



Biofuncionalización de superficies de titanio modificadas: Evaluación *in vitro*. Una opción innovadora en el campo de la implantología

A López-Aldrete,* ‡, †, ‡ AE Hernández Salinas,** KN Alvarado Estrada,***
D Silva-Herzog Flores,* Y Terán Figueroa,† JE Pérez López‡

RESUMEN

Antecedentes: Las superficies de titanio bioactivadas pueden ser una buena opción en el campo de la implantología, por tener una superficie con factores estimulantes del tejido óseo. **Objetivo:** Modificar superficies de titanio y evaluarlas con cultivos primarios de osteoblastos de rata. **Material y métodos:** Superficies de titanio modificadas con polímeros. Caracterización de las superficies por medio de espectroscopía de infrarrojo. Las superficies modificadas fueron evaluadas con cultivos primarios de osteoblastos de calvaria de rata utilizando dos técnicas de microscopía (electrónica de barrido y fuerza atómica) además de análisis por medio de técnicas de electroforesis y Western blot. **Resultados:** Nuestros resultados demuestran que la modificación de las superficies de titanio tiene efectos inductivos en la expresión de moléculas de adhesión de los osteoblastos de rata (OBr). **Conclusiones:** Este trabajo proporciona un parámetro muy interesante en la modificación de superficies, así como sus posibles aplicaciones en diferentes campos, como lo es implantología dental, cirugía apical y periodontología.

Palabras clave: Modificación de superficies, polielectrólitos, moléculas de adhesión, osteoblastos.

INTRODUCCIÓN

En el área de investigación de los materiales dentales existe la disciplina de la implantología dental, la cual está dedicada, entre otras cosas, a mejorar las propiedades del implante dental.¹⁻³ Este trabajo se enfocó específicamente en la modificación de la superficie de un material ampliamente utilizado en el

ABSTRACT

Antecedents: Bioactivated titanium surfaces can be a good choice in the field of implantology, having a surface with bone-stimulating factors. **Objective:** The development of this research was to modify titanium surfaces and evaluated with primary cultures of rat osteoblasts. **Material and methods:** Titanium surfaces modified with polymers. Characterization of the surfaces by means of infrared spectroscopy. Modified surfaces were evaluated with primary cultures of osteoblasts from rat calvaria of two techniques using microscopy (SEM and AFM) as well as analysis techniques by electrophoresis and Western blot. **Results:** The results show that surface modification of titanium has inductive effects on the expression of adhesion molecules rat osteoblasts (OBr). **Conclusions:** This work provides a very interesting parameter in the modification of surfaces and their potential applications in different areas such as dental implantology, apical surgery and periodontology.

Key words: Surface modified, polyelectrolytes, adhesion molecules, osteoblasts.

campo de la implantología, como lo es el titanio, con el fin de evaluar su biocompatibilidad con cultivos celulares de osteoblastos⁴⁻⁶ al biofuncionalizar el titanio con fosfatasa alcalina y calcitonina.

El objetivo de este trabajo fue modificar superficies de titanio utilizando la técnica de polimerización por plasmas y polielectrólitos autoensamblados, y la biofuncionalización con dos agentes osteoinductores para evaluar la biocompatibilidad de las superficies modificadas por medio de un cultivo celular primario de osteoblastos de rata.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las superficies utilizadas en este trabajo son laminillas de titanio (Ti c.p. 5 mm², espesor 0.5 mm, Alfa Aesar-Johnson Matthey Company). La modificación de las superficies se realizó utilizando dos técnicas

* Facultad de Estomatología (FE). Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP). SLP, México.

** Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina. UASLP.

*** Laboratorio de Ciencia Básicas. FE. UASLP.

† Facultad de Enfermería. UASLP.

‡ Instituto de Física. UASLP.

+++ Doctorado Institucional en Ingeniería y Ciencias de Materiales.

de polimerización; la primera es la de polimerización por plasmas y la segunda polielectrólitos autoensamblados. Finalmente se realizó la adsorción de la fosfatasa alcalina y la calcitonina (*Figura 1*). Para la caracterización de las superficies, se utilizó FTIR-ATR (Espectrofotómetro Perkin Elmer GX System modelo 1600). Para la evaluación *in vitro*, se utilizaron las siguientes técnicas: microscopía electrónica de barrido (MEB), microscopía de fuerza atómica (MFA), inmunofluorescencia con microscopio confocal invertido, Western blot (WB).

