

Unión de péptidos a superficies de titanio para la mejora de la osteointegración

M. GODOY, P. SEVILLA, F.J. GIL, D. RODRÍGUEZ.

ETSEIB. Universitat Politècnica de Catalunya.

Dpto. Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica.

BiBiTe - Grupo de Biomateriales, Biomecánica e Ingeniería de Tejidos.

Resumen

El presente estudio pretende mejorar el proceso de osteointegración del implante de titanio mediante la biofuncionalización de su superficie. Para ello se ha realizado una previa silanización de la superficie y una posterior unión covalente entre el silano y un péptido el cual posee la secuencia RGD. Se han estudiado diferentes aspectos como es la estabilidad tanto de conjunto titanio-silano como silano-péptido. Finalmente se ha realizado un ensayo de adhesión celular utilizando células osteoblásticas MG63 cuyas muestras de titanio han sido previamente biofuncionalizadas con el proceso estudiado.

Palabras clave: Silanización, CPTES, biofuncionalización, péptidos, RGD, línea celular MG63.

Abstract

This study aims to improve the osseointegration process of the titanium implant through surface biofunctionalization. Samples were silanised on the surface and afterwards a peptide with the RGD sequence was covalently attached to the silane. Specific characteristics of the stability of the union titanium-silane as well as silane-peptide were studied. Finally cell adhesion studies to samples biofunctionalized with the technique studied in this work were made with MG63 osteoblastic cells.

Keywords: Silanization, CPTES, biofunctionalization, peptides, RGD, MG63 cell line.

Introducción

Todo biomaterial implantado en el organismo, incluso implantes de titanio, es susceptible de sufrir problemas de biocompatibilidad. El presente estudio

pretende mejorar el proceso de osteointegración del implante de titanio mediante la biofuncionalización de su superficie. Para ello se ha realizado una previa silanización de la superficie y una posterior unión covalente entre el silano y un péptido el cual posee la secuencia RGD. El por qué de la presencia de dicha secuencia es que ésta es un dominio de adhesión peptídico siendo reconocido por los receptores superficiales de membrana llamados integrinas. Exactamente son reconocidos por las subunidades $\alpha 5 \beta 1$ aunque dependiendo de los aminoácidos vecinos las subunidades pueden variar.

Correspondencia:

Dr. Pablo Sevilla

ETSEIB - Universitat Politècnica de Catalunya

Dpto. Ciencia de los Materiales e Ingeniería

Metalúrgica - Grupo BiBiTe

Av. Diagona 647. Barcelona, 08028

Email: pablo.sevilla@upc.edu

Se han estudiado diferentes aspectos como es la estabilidad tanto de conjunto titanio-silano como silano-péptido. Finalmente se ha realizado un ensayo de adhesión celular utilizando células osteoblásticas MG63 cuyas muestras de titanio han sido previamente biofuncionalizadas con el proceso estudiado.

Materiales y métodos

Material

Se prepararon discos de titanio comercialmente puro (c.p.) grado 2 de 10mm de diámetro y 2mm de espesor a partir del corte de una barra del mismo material con una cortadora *Struers Accutom-50*. Los discos fueron pulidos a espejo en una de sus caras mediante sucesivos desbastes con papeles de carburo de silicio y una etapa final de pulido espejo con sílica coloidal de 0,06 μ m de tamaño de partícula. Para la limpieza de los discos se sonicaron y sumergieron durante 15 minutos en una solución de NaOH (0,5 mg/ml) y acetona (75%-25%). Posteriormente durante 15 minutos más fueron sonicados en una solución de acetona y finalmente 15 minutos en agua.

La rugosidad de las muestras así preparadas fue medida con un microscopio WYKO NT1100 y el software de análisis *Vision 32 V2.303* (Veeco Instruments, Inc, 2001), con la técnica de medición, PSI (*Phase Shifting Interferometry*).

Silanización

Inicialmente se realizó la limpieza de las muestras sumergiéndolas 5 minutos en ciclohexano y 5 minutos en isopropanol e introduciéndolas en un baño a los ultrasonidos. Posteriormente fueron limpiadas 3 veces con agua destilada, 3 veces con acetona y finalmente secadas con nitrógeno.

Previamente al proceso de silanización los discos fueron sometidos a plasma cleaning mediante el equipo Harrick Científic Corporation, modelo PDC-002 (Plataforma de Nanotecnología, Parc Científic de Barcelona). El plasma cleaning posee dos finalidades: limpieza de la superficie y su activación, es decir, introducir grupos hidroxilos en su superficie y así hacer posible la unión covalente entre el titanio y el silano de estudio. Las muestras preparadas se guardaron en un recipiente con atmósfera de nitrógeno para prevenir la contaminación de su superficie y por lo tanto la eliminación de los grupos hidroxilos.

