



---

**Nuevo tratamiento de oxidación en aleaciones de NiTi  
para aplicaciones biomédicas. Caracterización  
superficial y respuesta biológica *in vitro***

---

**Alexandra Michiardi**

Memoria de Tesis presentada para optar al grado de Doctor por la  
Universitat Politècnica de Catalunya

Co-dirigida por  
Profesor Francisco Javier Gil Mur  
Dr. Conrado José Aparicio Bádenas

Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica  
E.T.S. d'Enginyeria Industrial de Barcelona  
Universitat Politècnica de Catalunya

Diciembre 2005

# 6 Evaluación y comparación de la respuesta biológica *in vitro* entre superficies de NiTi con y sin tratamiento de oxidación

---

<b>6.1 Objetivos</b>	<b>210</b>
<b>6.2 Introducción</b>	<b>211</b>
6.2.1 Los osteoblastos	211
6.2.1.1 Generalidades	211
6.2.1.2 Marcadores de la formación ósea	212
6.2.2 Estudios celulares <i>in vitro</i> sobre NiTi: estado del arte	213
<b>6.3 Materiales</b>	<b>215</b>
6.3.1 Superficies estudiadas	215
6.3.2 Células utilizadas	216
<b>6.4 Métodos</b>	<b>216</b>
6.4.1 Preparación superficial de los materiales	216
6.4.2 Sembrado	217
6.4.3 Protocolo de cuantificación del número de células viables	217
6.4.4 <i>Attachment</i>	218
6.4.5 Proliferación	219
6.4.6 Diferenciación	220
6.4.6.1 Cuantificación de la proteína total	220
6.4.6.2 Protocolo de determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina	221
6.4.6.3 Protocolo de determinación de los niveles de osteocalcina	222
6.4.7 Morfología celular	223
6.4.7.1 Soluciones tampón y fijadores	224
6.4.7.2 Microscopia de fluorescencia	224
6.4.7.2.1 <i>Fijación</i>	224
6.4.7.2.2 <i>Doble inmunofluorescencia</i>	224
6.4.7.3 Microscopia electrónica de barrido (MEB)	226
6.4.7.3.1 <i>Fijación</i>	226
6.4.7.3.2 <i>Deshidratación</i>	226
6.4.7.3.3 <i>Punto crítico</i>	226

6.4.8 Estadística	226
<b>6.5 Resultados</b>	<b>227</b>
6.5.1 <i>Attachment</i>	227
6.5.2 Proliferación	230
6.5.3 Diferenciación	230
6.5.3.1 Cuantificación de la proteína total	230
6.5.3.2 Actividad de la fosfatasa alcalina	230
6.5.3.3 Niveles de osteocalcina	233
6.5.4 Morfología celular	234
6.5.4.1 Observaciones por MEB	234
6.5.4.1.1 <i>Observación después de 1h de adhesión</i>	234
6.5.4.1.2 <i>Observación después de 3 días de adhesión</i>	234
6.5.4.2 Microscopia de fluorescencia	236
<b>6.6 Discusión</b>	<b>237</b>
6.6.1 <i>Attachment</i>	237
6.6.2 Proliferación y diferenciación	239
<b>6.7 Conclusiones</b>	<b>242</b>

En el presente capítulo se pretende estudiar la influencia del efecto del tratamiento OT sobre la respuesta celular *in vitro* de células osteoblásticas.

Con este objetivo, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* de cultivos de células osteoblásticas de la línea MG63, estudiando su comportamiento cuando estaban en contacto con las superficies de NiTi tratadas por OT o sin tratamiento (NT). Se realizaron ensayos de adhesión a distintos tiempos, ensayos de proliferación hasta dos semanas de cultivo y también ensayos de diferenciación. Además se observó la morfología celular de las MG63 adheridas en ambos tipos de superficies.

## **6.1 Objetivos**

Los objetivos de este capítulo son:

1. Evaluar la citocompatibilidad *in vitro* de distintas aleaciones de NiTi NT y tratadas por OT con células osteoblásticas MG63.
2. Evaluar la influencia del tratamiento OT sobre la adhesión, la proliferación y la diferenciación *in vitro* de las MG63, en comparación con las superficies NT.
3. Evaluar la influencia del tratamiento OT sobre la morfología de las MG63 a distintos tiempos de adhesión, en comparación con las superficies NT.
4. Evaluar el efecto de la composición química de la aleación NiTi sobre la respuesta celular *in vitro* de las MG63.

## 6.2 Introducción

En el presente trabajo, se estudiaron células óseas, pensando en la aplicación de los materiales de NiTi tratados por OT, con preferencia, en los campos dentales y/o ortopédicos. En concreto, se utilizaron osteoblastos humanos de la línea MG63.

### 6.2.1 Los osteoblastos

#### 6.2.1.1 Generalidades

Los osteoblastos son células que provienen de las células madres del mesenquima, también conocido como tejido conjuntivo embrionario, del cual se desarrollan los tejidos conjuntivos, el hueso, el cartílago y el sistema linfático y circulatorio.

Los osteoblastos son las células formadores de hueso que sintetizan y secretan todos los constituyentes de la matriz ósea no mineralizada, también llamada osteoide. Asimismo, son células que participan en la calcificación del hueso, y regulan el flujo de calcio y fosfato dentro y fuera del hueso.

Los precursores osteoblásticos proliferan y se diferencian en preosteoblastos, y más adelante en osteoblastos maduros.

Las células MG63 son una línea inmortal de células osteoblásticas derivadas de un osteosarcoma humano. Estas células exhiben características de osteoblastos relativamente inmaduros. Son capaces de sintetizar osteoide, y expresan proteínas específicas de la maduración celular como la fosfatasa alcalina y la osteocalcina. Sin embargo, no son capaces de mineralizar su osteoide, aunque si se les proporciona una fuente de fosfato inorgánico.

Son células ampliamente utilizadas y estudiadas para ensayos *in vitro*, en parte porque son un excelente modelo para estudiar la influencia de la morfología de la superficie de un sustrato en el comportamiento de adhesión, proliferación y diferenciación.

6.2.1.2 Marcadores de la formación ósea

El osteoblasto maduro está caracterizado por todo un abanico de marcadores (*tabla 6.1*).

Durante el proceso de maduración de la matriz, se expresan fosfatasa alcalina (ALP) y otras proteínas específicas y no específicas del hueso, lo cual va preparando el osteoide para la mineralización.

Las únicas proteínas específicas del hueso, identificadas en el día de hoy, son la osteocalcina (OC) y la sialoproteína ósea. Sin embargo, la combinación de abundante fosfatasa alcalina (ALP), la secreción de colágeno de tipo I, y la síntesis de proteínas no colagenosas son características del fenotipo osteoblástico. Como consecuencia, la detección de fosfatasa alcalina (ALP) ósea y de osteocalcina (OC) en el suero son indicadores de la formación de hueso (*tabla 6.2*).

**Tabla 6.1:** Marcadores del fenotipo osteoblástico de las células osteoblásticas humanas (*adaptado de [Jee01]*).

Marcadores	Célula inmadura	Osteoblasto maduro
<i>General</i>		
Fosfata alcalina (ALP)	±	±
<i>Proteínas de la matriz</i>		
Colágeno tipo III	-	-
Colágeno tipo I	+	++
Osteopontina	++	+
Osteonectina	+	+
Osteocalcina	-	+
Sialoproteína ósea	-	+
<i>Receptores locales/factores</i>		
Tumor necrosis factor (TNF)	nd	±
Interleucina 6 (IL-6)	nd	++

±, +, ++: débil, claro, expresión marcada, respectivamente; nd: no determinado

**Tabla 6.2:** Marcadores bioquímicos de la formación ósea encontrados en el suero (adaptado de [Seg02]).

Marcador	Tejido de origen	Ejemplos de método de detección	Características
Fosfatasa alcalina específica del hueso (ALP)	Hueso	Colorimétrico	Adherida a la superficie extracelular de las membranas celulares; tiene un papel indispensable en la mineralización de la matriz. Producto específico de los osteoblastos.
Osteocalcina (OC)	Hueso, plaquetas	ELISA	Contiene aminoácidos capaces de enlazar con el calcio y ácido $\gamma$ -carboxiglutámico, lo que facilita la interacción con la hidroxiapatita. Producto específico de los osteoblastos.

### 6.2.2 Estudios celulares *in vitro* sobre NiTi: estado del arte

La citocompatibilidad *in vitro* de las aleaciones de NiTi ha sido ampliamente estudiada. Existen trabajos en los cuales se estudiaron las interacciones de este material con distintos tipos de células (endoteliales, fibroblastos, osteoblastos, macrófagos, monocitos, linfocitos), de origen primario o de línea.

En general, las conclusiones de estos estudios *in vitro* son que el NiTi no induce ningún tipo de efecto citotóxico, con resultados similares al Ti puro en la mayoría de los casos [Alr99]; [Ayr98]; [KkrR02]; [Reh04]; [Rns97]; [Ryh99]; [Wvs97]. Sin embargo, se reportaron efectos negativos, tal como la liberación de citocinas Il-1 $\beta$  [Wlm99], el más potente estimulador de la resorción ósea [Hlo02], por parte de monocitos cultivados sobre NiTi, lo cual podría favorecer la secreción de ICAMs-1 (Moléculas de Adhesión Intercelular, mediador de la respuesta inflamatoria responsable del reclutamiento de otras células inflamatorias en el sitio de expresión) por parte de células endoteliales; la disminución de proliferación de fibroblastos [Tlt99], en el caso de NiTi electropulido; o la supresión de proliferación de linfocitos de rata [Sha02], en el caso de NiTi poroso.

