

ÍNDIX MEMÒRIA

Índex memòria	1
Vist i plau d'autorització de defensa del TFG	iError! Marcador no definido.
Resum	5
Resumen.....	5
Abstract	6
Agraïments.....	6
Capítol 1: Objectius	7
Capítol 2: Estat de l'art.....	8
2.1. Implants dentals.....	8
2.2. Titani	10
2.2.1. Característiques físiques.....	10
2.2.2. Característiques mecàniques.....	11
2.2.3. Característiques químiques	11
2.2.4. Limitacions.....	11
2.3. Osteointegració	12
2.3.1. Fonaments de l'osteointegració	12
2.3.2. Mecanisme de l'osteointegració	12
2.3.3. Formació de l'os a l'implant	14
2.3.4. Tractaments superficials.....	15
2.4. Pèptid RGD	16
2.5. Creació del film bacterià	18
2.5.1. Introducció.....	18
2.5.2. Procés de creació del biofilm bacterià	18
2.5.3. Estratègies per reduir el biofilm bacterià	20
2.6. Pèptid hlf1-11	22
2.8. Pèptid MH13.	23
Capítol 3: Metodologia.....	25
3.1. Preparació de mostres	25
3.1.1. Adquisició de les mostres	25
3.1.2. Embotició en baquelita	26
3.1.3. Procés de polit	26

3.1.4.	Extracció de les mostres de la baquelita	27
3.1.5.	Rentat de les mostres de titani.....	28
3.2.	Tractament químic i funcionalització de la superfície de titani	28
3.2.1.	Activació amb àcid nítric.....	29
3.2.2.	Silanització APTES	29
3.2.3.	Funcionalització de la superfície de titani.	31
3.3.	Caracterització fisicoquímica.....	32
3.3.1.	Angle de contacte.....	32
3.3.2.	Interferometria	35
3.3.3.	SEM	35
3.3.4.	XPS.....	36
3.4.	Caracterització biològica cel·lular	36
3.4.1.	Introducció als cultius cel·lulars	36
3.4.2.	Preparació prèvia als assaigs.....	37
3.4.3.	Assaig d'adhesió cel·lular.....	40
3.4.4.	Assaig immunohistoquímic.....	42
3.5.	Caracterització biològica bacteriana	43
3.5.1.	Introducció als cultius bacterians	43
3.5.2.	Preparació prèvia a l'assaig.....	44
3.5.3.	Assaig d'adhesió bacteriana	46
3.6.	Anàlisi estadístic	47
Capítol 4: Resultat i discussió.....		48
4.1.	Condicions d'estudi	48
4.2.	Interferometria.....	49
4.4.	SEM.....	55
4.5.	XPS	57
4.6.	Assaig d'adhesió cel·lular	58
4.7.	Assaig d'adhesió bacteriana.....	62
Capítol 5: Anàlisi de l'impacte ambiental		65
Capítol 6: Conclusions		66
Capítol 7: Bibliografia		67
7.1.	Referències bibliogràfiques.....	67
7.2.	Bibliografia consultada.....	69

RESUM

Tot i que actualment els implants dentals de titani tenen un baix percentatge de fallada, encara hi ha diverses causes que poden provocar dificultats. Dues de les causes més rellevants i comunes són la baixa velocitat d'osteointegració i la creació de film bacterià a la superfície de l'implant.

Per tal de millorar aquestes dificultats s'ha demostrat que diferents pèptids com l'RGD, són capaços de millorar l'osteointegració i altres com la hLf1-11 reduir l'adhesió bacteriana. Fins a la data, aquestes dificultats s'han tractat de forma separada. Actualment, però, hi ha diverses investigacions que estudien poder combinar aquestes dues estratègies per poder resoldre els problemes de forma simultània. Una d'aquestes estratègies és l'adhesió sobre la superfície de titani d'una plataforma dual que contingui els pèptids que realitzen la funció desitjada.

En el aquest projecte es vol, mitjançant diverses caracteritzacions físiques, químiques i biològiques de la superfície del titani, demostrar la funcionalitat d'una plataforma dual amb els pèptids RGD i hLf1-11.

RESUMEN

A pesar de que actualmente los implantes de titanio tienen un porcentaje de fallida muy bajo, existen diferentes causas que pueden provocarla. Dos de estas causas son la baja velocidad de osteointegración y la creación de un biofilm bacteriano sobre la superficie de dicho implante.

Con el objetivo de mejorar estas dos dificultades, se ha demostrado que diferentes péptidos, tales como el RGD, tienen la capacidad de mejorar la velocidad de osteointegración y otros como la hLf1-11 de reducir la adhesión bacteriana. Hasta la fecha, estos problemas se han tratado de forma separada. En la actualidad, pero, hay varias investigaciones que estudian poder combinar estas dos estrategias para poder resolver estos problemas de forma simultánea. Una de estas estrategias consiste en la adhesión de una plataforma dual con dos péptidos encima de la superficie de titanio.

El objetivo de este proyecto es demostrar, mediante diferentes pruebas físicas, químicas y biológicas de la superficie, que esta plataforma con los péptidos RGD y hLf1-11 es funcional.

ABSTRACT

Dental implants currently have a very low percentage of failure. Despite this, there are many factors which can provoke such failure. The low velocity of osseointegration and the creation of a bacterial biofilm in the surface of this implant are two of these causes.

To overcome these difficulties it has been proved that different peptides like RGD are able to improve osseointegration and others like hLf1-11 are able to reduce bacterial adhesion. Until now, these problems have been investigated separately. Nowadays, but, there are current investigations which are studying how to simultaneously overcome both problems combining these two strategies. One of these strategies is the adhesion on the titanium surface of a dual platform with both peptides which do the required function.

The aim of this project is to prove, going through different physical, chemical and biological characterizations of the titanium surface, the correct functionality of a dual platform with the peptides RGD and Lhf1-11.

AGRAÏMENTS

A en Carles per haver-m'ho ensenyat tot. Per la infinita paciència i per tot el temps dedicat. Per haver-me guiat i aconsellat des del principi i fer que aquest projecte hagi estat tant enriquidor i il·lusionant com ha sigut.

A en Daniel, per haver-me obert les portes del laboratori i permetre'm descobrir aquest món tant fascinant.

A la Mireia per haver-me deixat formar part del seu projecte. Per la seva ajuda, els seus consells, la seva disposició i el temps dedicat, sempre amb un somriure i una vitalitat encomanadisses.

A tots i cadascun dels treballadors, investigadors, doctorands i projectistes del grup de BiBiTe, que sempre han estat disposats a resoldre els dubtes que m'han anat sorgint i que han fet que des del primer dia em sentís molt còmode treballant al seu costat.

Als meus amics i familiars, que sempre m'han animat i m'han ajudat a tirar endavant el projecte.

Gràcies a tots.

CAPÍTOL 1: OBJECTIUS

L'objectiu del projecte és la funcionalització i la demostració de la viabilitat d'una superfície de titani amb una plataforma dual amb dos pèptids, el RGD i la seqüència de la lactoferrina 1-11, per tal de millorar simultàniament el procés d'osteointegració i reduir l'adhesió bacteriana d'un implant dental. Per assolir aquest objectiu, haurem de:

- Tractar les superfícies de titani, per poder realitzar i obtenir mostres control dels passos mes rellevants.
- Funcionalitzar la superfície de titani amb el pèptid RGD i el pèptid de la Lactoferrina per separat i com a plataforma.
- Comparar els resultats obtinguts entre les mostres control de cada procés, les mostres funcionalitzades amb el pèptid RGD, el pèptid hLf1-11 i la plataforma dual.
- Realitzar assaigs cel·lulars i bacterians amb la finalitat de demostrar la funcionalitat de la plataforma.

CAPÍTOL 2: ESTAT DE L'ART

Actualment els implants dentals i pròtesis ortopèdiques són, majoritàriament, fets de titani o aliatges d'aquest material. Això succeeix perquè el titani és un element biocompatible, és a dir, que els teixits del cos humà no presenten reaccions malignes o al·lèrgiques quan entren en contacte amb aquest material. Aquest fet succeeix pel fet que el titani és un material que s'oxida ràpid, creant una capa d'òxid de titani molt estable i inert, que impedeix l'alliberació d'ions i que provoca que aquests ions no entrin en contacte amb les molècules del cos. A més a més, el titani té una duresa, una lleugeresa i una resistència mecànica adient, i que fan que sigui un material ideal per a poder ser usat com a pròtesis ja que permet suportar unes càrregues elevades.

Els implants dentals tenen dos problemes. El primer és la baixa velocitat d'osteointegració. És a dir, la baixa velocitat en què s'adhereixen i creixen les cèl·lules òssies per tal de fixar l'implant. El segon, és el film bacterià que es forma al voltant de l'implant abans o durant del procés d'osteointegració. Aquest film provoca una pèrdua de fixació i afecta l'estabilitat de l'implant augmentant la probabilitat de fallida.

Per tal d'entendre més bé què comporten aquests problemes, tant per l'implant com per al pacient i què signifiquen, aprofundirem més en aquests punts.

2.1. Implants dentals

Un implant és un dispositiu mèdic amb la funció de reemplaçar alguna estructura biològica faltant o danyada o millorar una estructura biològica existent. La superfície d'aquest implant interacciona amb els teixits corporals, i per tant necessita ser d'un material que sigui biocompatible. Alguns exemples de materials biocompatibles són el titani, la silicona o l'apatita.

Un implant dental és un dispositiu mèdic, generalment de titani i amb forma roscada que es col·loca a la geniva i en contacte amb l'os amb la finalitat de substituir l'arrel de la dent, i així donar suport a les futures dents artificials que aniran col·locades sobre aquest cargol.



Figura 1. Relació entre l'arrel de la dent i l'implant dental

Hi ha dues classes d'implants dentals principals: els juxtaossis i els endoossis.

Els juxtaossis són aquells que no penetren l'os. Són introduïts sota la mucosa i es troben en contacte amb la mandíbula o la mucosa. Són majoritàriament de crom-cobalt-molibdè i recoberts de ceràmica o carboni.

Per altre banda els endoossis són aquells que penetren l'espessor de l'os. Aquests implants són generalment fets de metalls, encara que també poden ser d'altres elements com ceràmics o materials orgànics o semi-orgànics.

En el nostre projecte s'intentarà simular el comportament d'un implant endoossi.

Els implants dentals endoossis tenen diversss tipus de morfologia. Els més habituals són els implants roscats. És a dir un cilindre roscat, amb una forma similar a la d'un cargol. D'aquesta manera la rosca aconsegueix augmentar la superfície de contacte entre l'implant i l'os. Un altre classe d'implant endoossi molt utilitzat és el de làmina, el qual permet el creixement de l'os a través de l'implant. S'utilitzen en casos on es vulgui col·locar un implant dental, però l'os sigui massa poc ample per col·locar-hi un implant cilíndric.

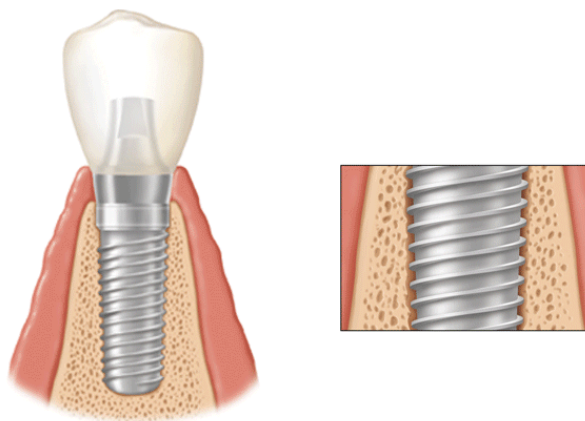


Figura 2. Implant dental roscat

Els implants dentals, generalment, són fets de titani. No obstant, hi ha altres metalls que també són vàlids, com el tàntal o la zircònia. A part dels metalls purs, els aliatges també són un material molt freqüent en la implantologia dental. L'aleatge crom-cobalt i l'acer inoxidable són els més utilitzats. Aquests segons poden ser un aliatge de ferro-crom-carboni o un aliatge de crom-níquel-ferro. No obstant, la majoria d'aquests materials presenten desavantatges en respecte al titani o en els processos de fabricació.

Cal remarcar que les ceràmiques i inclús alguns polímers, com el polietilè o el metacrilat, també poden ser usats, tot i que actualment pràcticament ja no s'utilitzen degut a que pateixen degradació en cas de les ceràmiques i depolimerització en cas dels polímers.

2.2. Titani

El titani és un element químic amb el número atòmic 22 de color gris platejat. Les característiques del titani, el fan un dels metalls més utilitzats en diverses aplicacions. El titani és un metall inert, ja que forma una capa d'òxid que és indissoluble, i per tant impedeix que s'alliberin ions que entren en contacte amb les molècules orgàniques del cos. A més, el titani permet que l'os creixi i s'enganxi al seu voltant. És a dir, és propici a la osteointegració. És per això que s'utilitza el titani en aplicacions mèdiques.

El titani, a part de la seva biocompatibilitat és un material ideal per ser utilitzat per els implants dentals ja que té una alta estabilitat química. A més, la seva duresa permet suportar càrregues elevades que es formen al mastegar i té un mòdul elàstic semblant al de l'os. A més el titani té una gran resistència a la corrosió i és hidrofílic. A continuació presentem algunes propietats més específiques del titani.

2.2.1. Característiques físiques

El titani té una densitat de 4507 kg/m^3 . Per fer-nos una idea aproximada, podem comparar aquesta densitat amb la d'altres metalls més coneguts o utilitzats en l'àmbit quotidià; amb la del plom (11340 kg/m^3), amb la de l'or (19320 kg/m^3), amb la del ferro (7870 kg/m^3) o amb la de l'alumini (2700 kg/m^3). Podem observar com la densitat del titani es relativament baixa, un cop comparada amb la densitat d'altres metalls.

De la mateixa manera, el titani és un element amb un alt punt de fusió (1.675°C). Ho podem veure si ho comparem amb els metalls amb els quals hi hem comparat la seva densitat. El ferro (1.538°C), l'or (1.064°C), el plom (327°C) i l'alumini (660°C). Es pot observar com tot i tenir la densitat menys elevada té el punt de fusió més elevat.

Cal destacar que el titani és un metall que posseeix una baixa capacitat tèrmica i elèctrica.

A més, el titani és un material del qual se'n poden formar aliatges amb altres metalls per tal de millorar les seves propietats mecàniques.

2.2.2. Característiques mecàniques

El titani té unes propietats mecàniques adients per a ser tractat. És un material mal·leable, dúctil i dur. A més té una gran tenacitat, és molt resistent a la tracció i permet, tant tractaments superficials com termoquímics.

Tot i aquestes propietats més generals, hi ha diversos graus de titani que tenen diferents característiques en funció de la seva puresa. No obstant, el titani que s'utilitza majoritàriament és el de grau 2, o comercialment pur. Aquest grau de titani presenta les característiques següents:

Taula 1. Característiques mecàniques del titani de grau 2 o comercialment pur (c.p.) segons la norma ISO 5832-2.

Resistència a la tracció	345 MPa
Límit elàstic	275 MPa
Ductilitat	20%
Duresa	82 HRB
Resistència elèctrica	0,56 $\mu\Omega\text{m}$

2.2.3. Característiques químiques

El titani pateix passivació. És a dir, a l'entrar en contacte amb l'ambient, s'oxida tot creant una capa d'òxid de titani que fa que el titani obtingui una elevada estabilitat i una elevada resistència a la corrosió. Aquesta capa d'òxid fa que el titani sigui un material biocompatible.

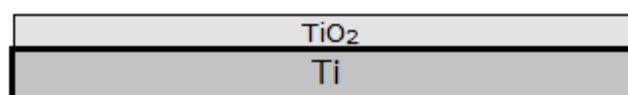


Figura 3. Passivació del titani

Degut a aquesta capa, el titani no interacciona amb els teixits del cos humà i fa que el titani sigui inert, no tòxic i sigui compatible amb els teixits del cos humà. Aquesta biocompatibilitat que presenta el titani, és un dels motius principals pels quals aquest material és tan usat en el camp de la implantologia.

2.2.4. Limitacions

Tot i que el titani és biocompatible i amb unes característiques adients per a ser utilitzat en implantologia, aquest material també té certes limitacions. Tal i com s'ha exposat amb anterioritat, aquest biomaterial és inert, fet que implica que no interaccioni amb els teixits del cos humà i no pugui crear enllaços entre l'implant i el teixit circumdant fet que provoca que no interaccioni amb l'ós. Aquest fet provoca que la velocitat de regeneració de l'ós a sobre de l'implant sigui lenta.

Un altre dels problemes que poden patir els implants dentals de titani és la creació d'un biofilm bacterià. Aquest biofilm es crea a la superfície de contacte entre l'implant i la geniva, fent que aquest implant pugui patir fallida.

Aquestes dos limitacions del titani, són les que es tractaran de resoldre en aquest projecte i que a continuació s'explicaran més detalladament.

2.3. Osteointegració

2.3.1. Fonaments de l'osteointegració

L'osteointegració és la connexió ferma, estable i duradora entre un implant subjecte a càrrega i l'os que l'envolta (Branemarck, 1983). Quan un implant s'insereix a l'os, es crea la interfase os-implant, una zona d'unió entre la superfície del biomaterial de l'implant i l'os circumdant. La cicatrització d'aquesta interfase, o altrament dit, el procés d'osteointegració, depèn principalment de les condicions biològiques de l'os, de les característiques del disseny de l'implant, del sistema del pacient, de la distribució de càrregues entre l'os i l'implant, de la resposta immunitària del pacient, el procediment d'inserció i de les característiques fisiològiques de l'os receptor entre moltes altres ¹.

L'os es caracteritza per 4 components microestructurals:

- Les cèl·lules òssies: els osteoblasts, responsables de la formació del teixit ossi; els osteòcits, osteoblasts madurs envoltats de matriu mineralitzada; i els osteoclasts, cèl·lules encarregades de la reabsorció de l'os.
- La matriu orgànica: representa el 35% del pes sec de l'os. El col·lagen és el seu principal component (90%). El 10% restant correspon a proteïnes no col·lagèniques com per exemple les glicoproteïnes.
- La matriu inorgànica: És el component mineralitzat i correspon al 60-65% del pes en sec de l'os. En aquesta matriu hi podem trobar el calci, el magnesi, el fòsfor, el sodi...
- Els factors solubles de senyal: Aquests factors corresponen a les proteïnes morfogèniques (BMP)

Com que l'os es troba en una dinàmica constant de creixement, deposició i resorció, permet que després d'una lesió, com podria ser la inserció d'un implant, aquest es pugui regenerar o cicatritzar i pugui recuperar les seves propietats i funcions amb normalitat. Aquest procediment s'anomena cicatrització.

Aquesta cicatrització és activada per qualsevol lesió de la matriu mineralitzada de l'os. Quan aquesta matriu està exposada a fluids extracel·lulars, una sèrie de proteïnes, enzims i factors de creixement són activats per tal de poder formar l'os. Les cèl·lules de la matriu òssia i de l'os adjacent, atretes químicament, envaeixen el lloc de la lesió, proliferant i diferenciant-se en cèl·lules que recuperen anatòmicament i funcionalment els teixits lesionats.

2.3.2. Mecanisme de l'osteointegració

El procés biològic de formació de la interfase os-implant dental està relacionat amb el procés de cicatrització d'una fractura. Aquest procés consta de 4 etapes.

- 1- Formació de l'hematoma
- 2- Degradació del coàgul i neteja de la ferida
- 3- Formació del teixit granular
- 4- Formació de la matriu òssia
 - a. Osteoinducció: reclutament de cèl·lules mare que són estimulades a proliferar com a cèl·lules formadores de la matriu òssia
 - b. Osteoconducció: desplaçament de les cèl·lules al llarg de la superfície de l'implant.
 - c. Formació del nou os: inicialment el coàgul serà substituït per teixit connectiu i cèl·lules osteogèniques. A continuació la calcificació de la matriu extracel·lular donarà lloc a la formació d'os nou.
 - d. Remodelatge ossi: llarg període de curació fins que l'implant acaba envoltat per l'os.

Durant el procés quirúrgic d'inserció d'un implant dental és comú que es presenti sagnat degut a la lesió causada sobre els teixits. Aquest sagnat és el punt de partida d'una cadena d'esdeveniments biològics que acaben amb la osteointegració i la interfase os-implant.

Resumint les primeres etapes, el primer pas és el sagnat i la coagulació de la ferida, tot formant un coàgul o un hematoma. Posteriorment, aquest coàgul es degrada, fet que permet la recuperació de l'estructura vascular i la formació d'una nova estructura fibril·lar (teixit granular). A partir d'aquest teixit granular comença la migració i la diferenciació de les cèl·lules osteoprogenitores que finalment restauren la matriu òssia mineralitzada. ¹.

Per tal d'entendre millor aquestes fases i per tal de relacionar-ho al màxim possible amb el nostre projecte, ens centrarem en explicar el procés de formació de la matriu òssia, que és el que nosaltres simularem a partir de les cèl·lules osteosarcomàtiques.

Una vegada acabat el procés de recuperació vascular, s'inicia el canvi de la matriu provisional de teixit connectiu sintetitzada per les cèl·lules osteoprogenitores que acaba amb la formació del nou os. L'aparició d'aquestes cèl·lules osteoprogenitores està associada a la diferenciació d'unes certes cèl·lules mares (hematopoiètiques) activades per certes proteïnes morfogèniques de l'os (BMP) produïdes per les cèl·lules mesenquimals i fibroblasts. Posteriorment s'activa un complex de proteïnes (SMAD) que transmeten la senyal de les BMP fins al nucli de les cèl·lules i s'activa el genotip osteogènic, que condueix a la diferenciació final dels osteoblasts, cèl·lules encarregades de secretar els compostos de la nova matriu òssia i regular la seva mineralització ².

