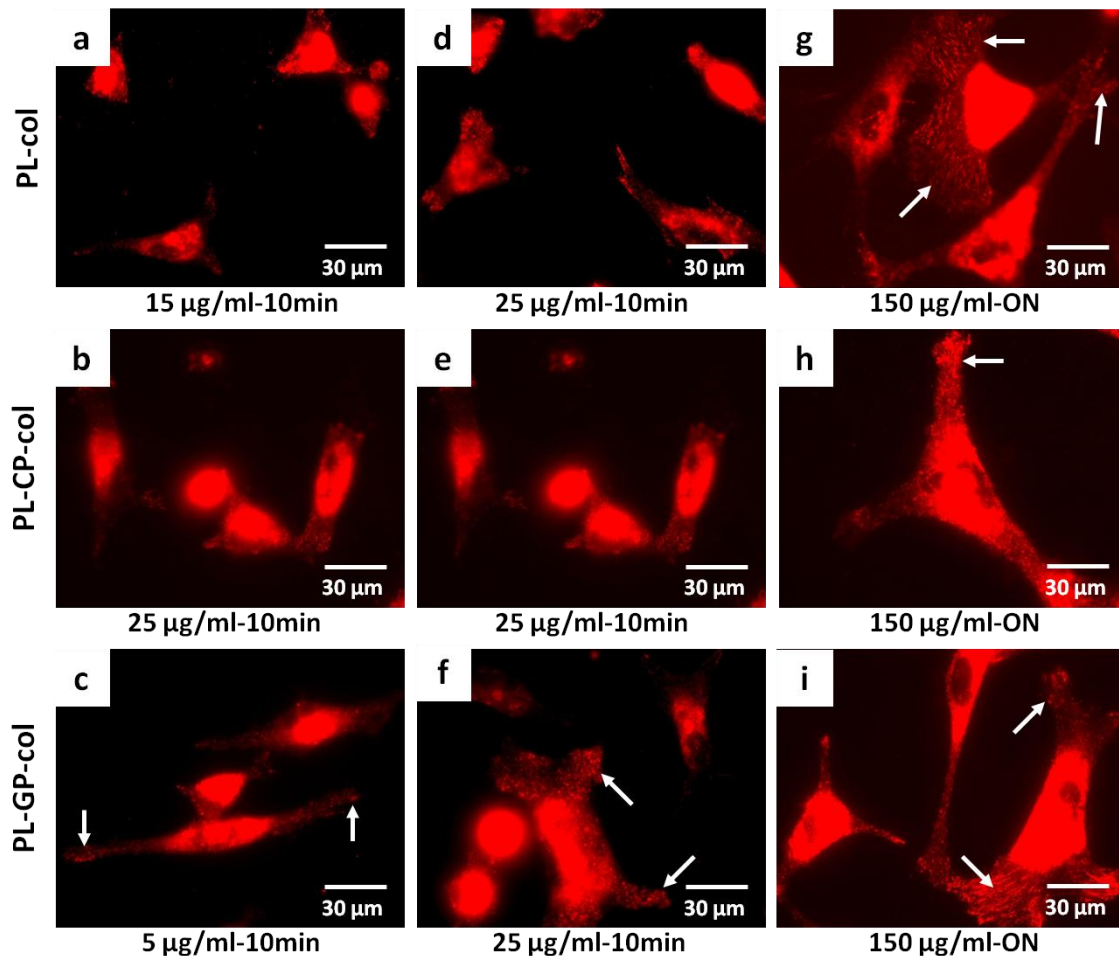


Figura 5.14: Imágenes de inmunofluorescencia de fibronectina (flechas), de fibroblastos sembrados sobre muestras de titanio biofuncionalizadas (PL-col, CP-col y GP-col) con concentraciones de colágeno en solución (a, b, c) ideales (15µg/ml, 25µg/ml y 5µg/ml), (d, e, f) 25 µg/ml sobre todas las muestras y (g, h, i) 150 µg/ml para todas las superficies.

Cuando se incrementó la concentración de la solución de colágeno a 25µg/ml manteniendo un tiempo de inmersión de 10 minutos para todas las muestras (Figura 5.13-d, e, f), se observó de nuevo que la presencia de puntos focales y la secreción de pequeñas fibrillas de fibronectina sólo fue evidente en las células cultivadas sobre las muestras de PL-GP-col, indicando nuevamente que la conformación del colágeno en forma globular favorece la respuesta de los fibroblastos.

Es sabido que la expresión de vinculina (puntos focales) está estrechamente relacionada con el grado de extensión de las células, es decir, a mayor extensión más posibilidades hay de que se formen puntos focales. Tanto la extensión como la expresión de vinculina son indicadores de un proceso de adhesión satisfactorio.²⁹

El área de las células fue mayor sobre las muestras de PL-GP-col tanto en las concentraciones mínimas como cuando se aumentó a una concentración de 25µg/ml, como se observó en las Figuras 5.8, y 5.12 a y b del apartado anterior, por lo tanto era de esperar que sobre estas muestras se expresara antes la vinculina.

En cuanto a la secreción de fibrillas de fibronectina, Gugutkov et al., reportaron que sólo hubo expresión de ésta en fibroblastos sembrados sobre fibronectina con una conformación en forma de agregados globulares, la cual se obtuvo sobre superficies de copolímeros de EA/HEA (acrilato de etilo/ acrilato de hidroxietilo) con valores de hidrofobicidad intermedios.⁵ En nuestros estudios se observó, un comportamiento similar al observado por Gugutkov, donde a bajas concentraciones la conformación que más favoreció la secreción de fibronectina fue la de agregados globulares, que se observó sobre las muestras de PL-GP. Sin embargo en nuestro caso, las células están sembradas sobre colágeno tipo I, por lo cual otros factores diferentes a la conformación pueden estar influyendo en la secreción temprana de fibrillas de fibronectina.

