

CONTROL DE LA ADHESION CELULAR Y BACTERIANA EN LOS DISPOSITIVOS BIOMEDICOS IMPLANTABLES

CATALINA GALEANO GARCES

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniera Biomédica

Vincent Semetey PhD, Physic Chemistry Laboratory

Institut Curie



**ESCUELA DE INGENIERÍA DE ANTIOQUIA
INGENIERIA BIOMEDICA
ENVIGADO
2013**

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	4
INTRODUCCION	5
ESTADO DEL ARTE	6
1. Efecto de los polímeros en la absorción de proteínas y adhesión celular.	7
2. Efecto de la topografía en la adhesión celular.....	9
DESARROLLO DEL PROYECTO	11
1. MATERIALES Y METODOS	11
1.1 Fabricación de las microestructuras	11
1.2 Cultivo celular <i>in vitro</i>	12
1.3 Análisis de adhesión celular	13
2.RESULTADOS	14
2.1 Fabricación de microestructuras.....	14
2.2 Adhesión bacteriana en estructuras 2D de altura constante	15
2.3 Adhesión bacteriana en topografías con diferentes alturas.....	17
2.4 Adhesión de células MDCK en estructuras 2D con diferente altura.....	19
3. DISCUSION	22
□□□□□□□□.....	24
BIBLIOGRAFIA	25

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento y gratitud a todos los que contribuyeron directa o indirectamente para el éxito de mi proyecto.

Estoy especialmente agradecida con mi director de proyecto, Vincent Semetey PhD, y Lucie Perquis quienes me aceptaron en su laboratorio y por darme toda la ayuda, el apoyo, el tiempo y su experiencia en el desarrollo de este proyecto.

Deseo agradecerles igualmente a todos los empleados del Institut Curie por la amabilidad que me han brindado durante el periodo y por su valiosa explicación y ayuda.

RESUMEN

Las estrategias actuales para limitar la adhesión celular y/o bacteriana se han centrado en el control de las propiedades físico-químicas del polímero y el control de la topografía de la superficie del implante. Nuestra hipótesis se centra en que el control de las propiedades de los materiales en la superficie en conjunto con una topografía óptima proporcione un enfoque que nos permita gobernar las interacciones material/célula/superficie para suprimir la adhesión celular. En nuestro estudio, el control de la adhesión celular se examinó utilizando microestructuras en forma de podio (60x60µm tamaño y una altura de 2 µm) y en forma de nido de abeja (2µm, 5µm altura y ancho variable entre 2 µm a 10µm) impresos en diferentes poli (etilenglicol) (PEG) usando la técnica de polimerización de dos fotones. Células de E. coli y MDCK se sembraron en ambas estructuras durante 3 y 4 días, respectivamente. Los resultados implican que controlando las propiedades de la superficie del material es posible controlar la adhesión celular. Por otra parte, el análisis de la topografía reveló que las bacterias eran más sensibles a los cambios entre diferentes tamaños y alturas. En particular, se encontró que una baja tasa de adherencia utilizando estructuras de forma de nido de abeja realizadas con PEGDA 6000 +10 % PETA y una alta tasa de adhesión bacteriana en estructuras realizadas con PEGDA 258. Para las células, se observó una adhesión tardía en estructuras fabricadas con PEGDA 6000 +10 % PETA y una adhesión mas temprana en estructuras fabricadas con NOA61. Las diferencias entre la adhesión celular en las estructuras con forma de podio mostraron que las propiedades físicas de la superficie pueden controlar y guiar la adhesión celular. El papel de la topografía en la adhesión celular se demostró como resultado de la baja tasa de adherencia de la topografía de nido de abeja con una mayor altura. Como resultado del estudio las estructuras topográficas fabricadas con PEGDA 6000 +10 % PETA con 6 µm de altura pueden evitar las bacterias de adhesión para las bacterias y las estructuras podio 6-8 µm para las células. De lo contrario, para mejorar la adhesión celular se deben utilizar las estructuras planas 2D fabricadas con PEGDA 258 para las bacterias y con NOA61 para las células.

INTRODUCCION

Desde principios de los años 1940 y principios de los cincuenta, cuando aparecieron los primeros dispositivos biomédicos, se desarrollaron los mismos biomateriales como los conocemos hoy en día. Al mismo tiempo, los científicos de todo el mundo comenzaron a estudiar las propiedades de su superficie, las interacciones proteína-superficie y modificaciones de superficies. (Castner y Ratner, 2002). La importancia de los biomateriales para salvar vidas humanas y la significativa implicación económica de los productos sanitarios inició una amplia investigación en este campo, incluyendo los modelos de la biología de superficie. Millones de dispositivos médicos están implantados en seres humanos cada año con un nivel razonable de éxito. Siendo el más implantado el catéter con cientos de millones de implantes por año y el marcapasos con cien mil por año. En la mayoría de los casos se utilizan estos dispositivos durante períodos prolongados. Alrededor del 41% de los pacientes debieron retirar el catéter antes del final del tratamiento. (Smith, et al., 2012).

Los dispositivos médicos en el cuerpo están en constante interacción con los tejidos circundantes, proteínas y células. Si el dispositivo presenta acumulación incontrolada de este material biológico (la absorción de proteínas y / o adhesión celular) no puede replicar la estructura y función natural en el sitio del cuerpo, causando reacciones biológicas en el sistema huésped. Las complicaciones típicas son: inflamación, trombosis, infección bacteriana o fibrosis. Estas complicaciones alargan las estancias hospitalarias, aumentan los costos de atención y la mortalidad de los pacientes entre 12 a 25% al año (Smith, et al., 2012). Los pacientes se beneficiarían enormemente de los dispositivos que proporcionen protección a largo plazo contra estas complicaciones. La adhesión bacteriana y celular son un desafío clave para el rendimiento óptimo de los dispositivos médicos, proporcionando una comprensión de cómo la química de la superficie y la estructura de un material se puede utilizar para controlar la reactividad biológica de una célula para interactuar con la superficie si es necesario.

Con el fin de hacer los implantes más seguros y evitar la absorción de proteínas y la adhesión celular, se consideraron diferentes estrategias para controlar las propiedades de la superficie. La estrategia más común es la modificación de la superficie usando poli etilenglicol (PEG) para cambiar las propiedades de la superficie. El PEG es muy conocido por ser un polímero hidrófilo con varios usos para la anti adhesión, el control de la absorción de proteínas, la adhesión bacteriana y la celular. Además , la baja citotoxicidad de estos materiales para las células humanas se ha demostrado previamente con las células madre embrionarias de cultivo (Hook, y col., 2012). Otro aspecto importante en la adhesión celular es la topografía de la superficie . Es conocido que las respuestas celulares a la topografía afectan la función de las células en términos de resistencia a la adhesión, la difusión, la señalización intracelular y el potencial de diferenciación (Kulangara y Leong, 2009)(Vogel & Sheetz, 2006)(Yim, EK;. Leong, KW, 2005). Esto se ha observado en varios tipos de células, incluyendo las células madre mesenquimales (Yim, Darling, Kulangara, y Guilak F, 2009)(Oh, et al., 2009)(Dalby, et al., 2007) las células endoteliales (Hung, Wu, Chien, y Hsu, 2009) (Dalby, Riehle, Johnstone, Affrossman, y Curtis, 2002) los fibroblastos (Dalby, Riehle, Sutherland, Agheli, y Curtis, 2004) (Kim, Han, Gupta,

Kwon, Suh, y Levchenko, 2009) y las células epiteliales (Andersson, Backhed, von Euler, Richter - Dahlfors, Sutherland, y Kasemo, 2003) (Teixeira, McKie, Foley, Bertics, Nealey, y Murphy, 2006) (Karuri, et al., 2004).

La modificación de la superficie se ha estudiado ampliamente en los últimos años. Se tiene un amplio conocimiento sobre la modificación de las propiedades químicas de la superficie utilizando diferentes polímeros. Incluso, varios están disponibles comercialmente. Sin embargo, todavía hay una falta de información sobre la influencia de la topografía de la superficie. Estas estrategias de modificación de la topografía no sólo se limitan en relación con el tiempo de preparación, la precisión de la topografía y los materiales que se pueden utilizar. Además, las normas sobre las características óptimas de la topografía, forma, tamaño y material son aun desconocidas. El conocimiento en este campo hasta el día de hoy es muy limitado. En la actualidad, ningún estudio ha sido realizado combinando modificación química de la superficie y modificación topográfica.

Debido a esta problemática, la elección de la técnica correcta que nos permita jugar con la química de la superficie y la topografía utilizando diferentes formas, tamaños y alturas, y posteriormente llevar a cabo experimentos con bacterias y células, tiene gran importancia para este proyecto. Se utilizó una técnica de polimerización de dos fotones usando un microscopio óptico, lo que permite diseñar y construir microestructuras 2D y 3D, reales y precisas, en menos tiempo que las técnicas anteriores.

El objetivo de este trabajo fue generar microestructuras 3D utilizando la polimerización de dos fotones para descifrar los parámetros clave para el control de la adhesión celular. Para hacer frente a este problema, un gran grupo de polímeros con diferentes propiedades físico-químicas (hidrofóbicos e hidrofílicos) y el control de la topografía del implante se consideraron. El interés es determinar un enfoque sistemático que permite el control total de las microestructuras generadas, así como las propiedades de la superficie, para tener un control de los parámetros importantes que gobiernan las interacciones del material con las células y/o tejidos.