Para llevar a cabo la silanización son necesarios un silano, una base y un disolvente. El silano

escogido corresponde al CPTES ((3-Chloropropil)trietoxisilano) debido a la presencia del grupo terminal cloro en la parte organofuncional el cual facilita la interacción del silano con el péptido a un pH de 11. La elección del disolvente corresponde al pentano y como base la DIEA (N,N-Diisopropiletilamina).

El proceso de silanización dura 1 hora, durante la cual se agita el recipiente mediante ultrasonidos durante 1 minuto, cada 10 minutos de proceso. De esta manera son eliminadas las moléculas de silano que hayan sido adsorbidas por la superficie de titanio ya que estos tipos de enlace no son interesantes en el estudio planteado. Tras completar la silanización se extraen las muestras y se limpian 3 veces con etanol, 3 veces con isopropanol, 3 veces con agua destilada y 3 veces con acetona seguido de un secado final con nitrógeno.

Se comprobó el anclaje del silano a la superficie del titanio mediante tres técnicas diferentes.

1.- Fluorescencia: se silanizaron dos muestras de titanio y fueron sumergidas durante 12 horas en una solución de péptido fluorescente disuelto en carbonato de sodio (0,5 mg/ml) obteniendo una concentración total de 500 μ g/ml. Como muestras de control fueron preparadas dos discos de titanio limpio sin silanizar y expuestos a la misma solución de fluoróforo. La utilización del péptido fluorescente (5(6)-Carboxifluoresceína-GGGK) es debida a que éste permite su observación mediante un microscopio de fluorescencia Nikon E600 con una cámara Olympus DP72.

2.- ToF-SIMS: 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). Las muestras de estudio fueron silanizadas y posteriormente sumergidas en una solución de 2,2,2-trifluoroetilamina con una concentración de 500 μ g/ml. En el caso de las muestras de control los discos de titanio limpio sin silanizar fueron sumergidos en la misma solución de 2,2,2-trifluoroetilamina. La 2,2,2-trifluoroetilamina es un reactivo el cual se enlaza al silano de la misma manera que lo hace un péptido (por el grupo amina). Además posee la particularidad de presentar flúor en su estructura siendo fácilmente detectable por la técnica ToF-SIMS. El resultado es dado como el ratio de la intensidad del pico de estudio (pico de flúor) y la intensidad de un pico de referencia (pico OH).

3.- XPS: Las muestras fueron analizadas mediante XPS para detectar la presencia de péptido en la superficie y el carácter covalente del enlace en el Instituto de Nanociencia de Aragón (Laboratorio de caracterización de nanoestructuras). Los resultados se calculan en forma de ratio N/Ti detectado en superficie, ya que sólo el péptido contiene nitrógeno. Como muestras de estudio se han preparado tres discos de titanio silanizados sumergiendo dos de ellos en una solución de carbonato de sodio (0,5mg/ml) durante 12 horas y 24 horas respectivamente. Como muestra de control se ha optado por una muestra de titanio limpia.

Funcionalización

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 previamente silanizadas durante 12 horas en una solución de carbonato de sodio (0,5mg/ml) y el péptido de trabajo con una concentración total de 450µg/ml. Tras el baño las muestras fueron lavadas 2 veces con agua mili-Q.

Se estudió la unión del péptido con el silano de la superficie de la muestra por dos técnicas diferentes:

1.- Fluorescencia: han sido silanizadas varias muestras de manera que cada una de ellas han estado sumergidas en una solución de péptido fluorescente (5(6)-Carboxifluoresceína-GGGK) de 500 µg/ml los tiempos de 1h, 3h, 5h, 7h, 13h y 15h. Como muestras de control se han sumergido discos de titanio limpios sin silanizar en la misma solución de péptido fluorescente durante 1h, 3h, 5h, 7h, 13h y 15h.

2.- XPS: Las muestras fueron analizadas mediante XPS para detectar la presencia de péptido en la superficie y el carácter covalente del enlace en el Instituto de Nanociencia de Aragón (Laboratorio de caracterización de nanoestructuras). Los resultados se calculan en forma de ratio N/Ti detectado en superficie, ya que sólo el péptido contiene nitrógeno. Las muestras de estudio han correspondido a titanio silanizado sumergido durante 12 horas a una solución de KGRGDS y carbonato de sodio (0,5mg/ml) de concentración final de 450 µg/ml. Como muestras de control se han preparado titanio limpio, titanio silanizado y titanio limpio sumergido durante 12 horas en la solución de KGRGDS y carbonato de sodio (0,5 mg/ml) a una concentración final de 450 µg/ml.