Estas discrepancias se pueden atribuir a diferencias en la preparación superficial del material, incluyendo el método de esterilización elegido, en el tipo de células utilizadas y/o en el tipo de factor biológico evaluado.



Aunque muchos estudios *in vitro* se centran únicamente en la adhesión y/o proliferación celular a corto plazo (algunos días) [Sha96], se ha visto que una respuesta correcta, comparado con el control negativo, durante la adhesión y/o proliferación celular, no es suficiente para concluir sobre la citocompatibilidad del material estudiado [Pgl05]; [Wcl05]; [Wlm99]. Por esta razón, se ha ido utilizando toda una batería de ensayos *in vitro* desde entonces. Algunos de estos ensayos son relativos al proceso de diferenciación celular o de mineralización (en el caso de células osteoblásticas) [Klh05]; [Wcl05b]. Otros ensayos se basan en la observación morfológica de las células y/o de los puntos focales por microscopía de fluorescencia [Kid02]. Los ensayos que permiten cuantificar la secreción de algunas citocinas involucradas en el proceso inflamatorio [Wlm99], la formación de ROS (Reactive Oxygen Species, *apartado 4.1*) [Pgl05], o la expresión de factores de crecimiento [Kkr02], son otros ejemplos de las herramientas a las cuales se puede recurrir para caracterizar las interacciones *in vitro* entre un biomaterial y el entorno biológico.

Como se comentó anteriormente en los apartados introductorios de los capítulos de caracterización superficial (*capítulo 3*), de resistencia a la corrosión (*apartado 4.1*), y de adsorción de proteínas (*capítulo 5*), la interacción celular con la superficie de un biomaterial depende de la adsorción proteica previa, la cual a su vez está determinada por las características físico-químicas de la superficie. Por esta razón, algunos trabajos intentan correlacionar la respuesta celular observada *in vitro*, con algunas de las características superficiales del material estudiado y/o la adsorción de proteínas. En el caso concreto del NiTi, algunos trabajos estudiaron la influencia de la rugosidad de la superficie sobre el comportamiento de distintos tipos de células. Se concluyó que una superficie rugosa favorece la adhesión y la proliferación de los osteoblastos [Kdl02]; [Wcl05b]. Sin embargo, también se observó que el comportamiento de los fibroblastos es opuesto, es decir, la proliferación de este tipo de células es mejor sobre una superficie lisa de NiTi [Wcl05b]. Además, se puso de manifiesto la influencia de la cantidad superficial de Ni sobre la respuesta biológica. Se mostró que una mayor cantidad de Ni en superficie (mayor que 10,5% at. comparado con 4,8% at.) provoca un incremento de la cantidad de ROS en las células, y la pérdida de integridad de los filamentos de actina del citoesqueleto, en el caso de células humanas endoteliales del cordón umbilical [Pgl05]. Finalmente, otros estudios relacionan la cantidad de Ni superficial con la adsorción proteica y la consiguiente respuesta celular. Se reveló que, para superficies tratadas con un mismo tipo de tratamiento, cuanto mayor es la cantidad de Ni superficial, mayor es la adsorción de albúmina y, en consecuencia, menor es la adhesión de plaquetas [Shw04].

## 6.3 Materiales

### 6.3.1 Superficies estudiadas

Todos los materiales de NiTi estudiados eran de fase martensítica, y todos fueron pulidos y lavados según la metodología detallada en el apartado 1.5.5.

Se estudiaron tres grupos de superficies:

- Grupo 1: superficies de NiTi (Ale 1 y Ale 12, *tabla 1.2*) no tratadas (NT)
- Grupo 2: superficies de NiTi (Ale 1 y Ale 12) tratadas por OT
- Grupo 3: superficies de Ti comercialmente puro (Ti c.p.), preparadas de la misma manera que las superficies de NiTi NT.

En cada experimento se incluyeron también una superficie de control negativo y otra de control positivo (*tabla 6.3*). La naturaleza de cada una de estas dos superficies varía en función del ensayo, por lo que se detallará en cada apartado correspondiente.

**Tabla 6.3:** Grupos de materiales estudiados en los distintos estudios de cultivo celular.

Material	Tratamiento	Attachment	Proliferación	Diferenciación
Aleación 1*	NT	X	X	X
	OT	X	X	X
Aleación 12*	NT	X	O	O
	OT	X	O	O
Titanio c.p	NT	X	X	X
Control positivo	-	X	X	X
Control negativo	-	X	X	X

\**tabla 1.2*

X: incluido, O: no incluido

### 6.3.2 Células utilizadas

Los osteoblastos utilizados a lo largo de todo el estudio *in vitro* fueron MG63 de la American Type Collection (ATCC).

Se descongelaron células MG63 del mismo pase para todos los distintos experimentos. Se pusieron a cultivar en frascos de 75 cm<sup>2</sup> en medio de cultivo completo, sin rojo fenol (*tabla 6.4*). Al cabo de una semana, las células llegaron a confluencia y se tripsinizaron con 10 ml de tripsina-EDTA (Invitrogen) durante 4 minutos a 37°C. Se centrifugaron y resuspendieron para llegar a una suspensión de 10<sup>5</sup> células/ml y otra de 25.10<sup>5</sup> células/ml.

**Tabla 6.4:** Composición del medio de cultivo utilizado durante los ensayos de cultivo celular.

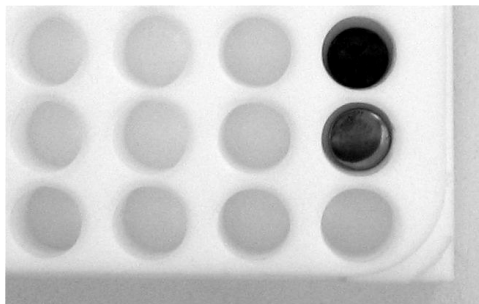
Producto	Concentración	Casa Comercial
DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )		Invitrogen
<i>Foetal Calf Serum</i> (FCS)*	10%	Invitrogen
Piruvato de sodio	1%	Invitrogen
Penicilina-Estreptomicina	1% (100U/ml)	Invitrogen
L-Glutamina	1%	Invitrogen

\*suero bovino fetal (complejo proteico)

## 6.4 Métodos

### 6.4.1 Preparación superficial de los materiales

Se sonicaron los discos de materiales de NiTi y Ti c.p. en acetona durante 10 minutos. Se sumergieron en etanol antes de ser esterilizados por luz ultravioleta, una hora cada cara. Se pusieron en botes estériles con *Phosphate Buffered Saline* (PBS, Sigma) estéril, y se dejaron con agitación orbital durante dos horas para limpiar los posibles residuos de etanol. Luego se colocaron en los pocillos de 8 mm de diámetro de una placa de cultivo de teflón, especialmente mecanizada para adaptarse a estos discos (*figura 6.1*), recién esterilizada por autoclave.



**Figura 6.1:** Detalle de una placa de cultivo mecanizada en teflón. Contiene pocillos de 8 mm de diámetro, en los cuales se colocan los discos de NiTi y de Ti c.p.

#### 6.4.2 Sembrado

Dos horas antes de sembrar las células, se añadieron 300  $\mu$ l de medio completo precalentado a 37°C en cada pocillo. Esta etapa sirve para que todas las superficies lleguen a un equilibrio con las proteínas presentes en el medio, antes de colocar las células.

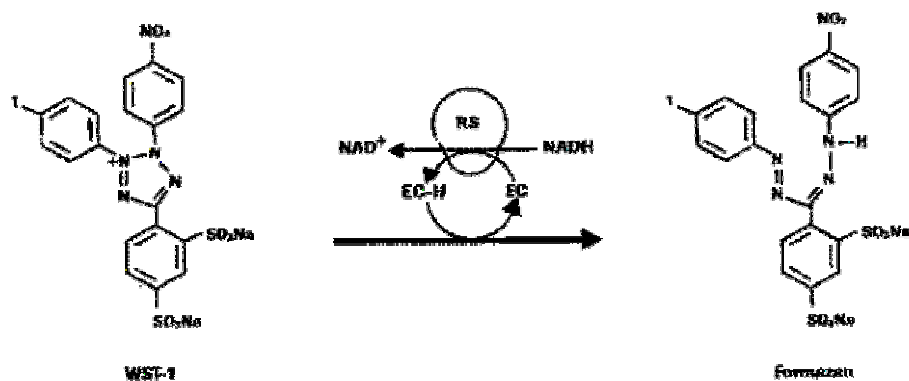
A continuación, se colocó el número de células requerido en función del ensayo en cada pocillo y se incubaron las placas a 37°C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> y de 100% de humedad.

Después de 1, 3, 6 y 9 días se renovó el medio de cultivo.