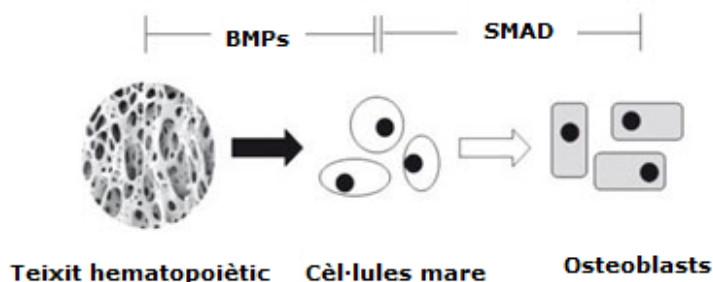


Figura 4. Procés de diferenciació osteoblàstica

Durant el procés de diferenciació dels osteoblasts es poden distingir quatre tipus de cèl·lules: preosteoblasts (precursors osteoblàstics), cèl·lules de recobriment (recobreixen la superfície de l'os), osteoblasts, i els osteòcits (osteoblast madurs que queden immersos a la matriu extracel·lular). En aquest procés de diferenciació, els osteòcits perden la capacitat de sintetitzar matriu òssia. Al quedar immersos a la matriu extracel·lular, els osteòcits adopten una forma estrellada amb extensions citoplasmàtiques. A aquestes extensions, els osteòcits connecten entre si i amb els osteoblasts que rodegen l'os i amb les cèl·lules de recobriment, i es creen gap junctions (o unions gap, unions comunicants o unions de fenedura) entre el citoplasma dels osteòcits i el citoplasma dels osteoblasts. La funció d'aquestes unions es formar una xarxa de cèl·lules a l'interior de la matriu mineralitzada que permet la conversió dels estímuls mecànics externs en senyals bioquímiques que controlen la deposició i la resorció de l'os ³.

2.3.3. Formació de l'os a l'implant

Els implants dentals a la seva superfície han de tenir l'habilitat de suportar les tensions exercides per les cèl·lules que migren sobre la xarxa de fibrina i col·lagen i que restauren els teixits lesionats. S'ha identificat que aquesta superfície ha de tenir una topografia a nivell de micromètrica i nanomètrica, ja que la rugositat és semblant a la de l'os ^{4,5}. Una tractament superficial que creï una topografia d'aquest tipus incrementa l'àrea superficial de contacte entre l'implant dental i els teixits en formació i intensifica l'absorció de proteïnes que estimulen l'activació de les plaquetes, la formació de la xarxa de fibrina i la migració de les cèl·lules osteoprogenitores cap a la superfície de l'implant.

L'èxit de la formació del nou os depèn de dos factors: la osteoconductivitat i la osteoinducció ⁶.

La fibronectina és una proteïna rellevant en els processos d'adhesió cel·lular. Aquesta proteïna està formada per 4 mòduls, que són seqüències d'aminoàcids. En concret, en el mòdul 3 hi trobem la seqüència tripeptídica RGD, que té una gran afinitat per les integrines. Aquestes integrines, receptors de membrana extracel·lulars, reconeixen la seqüència RGD i si uneixen. D'aquesta manera, les cèl·lules es poden adherir a la superfície del titani.

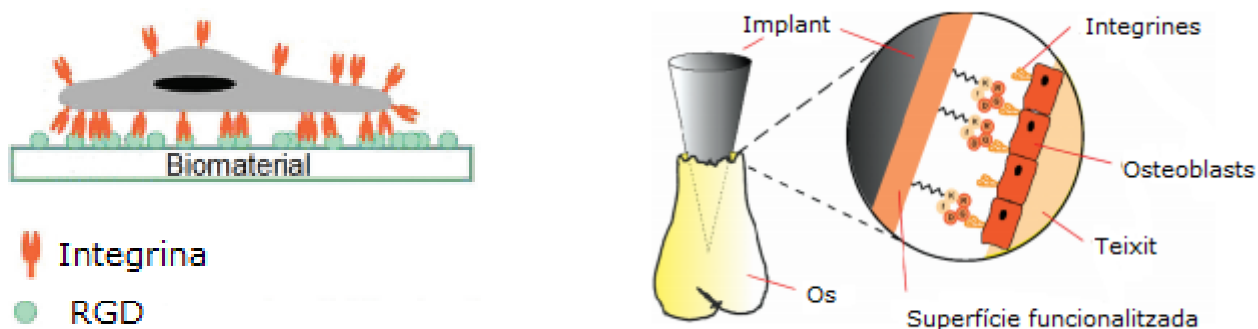


Figura 5. Adhesió cel·lular mitjançant integrines ⁷.

Hi ha una gran varietat de factors que poden millorar la viabilitat de l'implant. Entre altres, els més destacats són el disseny de l'implant, la composició química, la topografia de la superfície, el material, la forma de l'implant, la llargada, el diàmetre, el recobriment i altres tractaments de superfície, etc.

Per contra també hi ha varis factors que ho poden empitjorar. Per exemple una excessiva mobilitat de l'implant, una porositat elevada, la radioteràpia o alguns agents farmacològics. A més, els pacients amb certes malalties com l'osteoporosi, l'artritis o la insuficiència renal, i aquells pacients d'edat avançada, també es poden veure afectats per una baixa capacitat per a formar os nou⁸.

Per obtenir una bona osteointegració és important la estabilitat mecànica de l'implant. És a dir, que entre l'implant i l'os hi hagi una fixació rígida.

2.3.4. Tractaments superficials

El principal problema de l'osteointegració en els implants dentals de titani és la seva baixa velocitat d'osteointegració. És per això que s'apliquen diferents mètodes per tal de millorar aquesta limitació i així, impedir que aquest implant falli i s'hagi d'extreure i tornar a inserir.

Per tal de millorar aquesta osteointegració lenta hi ha varis mètodes de modificacions superficials: les físiques i les químiques.

Modificacions físiques

Les modificacions superficials de caràcter morfològic son un exemple de tractaments físics que permeten millorar l'adhesió cel·lular i així poder reduir el temps d'osteointegració de l'os a l'implant. Diversos estudis han demostrat que la rugositat del titani és un element important en l'adhesió cel·lular⁴.

Un altre mètode que permet millorar l'adhesió cel·lular és augmentar l'energia superficial i la mullabilitat de la superfície, fent-la més hidrofílica. Aquests tractaments impliquen una millora en l'adsorció de les proteïnes⁹. Aquest mètode es realitza amb atacs químics a la superfície del titani, ja sigui amb plasma, amb àcids, com l'àcid nítric, o altres components amb pH bàsic, com l'hidròxid de sodi.

Modificacions químiques

Hi ha dos grans tipus de modificacions químiques: les orgàniques i les inorgàniques.

Les modificacions químiques inorgàniques consisteixen en el recobriment amb hidroxiapatita (fosfat de calci) de la superfície del biomaterial. Els fosfats de calci tenen la mateixa composició química que la fase inorgànica de l'os i a més tenen la capacitat de fer proliferar i diferenciar els osteoblasts a la superfície del titani.

Les modificacions químiques orgàniques consisteixen en el recobriment del material a partir de biomolècules com proteïnes existents a la matriu extracel·lular o pèptids d'aquestes proteïnes. Aquestes biomolècules, però, tenen la dificultat que necessiten altres tractaments i processos per poder-les enllaçar amb la superfície del biomaterial.

Per tal de poder immobilitzar aquestes biomolècules existeixen dos mètodes principals: la fisisorció i l'enllaç covalent.

La fisisorció és el procés d'adsorció física de les biomolècules a la superfície del biomaterial mitjançant enllaços dèbils. Aquest mètode no dona una unió estable de la biomolècula i no en permet el control de la seva deposició.

El mètode d'immobilització de biomolècules per enllaç covalent consisteix en una reacció entre grups reactius de la biomolècula a immobilitzar i els grups reactius de la superfície sòlida. Per tant, la immobilització mitjançant enllaços covalents requereix la presència de grups funcionals adequats tant a la superfície sòlida del biomaterial com a la biomolècula.

En el nostre projecte utilitzarem el mètode de l'immobilització per enllaç covalent a partir de la silanització.

A més, en el nostre projecte no utilitzarem proteïnes, sinó pèptids, degut a que les proteïnes tenen certs desavantatges, que es poden minimitzar amb l'ús de pèptids derivats de la mateixa proteïna. Per exemple, les proteïnes poden presentar una selectivitat i especificitat baixes, i tenen riscos d'inflamació i d'infecció. En canvi els pèptids, tenen una especificitat més alta i són més estables al pH i a altes temperatures. També es poden adherir en major quantitat a les superfícies dels biomaterials.

Per tal de poder sintetitzar aquests pèptids que s'utilitzaran per millorar certes característiques de la superfície del titani, es seguirà l'esquema següent:



Figura 6. Esquema general de l'estructura dels pèptids.

2.4. Pèptid RGD

La fibronectina, l'osteopontina i la vitronectina són unes de les glicoproteïnes més rellevants en els processos d'adhesió cel·lular. En el cas de la fibronectina, que és la més coneguda i la que utilitzarem com a control en aquest projecte, esta formada per dues cadenes unides per ponts disulfur. Aquesta, es troba localitzada a la superfície de les cèl·lules i és elaborada pels fibroblasts.

La fibronectina s'uneix a les cèl·lules pels seus receptors: les integrines. Les integrines son glicoproteïnes formades per cadenes alfa i beta que travessen la membrana. Les porcions extracel·lulars de les integrines, són les que reconeixen la seqüència RGD i permeten la unió de la proteïna amb la cèl·lula.

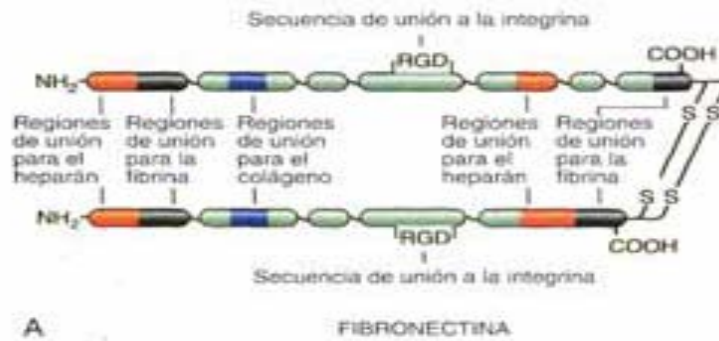


Figura 7. Seqüència de la fibronectina i ubicació del pèptid RGD.

La seqüència RGD és una cadena tripeptídica extreta de la fibronectina i altres proteïnes de la matriu extracel·lular, formada pels aminoàcids arginina, glicina i àcid aspàrtic. Per tal que aquest pèptid RGD sigui funcionalitzable i es pugui adherir a la superfície de titani mitjançant el crosslinker, caldrà una modificació d'aquest pèptid.

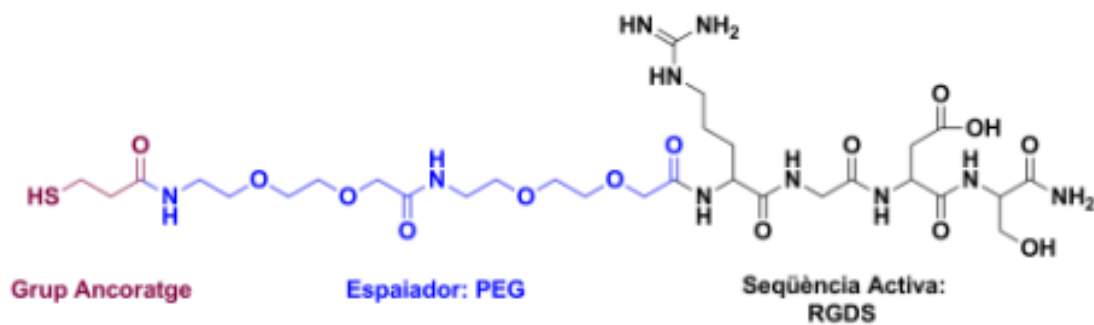


Figura 8. Pèptid RGD

Podem observar com hi ha tres elements distintius en la cadena peptídica:

- Grup d'ancoratge: És el grup que s'unirà a la superfície del titani. En aquest cas es tracta d'un grup tiol (SH).
- Grup espaiador: Assegura la correcta orientació i accessibilitat de la seqüència activa per a la interacció biològica. En el nostre pèptid aquest espaiador consisteix en una cadena curta de polietilenglicol.
- Seqüència bioactiva: Aquesta és la posició a on es troba el conjunt d'aminoàcids que formen el pèptid RGD, necessaris per a l'activitat biològica.

L'efecte de promoció de l'adhesió cel·lular i la seva funcionalització en superfícies de titani d'aquesta seqüència peptídica ja ha estat demostrat en múltiples estudis ^{10, 11, 12}.

2.5. Creació del film bacterià

2.5.1. Introducció

És sabut que a la cavitat oral hi ha un ecosistema microbià molt elevat, que ronda les 700 espècies de bacteris i on les poblacions polimicrobianes són les més freqüents.

A part d'aquesta gran diversitat, l'ecosistema de la cavitat oral està caracteritzat per la successió (el mateix ecosistema va regenerant els organismes que el formen), per les pertorbacions naturals, successos naturals que alteren l'estructura d'un cert ecosistema), pels matisos biogeogràfics i per la interacció amb els teixits del pacient i les seves secrecions.

L'ecosistema de la cavitat bucal es pot caracteritzar també, per la presència constant de líquid, la saliva, per fluctuacions curtes i extremes de temperatura, per una superfície externa dura, les dents, i una variació constant de l'entrada de carboni i nitrogen.

Els organismes que no s'adhereixen a la superfície de la cavitat bucal són transportats per el flux salivar cap al tracte digestiu. És per això que no és d'estranyar que els bacteris orals tinguin mecanismes d'adhesió ¹³.

Es defineix biofilm bacterià com a una comunitat de microorganismes que creixen immersos en una matriu de polisacàrids i que es troben adherits en una superfície inerta o a un teixit viu ¹⁴.

Aquest biofilm pot provocar diverses patologies. Les més freqüents són la gingivitis i la periodontitis. A més, en cas que hi hagi un implant dental, pot causar periimplantitis, una afectació inflamatòria dels teixits tous que envolten l'implant i que provoquen la destrucció del teixit ossi que realitza el suport de l'implant arribant a provocar una fallida d'aquest implant ¹⁵.

2.5.2. Procés de creació del biofilm bacterià

A l'inserir un biomaterial a l'organisme, queda recobert per macromolècules i restes cel·lulars derivades del medi. Aquests element constitueixen l'anomenada capa condicionant. L'adsorció i la composició d'aquesta capa són molt selectives i depenen de les propietats de la superfície del material com l'estructura molecular, l'energia lliure de superfície, la neteja, dels constituents del medi que l'envolta, dels tipus cel·lulars que intervenen.

Les superfícies metàl·liques netes, com podrien ser les de titani, són resistents a la corrosió a causa de la seva composició química, la seva homogeneïtat i a les capes d'òxid que es formen a la seva superfície, ja sigui espontàniament o bé mitjançant algun tractament.

Aquesta capa d'òxid és la que reacciona amb les glicoproteïnes de la capa condicionant.

Aquesta capa condicionant està constituïda, habitualment, per fibronectina, fibrinogen, col·lagen, elastina i altres proteïnes així com restes de plaquetes i cèl·lules. Aquesta capa proporciona els receptors necessaris per l'adherència tissular o bacteriana, mitjançant graus variables d'integració fisicoquímica.

Inicialment els bacteris es troben en fase planctònica, lliures pel medi líquid, procedents de la contaminació directa, per exemple durant la cirurgia, per

propagació de contigüitat o per sembrat hematogen, transportats per la sang. Aleatòriament arriben fins a les proximitats del biomaterial. La superfície del bacteri sol estar carregada negativament i la dels implants metàl·lics també, cosa que produeix una repulsió electrostàtica entre ells. Ocasionalment, però, entren en acció les forces d'atracció hidrofòbica, que aproximen el bacteri a la superfície de l'implant. Fins aquí el procés es denomina adhesió reversible no específica. A partir d'aquest moment s'inicia l'adhesió irreversible mitjançant processos d'enllaç químic.

Les superfícies metàl·liques produeixen un efecte catalitzador de les reaccions químiques. Aquest efecte accelerador de les reaccions químiques podria ser responsable de l'augment de l'activitat cel·lular i de la síntesi que es produeix en els bacteris instants després d'adherir-se, iniciant així la síntesi de polisacàrids i el creixement i la multiplicació bacteriana.

En els moments posteriors a la implantació d'un biomaterial, les seves zones d'alta energia estan "esperant" ser colonitzades pels primers colonitzadors disponibles, ja siguin bacteris o cèl·lules tissulars. Si els primers colonitzadors són cèl·lules tissulars i estableixen un ancoratge ferm, els bacteris que pugin arribar s'han d'enfrontar a una superfície resistent a la infecció en virtut de la viabilitat de les cèl·lules tissulars, de les seves membranes cel·lulars, dels seus polisacàrids de superfície i dels seus sistemes immunes operatius. Si a més, l'adhesió de les cèl·lules tissulars es produeix directament sobre la superfície del material (osteointegració), el grau de protecció davant l'atac bacterià serà major. Però si els primers colonitzadors són bacteris, com podrien ser els *Streptococcus sanguinis*, i s'adhereixen a la superfície del biomaterial, es produeix la infecció de l'implant. Una vegada produïda l'adhesió bacteriana és poc probable que les cèl·lules tissulars puguin desplaçar aquests primers colonitzadors.

Si en aquesta "lluita per la superfície", aconseguen adherir-se primer els bacteris, que formaran una primera capa bacteriana, a aquesta s'hi sumaran més bacteris produint el fenomen d'agregació bacteriana. Aquesta agregació bacteriana consisteix en el reclutament d'altres bacteris, per part dels colonitzadors primaris. Tant la primera capa de bacteris adherits com les següents, es multipliquen formant colònies, les quals, a l'expandir-se, constituïran pel·lícules bacterianes, sempre i quan els factors ambientals, com la temperatura, els nutrients o el balanç iònic entre d'altres, siguin propicis. Finalment, es trenquen petites parts d'aquest biofilm, de tal manera que els bacteris poden escapar i així envair una altra superfície de l'implant.

Altres factors influeixen a l'establiment del biofilm: els diagrames de flux dels fluids, el pH, la configuració química i geomètrica de la superfície del substrat, les tensions superficials i els residus del medi.

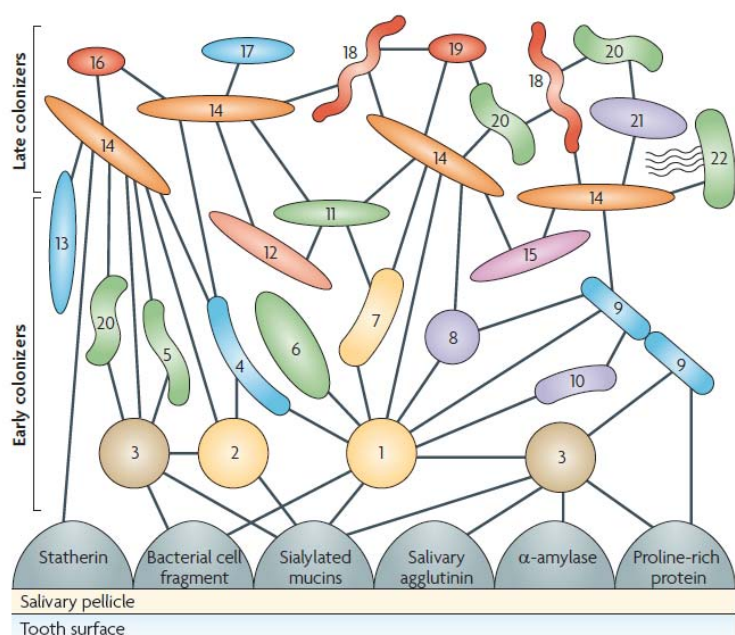


Figura 9. Agregació bacteriana per a la formació d'un biofilm bacterià ¹³

Els biofilms disposen d'un entorn que protegeix els bacteris dels seus possibles antagonistes i de les defenses de l'hoste. Aquest entorn fins i tot pot desenvolupar les seves pròpies propietats ambientals, com el pH, els ions, els nutrients i diverses toxines que poden col·laborar a la cohesió entre colònies.

Per als bacteris propers a l'implant és vital la utilització de metabòlits, molècules o ions del biomaterial, mentre que les capes externes dels bacteris utilitzen els factors ambientals; les capes mitjanes depenen de les molècules difoses des del material i des de l'entorn exterior, així com dels metabòlits produïts per les capes més profundes ¹⁶.

D'aquesta manera, el biofilm impedeix l'adhesió de les cèl·lules tissulars a la superfície del biomaterial, tot provocant la seva fallida.

2.5.3. Estratègies per reduir el biofilm bacterià

Per tal de reduir aquesta creació de biofilm bacterià, hi ha diverses estratègies que es poden dur a terme. Les més utilitzades són: els recobriments antiadherents, els recobriments antimicrobians, els recobriments antibiòtics i la utilització de pèptids antimicrobians ¹⁷.

Recobriments antiadherents

Les característiques de la superfície de l'implant, igual com passa amb l'adhesió cel·lular, com poden ser l'energia superficial, la rugositat, la hidrofilitat o la conductivitat juguen rols crucials en l'adhesió bacteriana i la creació del biofilm bacterià. És per això que realitzant tractaments fisicoquímics es pot reduir aquesta colonització bacteriana. Alguns exemples serien l'utilització de raigs ultraviolats o el canvi de l'estructura cristal·lina del biomaterial ¹⁸.

Un altre tipus de recobriment antiadherent és el recobriment amb polímers antiadherents com podrien ser el polietilenglicol o el polimetilmetacrilat. Aquests recobriments però, s'ha vist que danyen les funcions dels osteoblasts, i per tant requereixen la combinació amb pèptids com l'RGD.