Estudios in vitro

Se realizó un estudio *in vitro* de la adhesión celular de células osteoblásticas de la línea MG63 a muestras funcionalizadas. Se han usado dos péptidos diferentes: KGRGDS y KGGGRGDS, con concentraciones de 450 µg/ml. Las muestras de estudio han sido funcionalizadas con los dos péptidos estudiados y las muestras control corresponden a 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.

Una vez sembradas, se introduce el conjunto de células-probetas de titanio en la incubadora a 310 K durante 3 horas. Pasado el tiempo se extrae el medio de los pocillos y se limpian con PBS/Gly dos veces. Se fijan las células en la muestra de titanio con solución de PFA/PBS durante 15 minutos a 277 K, con limpieza posterior de las muestras dos veces con una solución de PBS/Gly. Una vez parado así el proceso, se ha añadido a cada pocillo un mililitro de una solución de PBS/Gly/azida sódica y se ha dejado el conjunto en la nevera.

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 siguientes fluoróforos:

- Hoetsch: tiñe los núcleos de la célula.
- Faloidin Rodamina R415: tiñe los filamentos de actina de la célula.
- Anticuerpo primario (Antivinculina F3648) y secundario (Alexa fluor 488): tiñe las integrinas.

Para la observación de las muestras teñidas se usó un microscopio de fluorescencia Leica DMRB, con software *Metamorph* (Universal Imaging) con los siguientes parámetros de trabajo:

- Tiempo de adquisición de la imagen: 6000 ms.
- Filtro azul: 333,3 ms.
- Filtro rojo: 666,7 ms.
- Filtro verde: 5250 ms.
- Histograma: 0%-100%.
- ISO 200.

y postprocesado con el software Image-J.