ESTADO DEL ARTE

A pesar del éxito en rendimiento de los dispositivos biomédicos implantables y la biocompatibilidad de los materiales utilizados para su fabricación, el cuerpo reacciona de manera similar a casi todos los materiales creando una bolsa de colágeno avascular (reacción de cuerpo extraño). La reacción se produce cuando un material sintético se implanta en un organismo superior. Esta encapsulación biológica incontrolada confunde el rendimiento del dispositivo implantable mediante la prevención de contacto entre el dispositivo y el tejido.

Desde el siglo 19, cuando se descubrió que el control de las superficies controla las reacciones biológicas, una amplia investigación en este campo influyó en el avance de las aplicaciones biológicas para dispositivos de contacto con sangre, los lentes de contacto, cultivo celular y los inmunoensayos. Debido a que las propiedades de la superficie de ciertos materiales están directamente relacionados con el rendimiento biológico *in vitro* tales como la absorción de

proteínas, la adhesión celular y el crecimiento. Muchas de las estrategias *in vitro* para inhibir la unión de células y proteínas en la superficie de los dispositivos superficies se han desarrollado.

La investigación en este campo trata de responder si con el control de la interacción entre las moléculas y los materiales es posible prevenir las complicaciones sin el uso de drogas. En la búsqueda de la modificación ideal de la superficie en el diseño de los implantes, se necesita el control de las propiedades físico-químicas del polímero usado en la superficie y la topografía de la superficie del implante. Por esta razón, los diferentes grupos de investigación de todo el mundo han informado de enfoques utilizando modelos *in vitro* de polímeros adheridos en las superficies para mejorar las propiedades antiadherentes por repulsión estérica usando diferentes técnicas. Estos experimentos se evalúan con las células y las bacterias.

1. Efecto de los polímeros en la absorción de proteínas y adhesión celular.

A pesar de todas las diferentes propiedades de los materiales (hidrofobicidad, hidrófilicidad, suave, de cerámica y de metal) todos los biomateriales comunes que se utilizan en la fabricación de dispositivos médicos después de un mes de la implantación tienen la misma respuesta de curación. El poli(metilmacrilato)(PMMA), la silicona, el politetrafluoroetileno (PTFE), el polietileno (PE), el titanio, el teflón, el acero inoxidable, el poliuretano, la celulosa, el oro, el poli (2-hidroxietil metacrilato) (PHEMA), el poli (etileno tereftalato) (PET) y el aluminio, son los biomateriales utilizados en dispositivos médicos. Debemos tener en cuenta que cada material tiene diferentes propiedades de absorción y adhesión celular.

La mayoría de estrategias para reducir la adhesión de bacterias se centran en la modificación de los materiales existentes que se utilizan para la fabricación de los dispositivos médicos con la incorporación de antibióticos. El objetivo es matar a las células que ya están unidas al material. El crecimiento de una biopelícula de bacterias aumenta la resistencia del microorganismo a los agentes antimicrobianos, lo cual termina en complicaciones que se desencadenan en la remoción del dispositivo colonizado. Además, la acumulación de esta biopelícula estimula la formación de trombos. El tratamiento con antibióticos no parece ser la estrategia más conveniente en los casos en que las bacterias ya son inmunes a los efectos de los antibióticos, pero, parece conveniente para evitar que la adhesión de las bacterias desde el inicio de la implantación. (Castner y Ratner, 2002)

En la búsqueda del mejor mecanismo para controlar la adhesión celular en superficies 2D y sin relieve varios autores han logrado resultados modificando las propiedades de la superficie del dispositivo. Diferentes técnicas y materiales se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Estrategias para alcanzar las propiedades no adhesivas en las superficies

Material	Estrategia en la superficie	Resultados	Referencia
Etilenglicol acrilamida	Cultivo de células de rata en una región cuadrada de 75x75 µm de aminosilano rodeada de etilenglicol acrilamida	La química de la superficie controla la forma y la estructura del citoesqueleto de la célula de rata	(Thomas, Lhoest, Castner, McFarland, & Healy, 1999)

Tetraetilenglicol dimetileter (tetraglyme)	Deposición del tetraetilenglicol dimetileter (tetraglyme)	Adhesión de proteínas significativamente baja	(Castner & Ratner, 2002)
Oxido de polietileno (PEO)	Cadenas terminales de PEO adheridas a un substrato solido hidrófobico de PE	-Propiedades de resistencia a las proteínas mejora cuando la densidad de la cadenas y la longitud de PEO en la superficie aumenta -La superficie exhibe repulsión cuando hay grandes distancias de separación entre las cadenas largas de PEO -Absorción de proteína decrece	(Jeon, Lee, Andrade, & Gennes, 1991)
Poli-sulfobetaina	Modificación de superficie en un catéter de poliuretano (adentro y fuera)	-Reduce interacción <i>in vitro</i> con la sangre y la formación de trombos comparado con los catéteres comerciales -Modelo canino <i>In vivo</i> demostró una reducción de la acumulación de trombos después de 4 días - Decrecimiento en la adhesión de microorganismos <i>in vitro</i> después de 24 horas (reducción de <i>candida albicans</i> 97%, <i>E.coli</i> 96% y <i>S.aureus</i> 97%).	(Smith, et al., 2012)
Monómeros de acrilato y PEG.	Monómeros de acrilato y PEG fueron impresos en un portaobjetos de vidrio cubierto con poli hidroxil metacrilato (pHEMA)	-Reducción en la adhesión de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>S.aureus</i> y <i>E.coli</i> comparado con el cubrimiento de metal que existe comercialmente <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> en un ratón durante 1 día de incubación -No citotoxicidad de estos materiales para las células humanas, probado previamente en células madres	(Hook, et al., 2012)
Oligo(ethilen glicol)	Foto superficies modeladas exhibiendo vinil y hepta (etilenglicol) terminados en rayas mono-capa auto-ensambladas en vidrio y titanio	-Resistencia contra la absorción no específica de proteínas como la albumina -Reducción de la adhesión de <i>E.coli</i> MG1655 y de células de mamífero.	(Oberleitner, Dellinger, De'foret, Galtayries, Castanet, & Semetey, 2013)
Metilcelulosa	Nano ensamblamiento de capas de metilcelulosa en la superficie de un catéter comercial fabricado con poli(dimetilsiloxano) (PDMS)	Validación <i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> en un modelo de rata muestra anti adhesión en la superficie	(Mussard, Nasreddine, Kriegel, Esteve, & Semetey, 2011)

Estos estudios anteriores han logrado reducir dramáticamente la adhesión de células bacterianas y de mamíferos en diferentes materiales hidrófobos modificando la superficie a través de la adhesión de polímeros antiadherentes en las superficies. Es claro que existe una gran cantidad de información con respecto a las propiedades de diferentes materiales, un grupo se encarga de

mejorar la adhesión celular y el otro grupo de reducir la adhesión celular sobre la superficie de dispositivos médicos.

En conclusión, sólo con el control de la parte superior de la superficie utilizando el material correcto, es posible controlar las bacterias y la adhesión celular *in vitro* e *in vivo*.

2. Efecto de la topografía en la adhesión celular

La superficie de un dispositivo médico interno puede ser colonizada por patógenos humanos que pueden formar biopelículas de bacterias y causar infecciones. En la mayoría de los casos, estas biopelículas son resistentes a la terapia antimicrobiana y, finalmente comprometen la eficacia de los materiales implantados que resulta en una eliminación o un reemplazo del dispositivo (Costerton, Stewart, y Greenberg, 1999) (Costerton, Geesey, y Cheng, 1978) . Por ejemplo, para los dispositivos tales como catéteres transcutáneos, el rango de tiempo para la formación de biopelículas es típicamente 14 días. Este problema de la formación de biopelículas se trata comúnmente con terapia de antibióticos, dando como resultado una erradicación incompleta de la biopelícula y bacterias resistentes a los antibióticos. Para esto, diferentes científicos han tratado de desarrollar otras estrategias para prevenir la formación de biopelículas modificando las propiedades de la superficie de los biomateriales.

También, la reacción a un cuerpo extraño, a su vez que la mediación de la inflamación y la cicatrización de heridas alrededor del sitio de implante tienen un papel importante en el rendimiento del implante. Durante 2-4 semanas, la inflamación marcada por la fusión de los macrófagos en grandes células gigantes de cuerpo extraño multinucleadas (células FBGC) rodean el implante en un tejido fibrótico formando una cicatriz. Los FBGCs pueden liberar radicales de oxígeno, enzimas digestivas y ácidos que contribuyen a la degradación y eventual fracaso del implante. Las estrategias actuales utilizadas para mediar en la interacción cuerpo-material son foco en la reducción inicial de la absorción de proteínas y la adhesión celular utilizando la modificación topográfica en la superficie.