RESULTADOS

En los espectros de infrarrojo se obtuvo la evidencia de la modificación de la superficie de titanio (*Figuras 2A y 2B*) y se corroboró la actividad funcional de las biomoléculas adsorbidas (*Figuras 3A y 3B*); cada una de las vibraciones características corresponde a las bandas de los polielectrólitos autoensamblados y las biomoléculas adsorbidas a partir de los parámetros de Silverstein y colaboradores, así como Lin-Vien y asociados.^{7,8} En la *figura 3A* se presentan los diferentes espectros que a continuación se describen: el espectro del titanio sin modificar (línea negra), el cual no presenta ninguna señal, permite determinar que no interfiere en las señales emitidas por los polielectrólitos y las biomoléculas. El segundo espectro (línea verde) es el plasma de alilamina (PAA) depositado sobre el sustrato de titanio y los polielectrólitos poli L lisina (PLL) y ácido poliglutámico (PGA) adsorbidos sobre éste. La línea roja corresponde al espectro de la biomolécula adsorbida

sobre la plataforma de polielectrólitos, en este caso es la fosfatasa alcalina, (FA) el cual presenta las bandas características de los compuestos orgánicos y es muy semejante al de la calcitonina (CA) por estar ambas biomoléculas formadas por aminoácidos. En primera instancia presenta una vibración de estiramiento del enlace N-H como parte del grupo amida secundaria [-C(=O)-NH-], la cual está localizada a 3,287 cm⁻¹; las siguientes dos bandas corresponden a las vibraciones de estiramiento antisimétricas y simétricas de los grupos metíleno (-CH₂-), localizadas a 2,968 y 2,948 cm⁻¹; a continuación se identifica la banda correspondiente a 1,740 cm⁻¹, denominada amida I; esta banda se origina por la vibración de estiramiento del enlace C=O del grupo amida [-C(=O)-NH-]; ésta sirve de patrón para determinar la estructura secundaria nativa de la proteína; la banda denominada amida II se localiza en 1,640 cm⁻¹, y corresponde a la vibración de deformación del enlace C-N-H en el grupo amida secundaria [-C(=O)-NH-]; por otra parte, la banda que se encuentra en 1,453 cm⁻¹ corresponde a la vibración de deformación de los grupos metílenos (-CH₂-), la banda localizada en 1,376 cm⁻¹ corresponde al estiramiento del enlace C-N del grupo amida secundaria [-C(=O)-NH-]; también se identifica la banda denominada amida III, la cual está localizada a 1,222 cm⁻¹ y que corresponde a la vibración de deformación del enlace C-N-H del grupo amida secundaria [-C(=O)-NH-]. Finalmente, presenta una banda correspondiente a la vibración de estiramiento del enlace C-N del enlace amida secundaria [-C(=O)-NH-], y está localizada en 1,063 cm⁻¹. La línea azul corresponde a la calcitonina en solución amortiguadora de fosfatos (200 mg/mL) que presenta las mismas bandas antes descritas.

Para el caso de las superficies modificadas con calcitonina se realizó el mismo análisis y se obtuvo lo siguiente: en la *figura 3* se presentan los espectros de la superficie modificada con calcitonina que muestra las bandas de absorbancia características de la enzima en la superficie (línea roja) en comparación con las bandas de la CA en solución 100 UI (línea azul); la línea negra corresponde al espectro del titanio sin modificar y la línea verde es el espectro del titanio modificado con el plasma de alilamina y los polielectrólitos autoensamblados adsorbidos (superficie modificada sin biofuncionalizar). El espectro de la calcitonina (CA) presenta las siguientes bandas características: vibración de estiramiento del enlace N-H como parte del grupo amida secundaria