Una conformación adecuada de la proteína sobre los sustratos, resulta en una excelente adhesión y formación de la matriz extracelular. La secreción de fibronectina y su organización en fibrillas, observada a bajas concentraciones, son un indicativo de una actividad temprana de las células y del inicio de la formación y organización de una matriz extracelular.³¹ Por lo tanto, parece ser que una conformación globular de colágeno proporciona las señales adecuadas que estimulan la actividad de formación de la matriz de fibroblastos cultivados en las muestras de PL-GP-col. En consecuencia, se puede decir que el GPTES, parece ser el tratamiento que proporciona una conformación de colágeno más adecuada para favorecer la respuesta de fibroblastos, a bajas concentraciones.

Sin embargo, a altas concentraciones y largos tiempos de inmersión (150µg/ml durante 16 horas) (Figura 5.13 y 5.14 g, h, i), en general se observó para todas las muestras una buena respuesta celular, con una extensión de la mayoría de las células (Figura 5.10) y por lo tanto con un número considerable de puntos focales en casi todas las células (Figura 5.13 g, h, i). Del mismo modo, se observó organización temprana de fibrillas de fibronectina en las células sembradas sobre

todas las superficies (Figura 5.14 g, h, i). En este caso, tampoco se observaron diferencias entre las superficies, probablemente debido a que la formación de multicapas de colágeno enmascara el efecto de la morfología que éste adopta sobre las superficies. Es sabido que a medida que las proteínas se acercan más a la superficie en contacto con las células, adquieren una orientación que determina que parte de su estructura está en contacto con la superficie y que parte queda expuesta a las células.³² En nuestro caso, puede ser probable que al haber múltiples capas, las últimas estén fisisorbidas y por lo tanto presenten una orientación diferente, lo que finalmente influirá en las secuencias de aminoácidos expuestas hacia los fibroblasto.

5.5 CONCLUSIONES

Conformación del colágeno inmovilizado

La conformación que adopta el colágeno tipo I sobre cada una de las superficies estudiadas depende de la química de las superficies.

1) Las superficies altamente hidrofílicas (PL, a.c. ≈ 0) y altamente hidrofóbicas (CP, a.c. ≈ 80) muestran una conformación del colágeno en forma de fibrillas entrecruzadas. En el caso del CPTES estas fibrillas están conformadas a su vez por diminutos glóbulos que van tomando grosor a medida que se aumenta la concentración, lo que ha sido atribuido a la alta hidrofobicidad de esta superficie.

2) Las muestras silanizadas con GPTES, con un carácter hidrofóbico intermedio (a.c. $\approx 50^\circ$), mostraron una morfología globular extendida que va aumentando de tamaño a medida que se aumenta la concentración del colágeno.

3) A altas concentraciones y altos tiempos de adhesión (150 μ g/ml-16horas), se forman multicapas de las morfologías observadas sobre cada superficie.

Cantidad de colágeno adherido

La cantidad de colágeno adherido sobre las superficies de titanio modificadas, depende de la química de superficie y del tiempo en el que la superficie y la solución están en contacto.

1) A bajas concentraciones de colágeno (<25µg/ml) y 10 minutos de inmersión, la cantidad de colágeno fue mayor sobre las muestras de PL-GP-col que sobre las muestras de PL-CP-col y PI-col. La diferencia entre estas superficies son los grupos funcionales que interactúan con el colágeno, El GPTES tiene como grupo funcional un epoxi mientras que el CPTES tiene grupos Cl y las muestras tratadas con plasma tienen grupos OH⁻ sobre su superficie. Parece ser que los grupos funcionales influyen en la cinética de la reacción con el colágeno, la cual es más eficiente con las muestras silanizadas con GPTES ya que esta requiere de una concentración en solución mucho menor para lograr la inmovilización de la misma cantidad de proteína que sobre la muestra silanizada con CPTES y a concentraciones en solución inicial igual se inmoviliza mayor cantidad de colágeno sobre GPTES que sobre CPTES.

2) Por el contrario, a alta concentración de colágeno y largo tiempo de inmersión (150µg/ml - 16 horas), la cantidad de colágeno adherido fue mayor en PL-CP-col que sobre las muestras de PL-GP-col, probablemente debido que el grupo epoxi de GPTES silano es propenso a hidrolizar en medio ácido cuando la reacción se prolonga en el tiempo.

Respuesta celular

1) A bajas concentraciones de colágeno, la conformación que adopta el colágeno en forma de agregados globulares sobre las superficies silanizada con GPTES, es la que más favorece la respuesta celular en número y extensión celular así como en la formación de puntos focales y secreción y organización temprana de fibronectina.

2) A bajas concentraciones de colágeno, la respuesta celular se vió influenciada no sólo por la conformación del colágeno sino también por las

propiedades de las partes del sustrato sin recubrir. La respuesta de los fibroblastos fue mejor sobre las muestras de PL-GP-col que sobre la muestra de PL-CP-col, debido a que el CPTES es más citotóxica que el GPTES, como se evidencio en el capítulo 4. Las superficies de PL-GP con valores intermedios de hidrofobicidad, favorecieron la respuesta de los fibroblastos.

3) A altas concentraciones, la respuesta celular no depende de la morfología del colágeno adherido, debido a que la gran cantidad de colágeno presente en la superficie, en forma de múltiples capas, enmascara el efecto que las diferentes conformaciones de colágeno pueden tener sobre las células.