Se observaron las respuestas celulares a diferentes topografías en la superficie en estudios anteriores. Chung et al. (Chung, Schumacher, Sampson, Burne, Antonelli, y Brennan, 2007), han logrado la interrupción de la formación de biopelículas utilizando una técnica AFTM Sharklet que crea una microtopografía en la superficie basada en la piel de los tiburones utilizando poli dimetil elastómero de siloxano (PDMS) (polímero hidrofóbico) con 2 μm de ancho y una altura característica de 3 μm . Los experimentos realizados con *S. aureus* después de 21 días no mostraron evidencia de colonización temprana de bacterias. Chen et al. (Chen, Jones, Xu, y col, 2010), lograron inducir un comportamiento diferente en los macrófagos utilizando rejillas paralelas (250 nm - 2 mm de ancho) impresas en poli (ε-caprolactona) (PCL), poli (ácido láctico) (PLA) y poli (dimetilsiloxano) (PDMS) con una técnica de inversión de litografía por nanoimpresión (NIL). Después de 48 horas se produjo una adhesión de máxima de macrófagos en las rejillas de 500 nm en comparación con los controles planos *in vitro*. Estudios *in vivo* a los 21 días demostraron una reducción de la densidad de la adhesión de macrófagos y el grado de fusión celular en rejillas de 2 mm en comparación con los controles planos. Se concluyó que la

topografía afectó el comportamiento de los macrófagos en la respuesta a los cuerpos extraños en todas las superficies de los polímeros examinados. La inducción de cambios con la topografía, independientemente de la química superficial, no reveló patrones distintivos *in vitro*, pero no afectaron la adhesión celular *in vivo* sobre todo en topografías de gran tamaño en comparación a los controles planos. También, Whitehead y Verran (Whitehead y Verran, 2006), observaron que las bacterias en forma larga, se adjuntan a través de los espacios de la superficie de tamaño similar o más pequeño que las células. Se sugiere que la topografía óptima para la adhesión microbiana se determine por el tamaño y por la forma del microorganismo.

A pesar de estos resultados anteriores encontrados en la literatura, todavía existe una gran falta de información con respecto a la influencia de las características topográficas en la adhesión celular. El desconocimiento de la forma topografía óptima para el control de la adhesión celular, la existencia de pequeños rasgos topográficos que ayudan a mantener las células presentes en el material y la acumulación en tres dimensiones de las células (Whitehead y Verran, 2006), son algunas de las limitaciones que necesitan ser arregladas para controlar la adhesión celular. Además, la falta de técnicas eficientes que incorporen la importancia de la topografía y las propiedades químicas de la superficie de los materiales para el control de la adhesión celular, disminuyen el progreso en este campo.

Con el objetivo de incorporar ambos cambios en las superficies de los dispositivos biomédicos. Se presenta una técnica de polimerización de dos fotones. Esta técnica permite al usuario crear topografía bien definida con un amplio panel de materiales fotosensibles con alta precisión y en unas pocas horas. Cambiando las propiedades de la superficie de los materiales de superficie para mejorar o reducir la adhesión celular.

DESARROLLO DEL PROYECTO

1. MATERIALES Y METODOS

1.1 Fabricación de las microestructuras

1.1.1 Desarrollo de la estructura

Para evaluar la adhesión de células y bacterias, se necesitó construir microestructuras 3D. Para generar estas estructuras, se seleccionó una técnica de polimerización de dos fotones. Esta técnica en comparación con las técnicas anteriores, como la técnica de polimerización de un fotón (Figura 1), permite la creación de estructuras bien definidas en 3D sin la ayuda de otras herramientas. Estudios anteriores utilizando esta técnica demostraron lo poderosa que es, creando estructuras 3D bien definidas, desde una estructura simple como un cuadrado a una sofisticada como un toro de tan sólo unas pocas micras. (Zhang, Chen Xia, y Sun, 2010)

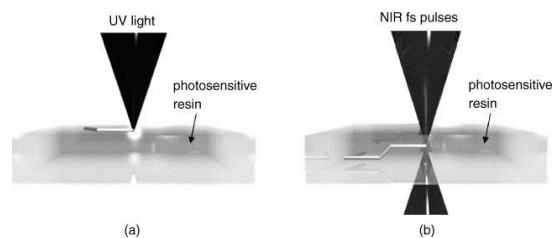


Fig. 1. (a) En una polimerización de un fotón, la luz UV es absorbida en la superficie de un polímero fotosensible y sólo se puede utilizar para la fabricación de estructuras planas. (b) En la polimerización de dos fotones, la luz NIR puede ser enfocada en el volumen de la resina sensible a la luz UV y por lo tanto se puede utilizar para fabricar verdaderas estructuras 3D (Wu, Serbin, y Min, 2006)

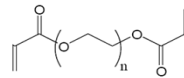
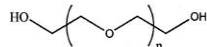
Para comenzar la creación de la estructura se requieren dos pasos. El primer paso fue diseñar y dibujar la estructura utilizando MATLAB con la altura, el ancho y el espacio necesario. A continuación, este archivo se importó al Software SYMPOLY para ajustar la potencia del láser y la velocidad de ejecución.

1.1.2 Desarrollo de la estructura fabricación de la estructura

El último paso del procedimiento de microfabricación 3D fue la creación de las microestructuras utilizando la técnica de polimerización de dos fotones. En esta técnica el láser se centró en una resina fotosensible. Entonces, la luz desencadena una reacción química que conduce a la polimerización; la resina se une por la absorción de dos fotones y forma una red 3D. En una etapa posterior, la resina que no fue expuesta a la radiación láser se eliminó utilizando 70 μ l de etanol .

Con el fin de comparar el comportamiento adhesivo y antiadhesivo, diferentes composiciones se prepararon usando las resinas fotosensibles disponibles en el laboratorio, Norland óptico

adhesivo (NOA 61), poli (etilenglicol) diacrilato (PEGDA)



y poli (etilenglicol)

. Las composiciones finales utilizadas fueron: NOA 61, PEGDA 258 + 10 % PEGDA 6000, PEGDA 258 + 20 % PEGDA 6000, PEGDA 258, PEGDA 6000 10 % de PETA, PEGDA 700, PEGDA 700 + 10 % PEG 5000 y NOA61 con la modificación de la superficie usando metilcelulosa (MECE). La resina NOA 61 por sus propiedades adhesivas se utilizó como control. Las microfabricaciones fueron hechas en portaobjetos de vidrio. Estructuras en forma de podio y de nido de abeja con diferente tamaño y altura fueron fabricadas. Varias capas fabricaron cada estructura para asegurar el cubrimiento total del polímero por toda la estructura. Después de la fabricación, las estructuras se almacenaron en cajas de Petri con 3 ml de agua destilada hasta que los experimentos se realizaron. Un protocolo óptimo fue desarrollado previamente a la construcción con los diferentes materiales fotosensibles. Esta optimización se realizó usando NOA61 .

1.2 Cultivo celular *in vitro*

1.2.1 Bacterias

Experimentos de adhesión bacteriana se realizaron utilizando E. coli MG1655 que expresan GFP (proteína fluorescente verde). Después de retirar las bacterias de la crio preservación, 300µl de suspensión de bacterias con 200µl de Ampicilina [10mg/ml] (Sigma - Aldrich, Inc) y 20 ml de LB (Luria broth) medio se transfirieron a un plato de 50 ml. Las bacterias se cultivaron en una incubadora orbital a 37 °C y a una velocidad de 100 rpm durante 12 horas.

Después de 12 horas, antes del experimento, se comprobó que las bacterias crecieron hasta alcanzar una densidad celular de 10×10^6 bacterias/ml y que la señal de fluorescencia era fuerte usando un microscopio de fluorescencia Leica .

Con el propósito de sembrar las bacterias en las estructuras. Se eliminó el agua de cada uno de los Petri. Luego, 3 ml de suspensión de bacterias se añadió con 100µl de Ampicilina [10mg/ml]. Las bacterias se sembraron durante 3 días en una incubadora orbital, agitando con una velocidad de 100 rpm .

Bacterias E. coli MG1655 que expresan GFP se sembraron en estructuras fabricadas con NOA 61, PEGDA 258 + 10 % PEGDA 6000, PEGDA 258 + 20 % PEGDA 6000, PEGDA 258, PEGDA 6000 + 10 % de PETA, PEGDA 700, PEGDA 700 + 10 % de PEG 5000 y NOA61 con modificación de superficie con metilcelulosa (MECE).

1.2.2 Células de mamífero

Células epiteliales MDCK (Madin-Darbi canine kidney) que expresan GFP previamente aisladas, fueron utilizadas para realizar los diferentes experimentos. Después de la eliminación de las células de la crio preservación (nitrógeno líquido), el tubo se sacudió con la mano hasta que se descongelara la suspensión celular. Luego, las células se transfirieron a tubos de 10 ml con 1 ml

de suero bovino fetal (FBS) y se centrifugaron durante 10 minutos. Después se retiró el sobrenadante, el botón celular se resuspendió en 10 ml de medio de cultivo (Dulbecco's modified Eagle's medium –DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 4 ml de geneticina y 5 ml de estreptomycin/penicilina (Gibco–Life technologies), y se sembraron en frascos T25 (BD Biosciences). Las células se cultivaron en una incubadora a 37 °C, 95% de humedad y 5% de CO₂ hasta que alcanzaron la confluencia (3 o 4 días).

Cuando las células fueron confluentes, antes del experimento, se separaron del piso del tubo T25 por tratamiento con tripsina y se diluyeron hasta obtener una densidad celular de $1,75 \times 10^5$ células / ml .