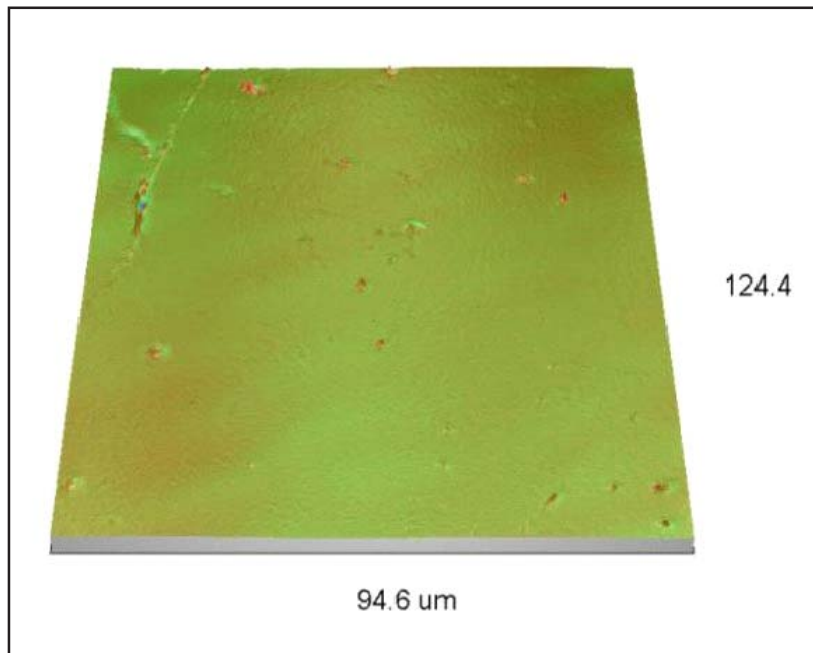


Figura 1

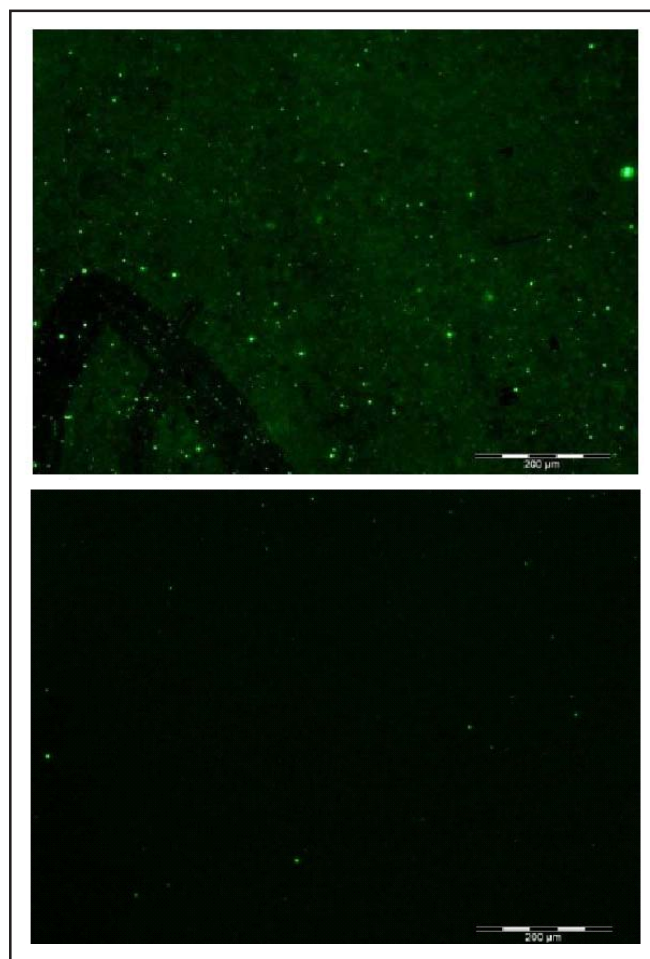


Figura 2. *Superior*- Ti limpio silanizado con CPTES y sumergido durante toda la noche en la solución de péptido-carbonato de sodio a 40 aumentos. *Inferior*-Ti limpio sumergido durante toda la noche en la solución péptido-carbonato de sodio a 40 aumentos

Resultados y discusión

Rugosidad

La media de rugosidad de las muestras pulidas en superficie fue de $Sa=17,42 \pm 2,29\text{nm}$ (Figura 1).

Silanización

La medida de la intensidad media de fluorescencia de las muestras analizadas muestra una clara diferencia en la medida de la muestra control (5,05 A) y la muestra tratada con silano CPTES y péptido marcador (12,93 A) (Figura 2).

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 y marcador fluorado (Figura 3).

La técnica de XPS muestra un ratio Ti/Cl para la muestra de control de 0. En el caso de las muestras de estudio los resultados obtenidos han sido de 0,16 para la muestra silanizada, 0,24 para la muestra silanizada y sumergida durante 12 horas en la solución de carbonato de sodio, y 0,16 en la muestra sumergida durante 24 horas en la solución de carbonato de sodio (Figura 4).