#### 6.4.3 Protocolo de cuantificación del número de células viables

Tanto en el ensayo de *attachment* (apartado 6.4.4) como en el de proliferación (apartado 6.4.5), se utilizó el ensayo denominado WST (WST-1, Roche), similar al más conocido ensayo MTT, para la cuantificación del número de células viables.

Es un método colorimétrico que se basa en la reducción de una sal de tetrazolio en formazán por la acción enzimática de las mitocondrias de las células viables (figura 6.2). Puesto que el formazán tiene una coloración naranja, se puede cuantificar el número de células viables mediante una medida de absorbancia a 450 nm. Un aumento del número de células viables resulta en un aumento de la cantidad de formazán formado, y consecuentemente, en una coloración de la solución más intensa. De esta manera, los valores de absorbancia leídos son directamente proporcionales al número de células viables.



**Figura 6.2:** Reducción del WST-1 (sal de tetrazolio de sodio) en formazán por la acción enzimática de las mitocondrias de las células viables.

Se retira el medio de cultivo de los pocillos. Se lavan dos veces con PBS precalentado a 37°C. Se vuelve a colocar 300 µl de medio de cultivo fresco, y se añade 30 µl de WST. Se dejan las placas en la incubadora durante 1 h, al cabo de la cual se hace la medida de absorbancia. La equivalencia entre el valor de absorbancia medido y el número de células correspondiente se obtiene gracias a la elaboración de una curva patrón, obtenida en las mismas condiciones para una cantidad de células de entre  $5 \cdot 10^3$  hasta  $100 \cdot 10^3$ .

#### 6.4.4 Attachment

En uno de sus trabajos, Boyan et al. [Bld01] aclaran la diferencia que existen entre las palabras de *attachment* y *adhesion* (en inglés) utilizadas en el campo del cultivo celular. Estos autores dicen que el *attachment* se refiere al número de células efectivamente adheridas al sustrato en comparación con el número de células que tuvieron una oportunidad de adherirse, mientras que la palabra de *adhesion* está relacionada con la fuerza con la cual estas células están unidas al sustrato.

Por otra parte, en su trabajo de revisión bibliográfica, la autora Anselme K. [Ans00] hace una distinción diferente de estas dos palabras que, según ella, se emplean indistintamente bajo el término de *adhesion*, en el campo de los biomateriales. Ella describe la adhesión celular como un fenómeno constituido de dos fases. La primera fase es la fase del *attachment*. Esta fase ocurre rápidamente y sólo involucra eventos de corto plazo, tal como enlaces físico-químicos entre las células y la superficie del material (fuerzas iónicas, de Van der Waals, etc.). Y, durante la segunda fase de adhesión, a más largo plazo, existen interacciones entre varias entidades biológicas: las proteínas de la matriz extracelular, de la membrana celular y del citoesqueleto. En esta segunda fase empieza la transducción de señal que lleva a la regulación de la expresión génica.

En el presente trabajo, se utiliza la palabra de *attachment* para referirse al ensayo de adhesión a muy corto plazo (hasta 8 horas). A más largo plazo, se utilizarán las palabras de adhesión, y de fuerza de adhesión para diferenciar entre el número de células adheridas y la fuerza con la cual están adheridas.

En el ensayo de *attachment*, el control positivo\* y el control negativo\* son respectivamente la superficie de poliestireno de las placas de cultivo comercial (TCPS, *Tissue Culture Polystyrene*, Nunc™), y la superficie de teflón de las placas de cultivo utilizadas y mecanizadas expresamente para realizar el presente trabajo.

Se colocaron 100 µl de la solución a  $25 \cdot 10^5$  células/ml sobre cada superficie estudiada (*tabla 6.3*). Después de 1h, 4h y 8 h de incubación a 37°C se realizó el ensayo WST para cuantificar el número de células adheridas a las distintas superficies.

Este experimento se llevó a cabo una única vez, por triplicado para cada grupo de superficie.

#### 6.4.5 Proliferación

En este estudio, el control negativo\* es el TCPS, mientras que el control positivo es el TCPS con medio de cultivo suplementado con 0.01% de *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS). El SDS es un producto tóxico para las células.

Se colocaron 120 µl de la solución a  $10^5$  células/ml sobre las superficie estudiadas (*tabla 6.3*). Se realizó el ensayo WST después de 1, 3, 6 y 9 días de incubación para determinar la curva de proliferación de los MG63 en función de la superficie.

Se llevaron a cabo dos experimentos separados de proliferación para comprobar la reproducibilidad de los resultados, por triplicado para cada grupo de superficie.

---

\* La denominación de control positivo o de control negativo depende del ensayo. En el caso del *attachment*, el control que da buenos resultados de adhesión, es el control positivo, es decir el TCPS. Mientras que en el caso de la proliferación, el control negativo es el que demuestra una buena citocompatibilidad. En este caso, también será el mismo TCPS.

#### 6.4.6 Diferenciación

El estudio de diferenciación se llevó a cabo a continuación del estudio de proliferación, detallado anteriormente.

Después de nueve días de proliferación, se colocaron diariamente en cada pocillo, y durante 48 h, 3 µl de ácido ascórbico (vitamina C a 10 mg/ml, Sigma) y 3 µl de dexametasona ( $5 \cdot 10^{-6}$ M, Sigma).

La adición de ácido ascórbico y de dexametasona en cultivos osteoblásticas, e incluso en cultivos de células madres embrionarias, fue reportada en varios trabajos como estimuladora de la diferenciación ósea [Aam02]; [Bbx01]; [Cps05]; [Ikh04]; [Nka03].

Después de estas 48 h de estimulación, se recogieron los sobrenadantes de cada pocillo. Se utilizaron 200 µl de *Mammalian Protein Extraction Reagent* (M-PER®, Pierce), durante 10 minutos, para lisar las células que estaban en contacto con los materiales. Tanto los lisados celulares como los sobrenadantes se conservaron a -80°C hasta su posterior análisis.

Los resultados se obtuvieron por triplicado para cada grupo de superficie, y en dos experimentos independientes para comprobar su reproducibilidad.

##### 6.4.6.1 Cuantificación de la proteína total

El ensayo denominado BCA (Pierce) fue el que se utilizó para la cuantificación de la proteína total contenida en los lisados celulares recogidos el decimoprimer día, después de dos días de estimulación para la diferenciación.

Las siglas BCA son utilizadas para *Bicinchoninic Acid Assay* (o test de ácido bicinconinico), que es un ensayo basado en la conversión de los iones  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$  en un medio alcalino. Los iones  $\text{Cu}^+$  se detectan luego por reacción con el BCA. Los productos de esta reacción dan una coloración violeta cuya absorbancia se lee a una longitud de onda de 562 nm.

La producción de los iones  $\text{Cu}^+$  depende de la concentración de las proteínas presentes en el medio, y del tiempo de incubación. De esta manera, la cantidad de proteínas contenidas en una muestra desconocida se puede determinar espectrofotométricamente y comparar con muestras estándares de concentración conocida. Estas muestras estándares son las que fueron utilizadas para obtener la curva patrón y correspondían a concentraciones de *Bovine Serum Albumin* (BSA, Sigma) entre 0 y 2000 µg/ml, según las instrucciones del fabricante.

El protocolo consiste en colocar 25 µl de muestra (lisado celular) con 200 µl de la solución de trabajo (que contiene cobre) en pocillos de una placa de 96 pocillos, dejar incubar al baño María durante 30 minutos a 37°C y leer la absorbancia a 562 nm.

Los valores obtenidos mediante este ensayo sirvieron en el cálculo de la actividad de la fosfatasa alcalina (*apartado 6.5.3.2*) y de la cantidad de osteocalcina (*apartado 6.5.3.3*).

#### 6.4.6.2 Protocolo de determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina

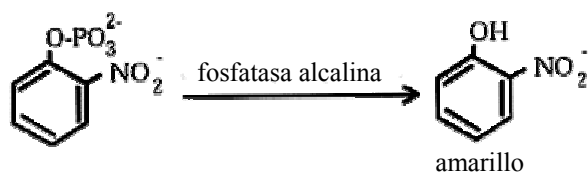
Se determinó la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) de las células contenidas en los lisados recogidos el decimoprimer día.

La ALP pertenece a un grupo de proteínas que están adheridas a la superficie extracelular de las membranas celulares (*tabla 6.2*). Es una enzima expresada en numerosos tejidos, como por ejemplo el hueso. Las funciones fisiológicas de la fosfatasa alcalina (ALP) están en parte todavía desconocidas, a pesar de que su descubrimiento remonte a 1923 (Robert Robison). Sin embargo, varios trabajos ya confirmaron que las funciones de la ALP en los humanos están relacionadas con la mineralización del esqueleto, por la capacidad que tiene de hidrolizar los fosfoésteres y los pirofosfatos inorgánicos para liberar el fosfato inorgánico necesario a la formación de la hidroxiapatita del hueso [Seg02].

Es un marcador que se expresa temprano en la diferenciación osteoblástica ya que su actividad es mayor justo antes de la iniciación de la mineralización [Bld01].