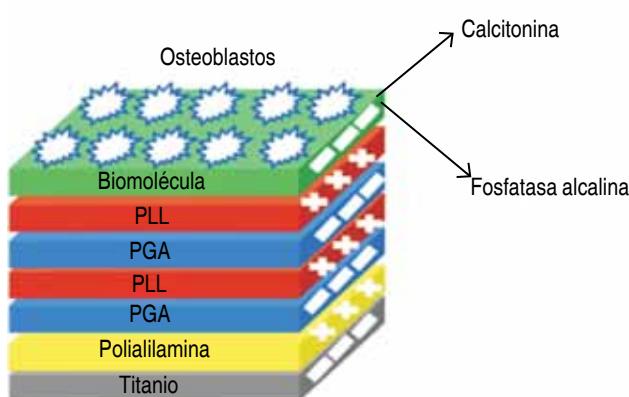


Figura 1. Dibujo que muestra el esquema de modificación de la superficie de titanio.

$[-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-]$, la cual está localizada a $3,338 \text{ cm}^{-1}$; las siguientes dos bandas corresponden a las vibraciones de estiramiento antisimétricas y simétricas de los grupos metíleno ($-\text{CH}_2-$), localizadas a $2,922$ y $2,811 \text{ cm}^{-1}$; a continuación se identifica la banda correspondiente a $1,742 \text{ cm}^{-1}$, denominada amida I; esta

banda se origina por la vibración de estiramiento del enlace $\text{C}=\text{O}$ del grupo amida $[-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-]$, ésta sirve de patrón para determinar la estructura secundaria nativa de la proteína; la banda denominada amida II se localiza en $1,640 \text{ cm}^{-1}$, y corresponde a la vibración de deformación del enlace $\text{C}-\text{N}-\text{H}$ en el grupo amida se-

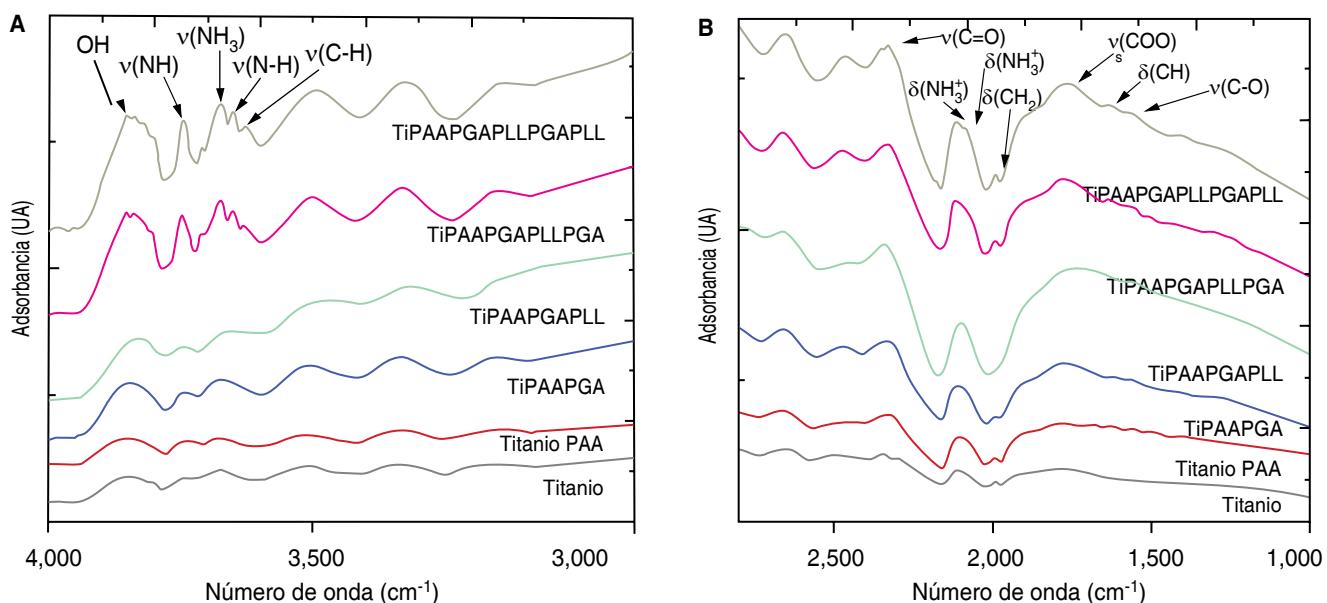


Figura 2. Espectros de FTIR-ATR. Modificación de la superficie de titanio.