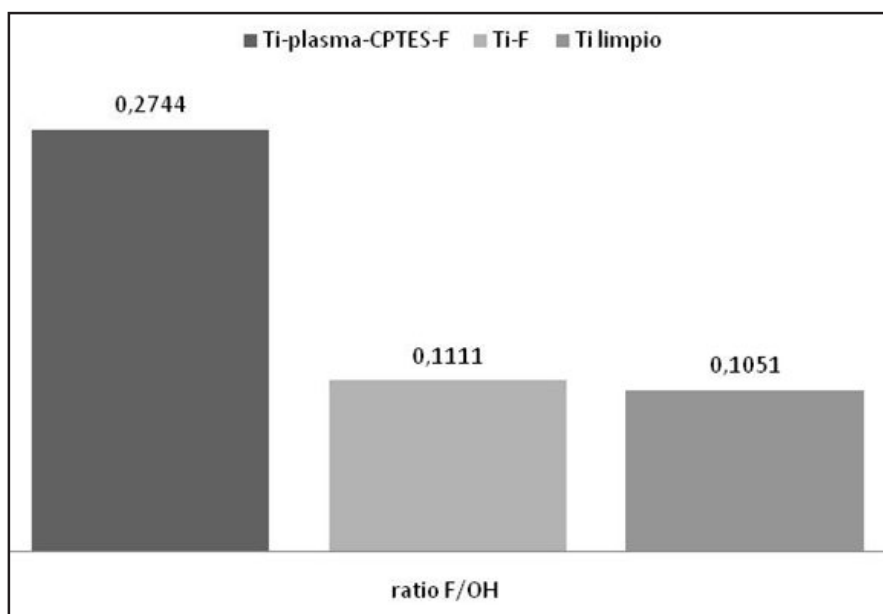


Figura 3

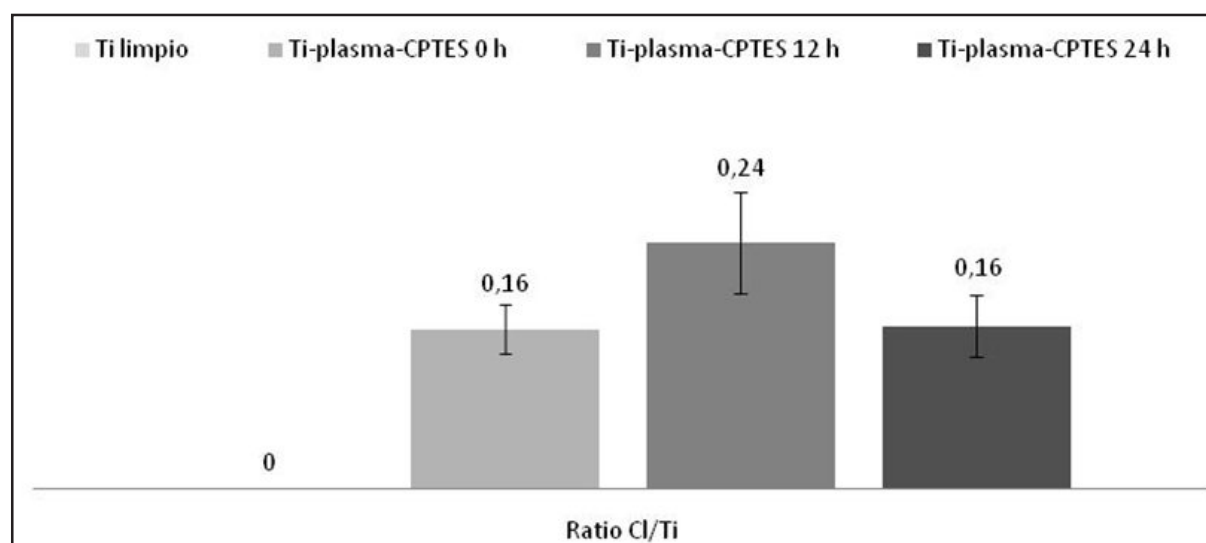


Figura 4

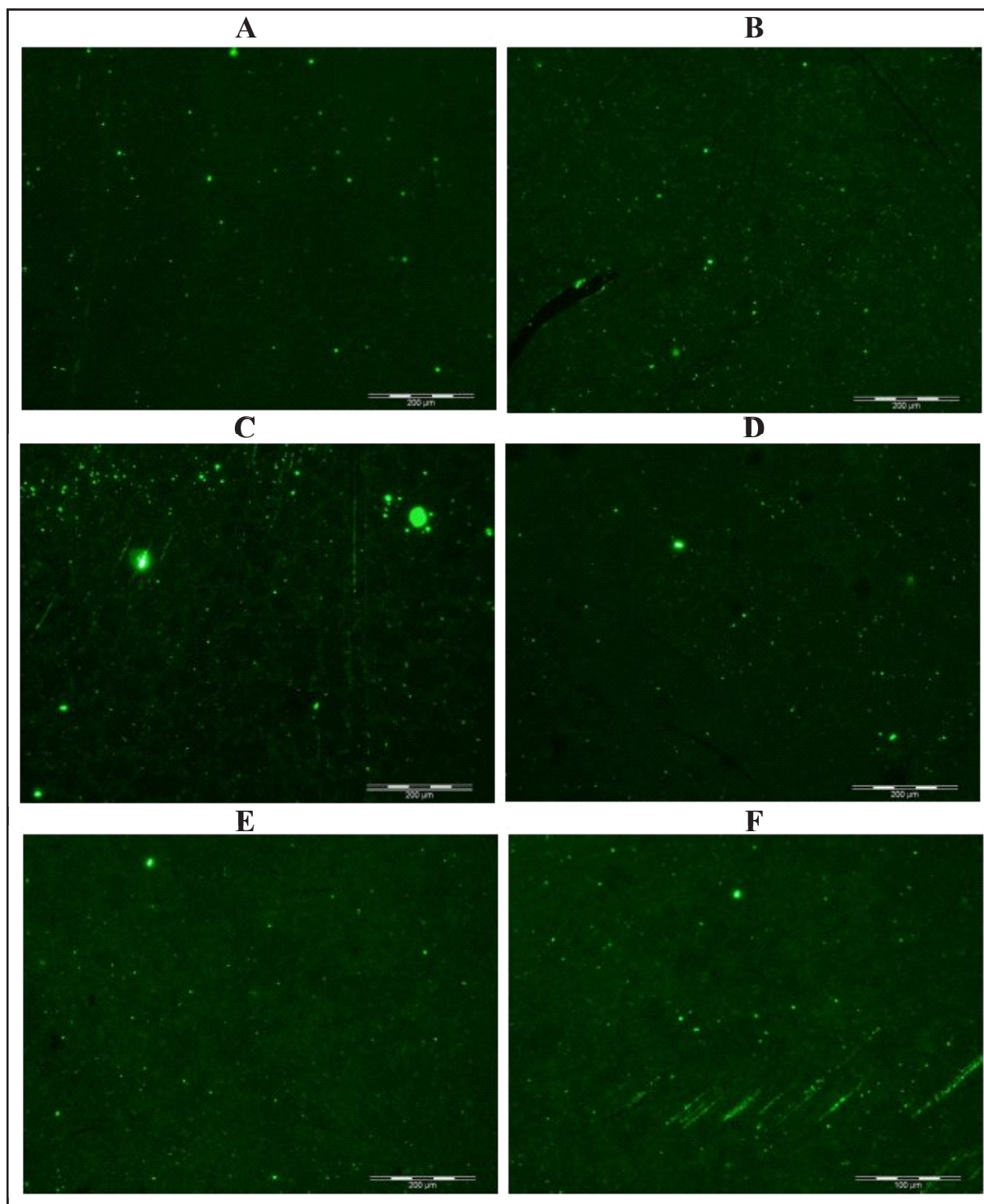


Figura 5.