5.6 REFERENCIAS

1. Chen CH, Hansma HG. Basement membrane macromolecules: insights from atomic force microscopy. *Journal of structural biology*. 2000;131(1):44-55.
2. Rodríguez Hernández JC, Salmerón Sánchez M, Soria JM, Gómez Ribelles JL, Monleón Pradas M. Substrate chemistry-dependent conformations of single laminin molecules on polymer surfaces are revealed by the phase signal of atomic force microscopy. *Biophysical journal*. 2007;93(1):202-7.
3. Arakawa H, Umemura K, Ikai. A. Protein images obtained by STM, AFM and TEM. *Nature*. 1992;358:171.
4. Bergkvist M, Carlsson J, Oscarsson S. Surface-dependent conformations of human plasma fibronectin adsorbed to silica, mica, and hydrophobic surfaces, studied with use of Atomic Force Microscopy. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 2003;64(2):349-56.
5. Gugutkov D, Altankov G, Rodríguez Hernández JC, Monleón Pradas M, Salmerón Sánchez M. Fibronectin activity on substrates with controlled --OH density. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 2010;92(1):322-31.
6. Sherratt MJ, Holmes DF, Shuttleworth CA, Kielty CM. Substrate-dependent morphology of supramolecular assemblies: fibrillin and type-VI collagen microfibrils. *Biophysical journal*. 2004;86(5):3211-22.
7. Sherratt MJ, Bax DV, Chaudhry SS, et al. Substrate chemistry influences the morphology and biological function of adsorbed extracellular matrix assemblies. *Biomaterials*. 2005;26(34):7192-206.

8. Adamczak M, Scisłowska-Czarnecka A, Genet MJ, Dupont-Gillain CC, Pamuła E. Surface characterization, collagen adsorption and cell behaviour on poly(L-lactide-co-glycolide). *Acta of bioengineering and biomechanics / Wrocław University of Technology*. 2011;13(3):63-75.
9. Rozana MD, Reece MJ, Famiza L, et al. AFM Image of Collagen on Induced Aligned Fluoropolymer Substrates. *Journal of Applied Sciences*. 2012;12(7):681 - 686.
10. Pérez-Garnes M, González-García C, Moratal D, Rico P, Salmerón Sánchez M. Fibronectin on PLLA with different topographies.pdf. *International Journal of Artificial Organs*. 2011;34(1):54 - 63.
11. Dufrêne YF, Marchal TG, Rouxhet PG. Influence of Substratum Surface Properties on the Organization of Adsorbed Collagen Films: In Situ Characterization by Atomic Force Microscopy. 1999;(22):2871-2878.
12. Cantini, M., González-García, C., Llopis-Hernández, V., and Salmerón-Sánchez M. Material-driven fibronectin fibrillogenesis. In: Horbett, T., Brash, B. and Norde N, ed. *Proteins at Interfaces III State of the Art*. Washington DC, VA, USA: ACS Symposium Series, American Chemical Society; 2012:471-496.
13. Taylor B, Weidmann E. Metallographic preparation of titanium. In: *Metals Handbook*. Desk Editi. 1984.
14. Méndez-Vilas A, Donoso MG, González-Carrasco JL, González-Martín ML. Looking at the micro-topography of polished and blasted Ti-based biomaterials using atomic force microscopy and contact angle goniometry. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*. 2006;52(2):157-66.
15. L. Bren, L. English, J. Fogarty, R. Policoro, A. Zsidi JV, J. Drelich, C. White, S. Donahue, N. Istephanous KR. Effect of Surface Characteristics of Metallic Biomaterials on Interaction with Osteoblast Cells. *Biomaterials*. 2004:1121.
16. Li Y, Zhang S, Guo L, et al. Collagen coated tantalum substrate for cell proliferation. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*. 2012;95:10-5.
17. De Cupere VM, Rouxhet PG. Collagen films adsorbed on native and oxidized poly (ethylene terephthalate): morphology after drying. *Langmuir*. 2001;491:395-404.
18. Denis FA, Hanarp P, Sutherland DS, et al. Protein Adsorption on Model Surfaces with Controlled Nanotopography and Chemistry. *Langmuir*. 2002;18:819-828.
19. Dupont-Gillain CC, Pamula E, Denis F a, et al. Controlling the supramolecular organisation of adsorbed collagen layers. *Journal of materials science. Materials in medicine*. 2004;15(4):347-53.