La técnica utilizada para la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina también es un ensayo colorimétrico (Sigma). Se basa en la capacidad de la fosfatasa alcalina de convertir el sustrato para-nitrofenilfosfato en para-nitrofenol (*figura 6.3*). Este compuesto le da una coloración amarilla a la solución, de manera que su absorbancia se puede leer con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm. La intensidad de la coloración es directamente proporcional a la actividad de la enzima.





**Figura 6.3:** Conversión del para-nitrofenilfosfato en para-nitrofenol por la acción de la fosfatasa alcalina.

La curva patrón de este ensayo se preparó con una solución estándar de p-nitrofenol a 10 mM que se diluyó para obtener concentraciones de entre  $2 \cdot 10^{-5}$  a  $2 \cdot 10^{-4}$  mol.

Se colocaron 50  $\mu$ l de solución tampón, 50  $\mu$ l de sustrato (para-nitrofenilfosfato) y 100  $\mu$ l de la muestra en pocillos de una placa de 96 pocillos. Se puso la placa a incubar en baño María durante 30 minutos a 37°C y se paró la reacción con NaOH 3M antes de leer la absorbancia.

Los resultados de actividad de fosfatasa alcalina se suelen expresar en mmol de p-nitrofenol por  $\mu$ g de proteínas (obtenidos del ensayo BCA) por minuto [Zzs05].

#### 6.4.6.3 Protocolo de determinación de los niveles de osteocalcina

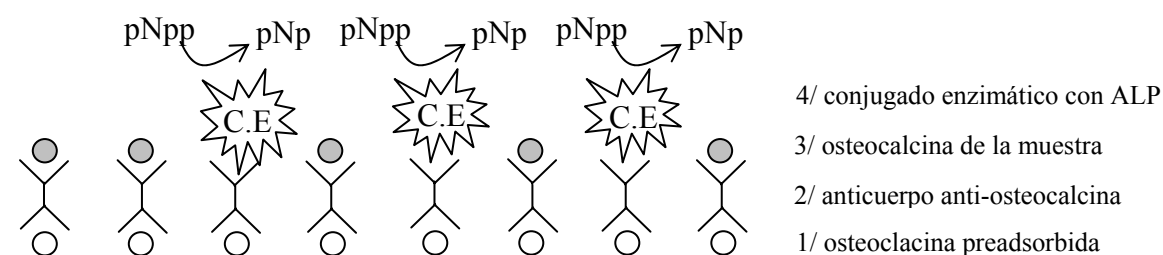
La osteocalcina es una proteína sintetizada no sólo por los osteoblastos maduros, sino también por los odontoblastos y los condrocitos hipertróficos. Sin embargo, en la mayoría de los sistemas de cultivo empleados para examinar células osteoblásticas, es razonable asumir que cualquier producción de osteocalcina observada es debida a las células formadoras de hueso [Bld01].

La osteocalcina, al contrario de la fosfatasa alcalina, es un marcador tardío de la diferenciación osteoblástica, y alcanza sus niveles mayores de expresión en el momento de mineralización de la matriz extracelular. Se piensa que la osteocalcina interacciona directamente con la fase mineral del hueso a través de los residuos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico que contiene y que son aminoácidos que se unen a los iones  $\text{Ca}^{2+}$  [Mss96]; [Seg02].

Se utilizó un ensayo colorimétrico de Metra™ para determinar la cantidad de osteocalcina en cada una de las muestras recogidas el decimoprimer día, después de 48 h de estimulación a diferenciación.

Este ensayo es un inmunoensayo competitivo que utiliza tiras recubiertas con osteocalcina, un anticuerpo anti-osteocalcina de ratón, un conjugado de inmunoglobulina-fosfatasa alcalina anti-ratón y un sustrato de para-nitrofenilfosfato (*figura 6.4*).

La coloración obtenida en este ensayo es debida a la acción de la fosfatasa alcalina presente en el conjugado enzimático, y que va convirtiendo el sustrato en p-nitrofenol. Sin embargo, al ser un ensayo competitivo, cuanto mayor es la absorbancia obtenida, menor es la cantidad de osteocalcina ya que el conjugado enzimático solo se puede ligar al anticuerpo anti-osteocalcina si este no está ocupado por osteocalcina (*figura 6.4*).



**Figura 6.4:** Principio de funcionamiento del ensayo de determinación de osteocalcina.

#### 6.4.7 Morfología celular

Las células MG63 adheridas sobre las distintas superficies estudiadas se observaron por microscopía. Al cabo de 5h de adhesión, se observaron los MG63 con un microscopio de fluorescencia (Leica DMRB, objetivo PL APO 63X) después de realizar una doble inmunofluorescencia indirecta. En cambio, las células adheridas después de 1h y tres días de proliferación, se observaron por microscopía electrónica de barrido (MEB), con un equipo Strata 235 Dual Beam (FEI) y un voltaje entre 5 kV y 10 kV.

Las muestras (células adheridas sobre el material) se prepararon de una manera precisa, detallada a continuación, previamente a la observación microscópica.

#### 6.4.7.1 Soluciones tampón y fijadores

Se utilizaron varias soluciones tampón y fijadores, distintos en función del tipo de microscopía utilizada:

##### Tampón fosfato:

Preparar una solución A con 11,99 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  en 1000 ml de agua pura. Preparar otra solución B con 14,199 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 1000 ml de agua pura. El tampón fosfato (PB) se obtiene mezclando 23 ml de solución A y 77 ml de solución B con 100 ml de agua pura.

##### Tampón glicina:

Poner 0,15 g de glicina en 100 ml de PBS.

##### Fijador para MEB:

Añadir 2,5 ml de glutaraldehído en 100 ml de PB.

##### Fijador para microscopía de fluorescencia:

Mezclar 760  $\mu\text{l}$  de paraformaldehído al 16% (Sigma) con 240  $\mu\text{l}$  de sacarosa 1M, 2 ml de PB y 1 ml de agua pura.

#### 6.4.7.2 Microscopia de fluorescencia

##### *6.4.7.2.1 Fijación de las células*

1. Colocar 300  $\mu\text{l}$  de la solución tampón glicina sobre cada muestra, en condiciones de esterilidad.
2. Sustituir el tampón glicina por la solución fijadora de paraformaldehído preparada anteriormente.
3. Dejar actuar unos 15 minutos a temperatura ambiente. Lavar con tampón glicina durante 2 minutos.
4. Si se quieren conservar las muestras varios días en la nevera antes de proceder a la etapa de tinción, hay que añadir el tampón glicina suplementado de azida sódica al 0,2 % (4  $\mu\text{l}$  de azida sódica por cada 2 ml de tampón glicina).

##### *6.4.7.2.2 Doble inmunofluorescencia*

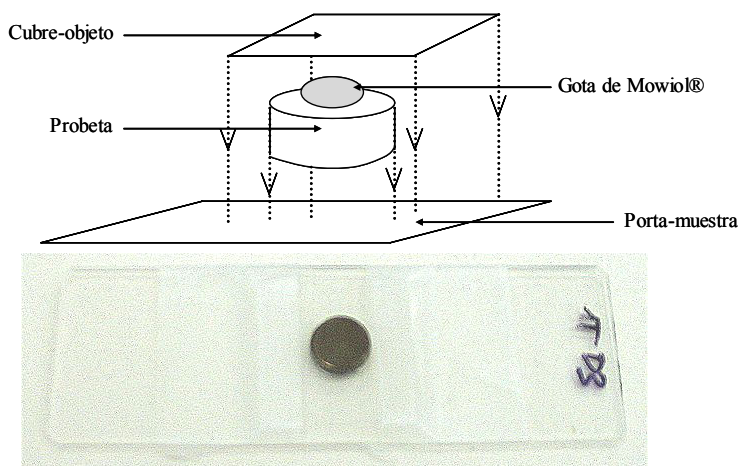
1. Preparar la solución de permeabilización con 25 ml de Triton® en 50 ml de PBS.
2. Vaciar los pocillos y lavarlos dos veces con tampón glicina durante 5 minutos.
3. Añadir la solución de permeabilización durante 10 minutos.
4. Lavar de nuevo con tampón glicina durante 10 minutos.
5. Preparar la solución de bloqueo con tampón glicina suplementado de BSA al 1%.

6. Añadir la solución de bloqueo y dejar actuar unos 20 minutos.
7. Incubar 1 h a 37°C con la tinción de Hoescht 3342 (al 1:500 en PBS/BSA, Sigma), y con faloidina acoplada al fluorocromo AlexaFluor 488 (Molecular Probes) en metanol (5 µl en 200 µl de PBS/BSA).

La tinción de Hoescht utilizada es altamente específica del ADN y se enlaza con preferencia a las regiones ricas en A-T (pares de bases adenosina-timina). No hay interferencias con el ARN. Por esta razón, se usa para teñir el núcleo de las células. Este fluorocromo se excita con luz UV (359 nm) y emite en el azul (520 nm).

En cuanto a la faloidina, tiene afinidad para la actina F y, en consecuencia, se utiliza para marcar el citoesqueleto de las células. El fluorocromo Alexa488 que se utilizó se excita en el azul (495 nm), y emite en el verde (518 nm)

8. Lavar las muestras dos veces con el tampón glicina durante 5 minutos.
9. Dejar secar a temperatura ambiente y con protección a la luz (papel de aluminio), antes de realizar el montaje.
10. Montar cada muestra sobre un porta-muestra de vidrio, recubriéndola de una gota de Mowiol-DABCO (Calbiochem), antes de colocar un cubre-objeto por encima. Sellar la unión mediante dos bandas de celo (figura 6.5).
11. Dejar polimerizar durante 1 h antes de guardar en una cámara fría.