Recobriment antibacterià

Un altre mètode per prevenir la creació del biofilm són els recobriments antibacterians. Aquest grup el podem separar en dos classes: els orgànics i els inorgànics.

Pel que fa als recobriments orgànics cal destacar la clorohexidina, ja que posseeix un ampli espectre antimicrobial.

Per altra banda, els recobriments que contenen agents inorgànics són un dels mètodes més efectius per eliminar aquesta colonització bacteriana degut a la seva excel·lent biocompatibilitat i una bona estabilitat. Un dels agents més comuns i eficaços és la plata. Això és degut a que la plata té un espectre antibacterià molt elevat tant per bacteris gram-positius com per bacteris gram-negatius. A més, aquest mètode no afecta a l'activitat de les cèl·lules osteoblàstiques ¹⁷.

Recobriments antibiòtics

A partir d'aquest tipus de recobriments es pot aplicar l'antibiòtic a la zona d'interès, i on possiblement després de la inserció de l'implant hi hagi una possible infecció. Aquests recobriments però, tenen certs desavantatges, com el temps d'alliberació del fàrmac, una possible toxicitat provocada per el mateix antibiòtic o inclús pot generar una certa resistència per part dels bacteris a aquest antibiòtic ¹⁷.

Utilització de pèptids antimicrobians

Els pèptids antimicrobians o AMPs són pèptids d'origen natural amb caràcter antibiòtic i que presenten activitat contra bacteris tant gram-positius com gram-negatius. El fet que aquestes AMPs siguin grups d'aminoàcids és el què fa que siguin fàcils de modificar i poder adherir-los a superfícies .

Els AMPs tenen com una de les seves característiques principals una efecte molt ràpid per matar els bacteris. A més, també son coneguts pel fet de millorar els efectes dels antibiòtics per mitjà d'efectes sinèrgics ¹⁹.

No obstant aquests avantatges, els AMPs encara tenen certs riscos, com per exemple una possible toxicitat perls humans o una falta de especificitat.

Un altre problema dels AMPs pot ser en el moment de la creació dels biofilms, degut a la possible interacció electrostàtica entre els pèptids i la matriu del biofilm carregada negativament²⁰. No obstant, s'ha demostrat que les modificacions superficials amb AMPs ajuden a reduir les infeccions dels dispositius associats ¹⁹.

En el nostre projecte s'utilitzarà aquesta última estratègia per tal de reduir aquesta adhesió bacteriana.

Per tal de sintetitzar el pèptid utilitzat per aquest procés es seguirà el mateix esquema que s'ha usat en el pèptid RGD.

2.6. Pèptid hlf1-11

El pèptid hlf1-11 és un pèptid extret dels 11 primers aminoàcids de la lactoferrina.

La lactoferrina és una proteïna globular, sintetitzada per els neutròfils de la sang i que té activitat antimicrobiana. Aquesta proteïna, contribueix a la immunitat innata i s'ha demostrat que té una activitat microbicida significant en contra els bacteris.

A més a més, hi ha pèptids més petits derivats de la lactoferrina que també tenen aquesta acció microbicida. Per exemple, el pèptid hLf1-11 (lactoferrina 1-11) que té un espectre antimicrobià molt gran.

L'hLf1-11 és el fragment més petit que conserva aquesta activitat antimicrobiana en comparació amb la seva cadena peptídica sencera.

De la mateixa manera que el pèptid RGD, aquesta pèptid extret de la lactoferrina esta comprès dels següents grups:

- Grup d'ancoratge: És el grup que s'unirà a la superfície del titani.
- Grup espaiador: Igual que el pèptid RGD, aquest grup espaiador consistirà en un polietilenglicol.
- Seqüència bioactiva: Aquesta és la posició a on es troba el conjunt d'aminoàcids que formen el pèptid hlf1-11.

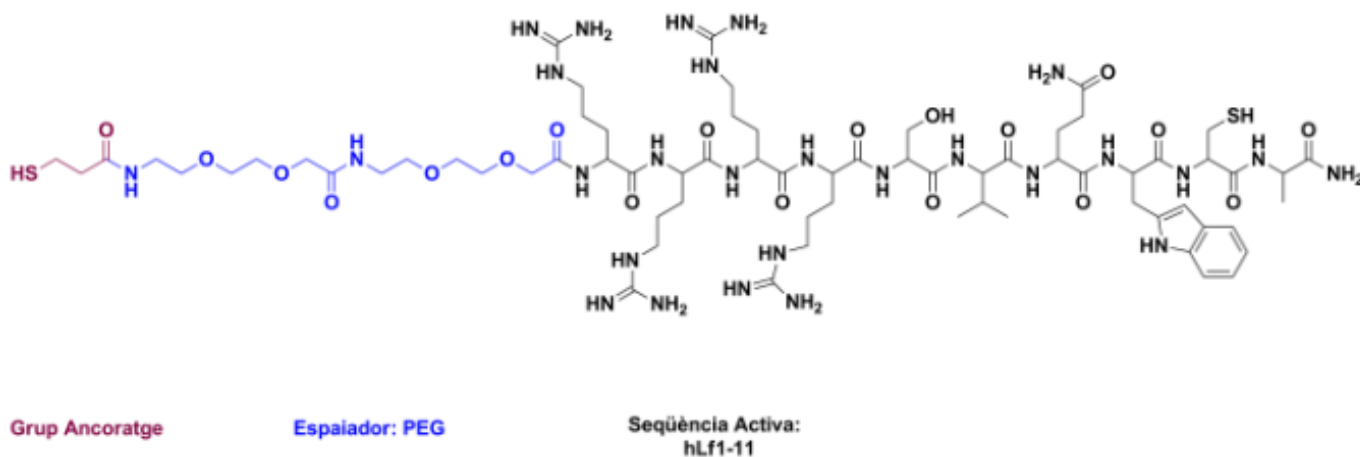


Figura 10. Pèptid hLf1-11

L'activitat antimicrobiana d'aquesta seqüència ha estat demostrada en varis estudis i per això aquest pèptid serà l'usat en el nostre projecte ^{21, 22, 23}.

A diferència dels pèptids RGD i hLf1-11, en aquesta plataforma podem trobar una lisina entre l'espaiador i les cadenes de polietilenglicol. Aquesta lisina permet derivar un grup d'ancoratge amb els seu espaiador corresponent en una cadena PEG, per tal de poder tenir les dues cadenes bioactives a al vegada.

La funcionalitat d'una plataforma dual ja ha estat demostrat en estudis anteriors

²⁴.

CAPÍTOL 3: METODOLOGIA

3.1. Preparació de mostres

El primer pas per tal de poder dur a terme el nostre projecte és l'adquisició i preparació de les mostres de titani per tal de poder fer els tractament superficials necessaris per tal de funcionalitzar la superfície.

3.1.1. Adquisició de les mostres

Les mostres de titani s'han adquirit al taller mecànic adjunt al departament de Ciència de Materials i Enginyeria Metal·lúrgica de la Universitat Politècnica de Catalunya. Aquestes mostres de titani venen subministrades en paquets de 50 mostres de 10 mm de diàmetre i uns 2 mm de gruix.



Figura 13. Mostres provinents del taller mecànic

3.1.2. Embotició en baquelita

L'embotició de les mostres de titani en baquelita té com a finalitat permetre un procés de polit homogeni per totes les mostres.

Per tal de poder realitzar aquest procés utilitzarem l'equip Labopress-3 de Struers (Alemanya). Aquest equip consisteix en un pistó on es dipositen els discs de titani, en tandes de 5. Aquest pistó es baixa i un cop ha arribat al seu punt inferior si diposita la baquelita en pols. Tanquem el pistó amb una baioneta i posem les condicions següents:

Taula 2. Condicions per embotir la baquelita.

Temperatura	180°C
Força	15 kN
Temps escalfament	5 minuts
Temps refredament	4 minuts

Una vegada finalitzat el temps del procés, desenrosquem la baioneta, pugem el pistó i enretirem el disc de baquelita, que s'haurà solidificat.



Figura 14. Embutidora Labopress-3.



Figura 15. Mostres embutides en baquelita

3.1.3. Procés de polit

L'objectiu de polir les mostres és el d'eliminar la rugositat de la mostra original. Aquest pas és important, ja que estudis previs han demostrat que la rugositat és un factor rellevant en el procés d'adhesió cel·lular^{4,5}.

Per tal de portar a terme aquest procés, utilitzem una polidora automàtica Phoenix 4000 (Buehler, USA). Per obtenir aquesta superfície mirall i llisa, hem de passar per una sèrie de panys de diferents mides de gra i dos panys de vellut amb dos solucions d'alúmina diferent en el següent ordre:

Taula 3. Protocol per polir les mostres de titani embotides en discs de baquelita

Pany	Velocitat (rpm)	Força (N)	Temps (minuts)	Direcció	Aigua
P800	300	8-10	15	Contra	Si
P1200	150	8-10	15	Contra	Si
Al ₂ O ₃ - 1µm	300	10-15	60	Contra	No
Al ₂ O ₃ - 0.05µm	300	10-15	60	Contra	No
Aigua	100	9	30	Contra	Si

Els dos primers panys aconseguen polir les mostres i els dos panys de vellut amb la solució d'alúmina és el que aconseguix aquest efecte mirall. En aquests panys de vellut, cal anar-hi tirant aigua i la solució d'alúmina cada cert temps per tal d'evitar que el pany s'assequi.

La direcció contra significa que el braç i el disc amb els panys giren en la direcció oposada.



Figura 16. Polidora automàtica Buehler

3.1.4. Extracció de les mostres de la baquelita

Per tal d'extreure les mostres de titani de la baquelita un cop polides, es realitza amb una serra. Cal serrar la baquelita a una distància prudent de les mostres i amb un tornavís acabar d'extreure les mostres.

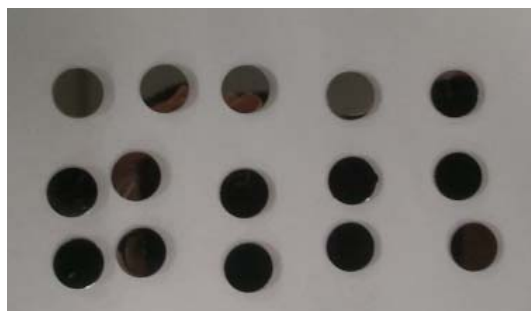


Figura 17. Mostres acabades de polir amb efecte mirall

3.1.5. Rentat de les mostres de titani

Després de polir, cal rentar les mostres de possibles impureses. Per això cal fer diversos rentats i sonicar les mostres al bany d'ultrasons. En aquest procés, s'utilitzen productes de diferents polaritats per tal de assegurar-nos que totes les impureses que ens podríem trobar són eliminades. Per tal de dur a terme aquest procés cal dipositar el dissolvent que especifica el protocol que tenim a continuació, sonicar durant 5 minuts, enretirar-lo i realitzar el procés dos vegades més per un total de tres rentats per a cada producte. La seqüència serà:

Ciclohexà (3 rentats x 5 minuts), Acetona (1x5'), Isopropanol (3x5'), Aigua (3x5'), Etanol (3x5'), Acetona (3x5')

- Ciclohexà (C_6H_{12}): El ciclohexà és un producte apolar, i per tant eliminarà totes aquelles impureses apolars que puguin tenir les mostres de titani. No és soluble en aigua.
- Acetona (C_3H_6O): Aquest pas s'ha afegit al mig ja que dos components amb diferents polaritats no tenen una bona afinitat. En aquest rentat l'acetona serveix per acabar d'emportar-nos possibles restes de ciclohexà. En aquest cas, com que el ciclohexà no és soluble en aigua, utilitzem acetona, ja que si utilitzéssim aigua no ens n'emportaríem les restes.
- Isopropanol o 2-propanol (C_3H_8O): Component polar que ens servirà per eliminar aquelles possibles impureses i restes de caràcter polar. És soluble en aigua.
- Aigua destil·lada (H_2O): A diferència del ciclohexà, l'isopropanol és soluble en aigua i per tant per tal de retirar les possibles restes podem utilitzar aquest component. A més l'aigua és un component polar, i per tant ajuda a eliminar aquells components polars que l'isopropanol no ha pogut eliminar.
- Etanol (C_2H_6O): Dissolvent polar.
- Acetona (C_3H_6O): Dissolvent polar.

Un cop finalitzat aquest procés de rentats assequem les mostres i les guardem a una placa de mostres.

Aquest procés s'ha de realitzar sempre després de l'extracció. En cas que portin un temps emmagatzemades a la placa, abans de realitzar un assaig o un procés cal tornar a fer un rentat. En aquest cas però, es pot utilitzar un protocol de rentat més curt, que consisteix en 3 rentats d'aigua, 3 d'etanol i 3 d'acetona durant 5 minuts al bany d'ultrasons.

3.2. Tractament químic i funcionalització de la superfície de titani

Per tal de poder funcionalitzar la superfície del titani, cal realitzar una sèrie de tractaments químics que permetin que els pèptids s'uneixin a la superfície de titani mitjançant enllaços covalents.

3.2.1. Activació amb àcid nítric

El primer pas per tal de poder adherir els pèptids a la superfície del titani és una activació amb àcid nítric. Aquest pas consisteix en la creació d'una capa hidroxílica (una capa de grups -OH) a partir de l'oxidació de la superfície, per tal de permetre una major adhesivitat, fer la superfície més hidrofílica i disminuir l'alliberament de ions.

Per tal de realitzar aquesta activació, cal deixar les mostres de titani durant una hora submergides en àcid nítric al 65%. Aquest procés cal realitzar-lo sota una campana, ja que els gasos que desprèn l'àcid nítric son perjudicials per la salut.

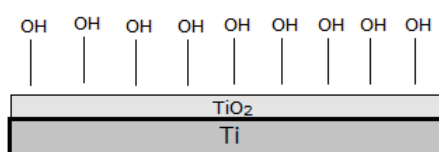


Figura 18. Activació de la superfície de titani amb àcid nítric

A més, un cop acabat el procés cal diluir l'àcid nítric amb aigua, enretirar les mostres i fer una sèrie de rentats amb aigua destil·lada, etanol i acetona.

3.2.2. Silanització APTES

L'objectiu d'aquest procés és adherir un grup silà, que serà l'APTES (*3-aminopropyl*)triethoxysilane, a la superfície oxidada del titani, i unir un crosslinker que permetrà la unió covalent dels pèptids i la plataforma dual.

Per tal de silanitzar les mostres de titani seguirem els passos explicats a continuació:

- Posar les mostres de titani a un erlenmeyer. Dins dels mateix erlenmeyer dipositar una barra magnètica i tapar-ho amb un sèptum.
- Clavant una agulla al sèptum crear el buit a l'interior. Acabar de purgar l'erlenmeyer amb nitrogen.
- Un cop fet el buit, dipositar dins de l'erlenmeyer 10 mL de toluè anhidre i 0,2 mL d'APTES (2% v/v o 0,08 M) clavant les agulles al sèptum.
- Col·locar l'erlenmeyer a l'agitador a 70°C i el deixem durant una hora

Aquests processos serveixen per unir, mitjançant ponts d'hidrogen, el silà als grups hidroxils que s'han format a la superfície del titani durant l'activació amb àcid nítric. És important mantenir el caràcter anhidre del procés ja que així s'evita la polimerització del silà.

- Un cop passada l'hora, posar les mostres a un vas de precipitats que contingui toluè i sonicar la mescal al bany d'ultrasons durant 5 minuts.
- Rentar les mostres amb toluè (x3), acetona (x1), isopropanol (x3), aigua (x3), etanol (x3) i acetona (x3). Un cop acabat de rentar, assecar les mostres amb nitrogen. Aquests rentats no cal sonicar-los.

- Dipositar les mostres a una placa de petri i col·locar-lo al forn a 120°C durant 5 minuts. Extreure les mostres del forn i posar-les en un nou vas de precipitats

Aquest últim pas, permet el trencament dels ponts d'hidrogen que unien el silà amb els grups hidroxils, alliberant aigua i unint el silici amb l'oxigen. D'aquesta manera es crea una unió més estable entre el silà i la superfície del titani.

En aquest punt s'obté la mostra control Ti_APTES.

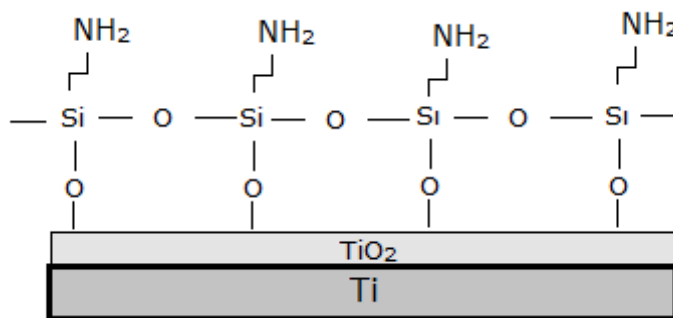


Figura 19. Silanització amb APTES

A continuació, cal unir aquest grup silà amb el crosslinker (N-succinimidyl-3-maleimidopropionate) per tal de permetre la unió amb els pèptids.

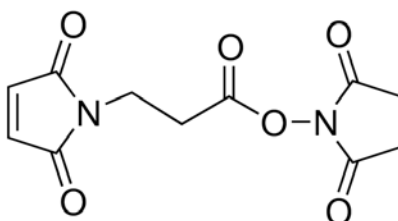


Figura 20. Estructura química del Crosslinker (N-succinimidyl-3-maleimidopropionate)

- Preparar una solució de 2 mg/mL del crosslinker en 10 mL de DMF (N,N-dimethylformamide).
- Deixar la reacció en agitació durant una hora a temperatura ambient.
- Rentar les mostres amb DMF (x3), acetona (x1), aigua (x3), etanol (x3) i acetona (x3) i ho assequem amb nitrogen. Un cop seques transferir les mostres a una placa de mostres.

En aquest punt s'obté la mostra control Ti_CL.

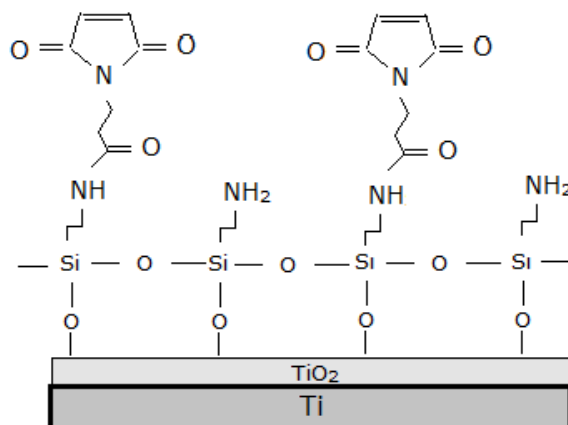


Figura 21. Silanització del titani amb el crosslinker

Aquesta unió del crosslinker amb el silà succeeix a partir de la unió d'aquest crosslinker amb un nitrogen del grup NH_2 .

3.2.3. Funcionalització de la superfície de titani.

La funcionalització amb els pèptids de la superfície de titani succeeix degut a que els grups ancoratge dels pèptids són grups tiols ($-\text{SH}$), i es poden adherir al crosslinker reaccionant amb el doble enllaç que té.

Aquest pas consisteix en dipositar gotes dels pèptids o de la plataforma a una concentració de $100 \mu\text{M}$. Com que l'stock dels pèptids esta a 1 mM , cal realitzar una dilució amb PBS.

Al tenir 3 mostres per a cada pèptid, i a cada mostra i dipositem $100 \mu\text{L}$ d'aquesta dissolució, necessitem $300 \mu\text{L}$ de dissolució. Per tenir $300 \mu\text{L}$ de pèptid $100 \mu\text{M}$, ens caldrà fer uns dissolució de 1:10, per tant:

$$300\mu\text{L de RGD} = 30\mu\text{L de RGD (1 mM)} + 270\mu\text{L de PBS 6,5}$$

$$300\mu\text{L de Lf1-11} = 30\mu\text{L de Lf1-11 (1 mM)} + 270\mu\text{L de PBS 6,5}$$

$$300\mu\text{L de Plataforma} = 30\mu\text{L de plataforma (1 mM)} + 270\mu\text{L de PBS 6,5}$$

A més, necessitarem un control positiu. Aquest control serà amb fibronectina (stock a $200 \mu\text{g/mL}$), en cas de l'assaig d'adhesió, i el CM10, en cas de l'assaig de bacteris. Per la fibronectina nosaltres la necessitem a una concentració de $50 \mu\text{g/mL}$. Per aconseguir aquesta concentració, realitzarem una dissolució 1:4. En cas del CM10, afegim $450 \mu\text{L}$ per tenir-la a una concentració de $100 \mu\text{M}$ i realitzem la mateixa dilució que els altres pèptids. Per tant:

$$300\mu\text{L de FN} = 75\mu\text{L de FN} + 225\mu\text{L de PBS 6,5}$$

$$300\mu\text{L de CM10} = 30\mu\text{L de CM10} + 270\mu\text{L de PBS 6,5}$$

Un cop tenim realitzades aquestes dissolucions, cal dipositar a sobre de la mostra de titani, gota a gota i intentant que no caigui pels laterals, 100 μ L del pèptid i deixar-ho durant la nit. El dia següent, es pot recuperar part del pèptid ja que tot el pèptid dipositat s'adhereix.

En aquest pas s'obtenen les mostres control Ti_FN, Ti_RGD, Ti_hlf1-11 i Ti_Plat

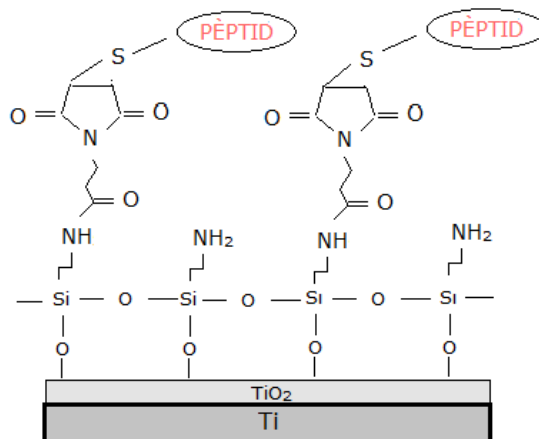


Figura 22. Superfície de titani silanitzada i funcionalitzada amb el pèptid.