20. Pamula E, De Cupere V, Dufrêne YF, Rouxhet PG. Nanoscale organization of adsorbed collagen: Influence of substrate hydrophobicity and adsorption time. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004;271(1):80-91.
21. Elliott JT, Woodward JT, Umarji A, Mei Y, Tona A. The effect of surface chemistry on the formation of thin films of native fibrillar collagen. *Biomaterials*. 2007;28(4):576-85.
22. Miranda-Coelho N, González-García C, Salmerón-Sánchez M, Altankov G. Arrangement of Type IV Collagen and Laminin on Substrates with Controlled Density of – OH Groups. *Tissue engineering. Part A*. 2011;17(17-18):2245-2257.
23. Llopis-Hernández V, Rico P, Ballester-Beltrán J, Moratal D, Salmerón-Sánchez M. Role of surface chemistry in protein remodeling at the cell-material interface. *PLoS one*. 2011;6(5):e19610.
24. Ege SN. *Organic Chemistry. Structure and Reactivity*. 4th ed. (Stratton R, Warne S, eds.). Boston - New York: Houghton Mifflin Company; 1999.
25. Gray JJ. The interaction of proteins with solid surfaces. *Current opinion in Structural Biology*. 2004;14(1):110 - 115.
26. Rabe M, Verdes D. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advance in Colloid and Interface Science*. 2011;162(1-2):87 - 106.
27. Yang Y, Tian J, Deng L, Ong JL. Morphological behavior of osteoblast-like cells on surface-modified titanium in vitro. *Biomaterials*. 2002;23(5):1383-9.
28. Zhao Y, Yao Y, Liu W, Zheng C, Li S. Fibroblast Adhesion and Proliferation on a New β Type Ti-39Nb-13Ta-4 . 6Zr Alloy for Biomedical Application. 2006;22(2):205-210.
29. Bacakova L, Filova E, Parizek M, Ruml T, Svorcik V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances*. 2011;29(6):739-767.
30. Miranda-Coelho N, Altankov G. Fibroblasts remodeling of type IV collagen at biomaterials interface depends on fibronectin and substratum chemistry. In: Miranda-Coelho N, ed. *Tesis: Dinamic behavior of type IV collagen at cell-biomaterial interface*. Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica. Universitat Politècnica de Catalunya: Barcelona, España; 2012:123-148.
31. Salmerón-Sánchez M, Altankov G. Cell-Protein-Material interaction in tissue engineering. In: Eberli D, ed. *Tissue Engineering*. Vukovar, Croatia: In-Teh; 2010:77 - 102.
32. Xu H, Zhao X. Orientation of a monoclonal antibody adsorbed at the solid/solution interface: A combined study using Atomic Force Microscopy and Neutron Reflectivity. *Langmuir*. 2006;22(14):6313 - 6320.

6

CONCLUSIONES GENERALES

La investigación desarrollada en esta tesis doctoral fue diseñada con el fin de obtener superficies de titanio biofuncionalización con colágeno tipo I, como estrategia para mejorar el sellado biológico de implantes dentales. Al mismo tiempo se buscaba aumentar los conocimientos sobre las propiedades que influyen en las interacciones que tienen lugar en la interfaz material-silano/proteína y en la interfaz material-proteína/fibroblastos. Los resultados obtenidos se pueden resumir en las siguientes conclusiones:

1. Comparación de los tratamientos de plasma y piraña en términos de limpieza y activación

Tanto el tratamiento de limpieza y activación por plasma (PL) como el de piraña (PH), son efectivos en términos de limpieza, ya que eliminan gran cantidad de carbono relacionado a los contaminantes atmosféricos, siendo mejor el tratamiento de plasma. En cuanto al grado de activación, se observó una mayor cantidad de grupos hidroxilo sobre las superficies de PL, los cuales son utilizados como agentes intermediarios en la unión superficie-silano. Ambas superficies

mostraron un comportamiento altamente hidrofílico debido a la incorporación de grupos OH⁻ sobre la superficie, siendo un poco menos hidrofílicas las superficies de PH debido a la menor cantidad de grupos OH⁻ encontrados sobre este tipo de superficies. Adicionalmente, se observó que sobre las superficies de PH se generó un cambio drástico en la rugosidad en comparación con las superficies de PL.

2. Comparación de los procesos de silanización con CPTES y GPTES sobre superficies de titanio tratadas con plasma y con piraña, en términos de eficiencia de la silanización

La presencia del CPTES y el GPTES sobre las superficies previamente activadas tanto con plasma como con piraña (PL-CP, PL-GP, PH-CP y PH-GP), así como el enlace covalente entre dichas superficies y los silanos se confirmó mediante estudios de ToF SIMS y XPS. Como era de esperar, la mayor cantidad de grupos hidroxilo generados sobre las superficies tratadas con plasma, se tradujo en una mayor cantidad de silanos enlazados. Debido a las cadenas hidrocarbonadas que poseen los silanos las superficies silanizadas mostraron un comportamiento hidrofóbico. Al comparar ambos silanos, se observó una menor cantidad de GPTES que de CPTES, tanto en superficies previamente tratadas con plasma como con piraña, lo cual puede explicar que este tipo de superficies tenga un comportamiento menos hidrofóbico que las superficies silanizadas con CPTES.

3. Comparación de las superficies activadas (PL y PH) y las silanizadas (PL-CP, PL-GP, PH-CP y PH-GP), en términos de eficiencia de inmovilización del colágeno tipo I

Después del proceso de inmovilización del colágeno tipo I, la presencia de éste sobre las diferentes superficies de titanio modificadas se confirmó a través de los estudios realizados con ToF SIMS y XPS, en los cuales se observaron especies químicas relacionadas con aminoácidos presentes en el colágeno.

En cuanto a la cantidad de colágeno inmovilizada, mediante estudios de fluorescencia se observó en las muestras previamente tratadas con piraña, una

mayor cantidad de colágeno adherido en comparación con las muestras de plasma, hecho que se puede atribuir al aumento de rugosidad producido por el tratamiento de piraña. También se observó mayor cantidad de colágeno sobre las muestras tratadas con piraña y silanizadas (PH-CP-col y PH-GP-col) que sobre las muestras sin silanizar (PH-col). En el caso de las muestras previamente tratadas con plasma, se observó tanto por inmunofluorescencia, como mediante los estudios de XPS y OWLS, una mayor cantidad de colágeno sobre las muestras silanizadas con CPTES (PL-CP-col) y con GPTES (PL-GP-col) que sobre las muestra de PL-col. A su vez se observó mayor cantidad de colágeno sobre las muestras de PL-CP-col que en las de PL-GP-col.

En cuanto a la estabilidad del colágeno, se observó mayor estabilidad sobre las muestras silanizadas que sobre la muestra sin silanizar, tanto en las previamente tratadas con plasma como con piraña. Al compara los silanos se observó, que las muestras silanizadas con CPTES, tanto previamente tratadas con plasma (PL-CP-col) como con piraña (PH-CP-col), mostraron una mayor cantidad y estabilidad del colágeno inmovilizado en comparación con las muestras silanizadas con GPTES (PL-GP-col y PH-GP-col).