**Figura 6.5:** Esquema y fotografía del montaje utilizado para observar las muestras con microscopía de fluorescencia.

### 6.4.7.3 Microscopia electrónica de barrido (MEB)

#### *6.4.7.3.1 Fijación de las células*

1. En condiciones de esterilidad, eliminar parte del medio de cultivo de cada pocillo, y añadir la solución fijadora para MEB. A continuación, vaciar los pocillos y colocar la solución fijadora para MEB. Dejar actuar dos horas.
2. Lavar tres veces con el PB, durante 10 minutos a 4°C.

#### *6.4.7.3.2 Deshidratación de las células*

1. Preparar una solución de tetraóxido de osmio, mezclando 2,5 ml de agua pura, 2,5 ml de osmio al 4% y 5 ml de tampón PB. Colocar esta solución sobre cada muestra y dejar actuar 1 hora a 4°C.
2. Lavar tres veces con PB durante 10 minutos.
3. Lavar de forma consecutiva una vez durante 10 minutos con una solución de etanol al 50%, y 70%, a 4°C.
4. Lavar de forma consecutiva tres veces durante 10 minutos con una solución de etanol al 90%, 95% y 100%, a 4°C.

#### *6.4.7.3.3 Punto crítico*

La técnica del punto crítico empleada consiste en sustituir el etanol contenido en las células, tras el proceso de deshidratación anterior, por CO<sub>2</sub> líquido, y posteriormente, sublimar el CO<sub>2</sub> para que las membranas celulares queden absolutamente secas e intactas.

Después de esta última etapa, las muestras quedan listas para observar en el MEB. No se necesitó ningún recubrimiento de oro para la observación.

### **6.4.8 Estadística**

Para evaluar si las diferencias entre los valores medios obtenidos en cada caso son estadísticamente significativas, se han calculado las tablas ANOVA de un factor y se ha aplicado el test de comparaciones múltiples de Fisher o de Tukey, dependiendo del caso. Se

empleó el test de Tukey, en lugar del de Fisher, para la comparación de muestras de diferente tamaño. En ambos casos, se eligió como valor de significación  $p < 0.05$ .

Estos tests se llevaron a cabo con la ayuda del programa Minitab™ Release 13.1.

## 6.5 Resultados

### 6.5.1 Attachment

Los resultados obtenidos en el ensayo de *attachment* muestran con claridad que las células MG63 se adhieren más rápidamente al TCPS (control positivo, C+) que a los otros materiales (*figura 6.6*).

Después de una hora de adhesión, las diferencias entre el control positivo y todas las demás superficies son estadísticamente significativas (*figura 6.6 a*). Hay más células adheridas sobre el TCPS. Parece que el tratamiento OT haya retrasado la adhesión celular respecto a las superficies NT, pero que varía su influencia en función de la composición química de la aleación de NiTi. Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las superficies de la Ale1 OT y la Ale12 OT, así como entre las superficies de la Ale12 NT y la Ale12 OT. En ambos casos, se han adherido menos células a la superficie de la Ale12 OT.

Además, a pesar de que las diferencias entre las superficies de la Ale1 NT y la Ale1 OT no son estadísticamente significativas, se observa la misma tendencia que para las superficies de la Ale12: hay más células adheridas a la superficie NT.

Después de cuatro horas de adhesión, se siguen observando las diferencias entre el TCPS y las demás superficies (*figura 6.6 b*).

Además, sigue habiendo más células adheridas sobre la superficie de la Ale12 NT comparando con la Ale12 OT.

Por otra parte, se observa una tendencia entre las superficies de la Ale12 NT y la Ale1 NT, con menos células sobre la Ale1. Esta tendencia se invierte cuando estas superficies están tratadas por OT: se observan más células sobre la Ale1 OT que sobre la Ale12 OT.

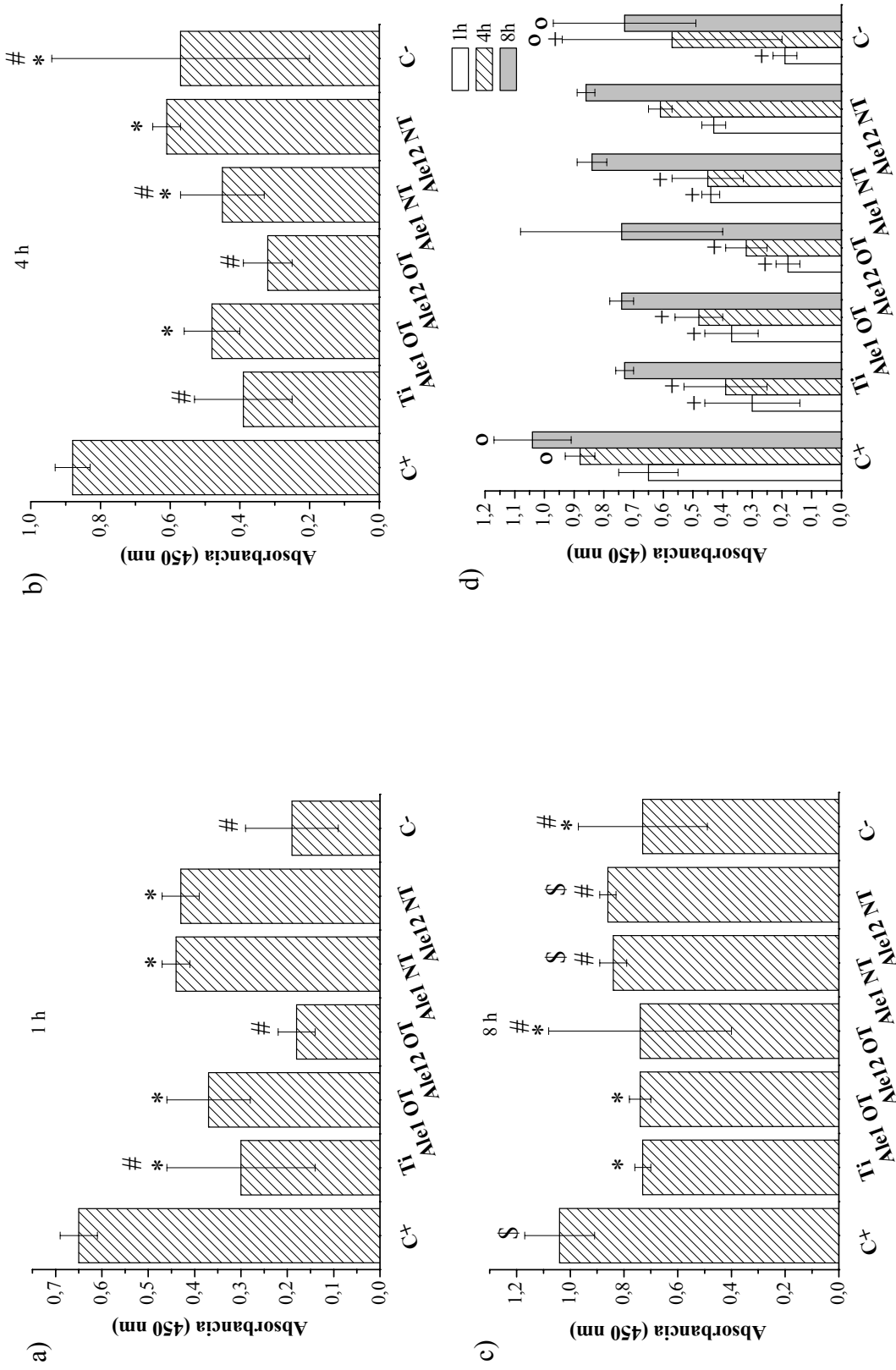
Finalmente, al cabo de ocho horas de adhesión, el TCPS sigue mostrando diferencias estadísticamente significativas con la Ale1 OT, la Ale12OT, el Ti y el C-. Hay más células adheridas sobre el TCPS que sobre las demás superficies (*figura 6.6 c*). Además, existen diferencias estadísticamente significativas entre las superficies Ale1 NT y Ale1 OT. Las superficies tratadas por OT tienen menos células adheridas. El Ti muestra además un número de células adheridas menor que las aleaciones no tratadas de NiTi, pero equivalente a las superficies tratadas por OT.

Analizando la evolución del número de células adheridas en función del tiempo para cada grupo de superficie, se observa lógicamente que a mayor tiempo de incubación, mayor número de células adheridas sobre las superficies (*figura 6.6 d*).

Sin embargo, para las superficies de Ti, C-, Ale1 NT, Ale1 OT y Ale 12 OT no existen diferencias estadísticamente significativas entre 1h y 4h de incubación.

Además, las diferencias entre la adhesión a 4h y la adhesión a 8h no son estadísticamente significativas para el TCPS (C+), mientras que lo son para los otros grupos de superficies. Tampoco lo son para el C-.