Con el propósito de sembrar las células en las estructuras. Cada Petri se lavó 2 veces con PBS. A continuación, se añadió y removió 3 ml de medio dos veces. Finalmente, se añadió 0,5 ml de suspensión de células con 2 ml de medio a un Petri. Las células fueron incubadas durante 4 días.

Las células MDCK que expresan GFP fueron sembradas en las estructuras fabricadas con NOA 61 y PEGDA 6000 + 10 % PETA.

1.3 Análisis de adhesión celular

1.3.1 Cuantificación de bacterias

En cada punto de tiempo (6 horas y 3 días), se removió la suspensión de bacterias. A continuación, se lavó 3 veces con PBS para eliminar las células no adheridas. Para la visualización, 3 fotos fueron tomadas con un objetivo de 40X con un microscopio de fluorescencia Leica y el software Image-Pro. La cuantificación se realizó visualmente a mano usando las fotos, se contaron las bacterias sobre la estructura en forma de podio y dentro de la estructura de nido de abejas. En cada punto de tiempo, después de realizar el análisis, se añadieron nuevas suspensiones de bacterias con Ampicilina.

1.3.2 Análisis del modelo celular

Para analizar el comportamiento de la interacción entre las células y las estructuras, se necesitaban cuatro puntos de tiempo: 24 horas, 48 horas, 72 horas y 96 horas. En cada punto de tiempo, se cambió medio celular. Para la visualización, 2 fotos y un video fueron tomadas con un aumento de 63x con un microscopio confocal de escaneo láser Zeiss. Para análisis posterior, fotos y vídeo se observaron con el software Image-J para determinar el grado de adherencia de las células a las estructuras.

2.RESULTADOS

Con el fin de comparar el comportamiento de adhesión y anti adhesión diferentes microestructuras 3D se evaluaron en diferentes puntos de tiempo.

2.1 Fabricación de microestructuras

La técnica de polimerización de dos fotones se aplicó con éxito para fabricar diversas microestructuras sobre portaobjetos de vidrio. Como estrategia, en primer lugar las estructuras en forma de podio fueron creados con el fin de observar el comportamiento de adhesión celular cuando se cambian las propiedades de la superficie del material. A su vez, las estructuras de nido de abeja se fabricaron para observar el impacto en la adhesión celular cuando una bien definida topografía esta presente en la superficie. Las Fig. 2A y B muestran respectivamente el podio y las estructuras de nido de abeja utilizadas. Con el fin de comparar las propiedades de los materiales en la superficie, las estructuras con forma de podio con dimensiones de $30 \times 30 \mu\text{m}$ y altura de 2 micras fueron fabricadas. Para evaluar la relevancia de la topografía para el control de la adherencia, las estructuras de forma de panel con dimensiones de $5 \mu\text{m}$, $6 \mu\text{m}$, $7 \mu\text{m}$, $8 \mu\text{m}$ y $9 \mu\text{m}$ $10 \mu\text{m}$ con una altura de $2 \mu\text{m}$, y dimensiones de $2 \mu\text{m}$, $4 \mu\text{m}$, $6 \mu\text{m}$, $8 \mu\text{m}$ y $10 \mu\text{m}$ con altura de $5 \mu\text{m}$ fueron fabricadas. El desarrollo de las estructuras se muestra en la figura 2.

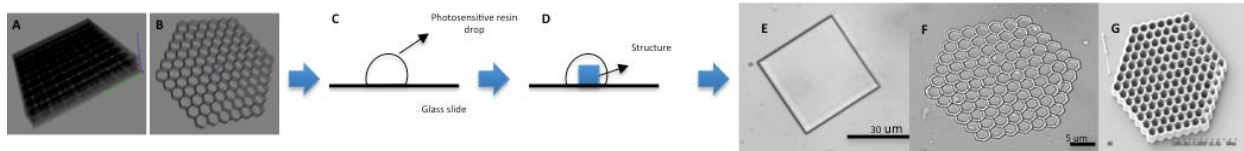


Fig 2. Desarrollo de la microfabricación utilizando la técnica de polimerización de dos fotones. Primero se construyen las estructuras en Matlab y luego se importaron al software Sympoly. (A y B) estructuras Podio y panel observadas en Sympoly. (C) Disposición para realizar la microfabricación. Una gota de polímero fotosensible se coloca sobre el portaobjetos de vidrio. (D) A continuación, la estructura se fabrica en el portaobjetos. (E y F) Estructuras finales de podio y nido de abeja observados con un microscopio óptico. (G) estructura de nido de abeja observada mediante microscopía electrónica (SEM).

Una comparación de los valores observados en el valor esperado de las diferentes podios mostró fidelidad al estar dentro del 10% del tamaño esperado. Se encontraron dos discrepancias en los podios fabricados utilizando PEGDA 700 y PEGDA 700 + PEG 5000, con una diferencia de 18% y 23%, respectivamente, del tamaño esperado (Figura 3).

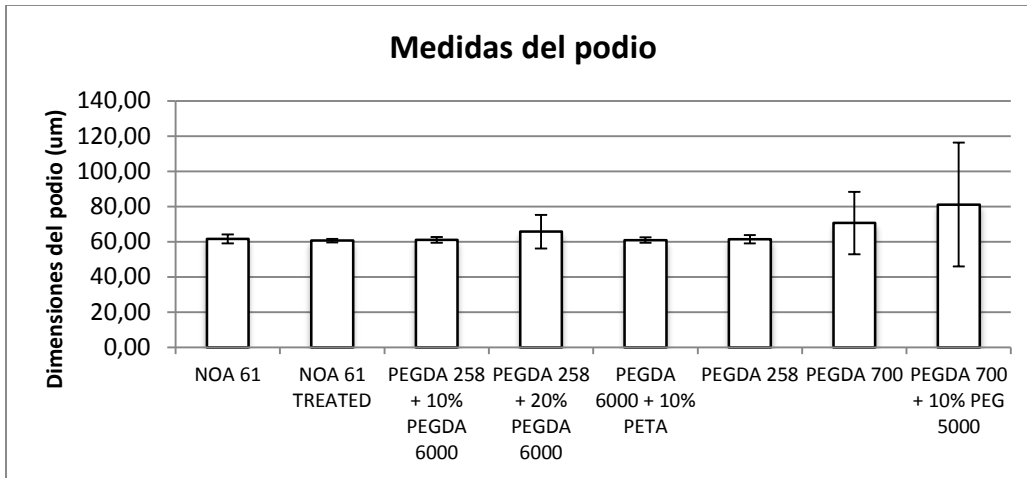


Fig 3. Mediciones de podios fabricados. Las dimensiones se muestran como el promedio entre las dos caras del podio \pm error estándar. El tamaño esperado era 60x60µm. Una comparación de los valores observados con el valor esperado de las diferentes podios mostró fidelidad al estar dentro del 10% del tamaño esperado. Excepto en los casos de PEGDA 700 y PEGDA 700 + PEG 5000, que tenían una diferencia de 18% y 23% respectivamente, desde el tamaño esperado.

Igualmente, se realizó la misma comparación para las estructuras de nido de abeja. Los resultados mostraron fidelidad al estar dentro del 2% del tamaño esperado, excepto en podios hechos con PEGDA 700 y PEGDA 700 + PEG 5000, que tenían una diferencia del 4% y 6%, respectivamente, del tamaño esperado. En este estudio utilizamos materiales de hidrogel fotosensibles, que tienen la tendencia a hincharse. PEGDA 700 y 700 PEGDA 10% PEG 5000 fueron las únicas estructuras que demostraron esta característica. Estos resultados nos permiten validar la fabricación exacta de la estructura 3D.

2.2 Adhesión bacteriana en estructuras 2D de altura constante

Bacterias *E. coli* MG1655 que expresan GFP se cultivaron en las estructuras hechas con forma de podio en NOA 61 (control), NOA 61 tratado con MECE, PEGDA 258, PEGDA 700, PEGDA 258 + 10% PEGDA 6000, PEGDA 258 + 20% PEGDA 6000, PEGDA 6000 + 10% de PETA y PEGDA 700 + 10% de PEG 5000. Los resultados después de 6 horas revelaron claramente que existe una diferencia de comportamiento entre las composiciones. Las bacterias fueron claramente adhesivas en PEGDA 258, PEGDA 258 + 10% PEGDA 6000 y NOA 61 (control), y antiadhesivo sobre el resto de las composiciones. El material mas adhesivo fue el PEGDA 258 + 10% PEGDA 6000 y PEGDA 700 el menos adhesivo, como se puede observar en las figuras 4 y 5.