4. Influencia del colágeno tipo I inmovilizado sobre las diferentes superficies de titanio modificadas, sobre la respuesta de las células de tipo fibroblasto

En general los fibroblastos mostraron mejor adhesión, mayor proliferación y mayor expresión de genes de secreción y reorganización de matriz extracelular, sobre las muestras biofuncionalizadas con colágeno tipo I que sin él, confirmando que la inmovilización de colágeno tipo I (una de las proteínas presente en la matriz extracelular de los tejidos de la encía) partiendo de una solución de 150 µg/ml es una buena estrategia para mejorar la respuesta de los fibroblastos y por lo tanto es una vía prometedora para mejorar el sellado biológico de los implantes dentales.

La rugosidad producida por el tratamiento con piraña, afecta de manera negativa a la adhesión de los fibroblastos y disminuye la expresión de los genes relacionados

con la secreción y remodelación de la matriz extracelular. Se observó mayor cantidad de células adheridas sobre las muestras previamente tratadas con plasma que con piraña, a pesar de que sobre estas últimas se había inmovilizado una mayor cantidad de colágeno. La extensión celular fue mayor en todas las superficies biofuncionalizadas con colágeno, siendo la muestra PL-col la que presentó una mayor extensión de las células. La expresión de génica fue en general mucho menor sobre el grupo de muestras previamente tratado con piraña que con plasma.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al número de células adheridas sobre el grupo de muestras tratadas con plasma (PL-col, PL-CP-col y PL-GP-col), a pesar de la diferencia en cuanto a la cantidad de colágeno inmovilizado. Por el contrario en el caso de las muestras previamente tratadas con piraña, se observó una mayor número de células adheridas en las muestras silanizadas que en las muestras sólo tratadas con piraña, coincidiendo con una mayor cantidad de colágeno inmovilizado sobre las primeras. Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas ni en el número y ni en la extensión de las células adheridas sobre las muestras silanizadas con CPTES o con GPTES, a pesar de que la cantidad de colágeno inmovilizado sobre las primeras era mayor.

La proliferación celular fue mayor sobre las muestras previamente tratadas con piraña (PH-col, PH-CP-col, PH-GP-col) que con plasma (PL-col, PL-CP-col, PL-GP-col). Sin embargo, al evaluar la expresión génica, se observó que las muestras previamente tratadas con plasma con y sin silano (PL-col, PL-CP-col y PL-GP-col) anticipan y amplifican la expresión de todos los genes analizados que están implicados en la activación de los fibroblastos (α -SMA), y en la secreción (col1 A1 y FN) y remodelación de la MEC (MMP2 y MMP3), en comparación con las muestras previamente tratadas con piraña con y sin silano (PL-col, PL-CP-col y PL-GP-col). En general se observó que la muestra con una mayor sobreexpresión y anticipación de la expresión de los genes de activación de los fibroblastos, fue la muestra de PL-CP-col.

5. Influencia de la química de la superficie en la conformación del colágeno inmovilizados sobre las diferentes superficies de titanio. Influencia de la conformación del colágeno sobre la respuesta de fibroblastos

Al evaluar concentraciones de colágeno mucho más bajas ($\leq 25 \mu\text{g/ml}$), se observaron varias características importantes: i) se requirió de una concentración de colágeno en solución mucho más baja sobre las muestras silanizadas con GPTES que con CPTES o tratadas con plasma, para obtener la misma cantidad final de colágeno inmovilizado; ii) la cantidad de colágeno inmovilizado fue mayor sobre las muestras silanizadas con GPTES que sobre las muestras silanizadas con CPTES y sobre las muestras tratadas con plasma; iii) la conformación del colágeno sobre las muestras tratadas con GPTES fue en forma de agregados globulares, mientras que sobre las muestras tratadas con CPTES y con PLASMA, se observó una conformación del colágeno en forma de microfibrillas entrecruzadas; iv) la conformación en forma de agregados globulares observada sobre las muestras de PL-GP-col, resultó en una mejor respuesta celular en cuanto a número y extensión de fibroblastos adheridos, expresión de puntos focales e inicio de secreción de microfibrillas de fibronectina; v) finalmente, al aumentar la concentración del colágeno a $150 \mu\text{g/ml}$, la respuesta celular en cuanto a los parámetros antes mencionados, fue igual sobre todas las superficies, debido a que la gran cantidad de colágeno inmovilizado sobre estas superficies, enmascaró el efecto de la conformación del colágeno sobre la respuesta celular.

ANEXO I: Listado de figuras

PORTADA

Portada delantera: Conformación del colágeno en forma de fibrillas entrecruzadas, observada sobre superficies de titanio activadas con plasma y silanizadas con CPTES. Imágenes obtenidas por AFM a una escala de magnitud de $1\mu\text{m}$, y tratadas mediante el programa NanoScope-versión 1.4 del 2010.

Imagen 1: Representación esquemática de un implante dental de titanio. Obtenida en: <http://randental.com/frisco-dental-services/dental-implants/> (2013)

Imagen 2: Representación esquemática en 3D de la estructura en triple hélice del colágeno. Obtenida en: <http://viotox.com/what-is-collagen/> (2013)

Imagen 3: Fluorescencia del citoesqueleto de actina (verde) y del núcleo (azul) de fibroblastos cultivados sobre muestras de titanio biofuncionalizadas con colágeno tipo I.