3.3. Caracterització fisicoquímica

3.3.1. Angle de contacte

Introducció

L'angle de contacte consisteix en la deposició d'una gota d'aigua sobre les mostres i mitjançant el software SCA20, calcular l'angle que forma aquesta gota amb la superfície del titani. Aquest assaig permet calcular la mullabilitat de la mostra.



Figura 23. Angle de contacte

La mullabilitat és el procés on un líquid s'expandeix en un substrat sòlid. Es poden distingir dos tipus: Hidrofòbics o hidrofílics.

La superfície hidròfoba és aquella superfície que prefereix estar en contacte amb ella mateixa abans que formar una interfície d'aigua. Aquestes superfícies són les que el seu angle de contacte és superior a 90° i la gota del líquid no s'expandeix.

La superfície hidròfila és aquella superfície que prefereix crear una interfície amb l'aigua que amb ella mateixa. L'angle de contacte d'aquestes superfícies és menor a 90° i la gota del líquid s'expandeix per la superfície.

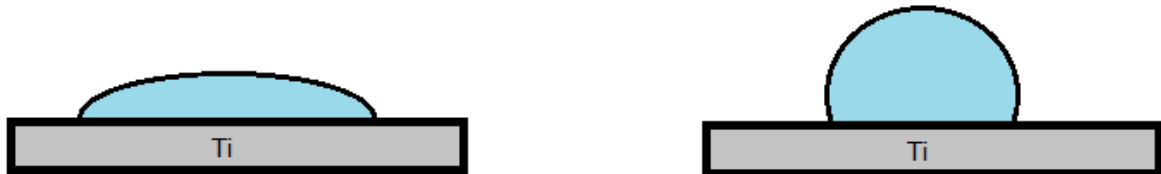


Figura 24. Superfície hidròfila i hidròfoba

Aquesta interacció entre el sòlid i els líquid depenen de diversos factors:

- Els grups químics de la superfície.
- La topografia de la superfície (Porositat, rugositat...)
- L'estructura i la funcionalitat dels components del fluid.

Angle de contacte

L'angle de contacte és l'angle entre la tangent a la gota i la tangent a la superfície, en el punt on estan en contacte el gas atmosfèric, el sòlid i el líquid. Això caracteritza la tensió interfacial entre el sòlid i la gota de líquid. Per tal de poder caracteritzar la tensió s'utilitza l'equació de Young.

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cdot \cos(\theta)$$

On:

γ_{SV} = Energia entre el sòlid i el gas

γ_{SL} = Energia entre el sòlid i el líquid

γ_{LV} = Energia entre el líquid i el gas

θ = Angle de la tangent

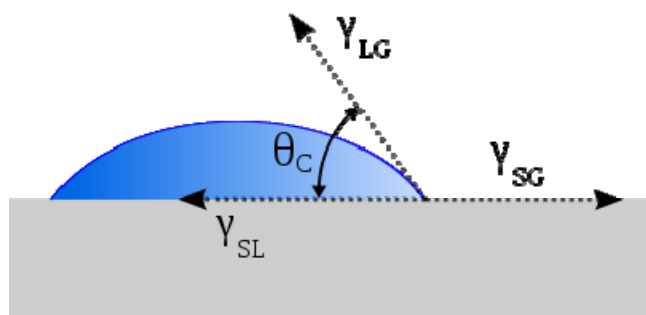


Figura 25. Angle de contacte d'una gota.

Per tal de calcular l'angle de contacte, però hi ha altres mètodes a l'utilització de l'equació de Young. En el nostre cas utilitzarem un software amb una càmera (OCA 15plus, Dataphysics, Espanya), on es veu la deposició de la gota. Un cop entra en contacte amb la superfície de titani es fa una foto. Mitjançant punts, marquem la superfície de la gota i el software suposa una circumferència perfecte. A partir dels punts d'aquesta circumferència i la superfície del titani el mateix software ens calcula l'angle de contacte.

En el nostre assaig calcularem l'angle de contacte de l'aigua i del diiodometà sobre diferents mostres de titani.

Per realitzar l'assaig dipositarem a la superfície del titani gotes amb un volum de $1\mu\text{L}$ i una velocitat de dispensació de $1\mu\text{L/s}$, tant en l'assaig amb aigua com amb l'assaig del diiodometà. Agafem aquest volum, per tal que la gota no ocupi molt d'espai i es puguin realitzar tres mesures per a cada mostra i així poder assegurar-nos que obtenim una bona repetibilitat i per tant que els resultats siguin el més precisos possible. A més, realitzarem 3 mostres per a cada condició.

Energia superficial

L'energia superficial de cada mostra es calcula a partir de la relació obtinguda entre l'angle de l'aigua, un líquid polar i l'angle del diiodometà, un líquid apolar.

Per calcular aquesta energia superficial, el software opera, mitjançant una simplificació de l'equació de Fowkes i els valors tabulats de cada líquid a partir dels valors obtinguts en l'angle de contacte. D'aquesta manera, introduint l'angle de contacte obtingut amb l'aigua i l'angle de contacte obtingut amb el diiodometà, el software et dona el valor de l'energia superficial i les seves components polar i dispersiva. Els paràmetres d'adhesió dels líquids són aquells que van estar tabulats per el mateix autor (Strom et all.)

Taula 4. Paràmetres utilitzats per el càlcul de l'energia superficial. (R.J. Good and C.J. van Oss 1992)

Líquids	γ_L (mJ/M ²)	γ^{LW} (mJ/M ²)	γ^{AB} (mJ/M ²)	γ^+ (mJ/M ²)	γ^- (mJ/M ²)
Aigua	72.8	21.8	51	25.5	25.5
Diiodometà	50.8	50.8	0	≈0	0

3.3.2. Interferometria

La interferometria és una tècnica que, mitjançant les ones de la llum permet extreure informació d'una superfície d'un material. En el nostre projecte l'utilitzarem per veure la rugositat de les mostres de titani.

Per poder mesurar la rugositat de les mostres utilitzarem un interferòmetre de llum blanca en la tècnica d'exploració vertical (VSI). L'interferòmetre emet una llum que va a parar a un divisor de feix que divideix aquest feix únic en dos. Un cop dividit, cada feix segueix un camí diferent per tornar-se a trobar abans d'arribar a un detector. La diferència de fase entre les ones dels dos feixos fa que es pugui saber, en el nostre cas, la rugositat de la mostra.



Figura 26. Interferòmetre

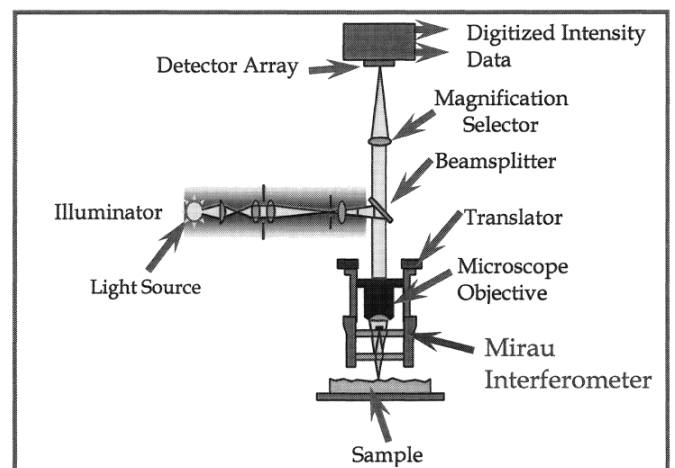


Figura 27. Esquema del funcionament

Per calcular la rugositat de la mostra ens fixarem en el valor de R_a que correspon a l'altura mitjana aritmètica de la rugositat de les mostres.

3.3.3. SEM

El microscopi electrònic de rastreig és un microscopi electrònic que proporciona una imatge de la mostra a partir d'un feix d'electrons els quals interaccionen amb la superfície. Aquests, al interaccionar es dispersen i són localitzats amb un detector, fet que permet veure la imatge de la superfície a una pantalla.



Figura 28. Microscopi electrònic de rastreig

Per tal de poder obtenir informació detallada de les mostres, s'han realitzat diverses captures a 1.000, a 5.000, a 20.000, a 100.000 i a 200.000 augments.

3.3.4. XPS

L'espectroscòpia de fotoelectrons emesos per a raigs X (XPS) permet estudiar la composició atòmica, l'estat químic i l'estructura electrònica dels elements que es troben a la superfície d'un material.

Per tal d'obtenir aquests paràmetres la mostra s'irradia amb raigs X al mateix temps que es mesura l'energia cinètica i el nombre d'electrons que s'escapen de la superfície del material ²⁵. La interacció fotoelectrònica entre els raigs-X monoenergètics i la superfície sòlida de la mostra, fa que els electrons d'aquesta superfície siguin expulsats amb una certa energia cinètica. Les quantitats observables en l'espectroscòpia de fotoelectrons són les energies cinètiques corresponents a aquests electrons. Els electrons, que pateixen pèrdua d'energia al travessar la mostra, són aquells que es poden veure al fons espectral ²⁵.

Com que l'ambient atmosfèric conté restes de partícules de diversos elements, per realitzar aquest assaig es requereix un ambient de buit, ja que d'aquesta manera s'evita la contaminació de la mostra i per conseqüent l'obtenció d'uns resultats erronis.

3.4. Caracterització biològica cel·lular

3.4.1. Introducció als cultius cel·lulars

Les cèl·lules que s'utilitzaran per tal de fer la caracterització biològica són SAOS-2, una línia de cèl·lules osteosarcomàtiques derivades de l'osteosarcoma d'una nena de 11 anys. Aquestes cèl·lules seran les utilitzades degut a que son

tumorals i per tant es poden reproduir amb molta facilitat i es poden diferenciar de la mateixa manera que les cèl·lules osteoblàstiques naturals. A més, les SAOS-2 són una línia cel·lular utilitzada arreu del món i per tant la seva caracterització està perfectament documentada.

Per tal de que aquestes cèl·lules tinguin les condicions ideals per a realitzar les seves funcions vitals, caldrà fer una sèrie de processos per garantir la seva supervivència. Tots aquests processos s'han de realitzar en un entorn estèril. Per això es realitzaran tots en una campanya estèril.

3.4.2. Preparació prèvia als assaigs

Preparació de medi

Per tal que aquestes cèl·lules puguin sobreviure i realitzar les seves funcions vitals, caldrà crear el medi de cultiu on seran cultivades. Aquest medi consisteix en la solució d'una sèrie de productes amb unes propietats específiques per tal de poder nodrir la cèl·lula. En el nostre cas, aquest medi serà el McCoy, i està compost per els components següents:

Taula 5. Taula de components i volums per a 50 mL de medi McCoy.

Component	Volum	Percentatge
Medi McCoy	42,5 mL	85%
HEPES	1 mL	2%
FBS	5 mL	10%
Sodi piruvat	500 µL	1%
Penicil·lina/estreptomina	500 µL	1%
L-glutamina	500 µL	1%

Cada component té una funció específica en aquest medi:

- El medi McCoy és el medi de cultiu que s'utilitza per a cultivar cèl·lules d'un ampli rang de teixits.
- L'FBS (sèrum fetal de boví) és la porció de plasma que queda després de la coagulació de la sang. És a dir, plasma sense cèl·lules sanguínies ni fibrinogen. Aquest plasma conté una gran varietat de proteïnes, com proteïnes extracel·lulars o factors de creixement, que ajuden les cèl·lules a sobreviure, créixer i proliferar. A més, aquest FBS permet l'adhesió de les cèl·lules a les parets del flascó.
- L'HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) manté el pH del medi a pesar dels canvis en la concentració de diòxid de carboni produït en la respiració cel·lular.
- El piruvat sodi s'utilitza com a font d'energia addicional.
- La penicil·lina/estreptomina inhibeixen el creixement de bacteris al cultiu.
- La L-glutamina proporciona nitrogen al medi i afavoreix les activitats metabòliques de les cèl·lules.

Una vegada acabat el medi, cal inserir uns 12 mL d'aquest medi al flascó de les cèl·lules.

Les cèl·lules, no obstant, no en tenen suficient per sobreviure amb aquest medi, sinó que necessiten unes condicions ambientals específiques.

- Humitat relativa del 95%.
- Temperatura de 37°C.
- Concentració de CO₂ del 5%.

Per tal de complir aquestes condicions, el flascó de les cèl·lules, sempre que no es realitzi cap assaig, es mantindrà a la incubadora.

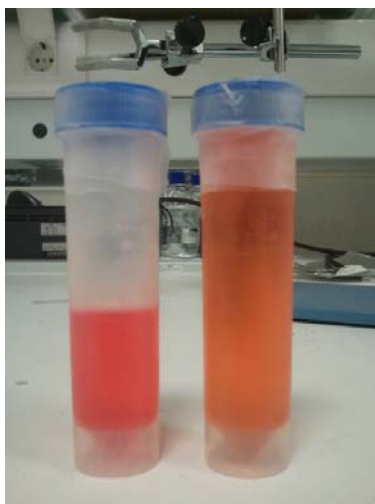


Figura 29. Medi sense FBS i medi amb FBS

Canvi de medi

El medi on es troben les cèl·lules té unes propietats limitades per el temps, ja que les cèl·lules consumeixen els recursos que els proporciona aquest medi. Com que el medi es queda sense nutrients, les cèl·lules no tenen una font d'alimentació per seguir fent les seves funcions, i corren el risc de morir-se. Per això, és necessari canviar el medi cada dos o tres dies per tal de garantir la viabilitat de les cèl·lules.

Aquest canvi de medi consisteix en treure el medi desnodrit del flascó, i introduir-ne de nou. No obstant, caldrà fer un rentat amb PBS per tal de poder extreure les cèl·lules mortes o que no s'han adherit a la paret del flascó.

Tripsinització

Les cèl·lules, sempre que tinguin les condicions necessàries per desenvolupar-se, seguiran reproduint-se fins a ocupar pràcticament la totalitat de la superfície del flascó. Arribats a aquest punt, les noves cèl·lules que es formen no es podran adherir enlloc i per tant moriran. Per tal d'evitar això, quan la superfície del flascó comença a estar plena, cal tripsinitzar o fer un "pase".

Aquest procés té com a objectiu reduir el nombre de cèl·lules adherides per tal que puguin seguir reproduint-se.

Per realitzar aquest procés cal seguir el protocol següent:

- Aspirar el medi del flascó.
- Fer dos rentats amb 10 mL de PBS.
- Afegir 2 mL de tripsina escalfada prèviament, i deixar que reaccioni durant un minut a temperatura ambient.
- Afegir 5 mL de medi per tal de parar l'acció de la tripsina.
- Transferir les cèl·lules a un tub tipus *falcon* de 15 mL.
- Rentar el flascó amb 5 mL més de medi i transferir-ho al *falcon*.
- Centrifugar les cèl·lules durant 5 minuts a 300 rcf (1700 rpm).
- Aspirar el medi sense cèl·lules.
- Resuspendre les cèl·lules amb 5 ml de medi.
- Pipetejar 1 mL del nou medi amb les cèl·lules i transferir-lo a un nou flascó.
- Incubar el nou flascó.
- Les cèl·lules restant que no s'han afegit dins el nou flascó, cal matar-les amb lleixiu.

Comptatge de cèl·lules

El comptatge de cèl·lules serveix per comptar el nombre de cèl·lules que hi ha en el flascó. Per fer això es calcularà el nombre de cèl·lules que hi ha a cada ml. Per tal de realitzar el comptatge, cal seguir els mateixos passos que la tripsinització fins a l'hora de resuspendre les cèl·lules. Un cop resuspeses, es pipetejen 10 μ L de cèl·lules i es posen a la placa Neubauer. En cas que la concentració de cèl·lules sigui molt elevada, es pot fer una dilució 1:10 i posar 10 μ L a dalt i 10 μ L a baix de la placa Neubauer.

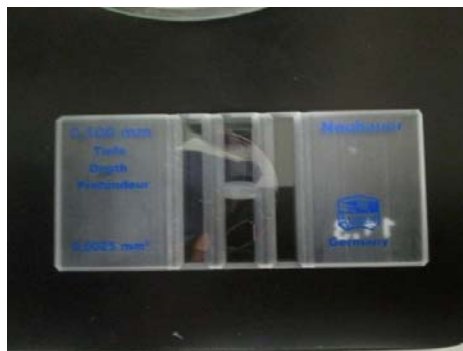


Figura 30. Placa de Neubauer

Per tal de realitzar el comptatge, contem les cèl·lules de cada quadrant, tant de la part superior, com de la part inferior. Es realitza la mitjana i s'aplica el factor de dilució. Un cop calculat en nombre de cèl·lules per mL, i en cas que es realitzi un assaig d'adhesió, cal pipetejar el volum necessari de cèl·lules per obtenir una concentració de 50.000 cèl·lules per cada mL, posar 1 mL de la solució de cèl·lules al nou flask i acabar d'afegir el volum restant necessari fins als 12 mL de medi amb FBS. Finalment, incubar les cèl·lules.

3.4.3. Assaig d'adhesió cel·lular

Un assaig d'adhesió consisteix en adherir un nombre conegut de cèl·lules a sobre la superfície de titani i posteriorment mirar quantes se n'han adherit. En el nostre cas, voldrem una concentració de 50.000 cèl·lules per a cada mL, o l'equivalent de 25.000 cèl·lules per a cada mostra (afegim 0.5 mL de la solució de cèl·lules per mostra). Per tal de realitzar aquest assaig, ens caldrà tenir a disposició les mostres de titani funcionalitzades amb els pèptids corresponents i a més, una mostra control, que en el nostre cas seran les mostres activades amb àcid nítric i una amb fibronectina per poder observar el nombre màxim d'adhesió.

Per tal de realitzar aquest assaig ens caldrà tenir disponible medi sense FBS, per tal d'evitar l'adhesió inespecífica de les cèl·lules a la superfície del titani. Aquest medi es realitza igual que el Medi McCoy, però substituïnt els 5 mL de FBS per el propi medi. A més, necessitarem BSA al 1% (albúmina de serum boví), que serveix per bloquejar els pous i així impedir interaccions indesitjades entre la superfície del titani i els pèptids de tal manera que no s'adhereixin més cèl·lules de les estrictament adherides al pèptid o a la plataforma.

Per tal de fer el BSA caldrà calcular la quantitat de BSA desitjat i preparar-lo. En la majoria dels nostres assaigs tindrem 15 mostres (Control àcid nítric (x3), fibronectina (x3), RGD (x3), hLf1-11 (x3) i Plataforma (x3)). A més, necessitarem 1 placa de 48 pous, on transferirem les mostres, i on es bloquejaran 3 pous més, per tal de fer-los servir de control. Per tant, si posem 500 µL de BSA (1%) a cada pou, necessitarem 16,5 mL i com que la solució de BSA amb PBS fa espuma en farem una mica d'excedent (22,5 mL). Com que el BSA ha d'estar al 1%, farem la solució amb 0,225 g de BSA i 22,25 mL de PBS.

Un cop es té preparat el BSA al 1% preparat, podem començar a realitzar l'assaig d'adhesió. Cal seguir el protocol següent:

- Extreure el recobriment sobrant de les mostres funcionalitzades.
- Rentar 3 vegades les mostres amb PBS. És important que en tots els rentats es facin sense tocar la mostra per tal de no perjudicar ni la superfície de les mostres ni les cèl·lules.
- Un cop retirat l'últim rentat de PBS, afegir 500 µL de BSA (1%) als pous amb mostres i a la placa de pous on si transferiran posteriorment. Cal bloquejar 3 pous més de la nova placa de pous, ja que aquests tres pous "nous", serviran per controlar que les cèl·lules s'han adherit.
- En el moment que s'han començat el bloqueig, cal esperar uns 30 minuts per tal que faci l'efecte desitjat. Mentrestant, es pot fer un comptatge de les cèl·lules, seguint el protocol explicat a l'apartat anterior. En aquest punt es calcula la solució de cèl·lules que s'utilitzarà per a l'assaig d'adhesió, partint de la base que volem tenir una concentració de 50.000 cèl·lules per a cada mL. Aquesta solució es realitzarà amb les cèl·lules resuspeses sense FBS i medi sense FBS.

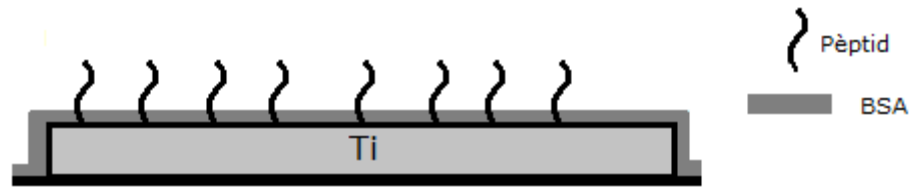


Figura 31. Mostra Bloquejada amb BSA

- Un cop finalitzat el temps de bloqueig, s'ha de retirar el BSA i fer tres rentats amb PBS a tots els pous. Abans d'extreure l'últim rentat de PBS, es transfereixen les mostres a la nova placa de pous.
- Un cop traspassades les mostres, aspirem l'últim rentat de PBS i s'afegeix la solució de cèl·lules desitjada. Posteriorment s'incuba a 37°C. A partir d'aquest moment, cal esperar entre 4 i 6 hores per tal que les cèl·lules es puguin adherir.