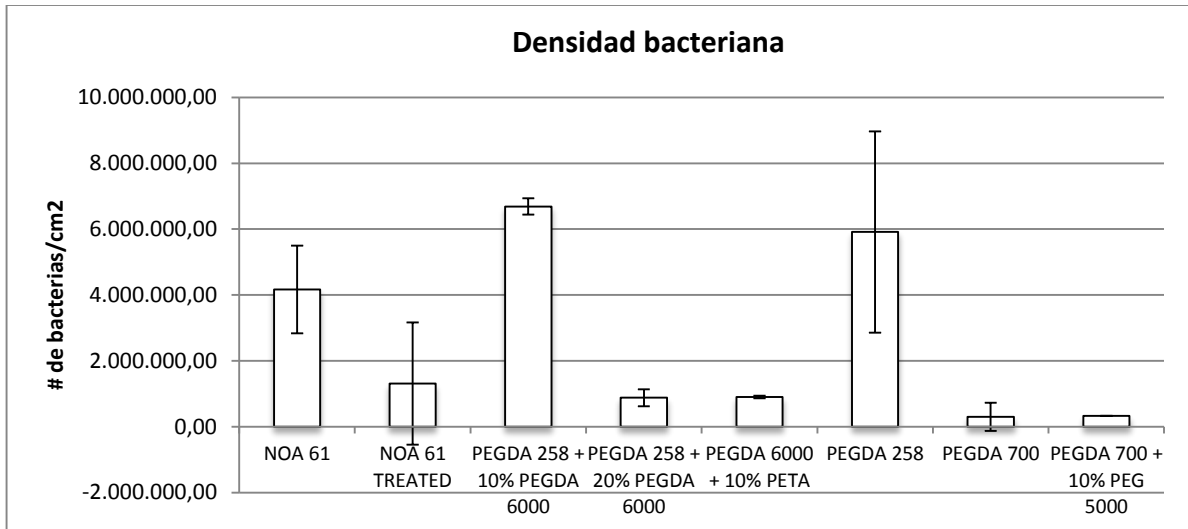


Fig 4. Los gráficos ilustran la cuantificación bacteriana en diferentes microestructuras. Para todas las figuras las barras representan el número promedio de bacterias adheridas por cm² ± SEM. Si comparamos vemos que el material más adhesivo fue el PEGDA 258 + 10% PEGDA 6000 y el menos adhesivo fue el PEGDA 700.

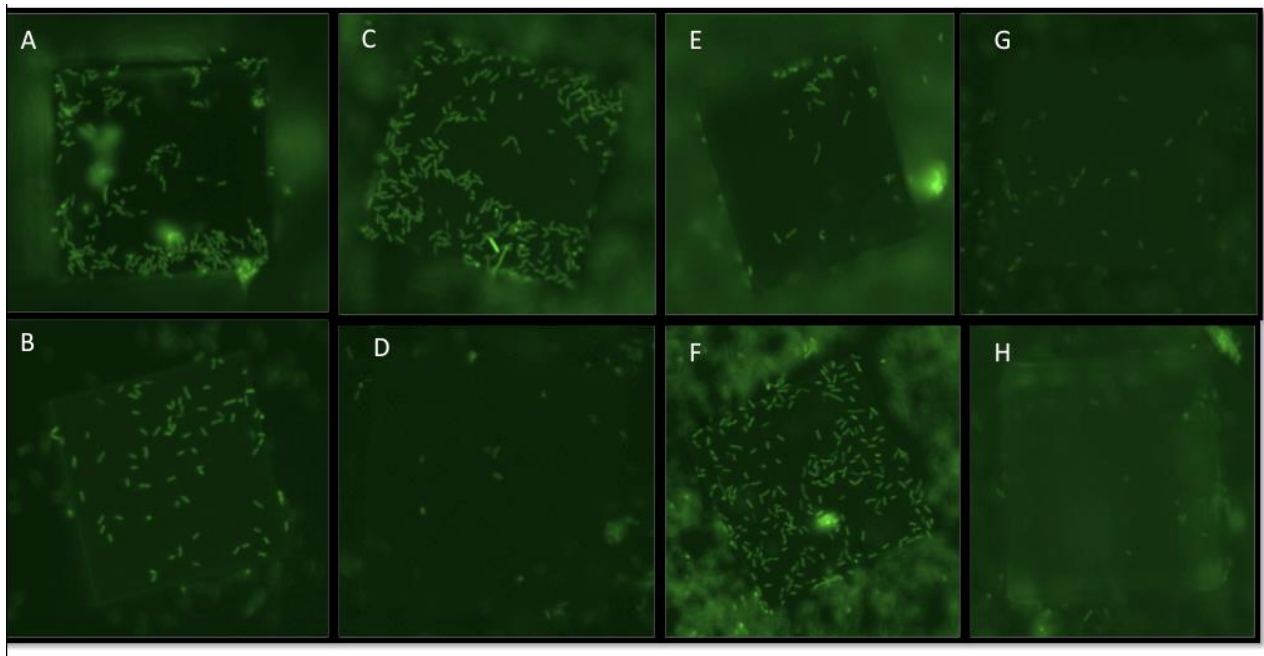


Fig 5. Cambios de adhesión bacteriana sobre diferentes materiales en comparación con el control (NOA61). *E. coli* MG1655 que expresan GFP se cultivaron en el podio con dimensiones 30x30µm y altura de 2 micras, hecho con (A) NOA61, (B) NOA 61 tratado con MECE, (C) PEGDA 258 +10% PEGDA 6000, (D) PEGDA 258 + 20% PEGDA 6000, (e) PEGDA 6000 +10% de PETA, (F) PEGDA 258, (G) PEGDA 700, y (H) PEGDA 700 + 10% PEG 5000. Para todas las imágenes se utilizó un microscopio de fluorescencia óptico con una magnificación de 40x.

2.3 Adhesión bacteriana en topografías con diferentes alturas

Bacterias *E. coli* MG1655 que expresan GFP se cultivaron en las estructuras de nido de abeja hechas con NOA 61 (control), NOA 61 tratado con MECE, PEGDA 258, PEGDA 700, PEGDA 258 +10% PEGDA 6000, PEGDA 258 + 20% PEGDA 6000, PEGDA 6000 +10% PETA y PEGDA 700 + 10% de PEG 5000. Después de 6 horas y 3 días de incubación, comparando el control (NOA 61) con las otras resinas se observó un comportamiento diferente. NOA 61 tratado, PEGDA 258 + 10% PEGDA 6000, PEGDA 258 +20% PEGDA 6000, PEGDA 6000+ 10% de PETA y PEGDA 700 +10% PEG5000 resultaron antiadhesivos. PEGDA 258 y PEGDA700 fueron adhesivos. PEGDA 258 fue significativamente más adhesivo y PEGDA 6000 +10% de PETA fue el más antiadhesivo.

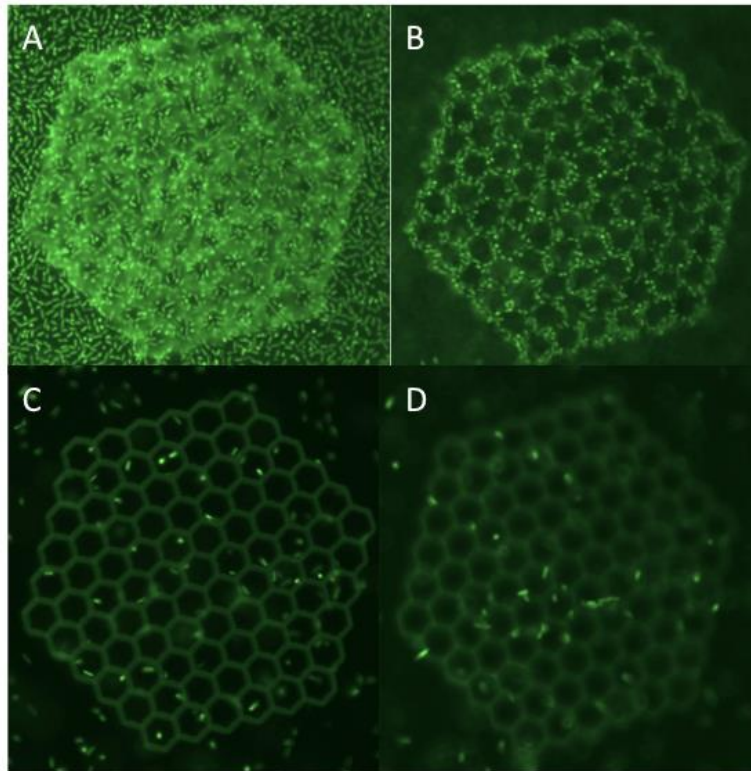


Fig 6. Comparación de la adhesión bacteriana entre PEGDA 258 y PEGDA 6000 + 10% PETA. Las bacterias *E. coli* MG1655 que expresan GFP cultivados en las estructuras de nido de abeja con dimensión $10\mu\text{m}$ y altura de $5\mu\text{m}$ hechos con (A-B) PEGDA 258 y (C-D) PEGDA 6000 +10% PETA. (C-A) dentro de la estructura y (B-D) parte superior de la estructura. Para todas las imágenes se utilizó un microscopio de fluorescencia óptico con una magnificación de 40x.