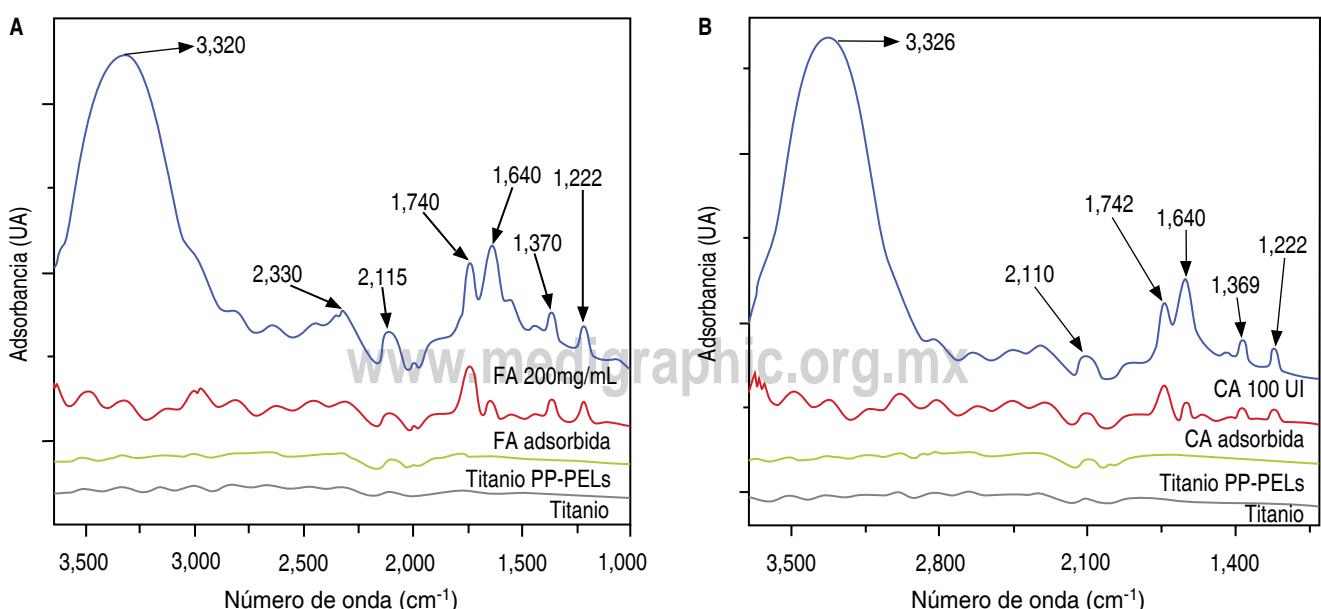


Figura 3. Espectros de FTIR-ATR. A. Fosfatasa alcalina B. Calcitonina.

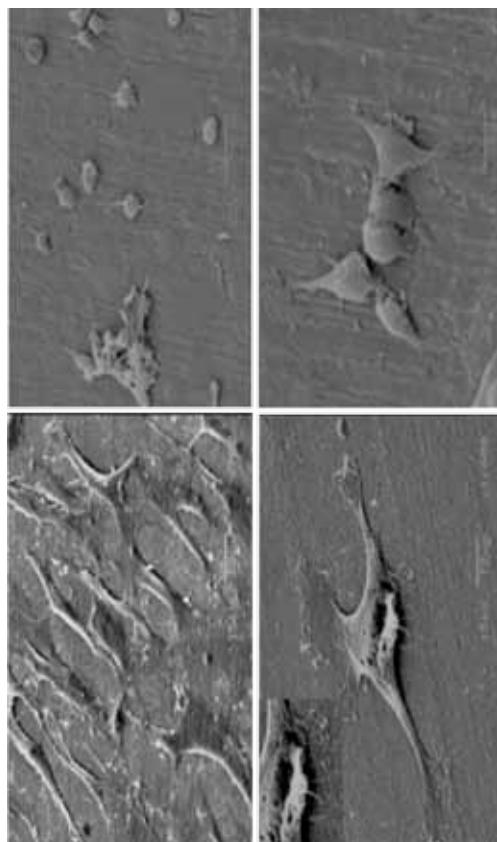


Figura 4. SEM Osteoblastos adheridos. Izq. Ti-CA. Der. Ti-FA.