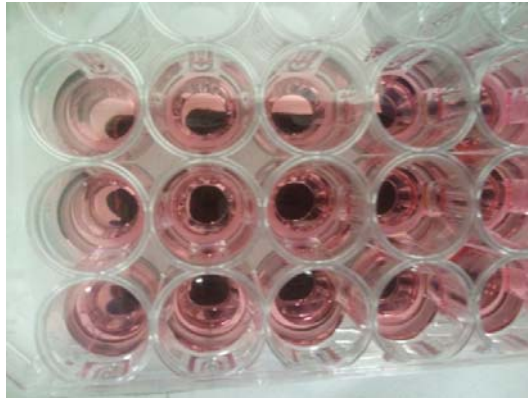


Figura 32. Mostres sembrades amb una concentració de 25.000 cèl·lules

Una vegada finalitzat el temps d'adhesió, que en el nostre cas està comprès entre 4 i 5 hores, cal fixar les cèl·lules a la superfície de titani. Per realitzar aquest pas, es requerirà paraformaldehid al 4%. Aquest PFA està en stock al 16% i caldrà diluir-lo 4 vegades amb PBS. És a dir $\frac{3}{4}$ parts de la solució de PBS i $\frac{1}{4}$ part de la solució amb PFA 16%.

Per tal de fer aquest últim pas, cal seguir els passos següents:

- Aspirar el medi dels pous i fer dos rentats amb PBS.
- Afegir 500 μ L per pou de PFA 4%.
- Deixar les mostres amb PFA 4% durant 30 minuts a temperatura ambient.
- Aspirar el PFA i fer 3 rentats amb PBS, sense extreure l'últim. Tancar la placa de pous amb parafilm i deixar-ho a al nevera.



Figura 33. Mostra amb les cèl·lules sembrades

3.4.4. Assaig immunohistoquímic

Un assaig immunohistoquímic consisteix en la tinció de diferents components de les cèl·lules adherides a les mostres de titani. En el nostre assaig es farà la tinció dels nuclis i dels filaments d'actina. Un cop tenyits aquests components, es podrà realitzar un comptatge per tenir resultats de l'assaig d'adhesió cel·lular.

- Abans de començar l'assaig cal tornar a fixar les mostres tal i com s'ha fet a l'últim pas de l'assaig d'adhesió.
- Un cop passats els 30 minuts de la fixació es faran 3 rentats de 5 minuts amb 500 µL/pou de PBS-Gly. La presència de la glicina ajuda a amortir la fluorescència que s'ha detectat al paraformaldehid.
- Afegir 500 µL/pou de triton 0,05% en PBS durant 20 minuts. El triton és un detergent que forma porus a la membrana, que augmentaran la permeabilitat de la membrana i permetran la difusió de les proteïnes.
- Rentar les mostres 3 vegades durant 5 minuts amb 500 µL/pou de PBS-Gly.
- Afegir 500 µL/pou de BSA 1% en PBS durant 30 minuts. Aquesta etapa de bloqueig ens assegura que no es crearan interaccions inespecífiques a les etapes següents.
- Rentar les mostres 3 vegades durant 5 minuts amb 500 µL/pou de PBS-Gly.
- Posar 100 µL/pou de triton al 0,05% amb fal·loïdina - rodamina (1:300) durant una hora. A partir d'aquest pas en endavant, es faran tots els passos a la foscor.

La fal·loïdina - rodamina és una variant de la microtoxina fal·loïdina que s'uneix als microfilaments d'actina i que està marcada amb un compost orgànic heterocíclic fluorescent, que en aquest cas serà la rodamina. Aquesta fal·loïdina - rodamina serà l'encarregada de marcar els filaments d'actina de color vermell.

- Rentar les mostres 3 vegades durant 5 minuts amb 500 µL/pou de PBS-Gly.
- Afegir DAPI (1:1000) en PBS-Gly durant 2 minuts

El DAPI és un marcador fluorescent que té una gran capacitat de passar per la membrana cel·lular i que té una gran afinitat pel nucli cel·lular. El DAPI és l'encarregat de marcar el nucli cel·lular de color blau.

- Rentar les mostres 3 vegades durant 5 minuts amb 500 µL/pou de PBS-Gly.

- Enganxar les tres mostres de cada control a un portaobjectes amb celo de doble cara.
- Afegir una gota de mowiol a cada mostra i tapar-la amb el cobreobjectes.
- Guardar les mostres a foscor i a 4°C.

Per tal de poder extreure els resultats de l'assaig d'adhesió caldrà utilitzar un microscopi que ens permetrà veure per separat els nuclis i els filaments d'actina tenyits a la immunohistoquímia. Per tal de poder visualitzar les imatges s'ha utilitzat el microscopi vertical NIKONE600 i el software Cell[^]F.

Per tal d'enregistrar les imatges, s'han utilitzat dos augments diferents. En cas dels nuclis, tenyits de color blau i que són visualitzats amb el filtre A, utilitzarem 10 augments i per visualitzar els filaments d'actina, tenyits de color vermell i que són visualitzats amb el filtre G-2A, utilitzarem 20 augments.

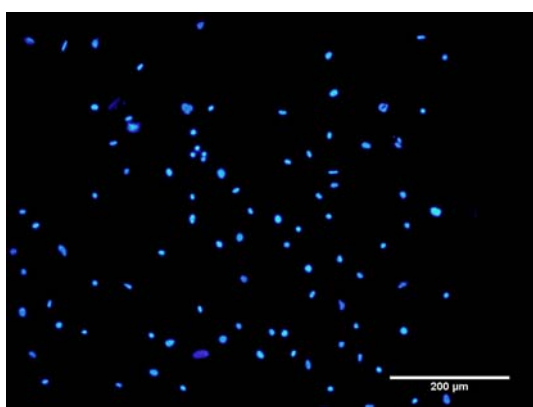


Figura 34. Nuclis de les cèl·lules

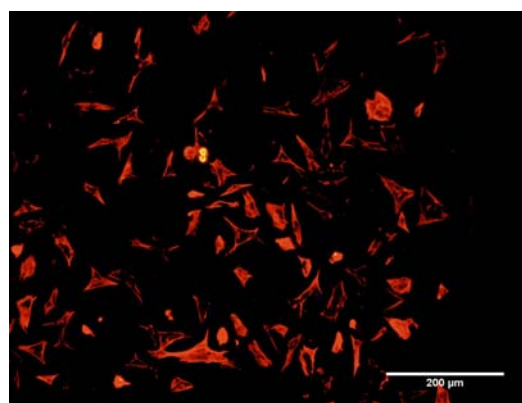


Figura 35. Filaments d'actina de les cèl·lules.

3.5. Caracterització biològica bacteriana

3.5.1. Introducció als cultius bacterians

L'assaig d'adhesió bacteriana es realitzarà amb bacteris *Streptococcus sanguinis*. Aquests bacteris gram positius són molt freqüents a la placa dental sana i són considerats com a colonitzadors primaris en la formació de biofilm. És a dir, s'adhereixen primer a la pel·lícula salivària i interaccionen amb els colonitzadors secundaris, alguns d'ells patògens de malalties com la periimplantitis.

L'elecció dels *S.sanguinis* és degut a que ens interessa evitar l'adhesió primària dels bacteris a l'implant i així evitar la formació d'aquest biofilm, i aquest són un dels bacteris més comuns.

Els *S.sanguinis* són uns bacteris gram-positius que constitueixen una part important de la flora microbiana normal del ser humà. És el primer bacteri en colonitzar la superfície dental, o que pot provocar l'aparició de càries dentals, malalties periodontals, entre d'altres.

Aquest bacteri es troba majoritàriament en la cavitat bucal, a l'espai que es forma entre la geniva i la corona de la dent.

3.5.2. Preparació prèvia a l'assaig

Preparació del medi Todd-Hewitt

Les bactèries necessiten un medi on poder créixer i reproduir-se. En el nostre projecte utilitzarem medi Todd-Hewitt (Brou Todd-Hewitt de Scharlab, Scharlab SL, Sentmenat, Espanya). Aquest medi de cultiu permet el desenvolupament de bactèries de creixement ràpid i nutricionalment exigents.

Aquest medi esta compost per:

- Infusió cervell cor i de peptona: Proveeixen a les bactèries de nitrogen, vitamines i aminoàcids.
- Glucosa: Energia en forma d'hidrats de carboni fermentables.
- Clorur de sodi: Manteniment el balanç osmòtic.
- Fosfat de sodi: Neutralització dels productes àcids generats a partir de la fermentació de la glucosa.
- Carbonat sodi: Evitar la destrucció de les hemolisines produïdes per els microorganismes i permetre la seva tipificació serològica.

Per tal de crear aquest medi, s'ha d'afegir a un pot, 36,4 g de medi Todd-Hewitt per a cada litre d'aigua destil·lada. Com que aquest medi es treballarà a una campana, caldrà esterilitzar-ho amb l'autoclau Presoclave – II (Grupo Selecta, Espanya).

Preparació de medi Todd-Hewitt amb Agar

L'assaig d'adhesió es realitza en unes plaques. Per tal que els bacteris puguin créixer en aquesta placa necessiten medi, però aquest necessita estar en un estat sòlid per poder comptar amb claredat la quantitat de colònies formadores que hi ha. Per tal que aquest medi es torni sòlid s'utilitza l'agar. L'agar, un agent gèlid molt utilitzat per medis sòlids o semisòlids, es un hidrocoloide derivat de les algues vermelles. L'agar és utilitzat per les seves propietats físiques úniques; es fon a 100 graus i roman en estat líquid fins a refredar-se a 40 graus, quan es torna en una substància gelatinosa. A més, no pot ser metabolitzat per la majoria de bacteris, el que fa que sigui un medi relativament inert, fet que provoca que mantingui els nutrients que es troben a la solució aquosa, que en aquest cas serien els nutrients del medi Todd-Hewitt.

El procés per realitzar aquest medi és el mateix que el de la preparació de medi líquid, però en aquest cas, per a cada litre d'aigua destil·lada si ha d'afegir 15 g d'Agar.

Preparació de les plaques

Per preparar les plaques cal abocar el medi Todd-Hewitt amb Agar a les plaques, de manera que el medi no superi la meitat de l'alçada de la placa. Per tal de poder optimitzar el procés, s'apilen les plaques formant una piràmide. D'aquesta manera, s'evita que l'aigua de la condensació es quedi a la tapa de la placa i corri el risc de caure al medi.

Un cop apilades totes les plaques esperem una hora aproximadament a que el medi gelatinós es solidifiqui. D'aquesta manera, podem tapar i moure les plaques sense que el medi perdi la seva forma.

Una vegada tapades les plaques es posen a dins la bossa, es giren al revés, per evitar que la possible aigua de la condensació caigui a la placa, i es guarden a la nevera o a temperatura ambient. Aquestes plaques es poden emmagatzemar a 4°C com a màxim durant 3 mesos.

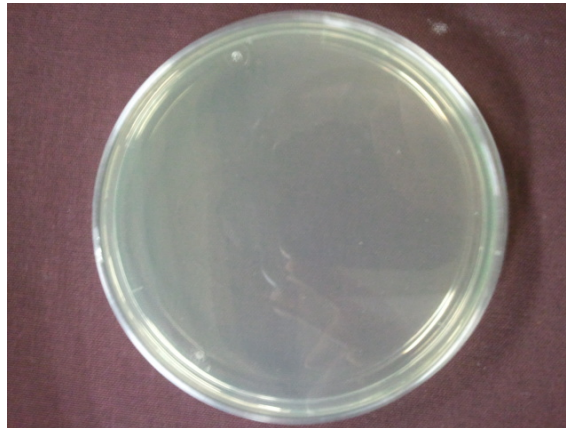


Figura 36. Exemple de placa amb medi i agar.

Preparació de l'inòcul

Per tal de preparar l'inòcul, partim de *S.sanguinis* (CECT 480, Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Espanya) congelats. Un cop descongelats, a un *falcon* de 15 mL si afegeix 10 mL de medi Todd-Hewitt i 50 µL de bacteris. Sempre realitzarem l'inòcul el dia anterior i l'incubarem a 37°C.



Figura 37. Inòcul amb bacteris precipitats al fons

Canvi de medi

En cas que es prepari l'inòcul un temps abans de realitzar l'assaig, i de la mateixa manera com passa amb les cèl·lules, el medi de l'inòcul s'haurà de canviar.

Per tal de realitzar aquest canvi de medi, només caldrà posar 5 mL de medi Todd-Hewitt a un *falcon* de 15 mL i traspasar 5 mL del medi amb els bacteris un cop passat per el vòrtex, per tal de resuspendre els bacteris que puguin haver precipitat. Reomplim amb 5 mL de medi el falcon amb l'inòcul "original", de tal manera que tindrem dos *falcon* amb 10 mL cadascun. Un cop es tenen els dos falcons, es posen a la centrifugadora a 400 rpm durant 10 minuts, es treu el sobrenedant i es resuspenen amb 10 ml de medi Todd-Hewitt. Un cop acabat s'han de tornar a posar a la incubadora.

3.5.3. Assaig d'adhesió bacteriana

Preparació de l'inòcul al 0,2 d'absorbància

A la literatura s'ha demostrat que per un nivell d'absorbància de 0,2 per part de l'inòcul és el punt on s'obtenen més unitats formadores de colònies (CFU). Seguint aquest paràmetre, el primer pas de l'assaig és decretar aquest 0,2 d'absorbància. Per tal de calcular el 0,2 d'absorbància, agafem 2 cubetes d'1 mL cadascuna. En un hi haurà 1mL de medi sol, que serà el que farem servir de zero, i a l'altre 1 mL de medi amb inòcul.

Aquest càlcul el realitzarem mitjançant un espectrofotòmetre, el qual ens calcularà l'absorbància de la primera mostra amb medi sol, per tenir la referència i l'absorbància de la cubeta amb inòcul, la qual volem al 0,2. L'absorbància es pot modificar posant medi, en cas que la volguéssim disminuir o posant inòcul en cas que ho volguéssim augmentar.

Els valors acceptables d'absorbància per a l'assaig d'adhesió oscil·len entre 0,19 i 0,21

Assaig d'adhesió

Per començar l'assaig d'adhesió bacteriana, esterilitzarem bé les mostres de titani deixant-les 10 minuts en etanol i els hi farem dos rentats amb PBS. Abans d'extreure l'últim rentat, traspassem les mostres a un altre well plate, així assegurem la màxima esterilitat possible, i hi afegim 1 mL de dissolució al 0,2 d'absorbància a cada mostra. En acabat, deixem les mostres durant unes 4 hores a la incubadora a 37°C, ja que s'ha demostrat en estudis anteriors que l'efecte antibacterià del pèptid hLf1-11 es produeix en aquest temps²¹.

Durant aquestes quatre hores, es pot aprofitar per preparar el material: necessitem 1 *falcon* de 15 mL i quatre eppendorfs per a cada mostra. A cada *falcon* s'hi ha de posar 1 ml de PBS i a cada eppendorf 0,9 mL.

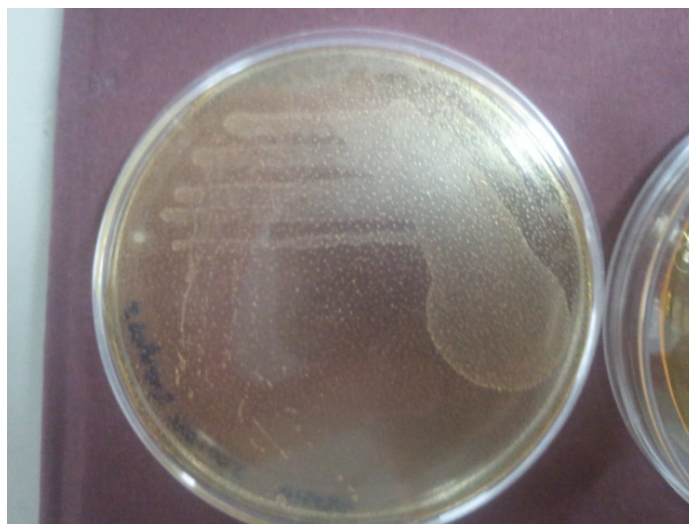


Figura 38. Placa amb bacteris *S. sanguinis*

Un cop passades les dos hores, cal espisar els bacteris i es fan dos rentats amb PBS per tal d'extreure aquells bacteris que no s'han adherit. Una vegada finalitzat el rentat, extraïem les mostres de titani de la placa de pous i les dipositem a dins el *falcon* corresponent. Posteriorment, agafem 4 falcons i els aguantem al vòrtex durant 5 minuts. L'objectiu d'aquest pas és extreure els bacteris del titani i que es quedin en suspensió en el PBS. D'aquesta manera podem obtenir els bacteris que s'han adherit a la superfície. Quan acaben els cinc minuts, ràpidament es posen 100 μ L del PBS al primer eppendorf, per tal d'evitar la sedimentació dels bacteris, i es realitzen 3 dilucions consecutives de 1:10 en els següents eppendorfs.

Per tal d'acabar, s'agafen 5 μ L de les dilucions 2, 3 i 4 i es dipositen a l'àrea de la placa corresponent marcada prèviament. Un cop aquestes gotes s'han assecat, es poden deixar les plaques a la incubadora. D'aquesta manera, els bacteris que estiguin al PBS, podran créixer a la placa gràcies al medi amb agar.

Comptatge de les CFU

El comptatge de les colònies de bacteris es realitza 48 hores després d'acabar l'assaig d'adhesió. Aquest comptatge consisteix en comptar les colònies de bacteris que han crescut a la placa i així poder comparar l'efecte antibacterià del nostre material en les diferents condicions.

3.6. Anàlisi estadístic

Per tal de presentar resultats estadístics en aquest estudi, s'han realitzat tres mostres per a cada condició. Els resultats presentats corresponen a la mitjana aritmètica de l'adquisició de tres valors per a cada mostra. D'aquesta manera ens assegurem una repetibilitat i per tant una major exactitud en els valors.

S'ha considerat que hi ha diferències estadísticament significatives entre mostres a partir de valors de confiança del 95%. Aquest anàlisi estadístic s'ha realitzat mitjançant el mètode ANOVA d'una cua, que és un anàlisi no paramètric, seguit d'una correcció de Tukey.

CAPÍTOL 4:

RESULTAT I DISCUSSIÓ

4.1. Condicions d'estudi

Per a la realització de cada prova, el conjunt de mostres utilitzades s'han activat i silanitzat totes a la vegada seguint el mateix procediment, de tal manera que les divergències que podem trobar a cada condició són mínimes. D'aquesta manera minimitzem les possibles discrepàncies i anul·lem la possibilitat d'obtenir resultats molt diferents degut a divergències del procediment de tractament químic.

Amb l'objectiu de poder comparar aquests assaig s'han agafat mostres de diversos punts control per tal de poder portar un control i extreure conclusions. Aquestes punts control són el que anomenem condicions i s'han utilitzat mostres en els següents punts:

- Titani sense polir: Ti_NP
- Titani polit: Ti_P
- Titani activat amb àcid nítric: Ti_HNO3
- Titani activat amb àcid nítric i silanitzat amb APTES: Ti_APTES
- Titani activat amb àcid nítric, silanitzat amb APTES i amb el crosslinker: Ti_CL
- Titani activat amb àcid nítric, silanitzat amb APTES, amb el crosslinker i funcionalitzat amb el pèptid RGD: Ti_RGD
- Titani activat amb àcid nítric, silanitzat amb APTES, amb el crosslinker i funcionalitzat amb el pèptid hlf1-11: Ti_Lf

- Titani activat amb àcid nítric, silanitzat amb APTES, amb el crosslinker i funcionalitzat amb la plataforma MH13: Ti_Plat

A més, a l'assaig cel·lular s'han utilitzat altres cadenes bioactives com a control lineal i que no són específiques del treball.

- Titani activat amb àcid nítric, silanitzat amb APTES, amb el crosslinker i funcionalitzat amb fibronectina: Ti_FN

4.2. Interferometria

El primer assaig que discutirem és el de rugositat de les mostres, extret per l'interferòmetre.

Es pot observar clarament a la figura 39 com la rugositat abans del procés de polir és molt més elevada que la resta. Això ens demostra que polir és un pas important per tal de poder obtenir una superfície homogènia, llisa i amb un efecte mirall adequat, perquè després, aquest titani es pugui tractar superficialment. Tal com s'ha mostrat a estudis previs la rugositat, tot i que no se sap amb exactitud, a partir d'uns certs valors nanomètrics millora l'adhesió cel·lular i bacteriana ^{4, 5}.

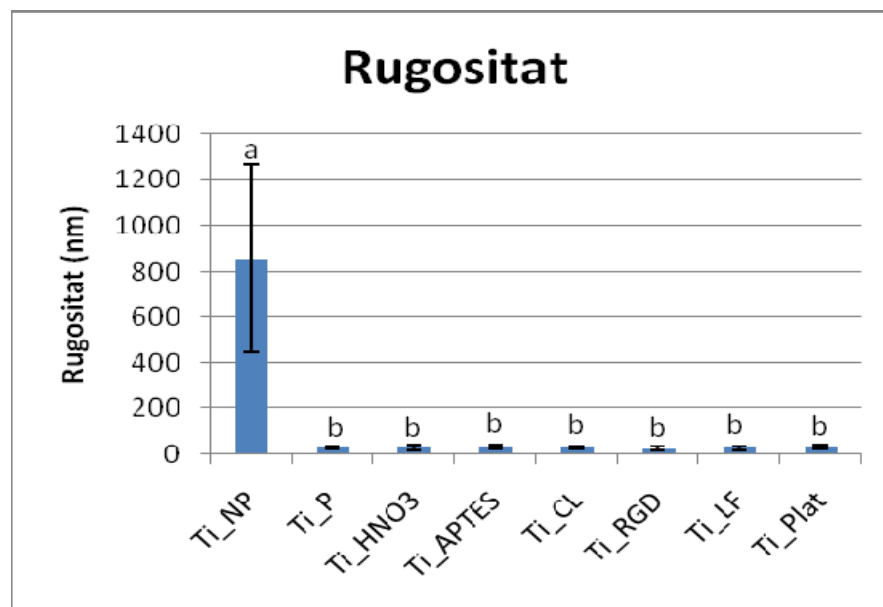


Figura 39. Gràfica de la rugositat amb la mostra Ti_P. Les condicions agrupades sota una mateixa lletra es considera que no són estadísticament diferents ($p > 0.05$)

Per tal de poder observar amb més precisió els valors de les mostres en diverses condicions, eliminarem el valor del Ti_P, tal i com es pot veure a la figura 40.