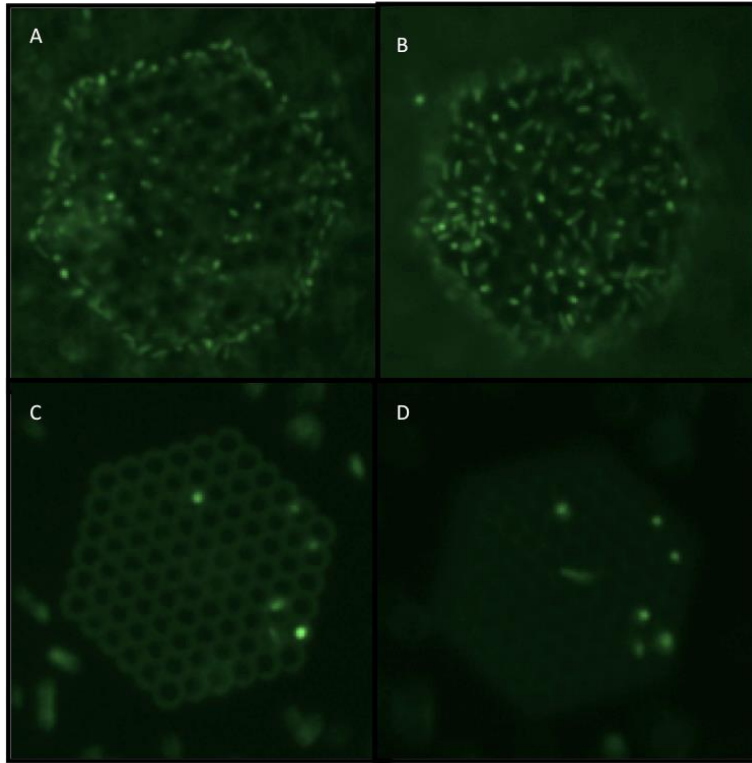


Fig 7. Comparación de la adhesión bacteriana entre PEGDA 258 y PEGDA 6000 + 10% PETA. Bacterias E.coli MG1655 expresando GFP cultivadas en las estructuras de nido de abeja con dimensión 3 μ m y altura de 5 μ m hechos con (A-B) PEGDA 258 y (C-D) PEGDA 6000 +10% PETA. (C-A) dentro de la estructura y (B-D) parte superior de la estructura. Para todas las imágenes se utilizó un microscopio de fluorescencia óptico con una magnificación de 40x.

Una comparación de las estructuras de nido de abeja hechas con PEGDA 258 y PEGDA 6000 +10% PETA reveló diferencias claras del control de la adhesión celular entre los diferentes alturas y tamaños. Como podemos ver en la tabla 2, la adhesión aumenta en tanto el tamaño de la estructura disminuye en las estructuras hechas con PEGDA 6000 +10% PETA. En las estructuras hechas con PEGDA258 la adherencia fue la misma a pesar de la modificación del tamaño. Este resultado sugiere que en los polímeros adhesivos la adhesión no depende de la topografía. Además, una disminución en el número de adhesión celular comparando las estructuras de tamaño 10, 8 y 6 μ m en ambas alturas, reveló que cuando la altura aumenta el número de bacterias disminuye. Esta diferencia fue más significativa en las estructuras de 6 μ m. En altura de 2 μ m, el más adhesivo fue PEGDA 6000 +10% de PETA en tamaño de 6 μ m y PEGDA 258 de 9 μ m. En altura de 5 μ m, el más adhesivo fue PEGDA 6000 +10% PETA en tamaño 3 μ m y PEGDA258 en tamaño de μ m. En la estructura de tamaño de 2 μ m de altura 5 μ m era la estructura menos adhesiva. En esta altura solo se presenta adherencia en PEGDA 258.

Tabla 2. Tabla comparativa entre el numero promedio de células/cm² en estructuras de nido de abeja fabricadas con PEGDA 258 y PEGDA258+10%PETA.

Altura: 2um	10	9	8	7	6	5
PEGDA 6000+10% PETA	19,872,328.37	20,299,688.76	26,823,395.92	31,724,935.32	63,961,917.60	19,413,886.00
PEGDA 258	144,699,732.84	154,212,891.62	122,794,538.73	98,842,850.32	146,174,493.40	152,663,655.14

Altura: 5um	10	8	6	4	3	2
PEGDA 6000+10% PETA	13,905,957.31	12,094,622.56	8,922,317.58	30,094,625.06	88,251,505.95	0.00
PEGDA 258	103,992,433.41	100,765,038.85	97,046,328.72	200,033,544.93	119,405,611.57	77,076,195.49

Entre tamaños se observó una diferencia en la alineación y la posición de las bacterias. En las grandes estructuras las bacterias estaban en posiciones horizontales y se adhieren a la parte inferior (Figura 6 A-C) y en tamaños más pequeños como 3 y 4µm, casi todas las bacterias en la estructura estaban en posición vertical como se muestra en la figure7C. Este último comportamiento estuvo presente también en algunas estructuras de gran tamaño, sobre todo en las estructuras adhesivas (Figura 6C). Además, algunas estructuras presentan un patrón de adhesión, una bacteria se adhieren por hoyo. Particularmente en PEGDA 600 + 10% PETA, como podemos ver en la figura 6 C y D, se observó este patrón en todos los tamaños y alturas. En estructuras de tamaño 3µm, las bacterias sólo se adhieren a la estructura siguiendo este patrón (Figura 7C).

Se observó la formación de biopelículas en la mayor parte de las estructuras de 2 µm de altura después de 3 días de incubación. Después de 6 horas de incubación la formación de una biopelícula se observó en estructuras fabricadas con NOA 61 y PEGDA 700 + PEG 5000 con altura de 2µm. En las estructuras de altura de 5µm no se observó la formación de biopelículas.

2.4 Adhesión de células MDCK en estructuras 2D con diferente altura

Células MDCK que expresan GFP se cultivaron en estructuras podio de dimensión 30x30µm con diferentes alturas (2µm, 4µm y 6µm) hechos con NOA 61 y PEGDA 6000 +10% PETA. Los diferentes puntos de tiempo se utilizaron para observar las diferencias en adhesión celular cada 24 horas durante 4 días de incubación. Como podemos ver en la figura 8 B y C, las células comenzaron a adherirse en las estructuras de altura de 4µm y 6µm. Después de 48 horas toda la estructura estaba cubierta (figura 8 E-F). La estructura de altura de 2µm no presenta adherencia durante los 4 días de incubación (figura 8 A-D-G-J). Después de 24 horas, las células no estaban cerca de la estructura.

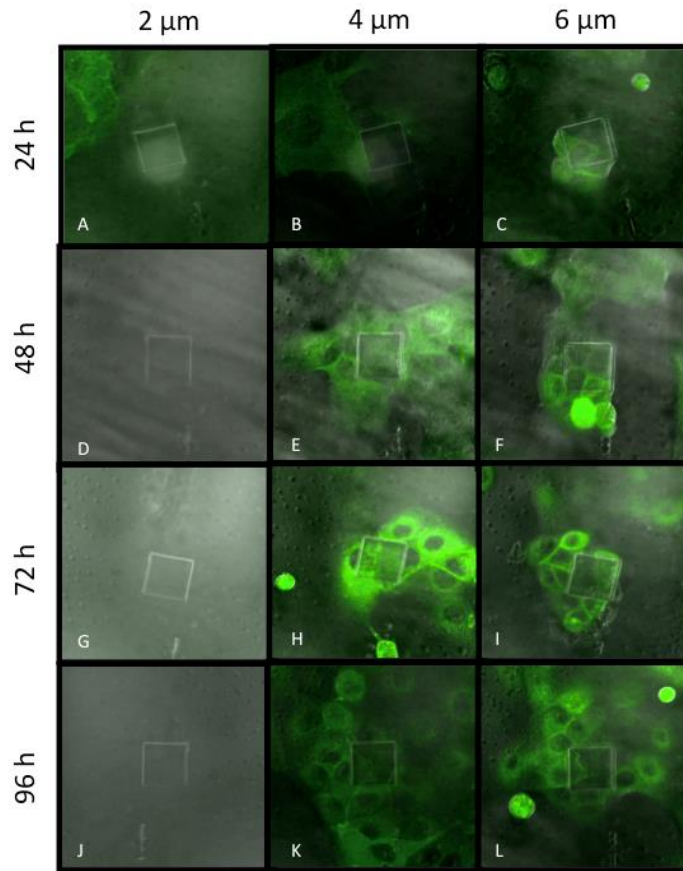


Fig 8. Imágenes representativas de células MDCK cultivadas en podios hechos con NOA61 de dimensión 30x30 μ m con altura variable (2 μ m, 4 μ m y 6 μ m). El proceso de adhesión se puede observar. Después de 24 horas las células empezaron a adherirse a la estructura en los casos de altura de 4 μ m y 6 μ m. Después de 48 horas toda la estructura estaba cubierta. La estructura de altura de 2 μ m no presenta adherencia durante 4 días de incubación. Para todas las imágenes se utilizó un microscopio confocal láser de barrido Zeiss con una magnificación de 63x.

Como podemos ver en la figura 9 A-B-C-D-E-F, después de 48 horas de incubación las estructuras fabricadas con PEGDA 6000 +10% PETA no presentaron adhesión celular en 3 alturas diferentes. Después de 72 horas, las células cubren toda la estructura de 2 μ m y la mitad de la estructura de 4 μ m. La estructura de 6 μ m no presenta adherencia (figura 9 G-H-I). Después de 96 horas, todas las estructuras presentan adherencia en toda la superficie de la estructura (figura 9 J-K-L).