Portada trasera: Conformación del colágeno en forma de agregados globulares observada sobre superficies de titanio activadas con plasma y silanizadas con GPTES. Imágenes obtenidas por AFM a una escala de magnitud de $1\mu\text{m}$, y tratadas mediante el programa NanoScope-versión 1.4 del 2010.

CAPÍTULO 1

Figura 1.1: Ilustración esquemática de un implante de titanio de tipo Branemark y de la supraestructura cerámica.....	19
Figura 1.2. Ilustración esquemática que muestra la región de contacto entre el cuello del implante y la encía.....	22
Figura 1.3: Ilustración esquemática de la macroestructura del periodonto.....	23
Figura 1.4: Estructura de un aminoácido.....	24
Figura 1.5: Representación de la reacción entre dos aminoácidos, en la cual se genera un enlace peptídico.....	25
Figura 1.6: Representación esquemática de la estructura primaria del colágeno conformada por la unión de secuencias de aminoácidos (AA).....	25
Figura 1.7: Estructura secundaria del colágeno en forma de hélice α	26
Figura 1.8: Unión de los principales aminoácidos presentes en las cadenas alfa del colágeno: glicina, prolina e hidroxiprolina.....	26
Figura 1.9: Representación esquemática de la estructura en triple hélice del colágeno, formada por la unión de tres cadenas α	27
Figura 1.10. Esquema general de un organosilano.....	38
Figura 1.11. Tasa de hidrólisis para diferentes grupos alcoxi que pueden estar presentes en un organosilano.....	39
Figura 1.12: Estructura química del 3-cloropropil-trietoxi-silano (CPTES) y el 3-glicidiloxipropil-trietoxi-silano (GPTES).....	42

Figura 1.13: Representación esquemática de del tratamiento de plasma de oxígeno realizado sobre discos de Titanio comercialmente puro.....	44
Figura 1.14: Representación esquemática del ataque químico con piraña realizado sobre discos de Titanio comercialmente puro	45
Figuras 1.15 y 1.16: Posibles mecanismos de la reacción en fase líquida de trialcoxilanos con sustratos metálicos activados con grupos hidroxilo	46
Figura 1.17: Representación esquemática de la inmovilización del colágeno sobre superficies de titanio modificadas.....	48

CAPÍTULO 2

Figura 2.1: Representación esquemática de los grupos hidroxilo generados sobre la capa de óxido natural del titanio comercialmente puro.....	62
Figura 2.2. Ilustración esquemática de la unión covalente entre un organosilano y los grupos hidroxilos presentes en la superficie del titanio	63
Figura 2.3: Representación esquemática de las posibles capas formadas entre el silano y el sustrato. (a) Monocapa lineal de silanos, (b) polimerización del silano.....	64
Figura 2.4: Discos de Titanio comercialmente puro, de 9 mm de diámetro y entre 2 y 3 mm de espesor, obtenidos por corte con disco de diamante	66
Figura 2.5: Representación grafica de los parámetros de rugosidad Ra, Rt y Sm.....	69
Figura 2.6: Representación esquemática del ángulo de contacto (θ) formado entre el líquido depositado y la superficie del sustrato	71
Figura 2.7: Formación y liberación del complejo de Zinc por medio de la interacción de los grupos hidroxilo activos (OH ⁻) presentes sobre la superficie de Titanio con el cloruro de Zinc.....	75
Figura 2.8: Perfiles tridimensionales representativos de las superficies tratadas con plasma (a) y con piraña (b)	77
Figura 2.9: Valores de los parámetros de rugosidad determinados sobre superficies de Ti después del tratamiento de plasma y piraña.....	77
Figura 2.10: Ángulo de contacto, medido sobre las muestras de Ti, PL y PH.....	78
Figura 2.11: Espectros de ToF SIMS de los fragmentos de moléculas presentes sobre las diferentes superficies de titanio antes y después de los tratamientos de limpieza y activación con plasma y piraña.	79
Figura 2.12: Espectros de alta resolución del pico de C1s de las muestras de titanio antes y después de los tratamientos de limpieza y activación, y de los subpicos que lo conforman	82

Figura 2.13: Espectros de alta resolución del pico O1s obtenidos en las muestras de Ti, PL y PH.....	85
Figura 2.14: Concentración normalizada de los grupos hidroxilo por unidad de área, cuantificados sobre las muestras de Ti, PL y PH.....	87
Figura 2.15: Ángulo de contacto, medido con agua sobre las diferentes superficies de titanio antes y después de la silanización.....	88
Figura 2.16: Espectros de ToF SIMS de los fragmentos de moléculas presentes sobre las superficies de titanio después de los tratamientos de activación y silanización.....	90
Figura 2.17: Espectros de alta resolución del pico O1s obtenidos en las muestras de plasma (a) y de piraña (b), antes y después del proceso de silanización.....	92
Figura 2.18: Espectros de alta resolución del pico C1s obtenidos en las muestras de plasma(a) y piraña (b) antes y después del proceso de silanización.....	94