Podem observar com la rugositat en aquestes condicions és molt semblant, ja que entre la condició més rugosa, que seria la titani amb APTES i la condició menys rugosa, que seria la mostra amb RGD, hi ha menys de 10 nm de diferència. Aquests resultats indiquen que el procés de funcionalització no afecta significativament la rugositat de les superfícies.

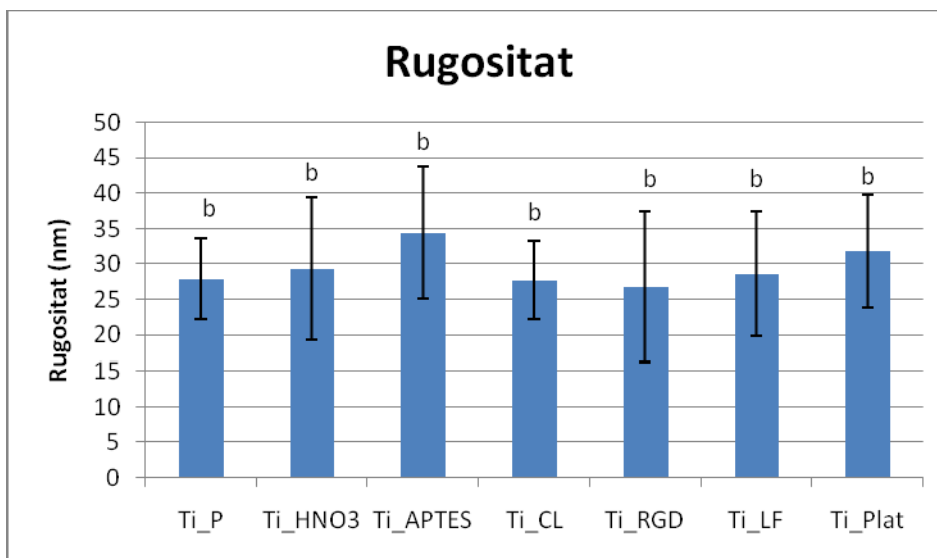


Figura 40. Gràfica de la rugositat sense la mostra Ti_P. Les condicions agrupades sota una mateixa lletra es considera que no són estadísticament diferents ($p > 0.05$)

Per tant, es pot concloure que el procés de polit és eficaç, ja que tal i com es pot apreciar en els gràfics anteriors, la rugositat es veu disminuïda considerablement.

Per tal de fer palesa aquesta diferència de rugositat entra una mostra sense polir i una mostra polida, a continuació presentem les imatges extretes amb l'interferòmetre, amb caràcter més qualitatiu.

El primer resultat que presentarem serà la imatge en 2-D de la superfície rugosa i la superfície polida.

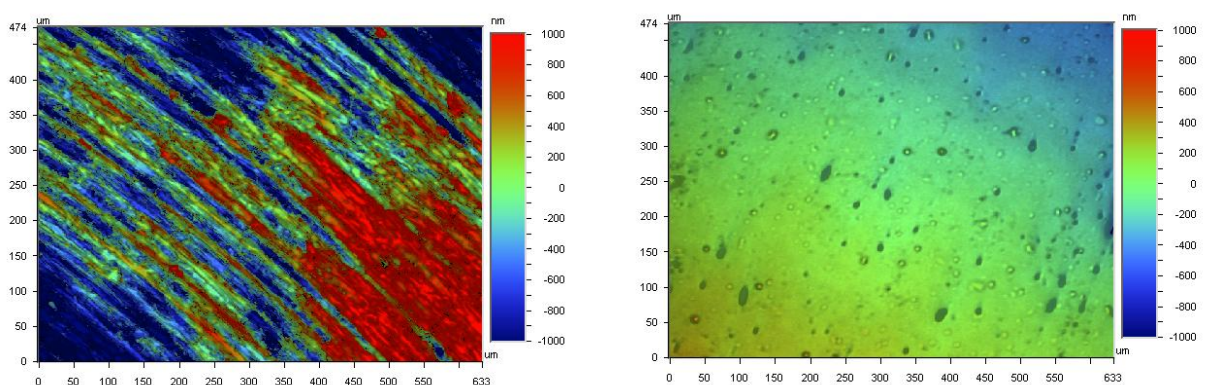


Figura 41. Imatges en 2-D de la rugositat de les mostres Ti_NP (esquerra) i Ti_P (dreta)

Tal i com es pot observar a simple vista en aquestes imatges, els colors de la imatge de la condició polida són els que es troben situats més al centre de l'escala, indicant que la mostra no presenta una rugositat molt significativa, tot el contrari que la mostra rugosa, que presenta una gran varietat de colors, el que

implica que hi ha una gran rugositat a la superfície. Per tal d'entendre més bé aquesta explicació, a la figura 42 es pot observar una imatge en 3-D de la mostra rugosa i una de la mostra polida. Tal com s'ha explicat anteriorment, a la mostra sense polir, podem observar com la mostra conté molts pics i moltes valls, cosa que provoca aquesta rugositat.

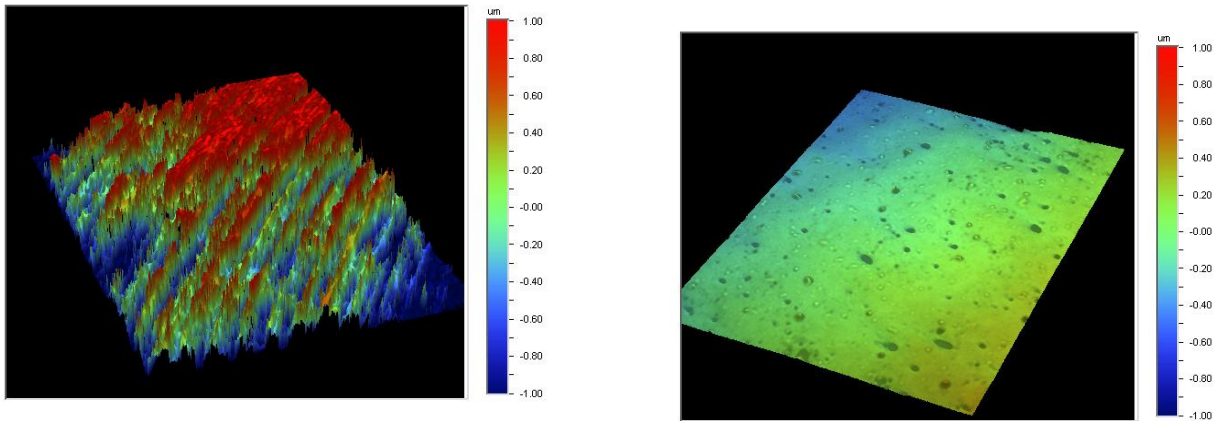


Figura 42. Imatge en 3-D de la rugositat de la mostra Ti_NP (esquerra) i Ti_P (dreta)

Una altre manera de poder observar aquesta rugositat és observar l'eix X en la superfície de la mostra i observar les seves variacions, tal i com es pot veure a la figura 43. Es pot observar com la mostra no polida presenta una gran variabilitat de valors que oscil·len entre $1 \mu\text{m}$ i $-1 \mu\text{m}$, partint del fet que el 0 és la superfície de la mostra. Per contra podem observar com a la mostra polida la rugositat és molt inferior i generalment és uniforme a excepció d'algun pic o alguna vall.

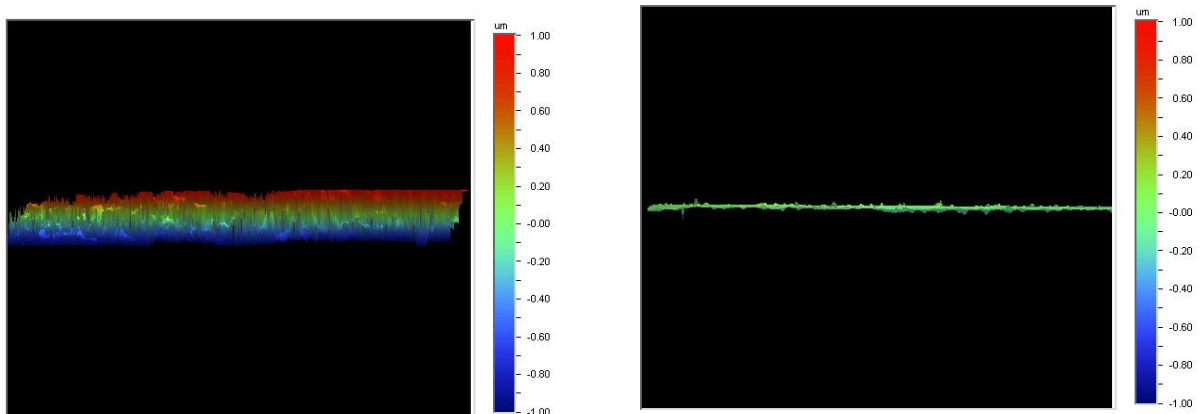


Figura 43. Imatges en 3-D de la rugositat de les mostres Ti_NP (esquerra) i Ti_P (dreta), vist a l'eix de les X.

4.3. Angle de contacte i energia superficial

El segon assaig consisteix en l'anàlisi de l'angle de contacte tant per l'aigua com per el diiodometà i l'anàlisi dels resultats de l'energia superficial. Primerament, ens centrarem en els dos assaigs d'angle de contacte i a continuació en el de l'energia superficial i així poder relacionar els resultats obtinguts.

Angle de contacte

El primer assaig és el de l'angle de contacte per l'aigua. Tal i com es pot observar a la figura 44 el procés de polir fa augmentar la hidrofobicitat de la superfície. No obstant, un cop s'ha fet la silanització i la funcionalització dels pèptids es pot observar com aquesta hidrofobicitat disminueix a nivells del titani sense polir en cas de les condicions de la silanització i inferior al titani sense polir per part de les condicions funcionalitzades amb el pèptid.

De totes maneres es pot observar com l'angle de contacte amb aigua un cop començats els tractaments superficials no pateix canvis significatius.

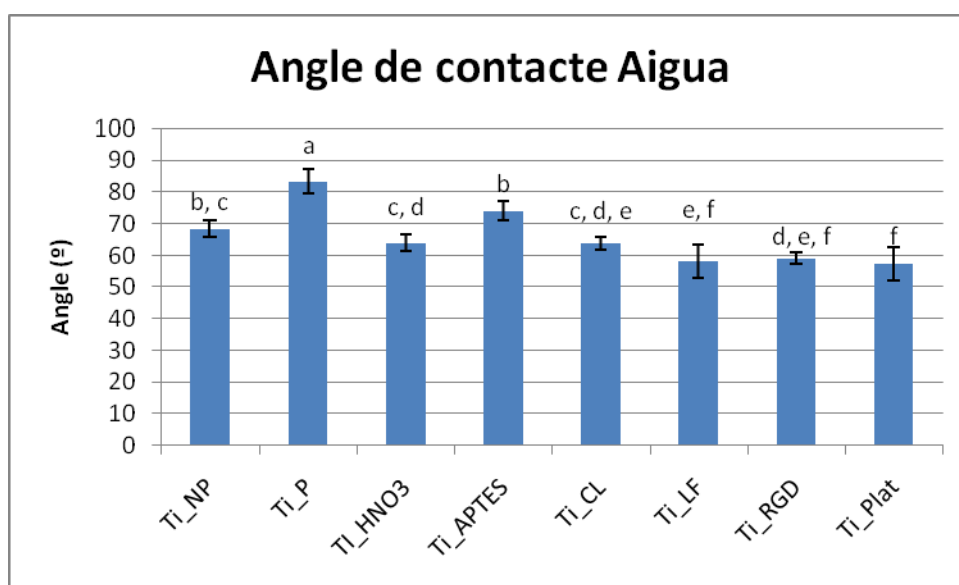


Figura 44. Gràfica de l'angle de contacte del titani amb aigua. Les condicions agrupades sota una mateixa lletra es considera que no són estadísticament diferents ($p > 0.05$)

Tal i com s'observa a la figura 44, el rang de valors d'angle de contacte de l'aigua oscil·la entre els $83,6^\circ$ que ens dona el titani polit i els $57,37^\circ$ que ens presenta la plataforma. L'activació amb nítric redueix significativament l'angle de contacte del titani polit, és a dir, fa la superfície més hidrofílica. Aquest resultat indica que aquest tractament serveix per netejar la mostra i generar grups hidroxils a la superfície, que són polars. La silanització amb APTES, per contra, augmenta els valors de l'angle de contacte. Això és lògic ja que els silans són molècules hidrofòbiques. La presència de les biomolècules, redueix en tots els casos els valors d'angle de contacte respecte al mostra silanitzada. Això és degut al caràcter hidrofílic de les molècules peptídiques.

Es pot observar com la variació entre els valors obtinguts de les superfícies funcionalitzades amb pèptids no és estadísticament significativa.

L'altre angle de contacte que s'ha realitzat és el del diiodometà. Tal i com es pot observar a la figura 45, aquest varia molt menys que l'angle de contacte obtingut amb l'aigua. Es pot observar com un cop polida la mostra l'angle de contacte roman bastant estable, només augmentant una mica durant la silanització. Cal remarcar que l'angle de contacte dels tres pèptids és pràcticament invariable.

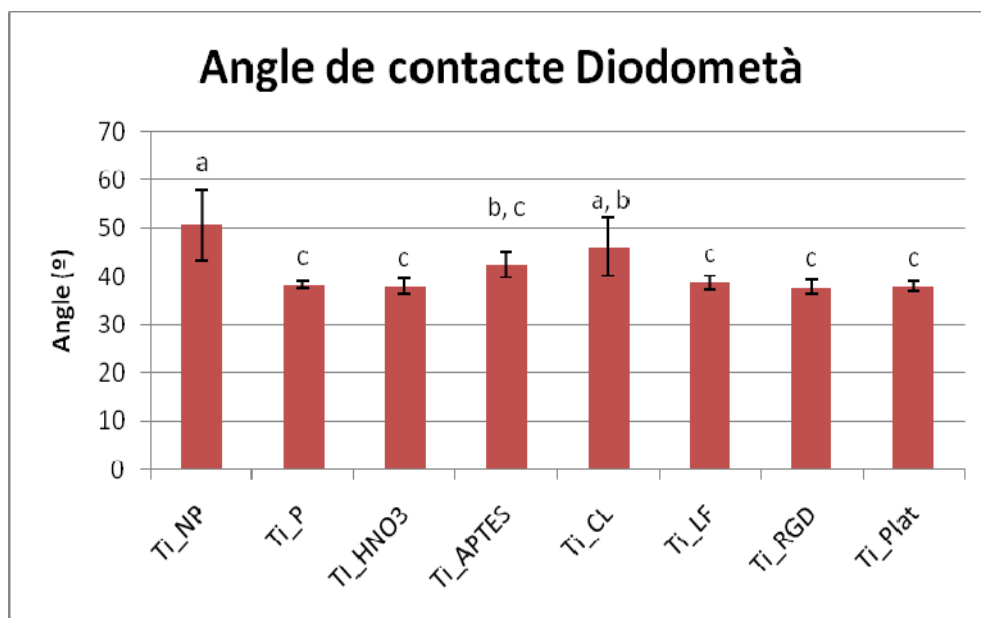


Figura 45. Gràfica de l'angle de contacte del titani amb diiodometà. Les condicions agrupades sota una mateixa lletra es considera que no són estadísticament diferents ($p > 0.05$)

Així doncs, el procés de funcionalització de les mostres, afecta clarament la mullabilitat de les mostres amb un líquid polar com és l'aigua, però no quan s'usa el diiodometà.

Energia superficial

L'altre resultat obtingut en aquest assaig, de manera indirecta, és l'energia superficial. A més, per aquesta energia superficial en tenim les seves components polar i dispersiva. A la figura 46 podem observar els resultats obtinguts.

Es pot observar com l'energia superficial augmenta en les mostres funcionalitzades amb pèptid en comparació amb les altres condicions. Podem veure com la diferència entre la mostra no polida i la polida és pràcticament invariable. Per contra, en activar-la amb el nítric aquesta energia superficial augmenta, per després tornar a disminuir amb l'APTES. A partir d'aquest punt, podem observar un creixement progressiu per a cada mostra control que es realitza assolint, així, el punt de major energia superficial amb la mostra funcionalitzada amb la plataforma. Es pot veure com una disminució en l'angle de contacte de l'aigua es relaciona amb un augment en l'energia superficial de les mostres.

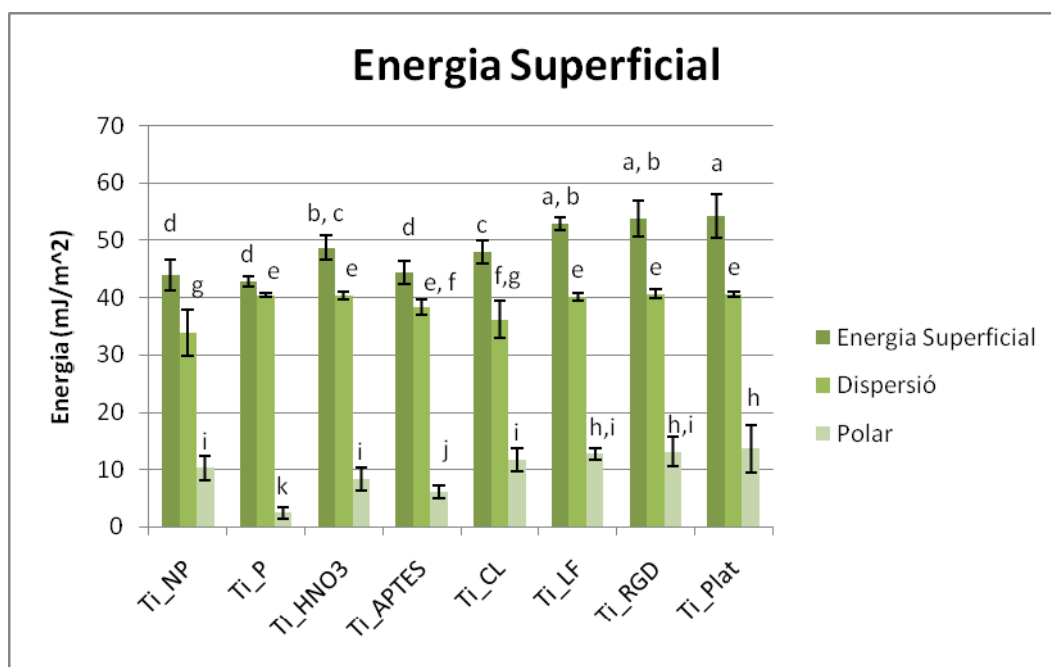


Figura 46. Gràfica de l'angle de contacte del titani amb aigua. Les condicions agrupades sota una mateixa lletra es considera que no són estadísticament diferents ($p > 0.05$)

Aquestes variacions de l'energia superficial no són els únics resultats que es poden extreure en aquest assaig. Per tal de poder extreure altres conclusions, es poden observar les seves components polar i dispersiva. Es pot observar com l'energia superficial és la suma de les dues components. Tot i això, qualitativament es pot observar com les components no segueixen la mateixa tendència que segueix l'energia superficial.

Primer analitzarem la component dispersiva. Podem observar com tot i tenir els valors més alts en les mostres funcionalitzades amb pèptid i amb la plataforma, no té la mateixa tendència creixent que es presenta a l'energia superficial.

Es pot veure com, a diferència de l'energia superficial i de la component polar, els processos de polir i d'activació augmenten aquesta component dispersiva. Tot el contrari succeeix en les condicions de la silanització, on tant la condició APTES com la condició CL disminueixen l'energia respecte l'activació. Tal i com s'ha comentat abans, un cop finalitzada la silanització es pot observar com la funcionalització amb pèptids fa augmentar aquesta component dispersiva.

A diferència de la component dispersiva, la component polar segueix una tendència més semblant a la de l'energia superficial. Tal com passa amb l'energia superficial, el procés de polir fa disminuir els valors de la component polar, augmenta amb l'activació i torna a disminuir amb la presència de l'APTES. Un cop afegit el crosslinker, però, es pot observar aquesta tendència creixent que també es pot observar al gràfic de l'energia superficial, i amb no tanta claredat a la component dispersiva.

Aquests resultats indiquen que les variacions en l'energia superficial són degudes principalment a variacions en la seva component polar, és a dir en canvis en la hidrofilitat de les mostres.

4.4. SEM

Per a l'assaig del SEM s'han obtingut imatges a 1.000, 5.000, 20.000, 100.000 i 200.000 augments. Tot i aquesta gran varietat d'imatges obtingudes, a continuació presentarem aquell conjunt d'imatges que poden ser més rellevants o que ens poden aportar més informació. Aquestes imatges seran les de 5.000 i les de 20.000 augments. Les imatges obtingudes restants no seran presentades ja que no aporten cap informació addicional. En aquestes imatges es pot observar com els processos i tractaments superficials no tenen cap efecte visual en la superfície del titani.

En aquestes imatges es pot observar, i enllaçant els resultats amb els obtinguts a l'interferometria, que la superfície del titani en cap cas està polida amb perfecció. A diverses imatges es pot observar com en aquesta superfície hi ha algunes perforacions que correspondrien a alguna ratllada. No obstant es pot observar com el procés de polit aporta un canvi molt significatiu en la morfologia de titani respecte a les mostres no polides.

En algunes altres imatges, es pot observar com hi ha petits elements que no formen part de la superfície. Aquests elements correspondrien a elements contaminants o externs als tractaments superficials.

Primer presentarem les imatges a 5.000 augments.