Se observa que el número de MG63 adheridos a las superficies de Ti puro es más parecido al número adherido sobre las superficies de NiTi tratadas por OT, que al número adherido a las superficies de NiTi no tratadas, con valores intermedios entre la Ale1 y la Ale 12.



**Figura 6.6:** Resultados del ensayo de attachment después de a) 1h, b) 4 y c) 8h de incubación. Los grupos marcados con un mismo símbolo no tienen diferencias estadísticamente significativas, d) Evolución de la absorbancia en función del tiempo, para cada una de las superficies estudiadas. Los + y #s indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre 1h y 4h, y entre 4h y 8h, respectivamente, dentro un mismo grupo de superficie. La absorbancia leída a 450 nm es proporcional al número de células presentes.



## 6.5.2 Proliferación

Los resultados de adhesión al cabo de 24h siguen la tendencia observada para el ensayo de *attachment* a 8h, donde el C- (TCPS) sigue presentando un mayor número de células que las demás superficies, excepto de la Ale1 NT (*figura 6.7 a*). Sin embargo, ya no existen diferencias significativas entre las superficies metálicas (Ale1 NT, Ale1 OT y Ti). Además, el C+, tiene menos células que todas las otras superficies.

Los resultados al cabo de tres, seis y nueve días son similares (*figuras 6.7 b-6.7 d*). El C- tiene un mayor número de células que las otras superficies, mientras que el C+ un menor número.

A lo largo de todo el estudio, las células han proliferado continuamente hasta el noveno día (*figura 6.8*)

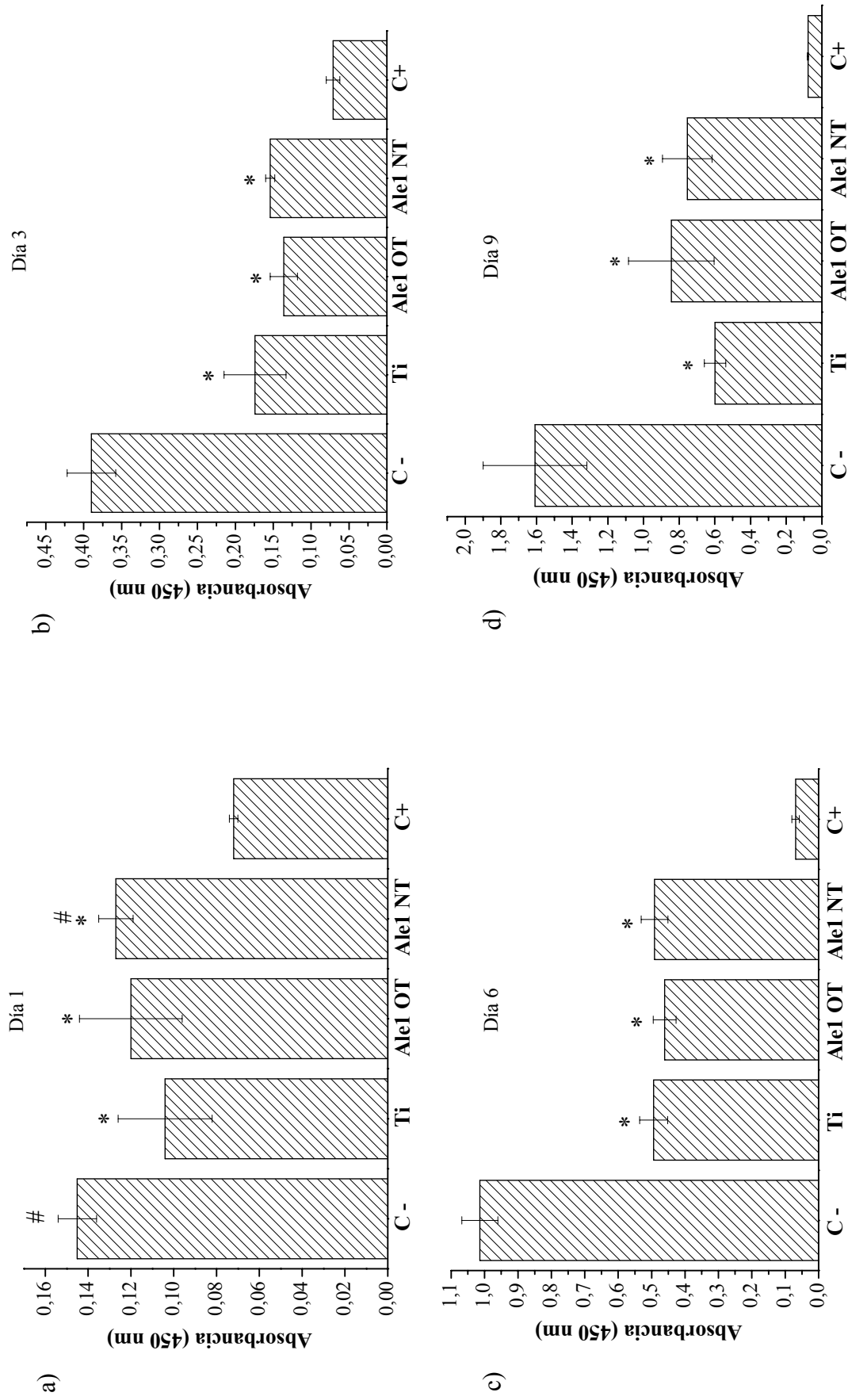
## 6.5.3 Diferenciación

### 6.5.3.1 Cuantificación de la proteína total

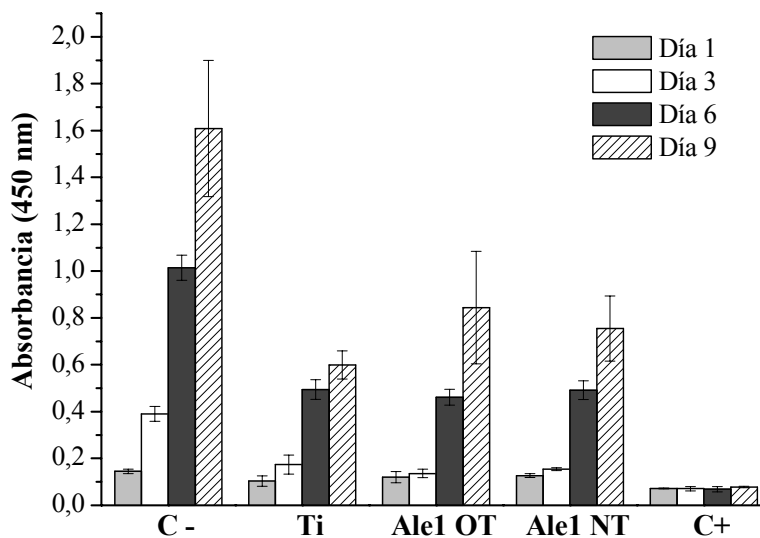
Los resultados del ensayo BCA muestran que los lisados celulares de las superficies de control negativo y de NiTi NT presentan valores significativamente mayores a las demás superficies. Además, las superficies de NiTi OT presentan una cantidad de proteínas total significativamente menor a la del Ti puro (*figura 6.9*).

### 6.5.3.2 Actividad de la fosfatasa alcalina

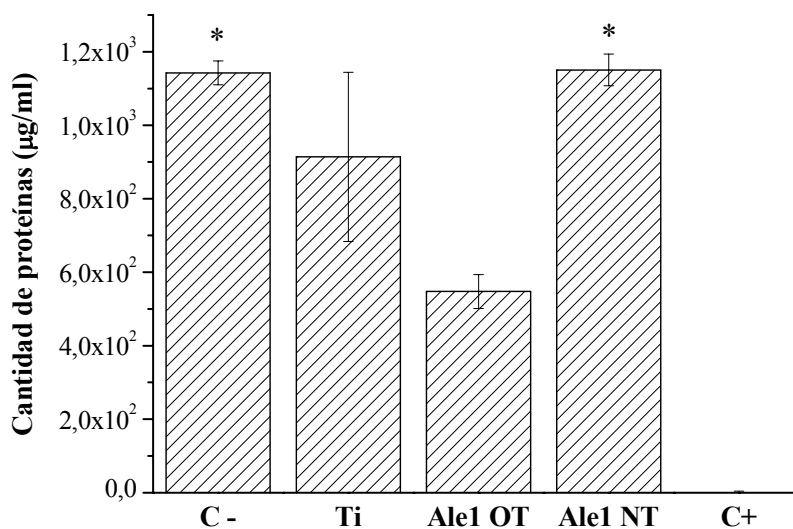
Los resultados de la actividad de la fosfatasa alcalina muestran un valor estadísticamente mayor para las superficies de NiTi OT, comparado con las demás superficies (*figura 6.10*).