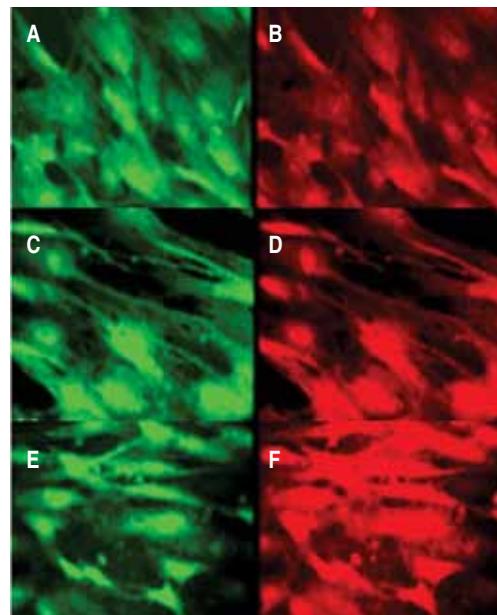


Figura 6. Expresión de vinculina e integrina beta 1 en osteoblastos de rata cultivados sobre superficies de titanio, inmunofluorescencia mediante microscopía confocal 40x, cultivo de 24 h. **A.** Vinculina (verde) **B.** Integrina beta 1 (rojo) sobre titanio sin modificar. **C.** Vinculina (verde) **D.** Integrina beta 1 (rojo) sobre titanio modificado con adsorción de calcitonina (TiCA). **E.** Vinculina (color verde) **F.** Integrina beta 1 (rojo) sobre titanio modificado con adsorción de fosfatasa alcalina (TiFA).

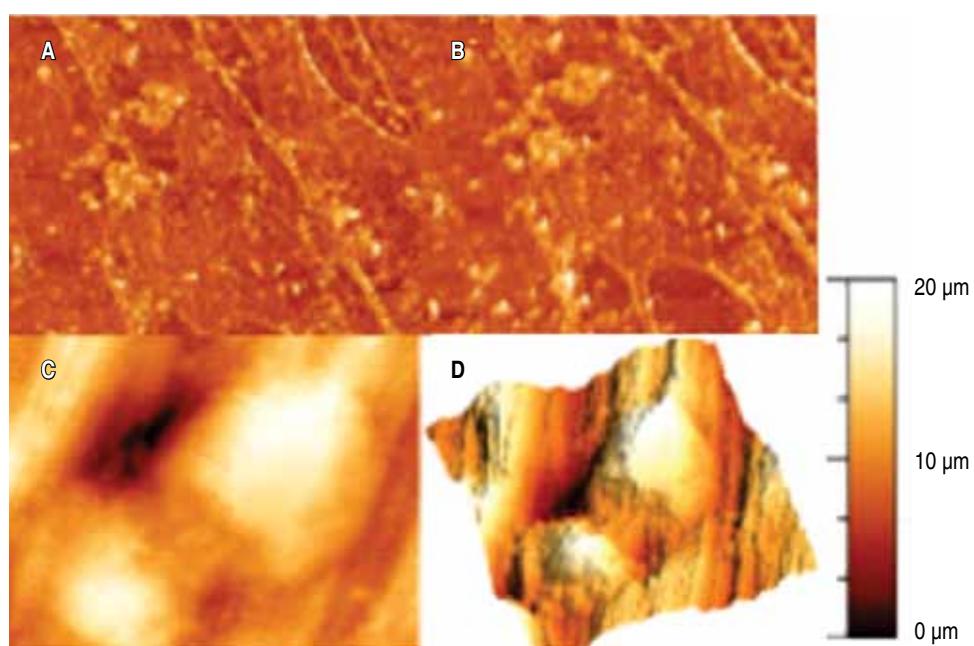


Figura 5.