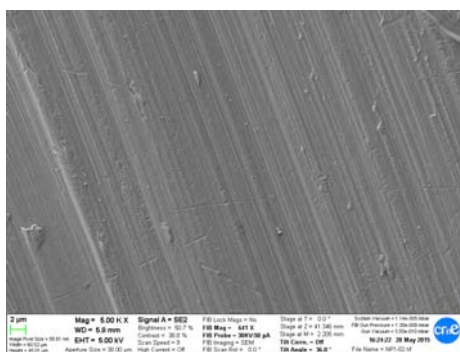


Figura 47. Imatge de la mostra Ti_NP a 5.000 augments

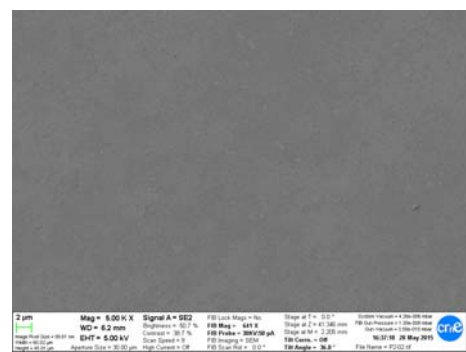


Figura 48. Imatge de la mostra Ti_P a 5.000 augments

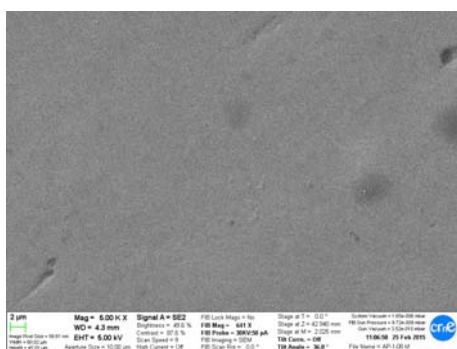


Figura 49. Imatge de la mostra Ti_APTES a 5.000 augments

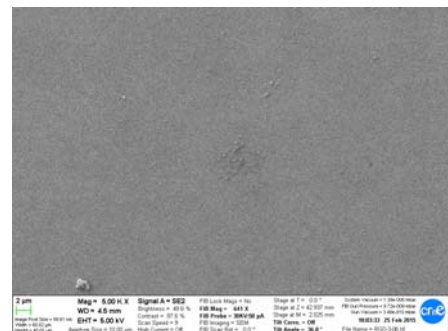


Figura 50. Imatge de la mostra Ti_RGD a 5.000 augments

A continuació presentarem les imatges de les condicions a 20.000 augments. De la mateixa manera que passa amb les imatges a 5.000 augments, només apreciem canvis significatius a la superfície de titani al passar d'una superfície rugosa a una superfície polida. La resta de condicions no presenten canvis significatius a la seva superfície.

Aquestes imatges al tenir uns augments més elevats, no observem possibles imperfeccions com podrien ser ratllades, però es pot observar amb més claredat les partícules contaminants.

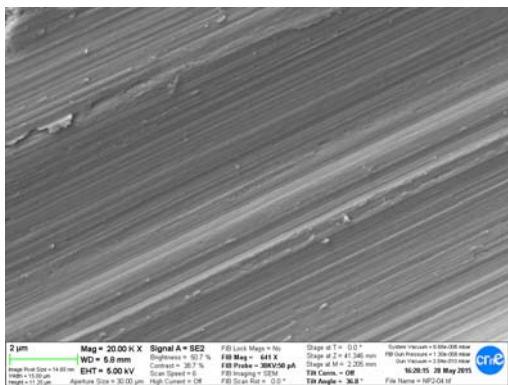


Figura 51. Imatge de la mostra de Ti_{NP} a 20.000 augments

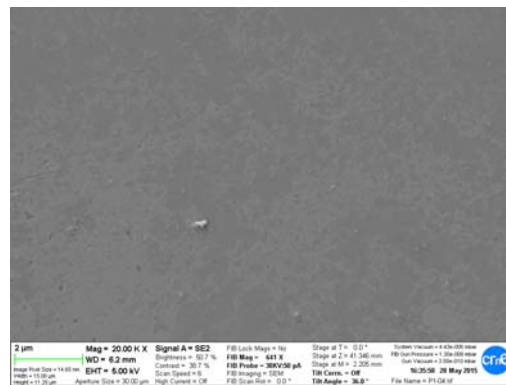


Figura 52. Imatge de la mostra de Ti_P a 20.000 augments

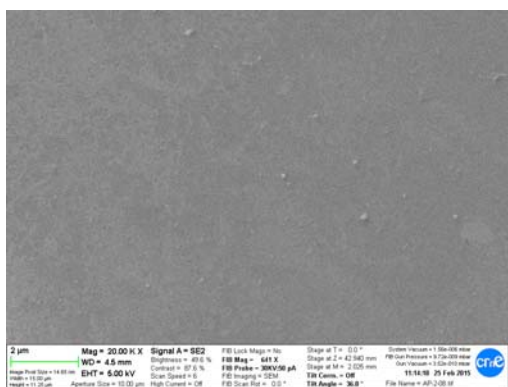


Figura 53. Imatge de la mostra de Ti_{APTES} a 20.000 augments

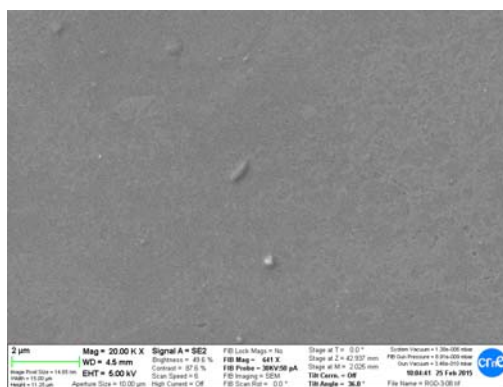


Figura 54. Imatge de la mostra de Ti_{RGD} a 20.000 augments

4.5. XPS

Un altre assaig que s'ha realitzat en el projecte és el de l'XPS. Aquest assaig consisteix en un rastreig mitjançant rajos-X de la superfície per tal de poder obtenir-ne la composició química. Per tal de poder extreure conclusions presentarem el % de composició de cada material a la superfície de la mostra de titani. Aquest assaig només ens permet observar fins a una certa profunditat de la superfície.

Els resultats es poden observar a la taula següent.

Taula 6. Taula de components i volums per a 50 mL de medi McCoy.

Condicció	C 1s	N 1s	O 1s	Si 2p	Ti 2p
Ti_HNO3	29,46 ± 5,88	1,26 ± 0,30	52,91 ± 3,41	0,16 ± 0,16	16,21 ± 2,15
Ti_APTES	51,02 ± 1,67	8,89 ± 1,05	25,57 ± 3,02	12,97 ± 1,54	1,55 ± 1,22
Ti_CL	53,77 ± 1,73	9,12 ± 0,44	24,45 ± 2,39	11,95 ± 0,89	0,71 ± 0,64
Ti_RGD	46,26 ± 0,58	7,32 ± 0,92	34,75 ± 1,66	7,08 ± 0,91	4,60 ± 0,73
Ti_Lf	45,01 ± 0,93	8,21 ± 0,38	34,55 ± 0,99	7,78 ± 0,34	4,44 ± 0,64
Ti_Plat	46,80 ± 1,78	8,34 ± 0,62	33,41 ± 1,91	8,03 ± 0,28	3,43 ± 0,77

Es pot observar com a la mostra control, Ti_HNO3, hi ha les senyals d'oxigen (O 1s) i titani (Ti 2p), corresponents a la capa de TiO₂. A més també s'observa la presència de carboni, degut segurament a la deposició de contaminants atmosfèrics a la mostra, ja que la condició activada amb nítric no hauria de presentar carboni a la seva superfície. A les altres mostres aquest senyal augmenta ja que totes les molècules que s'uniran progressivament a la superfície presenten molècules de carboni.

El cas del nitrogen ens indica que hi ha hagut el procés de silanització, ja que l'APTES, el crosslinker i els pèptids contenen grups amb nitrogen a la seva estructura. Aquest fet ens explica el fet que al Ti_HNO3 té molt poc nitrogen a la seva superfície i en canvi a les altres condicions aquest % augmenta.

El cas de l'oxigen és invers al del nitrogen. Es pot observar com al control Ti_HNO3 hi ha una elevada quantitat d'oxigen degut a que l'assaig detecta l'òxid de titani i els grups -OH que s'han format en l'activació. Per contra, un cop es comença a silanitzar i a crear capes sobre aquesta base, l'oxigen queda "tapat" i l'equip no el detecta amb tanta claredat. A l'hora de funcionalitzar els pèptids aquesta concentració torna a augmentar lleugerament.

El silici és també un clar exemple de la silanització ja que aquest element es troba principalment en aquest procés. Això fa que el Ti_HNO3 pràcticament no presenti silici a la seva superfície. En canvi al Ti_APTES i el Ti_CL es pot observar un augment considerable de la presència de silici. Després, un cop funcionalitzats els pèptids, podem observar com aquesta concentració disminueix, ja que no està tant exposat degut a que hi ha els pèptids i la plataforma a sobre.

Per acabar, podem observar com la presència de titani a la superfície segueix una tendència similar a la de l'oxigen explicada anteriorment. Podem veure com a la superfície activada amb nítric la presència de titani és molt elevada. No obstant, un cop es comencen a crear capes a sobre, la concentració de titani disminueix considerablement, ja que aquest titani queda tapat.

4.6. Assaig d'adhesió cel·lular

Per poder confirmar que aquesta plataforma actua correctament, i per tant, adquireix les propietats de millorar l'adhesió cel·lular i reduir l'adhesió bacteriana dels pèptids, s'ha procedit a realitzar un estudi cel·lular i un estudi bacterià.

El primer del que presentarem resultats és l'assaig d'adhesió cel·lular.

És sabut en molts estudis que el pèptid RGD sol té un efecte molt positiu en l'adhesió cel·lular i que la lactoferrina no té capacitat per millorar l'adhesió d'osteoblasts. Per això, es parteix de la hipòtesi que la plataforma ha de tenir un comportament similar al que s'obtingui amb el titani funcionalitzat amb el pèptid RGD.

En aquests assaigs es pretén veure el nombre de cèl·lules adherides a la mostra, i l'àrea de les seves cèl·lules. Ambdós gràfics han de tenir una tendència similar, ja que el fet de promoure l'adhesió cel·lular implica que les cèl·lules es troben més "còmodes" ja que tenen una interacció positiva amb receptors cel·lulars d'adhesió, les integrines fet que provoca que s'estiren més, fent que la seva àrea sigui superior a les mostres que no continguin senyals que promoguin la seva adhesió correctament, fet que farà que no s'estirin i per tant l'àrea sigui menor.

A més en aquest assaig s'ha assignat un control d'adhesió, que correspon a la fibronectina i que ens servirà per comprovar que les mostres han estat processades correctament i poder tenir un valor d'adhesió màxima i així poder comparar els resultats obtinguts.

Del primer assaig que es va realitzar se'n van extreure els resultats presentats a la figura 55. Tal i com es pot observar, obtenim un gràfic que concorda amb les idees exposades anteriorment a la hipòtesi de treball. Es pot observar com la mostra control i activada només amb nítric no promou l'adhesió cel·lular, tot el contrari que la mostra amb fibronectina (el control positiu) en la que s'obtenen uns valors molt elevats. Partint d'aquesta base, podem observar com les tres mostres funcionalitzades amb pèptids ens donen uns valors compresos entre aquests dos valors. Tal com s'ha explicat anteriorment, podem observar com la mostra amb el pèptid hLf1-11 té uns valors baixos, degut a que no promou l'adhesió cel·lular. Per contra, es pot observar com el Ti_RGD, té uns valors superiors al Ti_Lf, ja que promou l'adhesió cel·lular. Finalment es pot observar com els valors obtinguts en el Ti_Plat són molt similars als obtinguts al Ti_RGD, cosa que confirma la hipòtesi realitzada al principi.

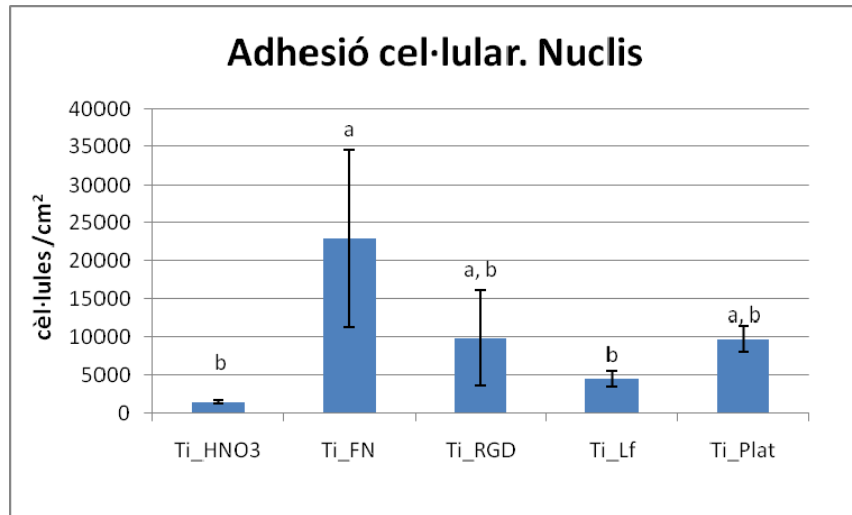


Figura 55. Assaig d'adhesió cel·lular (1). Nombre de cèl·lules. Les condicions agrupades sota una mateixa lletra es considera que no són estadísticament diferents ($p > 0.05$)

Encara que les tendències són evidents, un anàlisi estadístic d'aquestes dades indica que les diferències entre les mostres funcionalitzades no són estadísticament significatives.

En aquest assaig la tinció de les àrees no es va produir correctament i per tant no es va poder mesurar l'estirament de les cèl·lules adherides.

Per tal de poder comprovar la reproductibilitat d'aquests resultats, es va realitzar un segon assaig d'adhesió, els resultats del qual es poden trobar a la figura següent.

A simple vista es pot observar que la tendència dels resultats concorda amb els obtinguts a l'assaig anterior.

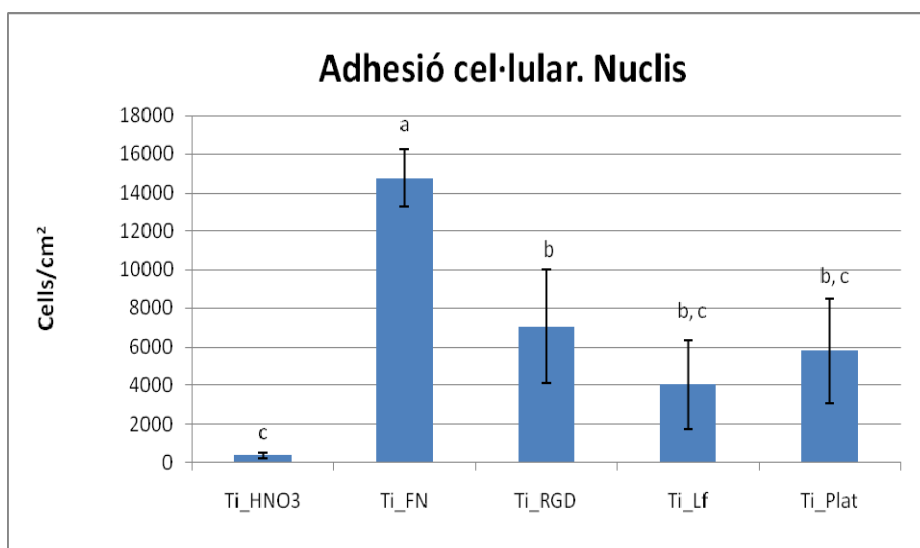


Figura 56. Assaig d'adhesió cel·lular (2). Nombre de cèl·lules. Les condicions agrupades sota una mateixa lletra es considera que no són estadísticament diferents ($p > 0.05$)

D'aquesta manera podem observar com de nou el Ti_HNO3 segueix essent el valor més baix i que no promou l'adhesió cel·lular, i el Ti_FN és el més elevat ja que correspon al màxim d'adhesió cel·lular. Tal i com passa amb l'assaig anterior els tres valors de les mostres funcionalitzades amb pèptid donen valors d'adhesió compresos entre els dos controls. La presència de RGD augmenta significativament l'adhesió cel·lular en comparació amb el control Ti_HNO3. La plataforma, que conté el motiu RGD també millora l'adhesió, tot i que no significativament. La lactoferrina dona els valors més baixos d'adhesió de la sèries de pèptids.

Per tant en aquest segon assaig d'adhesió s'ha pogut demostrar la correcta tendència de les mostres.

A més, en aquest segon assaig s'ha pogut visualitzar l'àrea de les cèl·lules de tal manera que ens ha permet extreure uns altres resultats (figura 57).

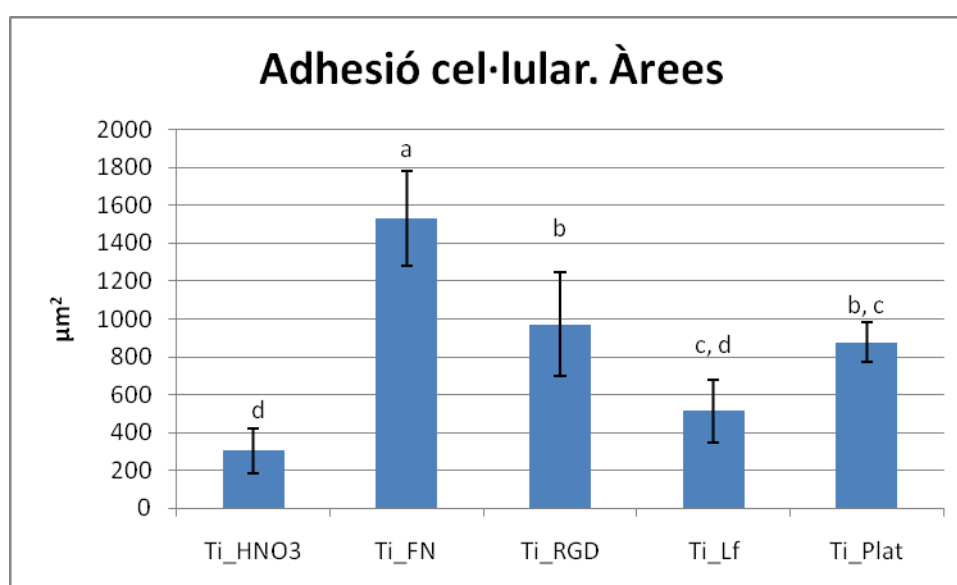


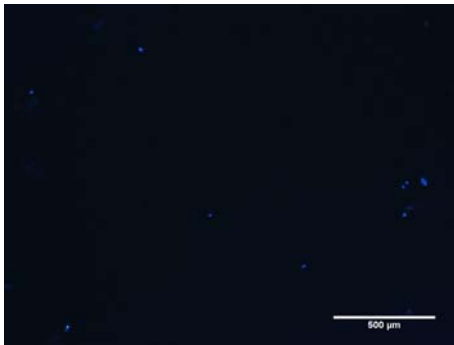
Figura 57. Assaig d'adhesió cel·lular (1). Àrea de les cèl·lules. Les condicions agrupades sota una mateixa lletra es considera que no són estadísticament diferents ($p > 0.05$)

D'aquesta manera, podem observar com el comportament i l'estirament d'aquestes cèl·lules segueix la mateixa tendència que els resultats obtinguts en l'assaig de comptatge. De la mateixa manera que s'ha vist en els assaigs anteriors podem observar com el Ti_HNO3 té el valor més baix i el Ti_FN el més elevat. Tal i com ha passat en els assaig anteriors, el valor obtingut per el Ti_RGD i el Ti_Plát és molt semblant, cosa que ens indica que les dues molècules tenen una capacitat per adhesiva similar. En el cas de la Ti_Lf s'observa que tot i haver-hi un cert augment en l'adhesió cel·lular per comptatge de nuclis (figures 55 i 56), aquesta unió no es tradueix en un augment en l'estirament cel·lular. Això indica que els valors observats d'augment d'adhesió cel·lular es deuen a processos inespecífics i no a la presència de senyals d'activació cel·lular, tal i com sí passa amb el pèptid RGD i amb la plataforma.

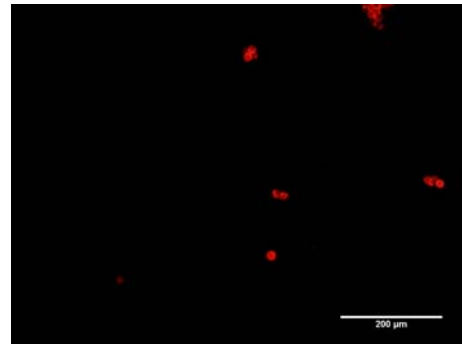
A més, i per tal de comprovar que aquesta tendència no varia, s'ha realitzat un tercer assaig d'adhesió que no s'ha presentat en el treball, però que confirma la tendència obtinguda en els dos assaigs anteriors tant en l'assaig d'adhesió de cèl·lules com en l'àrea d'aquestes cèl·lules.

A continuació i per tal de poder fer més visual els resultats comentats en aquesta secció es presentaran les imatges obtingudes a l'assaig d'immunofluorescència i on es podran apreciar les conclusions extretes.