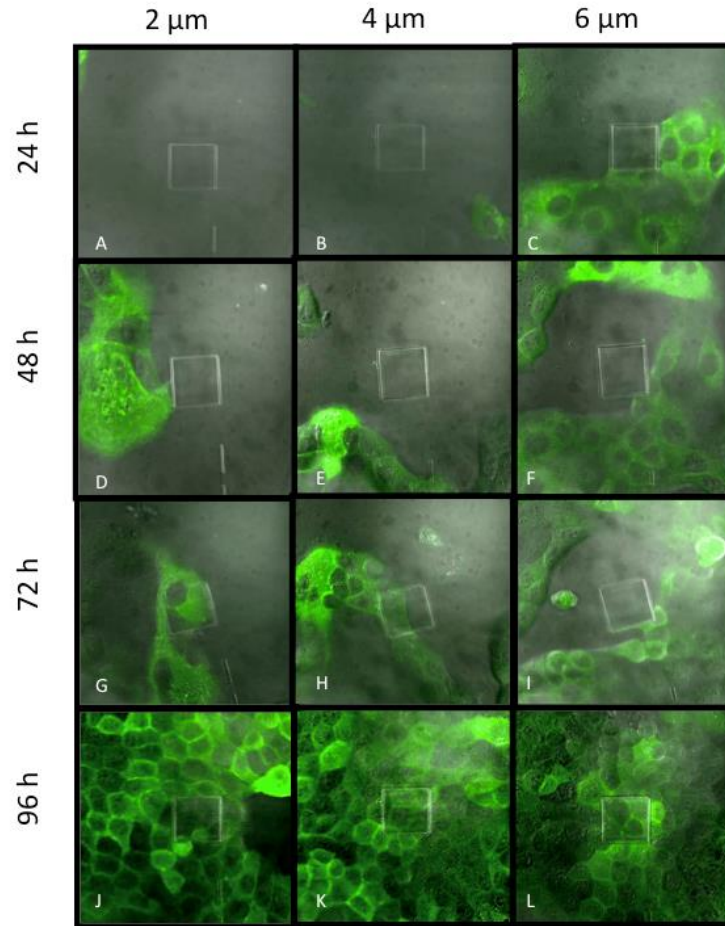


Fig 9. Imágenes representativas de células MDCK cultivadas en podios hechos con PEGDA 6000 +10% PETA de dimensiones 30x30 μm con altura variable (2 μm , 4 μm y 6 μm). El proceso de adhesión se puede observar. Después de 48 horas de incubación las estructuras no presentan adhesión celular en 3 alturas diferentes. Después de 72 horas, las células cubren toda la estructura de 2 μm y la mitad de la estructura de 4 μm . La estructura de 6 μm no presenta adherencia. Después de 96 horas, todas las estructuras presentan adherencia en toda la superficie de la estructura. Para todas las imágenes se utilizó un microscopio confocal láser de barrido Zeiss con una magnificación de 63x.

Una comparación entre las estructuras hechas con NOA 61 y PEGDA 6000 +PETA 10% mostró claras diferencias en adherencia. NOA61 no fue capaz de suprimir la adhesión de las células después de 24 horas aumentando la altura. Por el contrario, las estructuras hechas con PEGDA 6000 +10% PETA fueron capaces de suprimir la adhesión celular después de 48 horas. Después de 96 horas, ambas resinas no fueron capaces de suprimir la adhesión celular sobre toda la superficie.

3. DISCUSION

Fue posible utilizar una técnica sofisticada como la técnica de polimerización de dos fotones, para la fabricación de diferentes estructuras con un amplio panel de resinas fotosensibles en portaobjetos de vidrio. La fabricación óptima obtenida en este proyecto permitirá a otros usuarios crear diferentes estructuras bien definidas con esta técnica.

Las estructuras realizadas con PEGDA 700 en ambas formas mostraron propiedades de hinchazón, que pueden responder a la diferencia de la adhesión celular entre el podio de nido de abeja, esta resina no era el ideal para la construcción de las estructuras, debido al hecho de que después de almacenarlas en agua se hinchan y cambian su forma. Además, las estructuras en este polímero no estaban bien definidas. Curiosamente, se observó una falta de adherencia en las estructuras de dimensión de 2 μm . No podemos descartar que en estructuras de pequeña dimensión la inflamación reduce el tamaño efectivo de cada hoyo. El ancho de las bacterias *E. coli* es de 1,5 μm , por lo cual era difícil que las bacterias entraran en los agujeros más pequeños. En el caso de la estructura de tamaño de 3 μm , la alineación de las bacterias era particular, una bacteria por hoyo se adhirió, los agujeros eran lo suficientemente grandes como para permite la entrada de bacterias, pero lo suficiente pequeño para no permitir más de una bacteria. Esta estructura no fue la menos adhesiva, porque a pesar de que tiene menos número de bacterias adheridas en toda la estructura, tiene más bacterias por cm^2 .

En ambos experimentos, tanto con bacterias que con células, fue claro que con la modificación de las propiedades químicas de una superficie, es posible controlar la adhesión celular. En ambos casos, diferentes resinas revelaron un comportamiento adhesivo o no adhesivo. La comparación del número de bacterias que se adhieren a la estructura entre el control y otras resinas mostraron claramente la adhesión significativa en NOA 61, PEGDA 258 y PEGDA 258 +10 % PEGDA 6000 con la altura y dimensión constante. Aunque en las estructuras de panel de altura y dimensión variable, la adhesión se observó claramente en PEGDA 258 y PEGDA 700. La comparación de adhesión de las células MDCK entre NOA 61 y PEGDA 6000 +10 % PETA confirma que las propiedades de control de células de dichas resinas puede ser utilizado no sólo en las bacterias, sino también en las células. NOA61 y PEGDA 258 son las resinas mas adhesivas para las células y bacterias, respectivamente. Por el contrario, PEGDA 6000 +10 % PETA fue la resina no adhesiva en la mayoría de las bacterias y los experimentos celulares. El comportamiento hidrófilo presente debido al contenido de poli (etilenglicol) y el hecho de que poseía una cadena larga hizo el PEGDA 6000+ 10 % PETA la resina óptima para controlar la adhesión celular, esta logro llegar a la supresión de la adhesión de las bacterias después de 6 horas y la adhesión celular después de 48 horas.

Igualmente, el experimento con las bacterias en estructuras de nido de abeja sugiere que la topografía tiene un papel para controlar la adherencia. El PEGDA 6000+ 10% PETA mostró claras diferencias de adherencia cuando aumenta la altura. Por el contrario, en estructuras con topografía hechas en PEGDA258 no cambió la tasa de la adhesión celular. Las características topográficas en el material tienen un papel tan importante, que incluso en las celdas del panel casi del tamaño de la bacteria en material adhesivo, las bacterias lograron entrar a la estructura.

En el experimento de células se demostró también que la altura influye en la velocidad y el tiempo de adherencia. Los experimentos previos mostraron que la acumulación 3D de las células forma una capa por encima de la estructura; esta capa se presenta en todas las estructuras de altura inferior a 6 μm . Antes del experimento con células MDCK, se construyeron las estructuras de 8 μm de dimensión con ambas resinas. Después de 96 horas no mostraron adhesión celular sobre las superficies. La adhesión se inició después de 7 días de incubación sobre estas estructuras de gran altura.

En conclusión, este estudio demuestra que no sólo es posible controlar la adhesión celular y bacteriana cuando las propiedades químicas de la superficie del material se modifican utilizando polímeros no adhesivos o adhesivos, sino que también, es posible controlar la adhesión utilizando la topografía en la superficie. Esta topografía mostro tener un papel en el control de la adherencia en polímeros no adhesivos, la supresión de adhesión en grandes estructuras y la promoción de adhesión cuando la topografía alcanza el tamaño de la célula.



En este proyecto se describe una nueva estrategia para limitar la adherencia de células y bacterias controlando las propiedades físico-químicas del polímero y la topografía de la superficie del implante. La técnica de polimerización de dos fotones permite la fabricación de diferentes estructuras utilizando un amplio panel de resinas fotosensibles en un portaobjetos de vidrio. Esta técnica sofisticada permitió modificar las propiedades químicas de la superficie y su topografía para controlar la adherencia en las estructuras y, posteriormente, validar el control de la adherencia con bacterias vivas y células. Una comparación del número de bacterias que se adhieren a la estructura entre el control y las otras resinas mostraron claramente la adhesión significativa en estructuras fabricadas con NOA 61, PEGDA 258 y PEGDA 258+ 10 % PEGDA 6000 de altura y dimensión constante . Aunque en las estructuras de panel de altura y dimensión variable la adhesión se observó claramente en PEGDA 258 y PEGDA 700 . Los resultados implican que controlando las propiedades de la superficie del material es posible controlar la adhesión celular , modificando esta superficie usando polímeros no adhesivos o adhesivos para suprimir o promover la adhesión celular. En particular, en las estructuras topográficas, se encontró un bajo índice de adhesión bacteriana usando estructuras de forma de nido de abeja de PEGDA 6000 +10% PETA y la alta tasa se encontró con estructuras de PEGDA 258. Estos cambios sugieren que la topografía tiene un papel en el control de la adherencia en polímeros no adhesivos, supresión de la adhesión en grandes estructuras y la promoción de adhesión cuando la topografía alcanza el tamaño de la célula. El papel de la topografía en la adhesión celular también se demostró como resultado de la baja tasa de adherencia de la topografía de nido de abeja con una mayor altura. Las bacterias encontraron la forman de entrar en la topografía de tamaño pequeño, incluso cuando el material no adhesivo estaba presente. Para las células, se observó que la adhesión fue mas rápida en estructuras de NOA61 y lenta en estructuras de PEGDA 6000 +10% PETA. Las diferencias de adherencia en las estructuras en forma de podio mostraron que las propiedades físicas de la superficie pueden controlar y guiar la adhesión celular en bacterias y células.