AFM. **A** y **B** Osteoblastos adheridos Ti-CA. **C** y **D** Osteoblastos adheridos sobre Ti-FA.

cundaria [-C(=O)-NH-]; por otra parte, la banda que se encuentra en 1,450 cm⁻¹ corresponde a la vibración de deformación de los grupos metilenos (-CH₂-), la banda localizada en 1,371 cm⁻¹ corresponde al estiramiento del enlace C-N del grupo amida secundaria [-C(=O)-NH-]; también se identifica la banda denominada amida III, la cual está localizada a 1,222 cm⁻¹ y que corresponde a la vibración de deformación del enlace C-N-H del grupo amida secundaria [-C(=O)-NH-].

MEB, MFA e Inmunofluorescencia. En las superficies biofuncionalizadas con fosfatasa alcalina los osteoblastos estaban parcialmente extendidos y, por lo tanto, su forma era esférica. En cambio, los osteoblastos adheridos sobre las superficies biofuncionalizadas con calcitonina y las superficies sin modificar estaban completamente extendidos (*Figuras 4 y 5*). La expresión de la vinculina y la integrina beta 1 es mayor en las superficies biofuncionalizadas (*Figuras 6, 7 y 8*).

DISCUSIÓN

La osteointegración de un implante dental está condicionada por el tipo de material del que está hecho, así como de su topografía superficial y el tipo de recubrimiento. Aunque son varios los materiales utilizados para la fabricación de implantes dentales, actualmente el titanio es el de preferencia debido a su comportamiento inerte al entrar en contacto con

los tejidos biológicos. Como la topografía superficial influye en la adhesión y proliferación celular, los implantes dentales son sometidos a tratamientos que crean irregularidades superficiales en la escala micro y submicrométrica, o bien son utilizados recubrimientos basados en minerales de origen orgánico para mejorar la deposición de hueso sobre el implante. López-Aldrete y colaboradores (2011) realizan la bioactivación de la superficie de titanio con polielectrólitos y fosfatasa alcalina con el fin de evaluar la proliferación de fibroblastos de ligamento periodontal sobre las superficies; sus resultados confirman que las superficies bioactivadas promueven la proliferación celular.⁹

Además, una adecuada morfología superficial permite que las células osteogénicas se adhieran y proliferen sobre la superficie del implante; se crean así depósitos de mineral que constituyen la base de la formación del nuevo hueso.¹⁰ Por lo tanto, las estrategias que modifican la superficie del implante lo conducen a tener mejor respuesta osteoinductiva y osteoconductiva, y a tasas de deposición de hueso más elevadas que resultan en una osteointegración completa.¹¹

Por otra parte, en el 2010, Shin-Hee y colaboradores¹² realizaron un recubrimiento bioactivo sobre la superficie de titanio consistente en un gel híbrido con sílice y chitosán, el cual fue evaluado con fluido corporal simulado y cultivo de osteoblastos; los resultados mostraron que las superficies con el