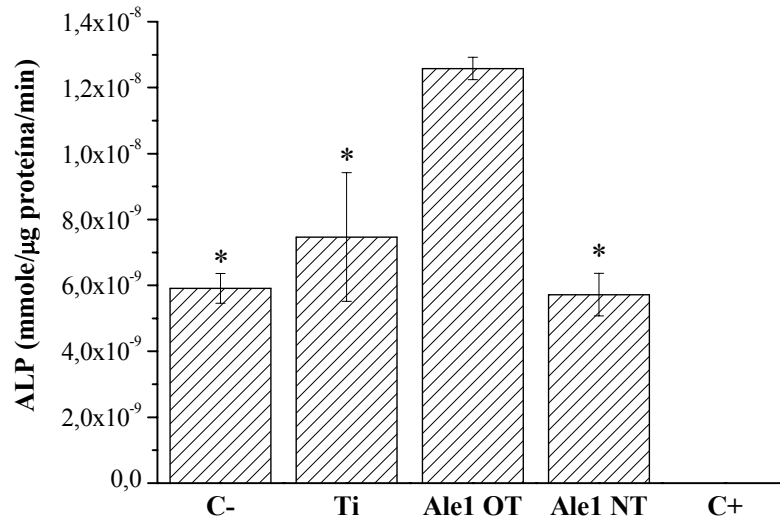
**Figura 6.7:** Resultados del ensayo WST después de a) 1 día, b) 3 días, c) 6 días y d) 9 días de incubación de las MG63 sobre las distintas superficies estudiadas. La absorbancia leída a 450 nm es proporcional al número de células presentes. Los grupos marcados con un mismo símbolo no tienen diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 6.8:** Evolución de la proliferación celular a lo largo de los nueve días de estudio, en función de la superficie estudiada. La absorbancia leída a 450 nm es proporcional al número de células presentes.



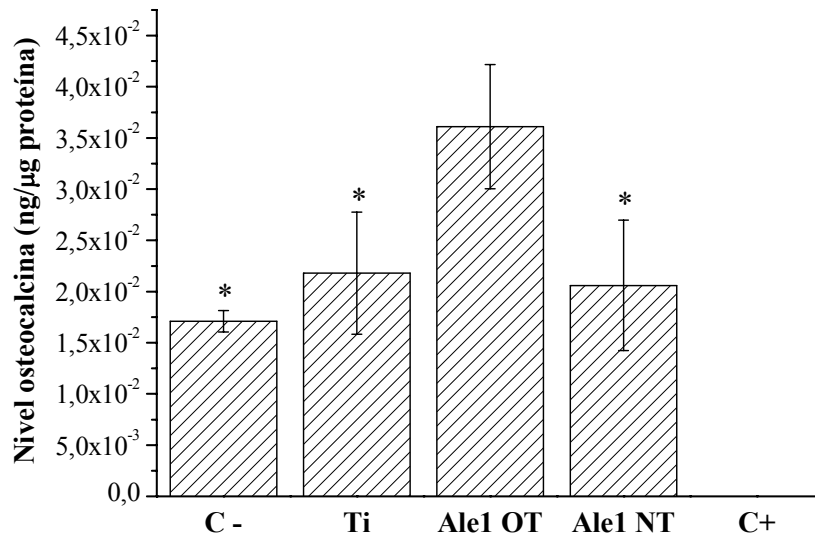
**Figura 6.9:** Resultados obtenidos por el ensayo BCA, después de 48h de estimulación con ácido ascórbico y dexametasona de las MG63 incubadas nueve días sobre las distintas superficies estudiadas. Los grupos marcados con un mismo símbolo no tienen diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 6.10:** Resultados del ensayo de ALP, llevado a cabo después de 48h de estimulación, el decimoprimer día de proliferación celular, en función de las superficies estudiadas. Los grupos marcados con un mismo símbolo no tienen diferencias estadísticamente significativas.

### 6.5.3.3 Niveles de osteocalcina

Los resultados de los niveles de osteocalcina presentan la misma tendencia que los resultados de ALP. Las superficies de NiTi OT inducen una secreción de osteocalcina estadísticamente mayor que las demás superficies (figura 6.11).



**Figura 6.11:** Resultados de la cuantificación del nivel de osteocalcina, llevado a cabo después de 48h de estimulación, el decimoprimer día de proliferación celular, en función de las superficies estudiadas. Los grupos marcados con un mismo símbolo no tienen diferencias estadísticamente significativas.

## **6.5.4 Morfología celular**

### 6.5.4.1 Observaciones por MEB

A pesar de que se hayan observado diferencias entre las células adheridas sobre un tipo de superficie u otra a través de la observación microscópica, es difícil establecerlas tanto de forma cualitativa como de forma cuantitativa. No se observaron casi ninguna célula sobre las superficies del cobre de vidrio que servía de superficie control, posiblemente debido a un problema en el protocolo de fijación, deshidratación, y/o punto crítico.

Además, las superficies aparecen contaminadas por suciedad de origen desconocido, que en algunos casos impide la observación correcta de las células.

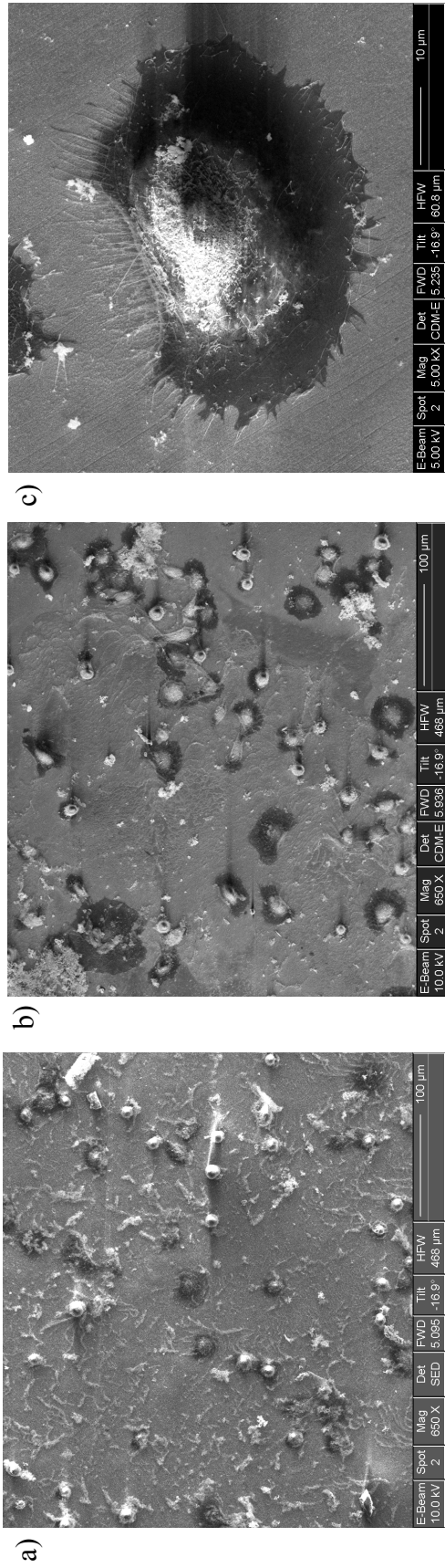
#### *6.5.4.1.1 Observación después de 1h de adhesión*

En general, se pueden observar, en todas las superficies, tanto células ya extendidas como células todavía con morfología redondeada.

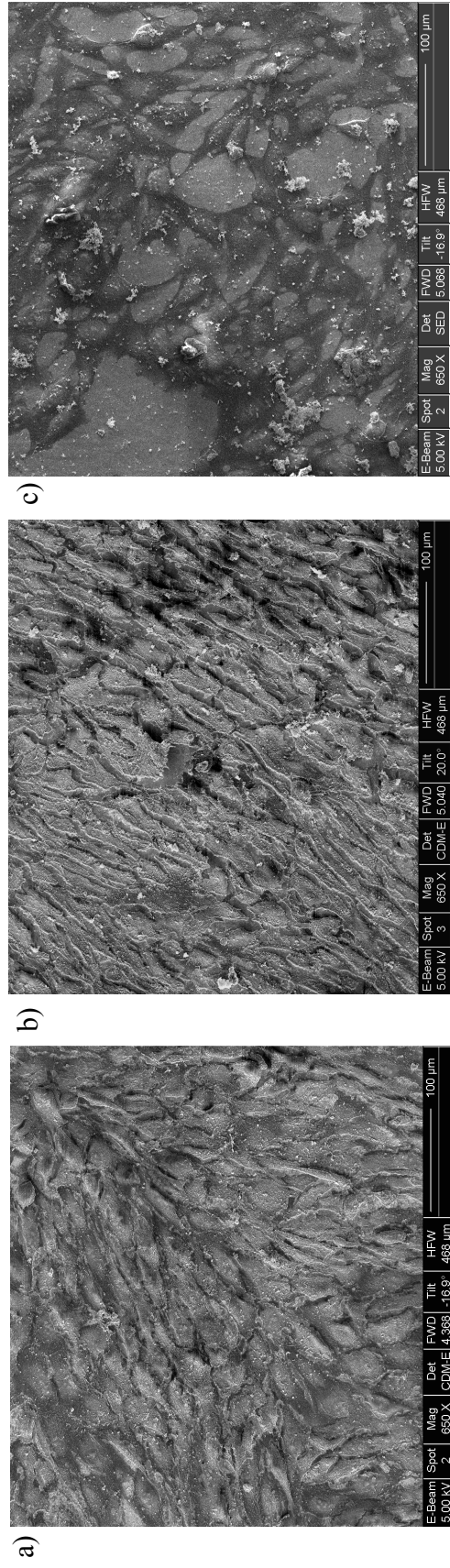
También, tanto para las superficies de la Ale1 NT como de la Ale12 NT, parece haber más células redondas que para sus homólogas OT (*figuras 6.12 a y 6.12 b*). Además, en el caso de la Ale1 NT, las células parecen adheridas con menos fuerza, ya que algunas se mueven cuando incide el haz de electrones. Sin embargo, en ambos tipos de superficies, NT y OT, se observa que las células que están estiradas presentan filopodios (*figura 6.12 c*). En cuanto a las superficies de Ti puro, se observan más células redondeadas que extendidas. Sin embargo, las células ya extendidas presentan un número elevado de filopodios.