Esto nos lleva a la conclusión de que no sólo es posible controlar la adhesión celular y bacteriana cuando las propiedades químicas de la superficie del material se modifican utilizando polímeros no adhesivos o adhesivos, sino también, es posible controlar la adhesión utilizando la topografía en la superficie para guiar la correctamente la adhesión cuando la supresión o la adhesividad es necesaria.

Si la participación continúa en este estudio, sería necesario evaluar este nuevo enfoque para el control de la adhesión celular en otro tipo de células y proteínas, ya que diferentes tipos de son absorbidas por diferentes materiales *in vitro* e *in vivo*. Además, las consideraciones futuras para el diseño de una microfotografía óptima en un dispositivo implantable debe incluir las interacciones con moléculas y el impacto en la formación de la cápsula fibrosa con el objetivo de desarrollar materiales con superficies que permitan interactuar específicamente con las células y mejorar el proceso de inflamación a corto y largo plazo.

BIBLIOGRAFIA

- Abrams, G., Bentley, E., Nealey, P., & Murphy, C. (2002). Electron microscopy of the canine corneal basement membranes. *Cells Tissues Organs* (170), 251-257.
- Abrams, G., Murphy, C., Wang, Z., Nealey, P., & Bjorling, D. (2003). Ultrastructural basement membrane topography of the bladder epithelium. *Urol Res* (31), 341-346.
- Andersson, A., Backhed, F., von Euler, A., Richter-Dahlfors, A., Sutherland, D., & Kasemo, B. (2003). Nanoscale features influence epithelial cell morphology and cytokine production. *Biomaterials* (24), 3427-3436.
- Biavasco, F., Giovanetti, E., Montanari, M., & Lupidi, R. (1991). *J. Antimicrob* (27), 71.
- Castner, D., & Ratner, B. (2002). *Surfaces science* (500), 28.
- Castner, D., & Ratner, B. (2002). Biomedical surface science: Foundations to frontiers. *Surface Science* , 28-60.
- Chapman, R., Ostuni, E., & Liang, G. (2001). *Langmuir* (17), 1225.
- Chen, S., Jones, J., Xu, Y., & al, e. (2010). Characterization of topographical effects on macrophage behavior in a foreign body response model. *Biomaterials* , 21, 3479-3491.
- Chung, K., Schumacher, J., Sampson, E., Burne, R., Antonelli, P., & Brennan, A. (2007). Impact of engineered surface microtopography on biofilm formation of staphylococcus aureus. *Biointerfaces 2* , 2.
- Costerton, J., Geesey, G., & Cheng, K. (1978). *Sci. Am* , 1 (238), 86.
- Costerton, J., Lewandowski, Z., Caldwell, D., Korber, D., & Lappin-Scott, H. (1995). *Annual reviscion of microbiology* , 45 (711).
- Costerton, J., Stewart, P., & Greenberg, E. (1999). *Science* , 284 (1318).
- Dalby, M., Gadegaard, N., Tare, R., Andar, A., Riehle, M., Herzyk, P., et al. (2007). The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *TNat Mater* (6), 997-1003.
- Dalby, M., Riehle, M., Johnstone, H., Affrossman, S., & Curtis, A. (2002). In vitro reaction of endothelial cells to polymer demixed nanotopography. *Biomaterials* (23), 2954-2954.
- Dalby, M., Riehle, M., Sutherland, D., Agheli, H., & Curtis, A. (2004). Use of nanotopography to study mechanotransduction in fibroblasts – methods and perspectives. *Eur J Cell Biol* (83), 1590169.

Gristina, A. (1987). *Science* (237), 1588.

Hook, A., Chang, C.-Y., Yang, K., Lockett, J., Alexander, M., Anderson, D., et al. (2012). Combinatorial discovery of polymers resistant to bacterial attachment. *Nature biotechnology* .

Hung, H., Wu, C., Chien, S., & Hsu, S. (2009). The behavior of endothelial cells on polyurethane nanocomposites and the associated signaling pathways. *Biomaterials* (30), 1502-1511.

Jeon, S., Lee, J., Andrade, J., & Gennes, P. (1991). Protein-surface interactions in the presence of Polyethylene Oxide. *Journal of colloid and interface sciences* , 149-160.

Karuri, N., Liliensiek, S., Teixeira, A., Abrams, G., Campbell, S., Nealey, P., et al. (2004). Biological length scale topography enhances cell-substratum adhesion of human corneal epithelial cells. *J Cell Sci* (117), 3152-3164.

Kim, D.-H., Han, K., Gupta, K., Kwon, K., Suh, K.-Y., & Levchenko, A. (2009). Mechanosensitivity of fibroblast cell shape and movement to anisotropic substratum topography gradients. *Biomaterials* (30), 5433-5444.

Kulangara, K., & Leong, K. (2009). Substrate topography shapes cell function. *Soft Matter* (5), 4072-4076.

Mussard, W., Nasreddine, K., Kriegel, I., Esteve, M., & Semetey, V. (2011). Facile and efficient control of bioadhesion on Poly(dimethylsiloxane) by using a biomimetic approach. *Angewandte chemie international edition* , 50, 10871-10874.

Oberleitner, B., Dellinger, A., De'foret, M., Galtayries, A., Castanet, A., & Semetey, V. (2013). A facile and versatile approach to design self-assembled monolayers on glass using thiol-ene chemistry. *Chemistry Communications* , 49, 1615-1617.

Oh, S., Brammer, K., Li, Y., Teng, D., Engler, A., Chien, S., et al. (2009). Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proc Natl Acad Sci U S A* (106), 2130-2135.

Ostuni, E., Chapman, R., Liang, M., Meluleni, G., & Pier, G. (2001). *Langmuir* (17), 6336.

Sastri, V. (2009). Properties, Requirements and applications. *Plastic medical devices* , 224.

Smith, R., Zhang, Z., Bouchard, M., Li, J., Heather, L., Brotske, G., et al. (2012). Vascular catheters with a nonleaching Poly-Sulfobetaine surface modification reduce thrombus formation and microbial attachment. *Science translational medicine* , 4 (153).

Teixeira, A., McKie, G., Foley, J., Bertics, P., Nealey, P., & Murphy, C. (2006). The effect of environmental factors on the response of human corneal epithelial cells to nanoscale substrate topography. *Biomaterials* (27), 3945-3954.

Thomas, C., Lhoest, J., Castner, D., McFarland, C., & Healy, K. (1999). Surface designed to control the projected area and shape of individual cells. *J. Biomech. Eng* (121), 40-48.

Vogel, V., & Sheetz, M. (2006). Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* (7), 265-275.

Whitehead, K., & Verran, J. (2006). The effect of surface topography on the retention of microorganisms. *Food and products processing* , 84, 253-259.

Williams, D. (2008). On the mechanism of biocompatibility. *Biomaterials* , 29, 2941-53.

Wu, S., Serbin, J., & Min, G. (2006). Two-photon polymerisation for three-dimensional microfabrication. *Journal of photochemistry and photobiology* , 181 (1), 1-11.

Yim, E., Darling, E., Kulangara, K., & Guilak F, L. K. (2009, 11 03). Nanotopography- induced changes in focal adhesions, cytoskeletal organization, and mechanical properties of human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* .

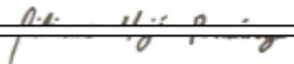
Yim, EK; Leong, KW. (2005). Significance of synthetic nanostructures in dictating cellular response. *Nanomedicine* (1), 10-21.



ESCUELA DE INGENIERÍA DE ANTIOQUIA

ACTA DE EVALUACIÓN FINAL DE TRABAJO DE GRADO

Fecha: (dd/mm/aa)	19 / 11 / 2013				
Nombre del proyecto:	Control de la adhesión celular y bacteriana en los dispositivos biomédicos implantables.				
Director del proyecto:	Vincent Semetey (Tutor académico)				
<table border="1"><tr><td>Nombre del estudiante</td><td>Programa académico</td></tr><tr><td>Catalina Galeano Garcés</td><td>Ingeniería Biomédica</td></tr></table>		Nombre del estudiante	Programa académico	Catalina Galeano Garcés	Ingeniería Biomédica
Nombre del estudiante	Programa académico				
Catalina Galeano Garcés	Ingeniería Biomédica				
Nombre del Jurado:					
Evaluación del proyecto: Espacio exclusivo para jurado					
___ No aprobado <input checked="" type="checkbox"/> Aprobado sin mención					
___ con Mención Pública ___ con Mención honorífica ___ Trabajo laureado					
Justificación del reconocimiento: (Artículo 28 del Acuerdo 11: "El director del Programa presentará el acta final de evaluación al Consejo Académico, donde consta la solicitud de mención especial debidamente justificada y el Consejo determinará si se otorga o no")					



DIRECTOR DEL PROGRAMA (E)

DIRECTOR DEL TRABAJO DE GRADO

N.A

JURADO (Si lo hubo)