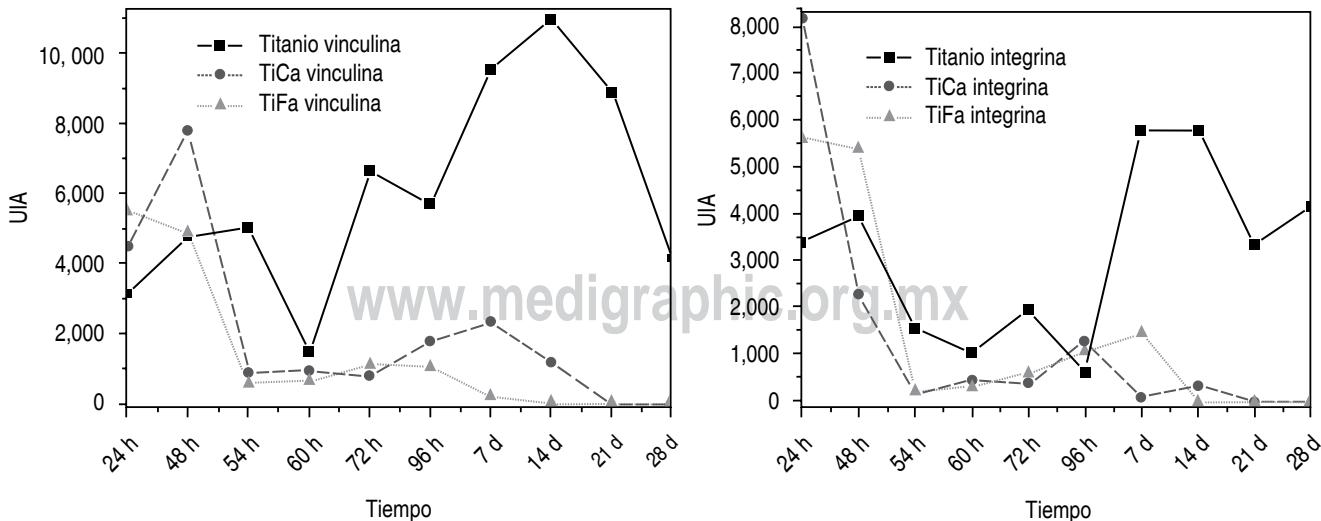


Figura 7. Gráfica de intensidad de fluorescencia que muestra la expresión de las moléculas de adhesión vinculina e integrina beta 1 de los osteoblastos de rata adheridos a las diferentes superficies.

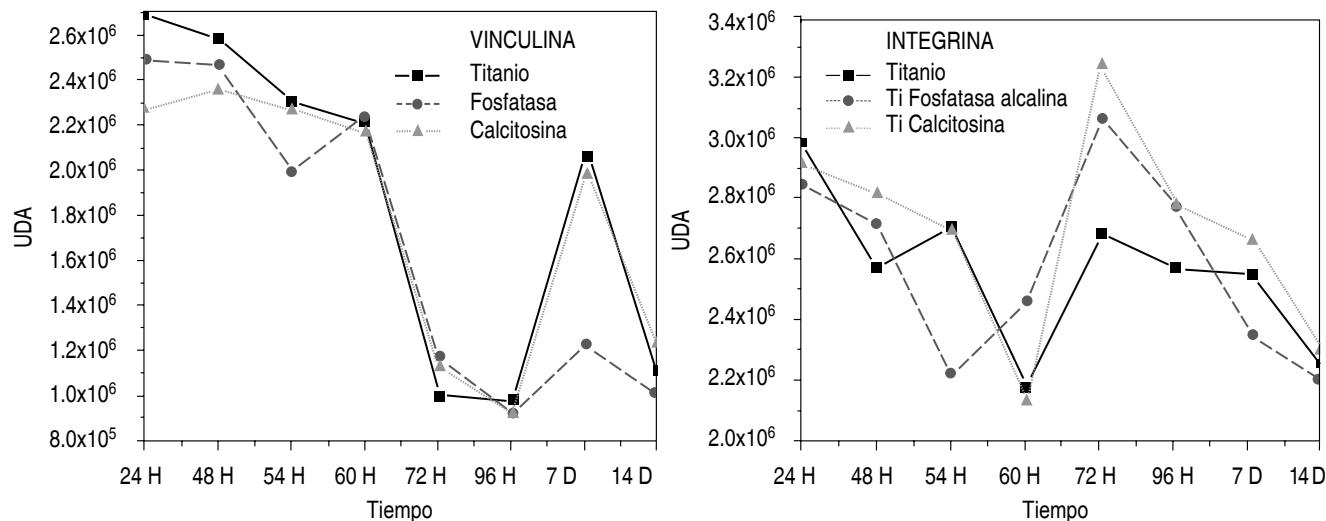


Figura 8. Gráfica de la densitometría del Western Blot que muestra la expresión de las moléculas de adhesión vinculina e integrina beta 1 ($\beta 1$) en los osteoblastos de rata adheridos a las tres superficies en diferentes tiempos (eje X), unidades densitométricas arbitrarias UDA (eje Y).

recubrimiento híbrido tuvieron una bioactividad excelente mediante la inducción de la precipitación rápida de apatita en su superficie cuando se sumerge en un fluido corporal simulado (SBF). En el 2010, Ning y asociados,¹³ dentro del campo de la modificación de superficies, recubren fibras de carbono con hidroxiapatita y fabrican una malla para ser aplicada en defectos óseos; los resultados demostraron que el recubrimiento de hidroxiapatita tiene efecto osteoconducivo al compararlo con la malla de fibra de carbono puro.