CAPÍTULO 3

Figura 3.1: Representación esquemática de la fluorescencia producida por la reacción entre el CBQCA y las aminos primarias presentes en las proteínas.....	107
Figura 3.2: Diagrama descriptivo de la detección de campo evanescente de los procesos sobre superficies transparentes de tipo óxido metálico por medio de Espectroscopia Óptica de Guía de onda en modo de luz (Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy-OWLS).....	109
Figura 3.3: Grafica de la evolución del proceso de cuantificación del colágeno adsorbido sobre las superficies de titanio modificadas, mediante análisis por OWLS.....	111
Figura 3.4: Imágenes de fluorescencia del colágeno inmovilizado sobre muestras activadas con piraña (PH) y silanizadas con CPTES (PH-CP).....	113
Figura 3.5: Imágenes de fluorescencia del colágeno fisisorbido (PL-col, PH-col) y el enlazado covalentemente (PL-CP-col, PL-GP-col, PH-CP-col y PH-GP-col).....	115
Figura 3.6: Cuantificación de la fluorescencia del colágeno fisisorbido (PL-col, PH-col) y el enlazado covalentemente (PL-CP-col, PL-GP-col, PH-CP-col y PH-GP-col).....	115
Figura 3.7: Representación esquemática de la reacción de hidrólisis en ambiente ácido del grupo epoxi presente en el GPTES.....	118
Figura 3.8: Ángulo de contacto medido con agua desionizada sobre las superficies de Ti modificadas antes y después de la inmovilización de colágeno.....	119

Figura 3.9: Espectros de los picos relativos a los principales aminoácidos presentes en el colágeno inmovilizados sobre muestras previamente tratadas con plasma (a) PL-col, PL-CP-col y PL-GP-col, y con piraña (b) PH-col, PH-CP-col y PH-GP-col	120
Figure 3.10: Espectros de alta resolución de la deconvolución del pico de C1s antes y después de la inmovilización de colágeno	123
Figure 3.11: Espectros de alta resolución del pico de O1s antes y después de la inmovilización de colágeno.....	126
Figura 3.12: Masa de colágeno fisisorbido (PL-col) y de colágeno enlazado mediante el uso de silanos (PL-CP-col y PL-GP-col).....	129
Figuras 3.13 y 3.14: Evolución de la intensidad de la fluorescencia con el tiempo de sonicación, del colágeno fisisorbido y enlazado covalentemente sobre muestras con tratamientos previos de plasma (PL, PL-CP y PL-GP) y con tratamientos previos de piraña (PH, PH-CP y PH-GP), respectivamente	131
Figura 3.15: Tasa de reducción del colágeno que permanece inmovilizado sobre las diferentes superficies de titanio después de ser sometidas al tratamiento de sonicación en agua destilada durante 120 minutos	132
Figura 3.16: Espectros de alta resolución del C1s, obtenidos sobre las muestras con colágeno inmovilizado antes y después del tratamiento de estabilidad.....	136
Figura 3.17: Espectro de alta resolución del O1s, obtenidos sobre las muestras con colágeno inmovilizado antes y después del tratamiento de estabilidad.....	138

CAPÍTULO 4

Figura 4.1: Mecanismo de la reacción de oxido reducción que se da entre el LDH con el lactato de sodio y con las sales de tetrazolio.....	156
Figura 4.2: Imágenes de tinción fluorescente (citoesqueleto de actina en rojo y núcleos en azul) de los fibroblasto cultivados sobre las distintas muestras después de 4 horas de incubación.....	160
Figura 4.3: Área de las células adheridas a 4 horas de incubación	161
Figura 4.4: Número de células adheridas a 4 horas de incubación	161
Figura 4.5: Numero de células/cm ² cuantificado a través del método de detección de LDH, en cada una de las muestras biofuncionalizadas con colágeno, a 1, 3 y 7 días de cultivo.....	165

Figura 4.6: Análisis de la expresión del gen marcador de miofibroblastos α -SMA (alpha smooth muscle actin).....	167
Figura 4.7: Análisis de la expresión del gen de secreción de Colágeno I α 1 (componente de la matriz extracelular).....	167
Figura 4.8: Análisis de la expresión del gen de secreción de Fibronectina (componente de la matriz extracelular).....	168
Figura 4.9: Análisis de la expresión del gen de secreción de las encima remodeladora de la matriz extracelular MMP2 (Gelatinasa A).....	170
Figura 4.10: Análisis de la expresión del gen de secreción de las encima remodeladora de la matriz extracelular MMP3 (estromelina 1, progelatinasa).....	170

CAPÍTULO 5

Figura 5.1: Imágenes obtenidas por AFM a varias escalas de longitud (2, 1 μ m y 500 nm), de las superficies de titanio activadas por plasma (PL) (a, b y c) y silanizadas con CPTES (PL-CP) (d, e y f) y con GPTES (PL-GP) (g, h y i), sin recubrimiento de colágeno.....	185
Figura 5.2: Imágenes obtenidas por AFM a varias escalas de longitud (2, 1 μ m y 500 nm), de las superficies de plasma con colágeno inmovilizado (PL-col) a concentraciones de 10 (a, b y c), 15 (d, e y f) y 20 μ g/ml (g, h y i), durante 10 minutos....	186
Figura 5.3: Imágenes obtenidas por AFM a varias escalas de longitud (2, 1 μ m y 500 nm), de las superficies silanizadas con CPTES con colágeno inmovilizado (PL-CP-col) a concentraciones de 20 (a, b y c), 25 (d, e y f) y 30 μ g/ml (g, h y i), durante 10 minutos.....	187
Figura 5.4: Imágenes obtenidas por AFM a varias escalas de longitud (2, 1 μ m y 500 nm), de las superficies silanizadas con GPTES con colágeno inmovilizado (PL-GP-col) a concentraciones de 2.5 (a, b y c), 5 (d, e y f) y 10 μ g/ml (g, h y i), durante 10 minutos.....	188
Figura 5.5: Imágenes obtenidas por AFM a varias escalas de longitud (2, 1 μ m y 500 nm), de las superficies de plasma y silanizadas con CPTES y GPTES, con colágeno inmovilizado (PL-col , PL-CP-col y PL-GP-col) a una concentración de 150 μ g/ml durante 16 horas.....	189
Figura 5.6: Nanogramas de colágeno adherido sobre las superficies de PL, PL-CP, PL-GP, partiendo de una concentración en solución de 25 μ g/ml para todas las muestras.....	193