- A) Titanio limpio silanizado con CPTES y sumergido durante 1 hora en la solución péptido-carbonato de sodio a 10 aumentos.
- B) Titanio limpio silanizado con CPTES y sumergido durante 3 horas en la solución péptido-carbonato de sodio a 10 aumentos.
- C) Titanio limpio silanizado con CPTES y sumergido durante 5 horas en la solución péptido-carbonato de sodio a 10 aumentos.
- D) Titanio limpio silanizado con CPTES y sumergido durante 7 horas en la solución péptido-carbonato de sodio a 10 aumentos.
- E) Titanio limpio silanizado con CPTES y sumergido durante 13 horas en la solución péptido-carbonato de sodio a 10 aumentos.
- F) Titanio limpio silanizado con CPTES y sumergido durante 15 horas en la solución péptido-carbonato de sodio a 10 aumentos.

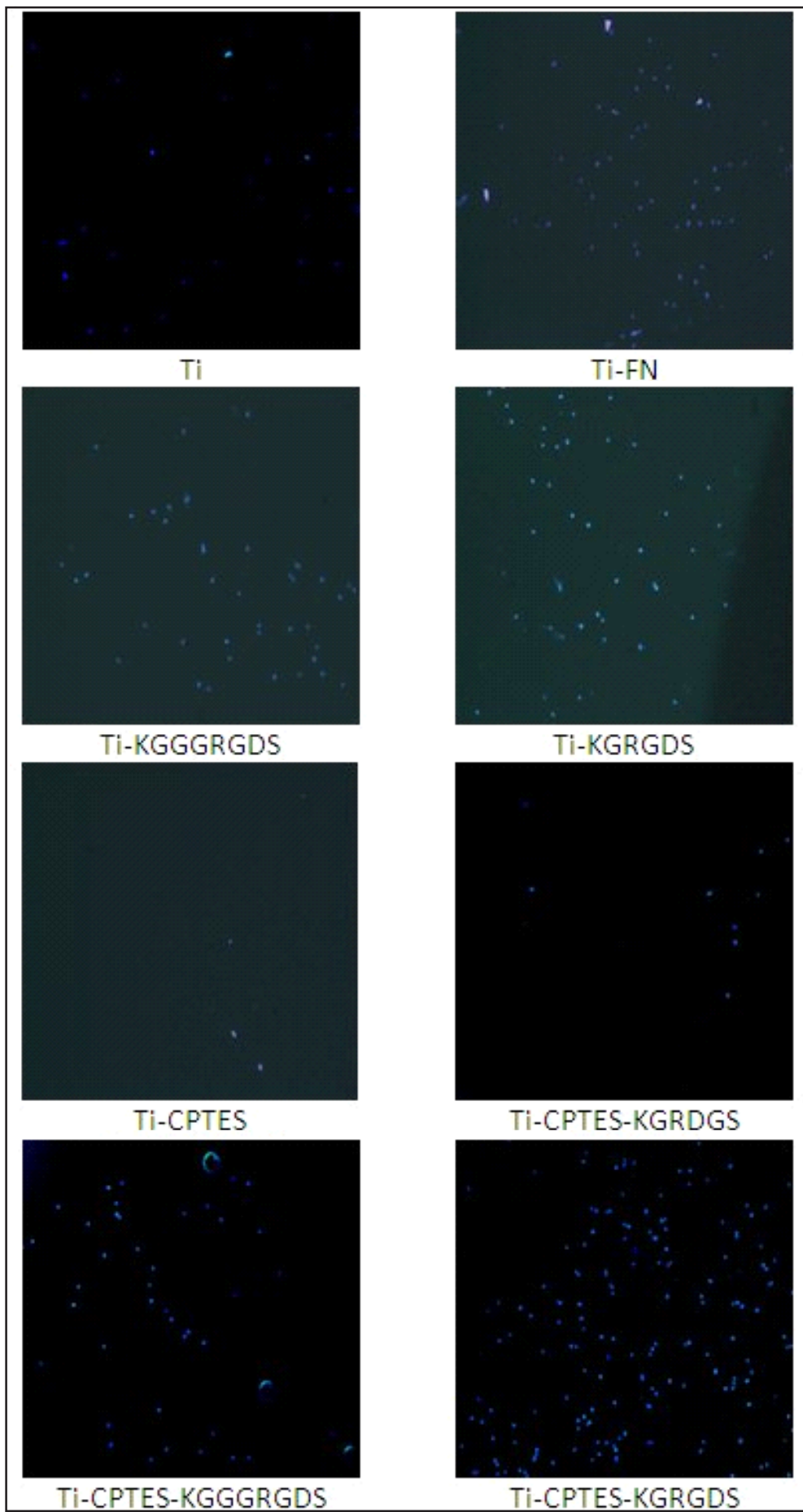


Figura 7

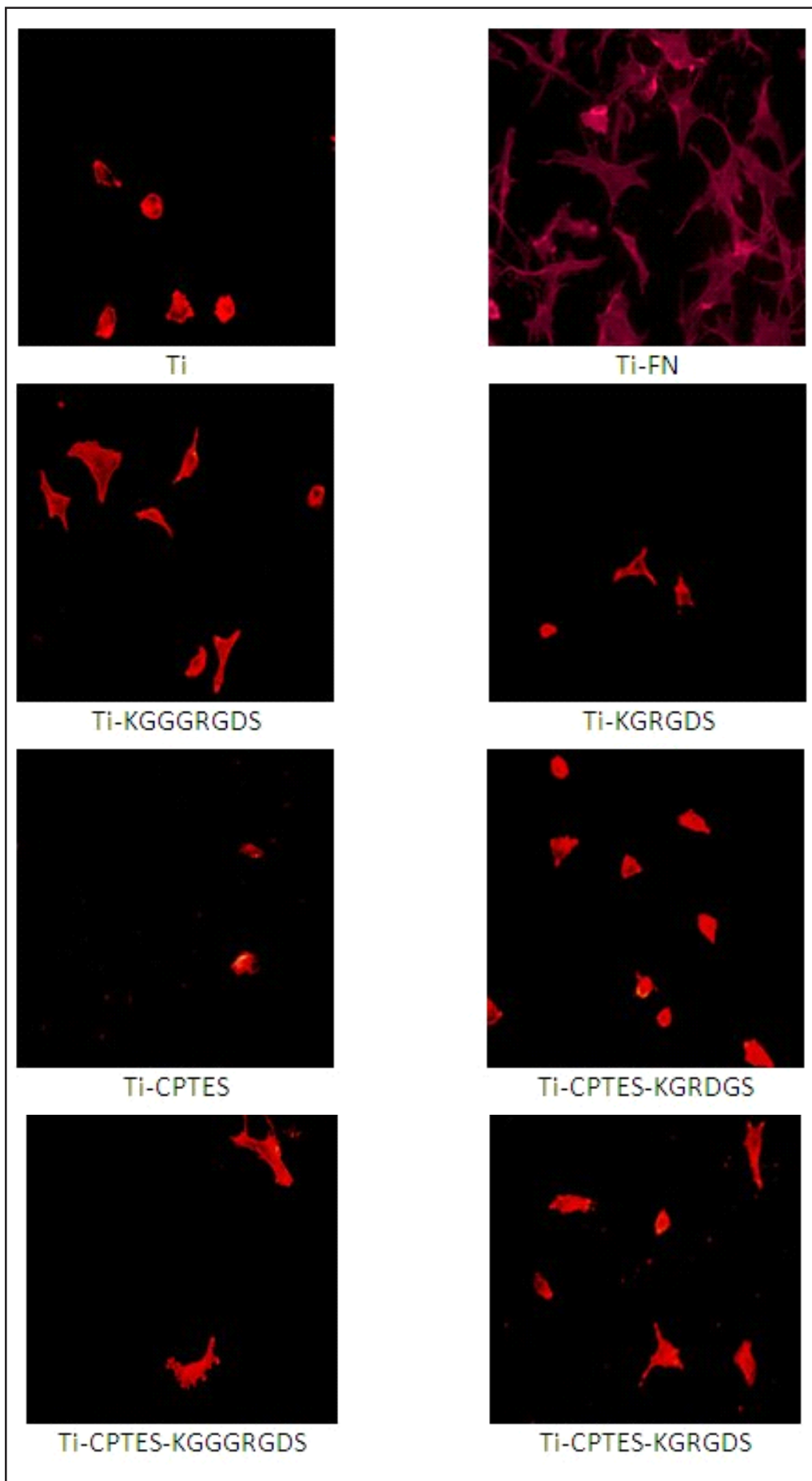


Figura 8

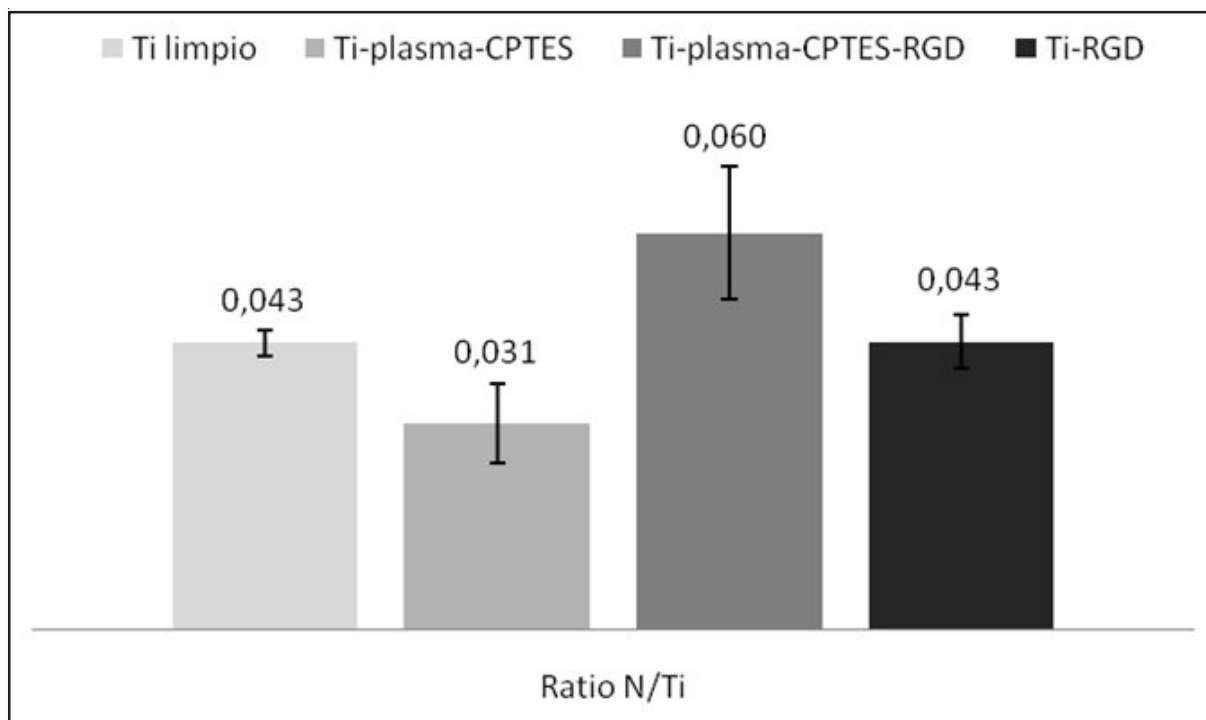


Figura 6