CONCLUSIONES

El comportamiento de los osteoblastos es semejante en períodos de tiempo corto al adherirse sobre la superficie de titanio sin modificar y sobre la superficie de titanio biofuncionalizado con calcitonina. En ellos se observa un número similar de osteoblastos adheridos y con una morfología de osteoblastos extendidos y aplanados con una gran cantidad de prolongaciones citoplasmáticas. En cambio, los osteoblastos adheridos a la superficie de titanio biofuncionalizado con fosfatasa alcalina presentaron evidentes diferencias a tiempos cortos. Los osteoblastos adheridos eran en menor cantidad y tenían una morfología esferoide, no estaban extendidos y con pocas extensiones citoplasmáticas.

AGRADECIMIENTO

Alejandro López Aldrete agradece al CONACYT la beca No. 213622.

REFERENCIAS

- Black J, Hastings G (eds). Handbook of Biomaterial Properties. Springer, UK: Chapman & Hall; 1998. pp. 135-143.
- Kamila, Morris. Considerations for the Biocompatibility. Evaluation of Medical Devices. USA: Medical Device & Diagnostic Industry; 2001. p. 236-240.
- Dunn MG & Maximan J. Biomaterials used in orthopaedic surgery. Boca Raton, FL: CRC Press; 1994. pp. 229-252.
- López Aldrete A. Inmovilización de proteínas en superficies biocompatibles. Tesis de Maestría. Maestría en Endodoncia. UASLP; 2005.
- Schuler M, Owen GRH, Hamilton DW, de Wild M, Textor M, Brunette DM et al. Biomimetic modification of titanium dental implant model surfaces using the RGDSP-peptide sequence: A cell morphology study. Biomaterials 2006; 27 (21): 4003-4015.
- Tang ZG, Hunt JA. The effect of PLGA doping of polycaprolactone film on the control of osteoblast behavior and proliferation *in vitro*. Biomaterials 2006; 27 (25): 4409-4418.
- Silverstein RM, Bassler GC, Morrill TC. Identificación espectrométrica de compuestos orgánicos. México, D.F.: Editorial Diana; 1980. pp. 85-132.
- Lin-Vien D, Colthup NB, Fateley WG, Grasselli JG. The Handbook of Infrared and Raman Spectroscopy Characteristic Frequencies of Organic Molecules. San Diego, NC: Academic Press; 1991. pp. 9-28.

9. López-Aldrete A, Silva-Herzog Flores D, Hernández Salinas AE, Palestino EAG, Sayao S, Terán FY et al. Bioactivation with alkaline phosphatase of modified surfaces of titanium and glass for the growth of human periodontal ligament fibroblasts. Rev ABO Nac 2011; 18 (6): 368-372.
10. Wennerberg A, Albrektsson T, Lindhe J. Surface topography of dental implants. Clinical Periodontology and Implant Dentistry. Munksgaard, UK: Blackwell; 2003. pp. 89-94.
11. Davies J. Bone bonding at natural and biomaterial surfaces. Biomaterials 2007; 28: 5058-5067.
12. Shin-Hee Jun, Eun-Jung Lee, Se-Won Yook, Hyoun-Ee Kim, Hae-Won Kim, Young-Hag Koh. A bioactive coating of a silica xerogel/chitosan hybrid on titanium by a room temperature sol-gel process. Acta Biomaterialia 2010; 6: 302-307.
13. Ning C, Jianwen D, Qiangxiu W, Quansheng M, Chengqian X, Musen L. An experimental bone defect healing with hydroxyapatite coating plasma sprayed on carbon/carbon composite implants. Surface & Coatings Technology 2010; 205: 1150-1156.

Correspondencia:

Alejandro López-Aldrete

Facultad de Odontología. UASLP.

Av. Manuel Nava No. 2, Zona Universitaria,

C.P. 78290, San Luis Potosí, S.L.P., México.

E-mail: aldrete@dec1.ifisica.uaslp.mx