Figura 5.7: Nanogramos de colágeno adherido sobre las superficies de PL, PL-CP, PL-GP, partiendo de unas concentraciones en solución del 15µg/ml para PL, 25µg/ml para PL-CP y 5µg/ml para PL-GP.....	193
Figura 5.8: Imágenes de tinción fluorescente del citoesqueleto de los fibroblastos sembrados sobre las superficies con las concentraciones de colágeno mínimas: PL-15µg/ml, CP-25 µg/ml, GP-5 µg/ml.....	196
Figura 5.9: Imágenes de tinción fluorescente del citoesqueleto de los fibroblastos sembrados sobre las superficies con una concentración de colágeno inicial de 25 µg/ml.....	196
Figura 5.10 Imágenes de tinción fluorescente del citoesqueleto de los fibroblastos sembrados sobre las superficies con una concentración de colágeno inicial de 150 µg/ml.....	197
Figura 5.11: Número de fibroblastos adheridos a 4horas, sobre superficies de titanio modificadas con cada una de las concentraciones de colágeno estudiadas por AFM.....	197
Figura 5.12: Área y Circularidad del citoesqueleto de los fibroblastos adheridos sobre superficies de titanio biofuncionalizadas con colágeno.....	198
Figura 5.13: Imágenes de inmunofluorescencia de la vinculina, de fibroblastos sembrados sobre muestras de titanio biofuncionalizadas (PL-col, PL-CP-col y PL-GP-col) con concentraciones de colágeno en solución (a, b, c) ideales (15µg/ml, 25µg/ml y 5µg/ml), (d, e, f) 25 µg/ml sobre todas las muestras y (g, h, i) 150 µg/ml para todas las superficies.....	202
Figura 5.14: Imágenes de inmunofluorescencia de fibronectina, de fibroblastos sembrados sobre muestras de titanio biofuncionalizadas (PL-col, CP-col y GP-col) con concentraciones de colágeno en solución (a, b, c) ideales (15µg/ml, 25µg/ml y 5µg/ml), (d, e, f) 25 µg/ml sobre todas las muestras y (g, h, i) 150 µg/ml para todas las superficies.....	203

ANEXO II: Listado de tablas

CAPÍTULO 1

Tabla 1.1 <i>Propiedades fisicoquímicas del titanio y de su capa de óxido</i>	21
--	----

CAPÍTULO 2

Tabla 2.1: <i>Nomenclatura de las superficies de Titanio modificadas</i>	68
---	----

Tabla 2.2: <i>Parámetros usados en el estudio de rugosidad por Interferometría de luz blanca</i>	69
---	----

Tabla 2.3: <i>Porcentaje atómico de los elementos químicos presentes sobre las muestras de Ti, PL y PH</i>	81
---	----

Tabla 2.4: <i>Porcentaje de las especies presentes en el pico de C1s para las muestras de Ti, PL y PH</i>	82
--	----

Tabla 2.5: <i>Porcentaje atómico de las especies presentes en el pico de O1s para las muestras de Ti, PL y PH</i>	85
--	----

Tabla 2.6: <i>Porcentaje atómico de los elementos presentes sobre las muestras antes y después del proceso de silanización</i>	91
---	----

Tabla 2.7: <i>Porcentaje atómico de las especies presentes en el pico O1s del grupo de muestras tratadas con plasma (a) y con piraña (b) antes y después del proceso de silanización</i>	92
---	----

Tabla 2.8: <i>Porcentaje atómico de las especies presentes en el pico C1s del grupo de muestras tratadas con plasma (a) y con piraña (b) antes y después del proceso de silanización</i>	94
---	----

CAPÍTULO 3

Tabla 3.1: <i>Nomenclatura de las superficies de titanio modificadas</i>	106
---	-----

Tabla 3.2: <i>Porcentaje atómico de los elementos encontrados sobre las diferentes superficies de titanio modificadas antes y después de la inmovilización del colágeno</i>	121
--	-----

Tabla 3.3: <i>Porcentaje atómico de las especies químicas presentes en el pico de C1s antes y después de la inmovilización de colágeno</i>	124
---	-----

Tabla 3.4: <i>Porcentajes atómicos de las especies químicas presentes en el espectro de alta resolución del O 1s, observadas después de la inmovilización del colágeno</i>	127
---	-----

Tabla 3.5: <i>Porcentaje atómico de los elementos encontrados sobre las diferentes superficies de titanio modificadas y recubiertas con colágeno antes y después del tratamiento de estabilidad</i>	133
--	-----

Tabla 3.6: <i>Ratio del porcentaje de N1s, C1s y O1s, detectados sobre las muestras antes (pre) y después (post) del tratamiento de estabilidad</i>	134
--	-----

Tabla 3.7: Porcentaje atómico de las especies químicas que conforman el espectro de alta resolución del C1s	137
Tabla 3.8: Porcentaje atómico de las especies químicas que conforman el espectro de alta resolución del O1s	139
Tabla 3.9: Ratios de los porcentajes de las especies químicas que conforman el espectro de alta resolución del O1s	140

CAPÍTULO 4

Tabla 4.1: Nomenclatura y descripción de las muestras utilizadas en los ensayos celulares	152
Tabla 4.2: Medio de cultivo utilizado en los cultivos celulares	153
Tabla 4.3: Secuencias de DNA de los “primers” utilizados en el estudio de RT-PCR para cuantificar los genes seleccionados	158

CAPÍTULO 5

Tabla 5.1: Nomenclatura y descripción de las muestras evaluadas	182
--	-----