Los resultados procedentes de la técnica de ToF-SIMS y de fluorescencia muestran la formación de un enlace estable entre el silano CPTES y la superficie de titanio. El XPS deja ver que dicho enlace también es estable con el tiempo.

Funcionalización

La intensidad de la fluorescencia emitida por las muestras de estudio ha variado siendo de 11,03; 13,35; 10,51; 10,45; 14,18 y 14,96 A en los tiempos de 1, 3, 5, 7, 13 y 15 horas. Éstas presentan una diferencia de intensidad de fluorescente con sus muestras control siendo su intensidad del orden de 5 A (Figura 5).

El análisis por XPS de la unión péptido-silano muestra claras diferencias entre las muestras control (media N/Ti=0,043) y las muestras funcionalizadas (media N/Ti=0,060) (Figura 6).

Estos resultados demuestran la presencia de péptido unido al silano.

Estudios in vitro

Los resultados de los estudios de adhesión in vitro muestran una clara diferencia entre las muestras control (657,3 cel/cm²), muestras funcionalizadas con KGRGDS (1278,6 cel/cm²) y

muestras funcionalizadas con KGGGRGDS (847,8 cel/cm²) (Figura 7).

La medición del área promedio de las células en cada muestra arroja resultados igualmente diferenciados entre las muestras control (661,0 cm²), y las muestras funcionalizadas con KGRGDS (770,4 cm²) y muestras funcionalizadas con KGGGRGDS (927,6 cm²) (Figura 8).

Conclusiones

- Se ha podido comprobar que el silano que genera un enlace estable sobre la superficie de titanio mediante fluorescencia, ToF-SIMS y XPS. El enlace silano-péptido se ha estudiado mediante fluorescencia y XPS, mostrándose su estabilidad.

- Los ensayos de adhesión de células osteoblásticas MG63 sobre las superficies de titanio funcionalizadas muestran un claro incremento, en comparación con muestras control de titanio sin tratar, tanto en el número de células adheridas como en su área expandida sobre el material.

Estos resultados sugieren que implantes de titanio biofuncionalizados con el proceso estudiado puedan tener respuestas mejoradas respecto a las superficies actualmente empleadas.