



**Modificación de la interface titanio-tejido vivo para mejora de la osteointegración**  
Rodríguez D.

Universitat Politècnica de Catalunya  
Depto. Ciencia de los Materiales e Ing. Metalúrgica - Grupo BiBiTe  
Av. Diagonal 647; 08028 - Barcelona

**Introducción**

Los implantes fabricados en titanio pueden sufrir problemas de biocompatibilidad por diversos motivos, siendo uno de ellos una falta en la respuesta osteointegrativa por parte del organismo. El presente estudio repasa las posibles mejoras en la osteointegración del implante de titanio mediante la biofuncionalización de superficies de titanio.

Una de las posibles vías de mejora es la silanización de la superficie y posterior unión covalente con un péptido que contiene la secuencia RGD. Esta secuencia está presente en diversas proteínas de la matriz extracelular, como la fibronectina y la vitronectina, y es un motivo de anclaje de la célula a la matriz extracelular a través de la integrina de membrana  $\alpha 5$ - $\beta 1$ .

**Materiales y métodos**

Se prepararon discos de titanio comercialmente puro grado 2 de 10mm de diámetro y 2mm de espesor con una cortadora *Struers Accutom-50*. Los discos se pulieron con sílica coloidal y se limpiaron 3 veces en agua bidestilada en baño en ultrasonidos. La rugosidad de las muestras fue controlada en microscopio interferométrico de luz blanca.

Para realizar la silanización debe de emplearse un silano, una base y un disolvente. El silano escogido es el (3-Cloropropil)trietoxisilano; la presencia del grupo terminal cloro facilita la interacción del silano con el péptido a un pH de 11. Junto a éste se utiliza como disolvente el pentano y como base la DIEA (N,N-Diisopropiletilalamina). Previamente, los discos de titanio se sometieron a una limpieza por plasma. Las muestras preparadas se guardaron en un recipiente con atmósfera de nitrógeno para prevenir la contaminación de la superficie. Tras el proceso, se extraen las muestras y se limpiaron con etanol, agua destilada y acetona, con un secado final con nitrógeno.

Se comprobó el anclaje del silano a la superficie del titanio mediante dos técnicas diferentes. En la primera, se enlazó al silano un fluoróforo (5(6)-Carboxifluoresceína-GGGK) que permite su observación en el microscopio de fluorescencia, y se comparó el resultado con muestras control expuestas al mismo fluoróforo. Se analizaron dos muestras por cada tratamiento mediante un microscopio de fluorescencia Nikon E600 con una cámara Olympus DP72. En la segunda, se analizó la superficie de las muestras tratadas y de muestras control mediante la técnica de ToF-SIMS. El equipo utilizado corresponde al modelo ToF-SIMS IV, Ion Tofe (Plataforma de Nanotecnología, Parc Científic de Barcelona). Se empleó 2,2,2-trifluoroetilamina enlazada con el silano para mejorar su detección al presentar flúor en su estructura, y se dio el resultado como el ratio de la intensidad del pico de estudio (pico de flúor) y la intensidad de un pico de referencia (pico de OH).

La funcionalización de la superficie de las muestras silanizadas se realizó con la unión covalente de un péptido con la secuencia RGD. El proceso de funcionalización consistió en sumergir las muestras de titanio 5 minutos con ciclohexano y isopropanol en



ultrasonidos. Se limpiaron 3 veces con agua destilada, acetona y se secaron con nitrógeno. Las muestras se sumergieron toda una noche en una solución de carbonato de sodio y el péptido de trabajo. Tras el baño las muestras fueron lavadas 2 veces con PBS.

Las muestras funcionalizadas fueron analizadas mediante XPS para detectar la presencia de péptido en la superficie y el carácter covalente del enlace. Los resultados se calculan en forma de ratio N/Ti detectado en superficie, ya que sólo el péptido contiene nitrógeno.

Se realizó un estudio *in vitro* de la adhesión celular de células osteoblásticas de la línea MG63 a muestras funcionalizadas mediante los dos péptidos estudiados y a muestras control de titanio limpio, no tratado. Las muestras empleadas en los estudios de adhesión celular se depositan cada una en un pocillo. Se han observado las células a sembrar mediante la cámara de Neubauer y un microscopio Nikon Eclipse TS100 para determinar la concentración en el medio de trabajo, y así calcular la dilución necesaria para realizar un sembrado de 20000 células por pocillo.

Para la cuantificación y análisis de los resultados han sido teñidos los núcleos, filamentos de actina y los puntos focales de las integrinas de las células MG63 fijadas sobre la superficie de titanio con los fluoróforos Hoetsch, Faloidin Rodamina R415 y Antivinculina F3648. Para la observación de las muestras teñidas se usó un microscopio de fluorescencia Leica DMRB y postprocesado con el software Image-J.

### **Resultados y discusión**

La medida de la intensidad media de fluorescencia (A) de las muestras analizadas muestra una clara diferencia en la medida de la muestra control (A=5,05) y la muestra tratada con silano CPTES+péptido marcador (12,93). El resultado de los análisis con la técnica de ToF-SIMS muestran un ratio de F/OH de 0,11 de media para las muestras control y de 0,27 de media para las muestras con CPTES+marcador fluorado. Ambos resultados (técnica de TOF-SIMS y fluorescencia) muestran que el silano CPTES genera un enlace estable sobre la superficie de titanio.

El análisis por XPS de la unión péptido-silano muestra claras diferencias entre las muestras control y las muestras funcionalizadas (media N/Ti=0,060). Estos resultados demuestran la presencia de péptido unido al silano.

Los resultados de los estudios de adhesión *in vitro* muestran una clara diferencia entre las muestras control, muestras funcionalizadas con KGRGDS y muestras funcionalizadas con KGGGRGDS. La medición del área promedio de las células en cada muestra arroja resultados igualmente diferenciados entre las muestras control (661,0 cm<sup>2</sup>), y las muestras funcionalizadas con KGRGDS (770,4 cm<sup>2</sup>) y muestras funcionalizadas con KGGGRGDS (927,6 cm<sup>2</sup>).

### **Conclusiones**

Las superficies de titanio biofuncionalizadas presentan respuestas mejoradas respecto a las superficies actualmente empleadas.