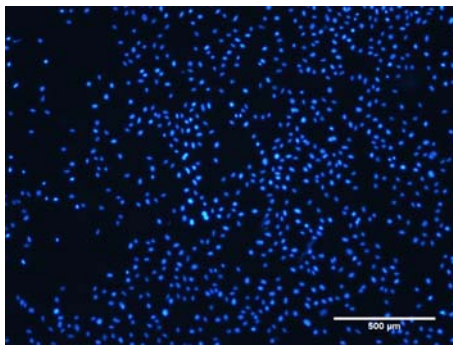
Ti_HNO3



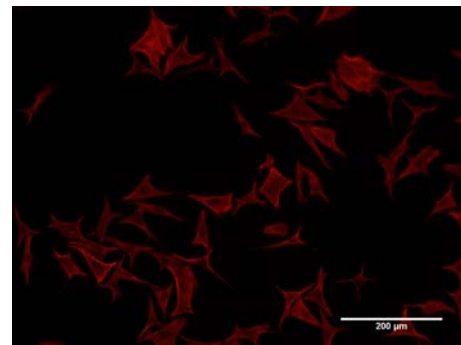
Ti_HNO3



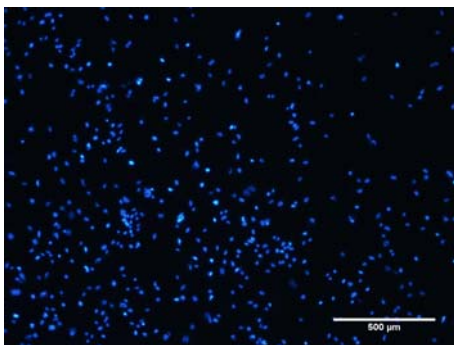
Ti_FN



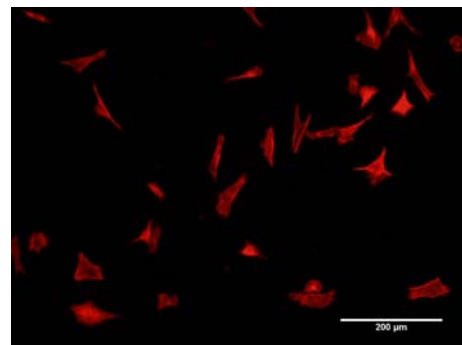
Ti_FN



Ti_RGD



Ti_RGD



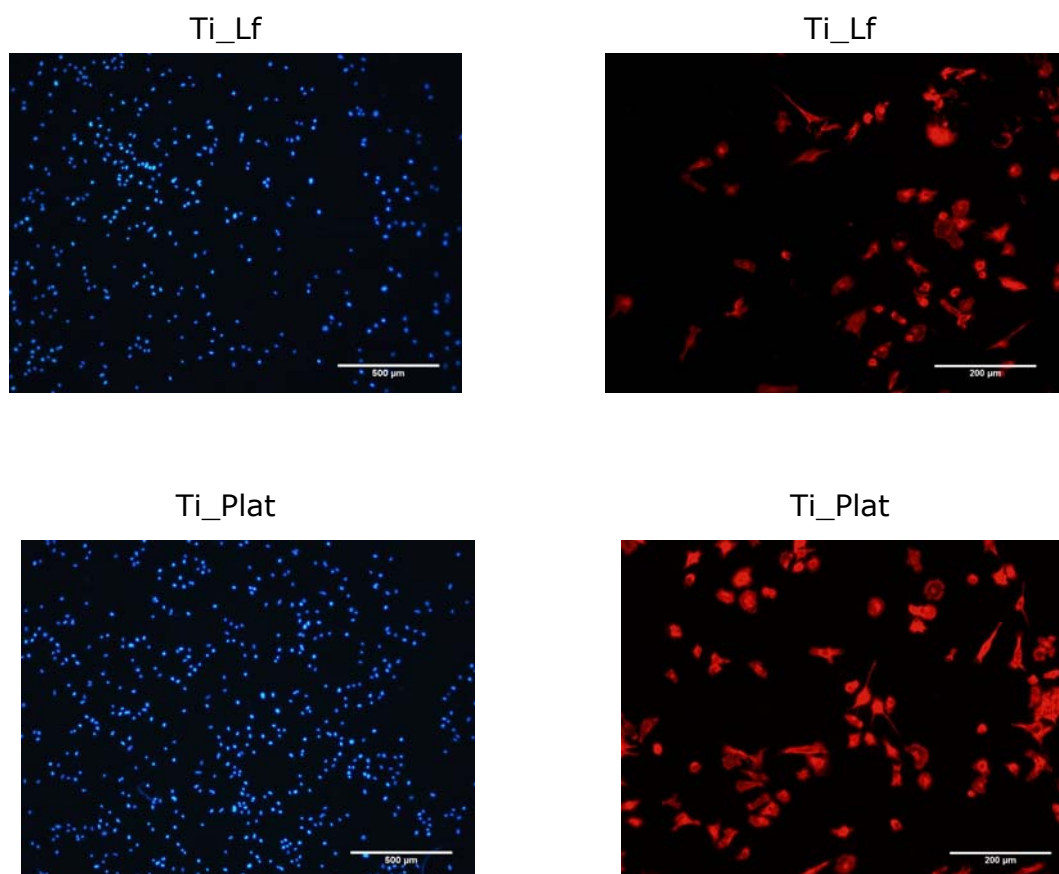


Figura 58. Imatges de cada control realitzades amb el microscopi d'immunofluorescència

4.7. Assaig d'adhesió bacteriana

L'últim assaig que s'ha dut a terme en aquest projecte és l'assaig amb bacteris, el qual ens permet comprovar si la plataforma presentava la propietat antimicrobiana que presenta la lactoferrina sola.

En aquest assaig partim de la hipòtesi que totes les mostres han de tenir una quantitat de bacteris adherits elevada amb l'excepció de la mostra Ti_Lf i la mostra Ti_Platform, les quals tenen propietats antibacterianes.

Per tal de poder observar aquesta característica antibacteriana, el que farem serà un comptatge de les CFUs. Aquestes CFUs corresponen a les unitats formadores de colònies que es formen a la mostra.

Un cop realitzat l'assaig i comptades les CFU que hi havia a cada placa, s'han extret els resultats que es poden observar a la figura 59.

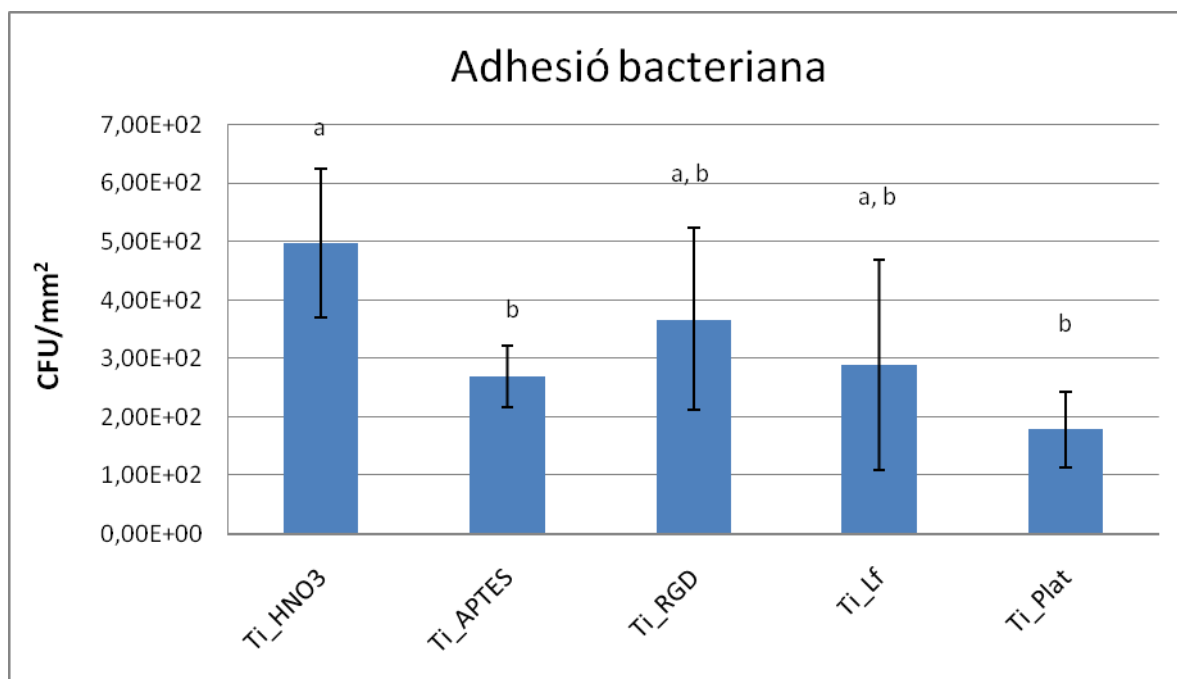


Figura 59. Assaig d'adhesió bacteriana. Nombre de CFUs. Les condicions agrupades sota una mateixa lletra es considera que no són estadísticament diferents ($p > 0.05$)

Podem veure com el Ti_HNO3 presenta una gran adhesió bacteriana, i que el segon valor més elevat és el del Ti_RGD. Això succeeix perquè cap de les dos superfícies conté cap component amb caràcter antibacterià.

També podem observar com el valor obtingut per el Ti_Lf i el Ti_Plac és inferior a aquests dos. Aquesta tendència decreixent que es mostra és el canvi que s'esperava, ja que les mostres que contenen el pèptid hLf1-11 a la seva superfície si tenen un component antibacterià.

Per contra, però, podem observar que el Ti_APTES que a priori no s'esperava que tingués un efecte antibacterià presenta valors inferiors al Ti_Lf. Aquest efecte podria ser degut a una interacció electrostàtica inespecífica entre els bacteris (que tenen a la seva membrana grups amb càrrega negativa) i l'APTES (que té grups amino carregats positivament).

Aquests resultats s'han intentat reafirmar en dos assaigs més d'adhesió bacteriana. En els assaigs posteriors s'ha pogut confirmar l'activitat antibacteriana de la plataforma, però sorprenentment, el pèptid lactoferrina ha donat valors alts d'adhesió bacteriana (no s'ha detectat inhibició), contràriament al que s'esperaria per la seva activitat antibacteriana descrita a la literatura.

Aquest problema pot ser degut a la contaminació d'aquest pèptid, ja que el fet de congelar-lo i descongelar-lo cada vegada en un ambient no estèril, fa que aquesta esterilitat es perdi i pugui ser contaminats amb més facilitat.

Una altra possible causa seria una possible contaminació de les plaques ja que no totes han estat guardades en condicions òptimes (a 4°C) i n'hi havia que presentaven una certa rugositat degut al flux de la campana creat durant el procés de solidificació de l'agar.

Per tal de poder assegurar i comprovar que els resultats obtinguts en aquest assaig són correctes, s'hauria de repetir l'assaig, partint de plaques noves, i re-esterilitzant els pèptids per tal d'assegurar que la possible contaminació que han sofert les mostres no vingui del pas de la funcionalització.

CAPÍTOL 5: ANÀLISIS DE L'IMPACTE AMBIENTAL

Aquest projecte s'ha realitzat amb la voluntat de minimitzar el màxim possible l'impacte ambiental.

Els residus sòlids i que no han estat en contacte amb cap substància perillosa s'han dipositat a uns cubells de brossa que es troben repartits per el laboratori. A més, el laboratori disposa de cubells de reciclatge de paper, cartró i plàstic, per a productes més generals. El mateix laboratori també disposa d'un cubell específic per els objectes de vidre.

Pel què fa als residus líquids, un cop utilitzats es dipositen en uns envasos de polipropilè específics. Aquests envasos estan identificats i separats en funció dels líquids que contenen a dins. D'aquesta manera, l'etanol, l'acetona, els dissolvents no halogenats utilitzats en els rentats i els àcids van separats evitant, així, interaccions indesitjades i que poden provocar reaccions no desitjades.

Els residus sòlids estèrils i no perillosos però que han estat en contacte amb productes biològics com podrien ser pipetes, puntes, falcons..., i que es troben en les campanes de cultius, tant cel·lulars com bacterians, són dipositats a un contenidor de brossa específic. Un cop el cubell esta ple, aquesta brossa s'esterilitza mitjançant una autoclau.

Finalment, els productes sòlids i perillosos, com podrien ser les agulles de les xeringues, un cop utilitzades, són dipositades a un cubell especial que es troba a dins la campana.

CAPÍTOL 6: CONCLUSIONS

Durant el projecte s'han obtingut una sèries de resultats experimentals que ens han permès arribar a una sèries de conclusions final.

S'ha pogut comprovar com els diferents tractaments superficials i químics no alteren la rugositat de la mostra, tot i que si afecten a la mullabilitat. Tal com s'ha explicat anteriorment, aquest efecte en la mullabilitat ha estat demostrat a la literatura i per tant podem concloure que els tractaments han fet el seu efecte i actuen correctament.

A més, s'ha comprovat que per separat, els pèptids realitzen la funció biològica per a la qual van ser dissenyats. Es pot dir que el pèptid RGD millora l'adhesió cel·lular en comparació a les altres condicions i que el pèptid hLf1-11 redueix l'adhesió bacteriana en comparació les altres condicions.

Per acabar, també es pot afirmar que la superfície de titani mostra una multifuncionalitat donada per l'ús de la plataforma. Aquesta plataforma, que presenta un motiu d'adhesió cel·lular i un antibacterià, ha donat lloc a:

- Uns valors d'adhesió cel·lular semblants als obtinguts amb el pèptid RGD
- Uns valors d'activitat antibacteriana similars o fins i tot millors que als obtinguts amb els pèptid hLf1-11.

Per tant podem extreure com a conclusió principal, que l'ús de la plataforma amb la combinació dels dos pèptids és completament funcional i dota la superfície del titani del caràcter antimicrobià que li aporta el pèptid hLf1-11 i que a més millora la capacitat d'adhesió de les cèl·lules, activitat provocada per el pèptid RGD. Així doncs, aquesta estratègia de funcionalització podria utilitzar-se per millorar la capacitat osteointegrativa dels implants dentals.

CAPÍTOL 7: BIBLIOGRAFIA

7.1. Referències bibliogràfiques

1. Vanegas J, Landinez N, Alvarado D. Generalidades de la interfase hueso-implante dental Basic principles of bone-dental implant interphase. *Rev Cuba Investig Biomédicas*. 2009;28(3):130-146.
2. Sfeir C, Ho L, Doll B a, Azari K, Hollinger JO. Fracture Repair. *Bone Regen Repair Biol Clin Appl*. 2005;(11):21-44. doi:10.1385/1-59259-863-3:021.
3. Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials*. 2001;22(19):2581-2593. doi:10.1016/S0142-9612(01)00002-3.
4. Novaes AB, de Souza SLS, de Barros RRM, Pereira KKY, Iezzi G, Piattelli A. Influence of implant surfaces on osseointegration. *Braz Dent J*. 2010;21(6):471-481.
5. Rosa MB, Albrektsson T, Francischone CE, Schwartz Filho HO, Wennerberg A. The influence of surface treatment on the implant roughness pattern. *J Appl Oral Sci*. 2012;20(5):550-555. doi:10.1590/S1678-77572012000500010.
6. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J*. 2001;10(SUPPL. 2):96-101. doi:10.1007/s005860100282.

7. López-García M, Kessler H. Stimulation of Bone Growth on Implants by Integrin Ligands. *Handb Biominer Biol Asp Struct Form*. 2008;3:109-126. doi:10.1002/9783527619443.ch52.
8. Mavrogenis a. F, Dimitriou R, Parvizi J, Babis GC. Biology of implant osseointegration. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2009;9(2):61-71.
9. Schliephake H, Scharnweber D. Chemical and biological functionalization of titanium for dental implants. *J Mater Chem*. 2008;18(21):2404-2414. doi:10.1039/B715355B.
10. Godoy M, Sevilla P, Gil FJ. Unión de péptidos a superficies de titanio para la mejora de la osteointegración. *Biomecánica*. 2009;17(2):60-68.
11. Xiao SJ, Textor M, Spencer ND, Wieland M, Keller B, Sigrist H. Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. *J Mater Sci Mater Med*. 1997;8(12):867-872. doi:10.1023/A:1018501804943.
12. Huber O. Cellular and Molecular Life Sciences Structure and function of desmosomal proteins and their role in development and disease. 2003;60:1872-1890. doi:10.1007/s00018-003-3050-7.
13. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(7):471-480. doi:10.1038/nrmicro2381.
14. Lasa I, Del Pozo JL, Penadés JR, Leiva J. Biofilms bacterianos e infección. *An Sist Sanit Navar*. 2005;28(2):163-175. doi:10.4321/S1137-66272005000300002.
15. Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol*. 2008;35(SUPPL. 8):286-291. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01274.x.
16. Cordero Ampuero J. Mecanismos de resistencia bacteriana en la infección de implantes. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol*. 2000;44(2):115-126. <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-cirugia-ortopedica-traumatologia-129-articulo-mecanismos-resistencia-bacteriana-infeccion-implantes-13007294>. Accessed May 11, 2015.
17. Zhao L, Chu PK, Zhang Y, Wu Z. Antibacterial coatings on titanium implants. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2009;91(1):470-480. doi:10.1002/jbm.b.31463.
18. Watanabe T, Nakajima A, Wang R, et al. Photocatalytic activity and photoinduced hydrophilicity of titanium dioxide coated glass. *Thin Solid Films*. 1999;351(1-2):260-263. doi:10.1016/S0040-6090(99)00205-9.
19. Bahar AA, Ren D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*. 2013;6(12):1543-1575. doi:10.3390/ph6121543.

20. Otto M. Bacterial Evasion of Antimicrobial Peptides by Biofilm Formation. In: Shafer W, ed. *Antimicrobial Peptides and Human Disease SE - 10*. Vol 306. Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Berlin Heidelberg; 2006:251-258. doi:10.1007/3-540-29916-5_10.
21. Godoy-Gallardo M, Mas-Moruno C, Fernández-Calderón MC, et al. Covalent immobilization of hLf1-11 peptide on a titanium surface reduces bacterial adhesion and biofilm formation. *Acta Biomater*. 2014;10(8):3522-3534. doi:10.1016/j.actbio.2014.03.026.
22. Huo L, Zhang K, Ling J, et al. Antimicrobial and DNA-binding activities of the peptide fragments of human lactoferrin and histatin 5 against *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*. 2011;56(9):869-876. doi:10.1016/j.archoralbio.2011.02.004.
23. Costa F, Maia S, Gomes J, Gomes P, Martins MCL. Characterization of hLF1-11 immobilization onto chitosan ultrathin films, and its effects on antimicrobial activity. *Acta Biomater*. 2014;10(8):3513-3521. doi:10.1016/j.actbio.2014.02.028.
24. Mas-Moruno C, Fraioli R, Albericio F, Manero JM, Gil FJ. Novel peptide-based platform for the dual presentation of biologically active peptide motifs on biomaterials. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014;6(9):6525-6536. doi:10.1021/am5001213.
25. Techane SD, Gamble LJ, Castner DG. X-Ray Photoelectron Spectroscopy. *Biointerphases*. 1970;17(June):98. doi:10.1116/1.3622481.

7.2. Bibliografia consultada

- Costa F, Carvalho IF, Montelaro RC, Gomes P, Martins MCL. Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomater*. 2011;7(4):1431-1440. doi:10.1016/j.actbio.2010.11.005.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):167-193. doi:10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.
- Fraioli R, Rechenmacher F, Neubauer S, et al. Mimicking bone extracellular matrix: Integrin-binding peptidomimetics enhance osteoblast-like cells adhesion, proliferation, and differentiation on titanium. *Colloids Surfaces B Biointerphases*. 2015. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.12.057.
- Gil FJ, Manzanares N, Badet A, Aparicio C, Ginebra MP. Biomimetic treatment on dental implants for short-term bone regeneration. *Clin Oral Investig*. 2014;18(1):59-66. doi:10.1007/s00784-013-0953-z.
- Hanawa T. Biofunctionalization of titanium for dental implant. *Jpn Dent Sci Rev*. 2010;46(2):93-101. doi:10.1016/j.jdsr.2009.11.001.

- Kroese-Deutman HC, van den Dolder J, Spauwen PHM, Jansen J a. Influence of RGD-loaded titanium implants on bone formation in vivo. *Tissue Eng.* 2015;11(11-12):1867-1875. doi:10.1089/ten.2005.11.1867.
- Mas-Moruno C, Dorfner PM, Manzenrieder F, et al. Behavior of primary human osteoblasts on trimmed and sandblasted Ti6Al4V surfaces functionalized with integrin avb3-selective cyclic RGD peptides. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2013;101 A(1):87-97. doi:10.1002/jbm.a.34303.
- Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(19):5985-5988. doi:10.1073/pnas.81.19.5985.
- Roessler S, Born R, Scharnweber D, Worch H, Sewing a., Dard M. Biomimetic coatings functionalized with adhesion peptides for dental implants. *J Mater Sci Mater Med.* 2001;12(10-12):871-877. doi:10.1023/A:1012807621414.
- Schwartz Z, Martin JY, Dean DD, Simpson J, Cochran DL, Boyan BD. Effect of titanium surface roughness on chondrocyte proliferation, matrix production, and differentiation depends on the state of cell maturation. *J Biomed Mater Res.* 1996;30(2):145-155. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199602)30:2<145::AID-JBM3>3.0.CO;2-R.
- Tim A. El Centro de Investigaci. 2002;173(683-684):653-668. doi:10.3989/arbor.2002.i683-684.1144.
- Vila J, Soriano A, Mensa J. Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26(1):48-55. doi:10.1157/13114395.
- Wyant JC. White light interferometry. *Proc SPIE - Int Soc Opt Eng.* 2002;4737(2002):98-107. doi:10.1117/12.474947.
- Xiao S-J, Textor M, Spencer ND. Covalent Attachment of Cell-Adhesive , (Arg-Gly-Asp) -Containing Peptides to Titanium Surfaces. *Langmuir.* 1998;14(9):5507-5516. doi:10.1021/la980257z.
- Zhao L, Hu Y, Xu D, Cai K. Surface functionalization of titanium substrates with chitosan-lauric acid conjugate to enhance osteoblasts functions and inhibit bacteria adhesion. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2014;119:115-125. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.05.002.
- Formación de biofilms bacterianos sobre distintas superficies de implantes dentales Eva Fernández Vidal Tutor: David Herrera González Junio 2013. 2013.
- Vanegas JC, Landinez NS, Garzón-Alvarado DA. Generalidades de la interfase hueso-implante dental. *Rev Cuba Investig Biomédicas.* 2009;28(3):130-146.