#### *6.5.4.1.2 Observación después de 3 días de adhesión*

En general, se observa en todas las superficies, que las células han proliferado de manera extensa sobre toda la superficie, acercándose a la confluencia (*figuras 6.13 a-6.13c*). No se observan diferencias importantes entre una superficie y otra, excepto para la Ale12 OT sobre la que las células han proliferado significativamente menos y aparecen muy aplanadas (*figura 6.13 c*). Algunas células tienen formas del tipo poligonal, mientras que otras están más extendidas.



**Figura 6.12.** Morfología celular representativa de las MG63 después de 1h de adhesión sobre superficies de a) Ale1 NT, b) Ale1 OT y c) Ale12 NT. Se aprecia como las células están más estiradas sobre las superficies OT que NT. Sin embargo, incluso sobre las superficies NT, se observan células con extensiones.



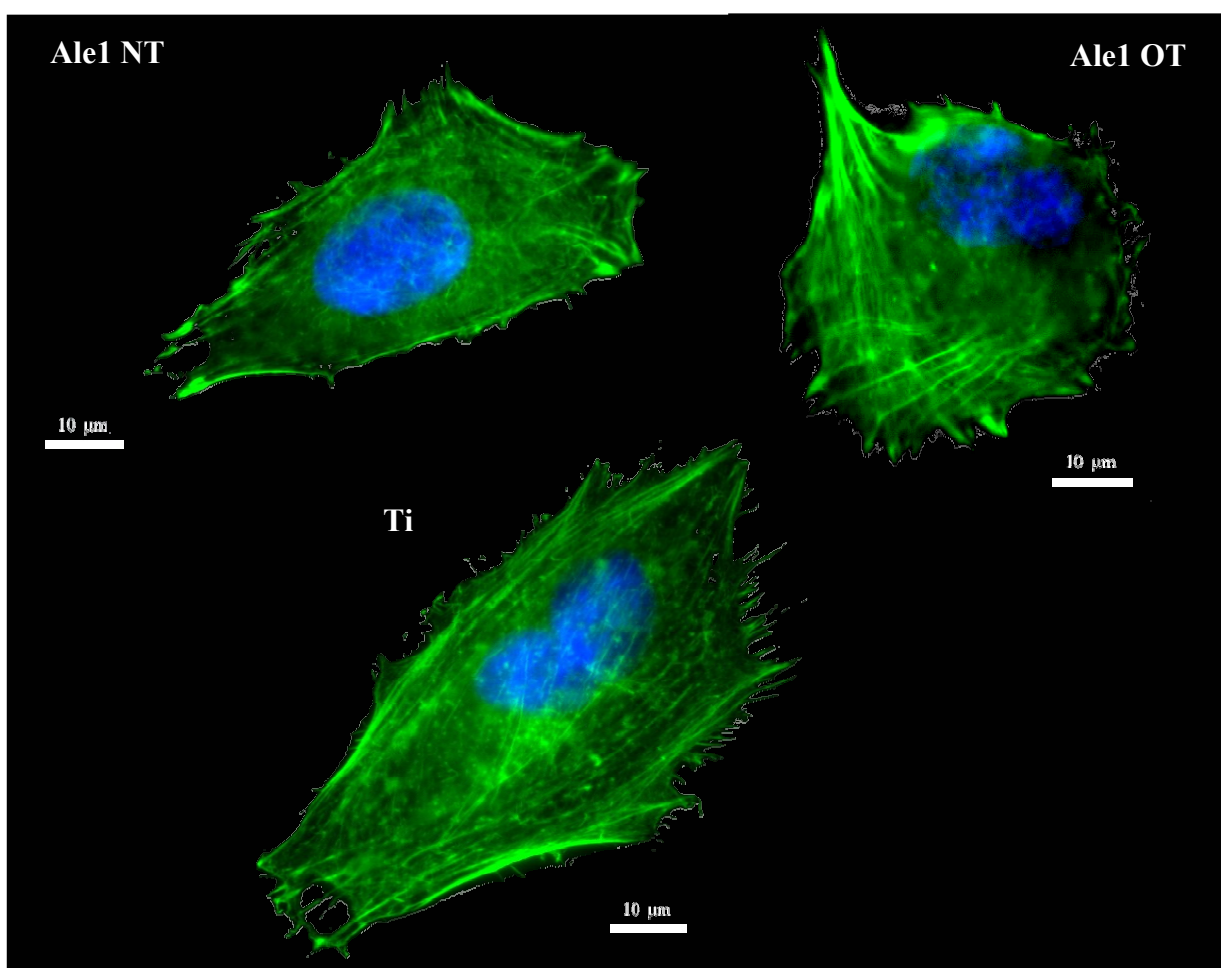
**Figura 6.13.** Morfología celular representativa de las MG63 después de 3 días de adhesión sobre superficies de a) Ale12 NT y b) Ale12 OT y c) Ale12 OT. Las células están menos confluentes sobre la Ale12 OT que las demás superficies.

#### 6.5.4.2 Observaciones por microscopia de fluorescencia

No se observaron diferencias significativas entre las distintas superficies estudiadas después de 5h de adhesión. Sin embargo, las células adheridas sobre la superficie de la Ale12 OT no se pudieron observar claramente. La tinción con faloidina no ofreció buenos resultados.

Para todas las demás superficies, se observó claramente la formación de filamentos de actina (figura 6.14). Estos filamentos parecen más presentes en el caso de las superficies OT que las superficies NT. Sin embargo, la actina está todavía muy difusa en la mayoría de los casos.

Las observaciones de las células adheridas al Ti demuestran la presencia de filamentos de actina mucho más finos y numerosos que para las aleaciones de NiTi.



**Figura 6.14:** Microfotografía representativa de la morfología de las células MG63 adheridas al cabo de 5 h, sobre superficies de Ale1 NT, Ale1 OT y Ti puro. En azul se ve el núcleo celular y en verde los filamentos de actina constitutivos del citoesqueleto de la célula.

## 6.6 Discusión

### 6.6.1 Attachment

La adhesión de las MG63 es mucho más rápida sobre el TCPS que sobre las otras superficies. Los resultados obtenidos del C- (teflón) son sorprendentes. Este material se acostumbra a usar para aplicaciones en las cuales se necesitan propiedades anti-adhesivas, como en el caso de las agujas utilizadas en mediciones de ángulos de contacto, para evitar la adsorción de proteínas cuando se utiliza algún fluido biológico. En la introducción de los capítulos 4 y 6 se comentó el papel primordial de algunas proteínas para la adhesión celular, y la necesidad de interacciones específicas entre ellas y las células para que pueda tener lugar esta adhesión. Suponiendo que ninguna proteína, o muy pocas, se hayan podido adsorber en la superficie del teflón, los resultados del *attachment* hasta 8h sólo se podrían explicar por algunas interacciones del tipo físico-químicas (fuerzas electrostáticas) o mecánicas (superficie mecanizada bastante rugosa). Sin embargo, un estudio de Hallab et al. [Hbo01] muestra que los fibroblastos son capaces de adherirse y proliferar sobre superficies de politetrafluoroetileno (PTFE, Teflón®), a pesar de una muy baja fuerza de adhesión y tasa de proliferación, comparado con las superficies metálicas, debido a una energía de superficie muy baja. Asimismo, Tidwell et al. [Tcg01] también observaron la adsorción de albúmina y de fibronectina sobre PTFE.

Se determinó, principalmente, una diferencia de comportamiento de las células entre las superficies de NiTi NT y las superficies de NiTi OT. Con un comportamiento de las MG63 sobre el Ti puro muy similar al de las superficies OT. Las células se adhieren mucho menos rápido sobre las superficies OT y el Ti puro. Estos resultados sugieren que la rugosidad y topografía de las superficies estudiadas no es el factor determinante de la adhesión de los osteoblastos, ya que las superficies de NiTi OT son significativamente más rugosas que las superficies de Ti puro, que presentan características topográficas similares a las superficies NT, y sin embargo se comportan de manera similar a las superficies OT. Además, esta observación corrobora las conclusiones de los capítulos anteriores, según las cuales las superficies de NiTi OT son muy similares, tanto en composición química, como en energía de superficie y en cargas superficiales, a las del Ti puro. Estas características físico-químicas tienen una influencia importante sobre la respuesta biológica, y por lo tanto, no es extraño obtener un comportamiento similar de las MG63 sobre ambos tipos de superficies. Además, también se observan diferencias de adhesión en función de la composición química de la aleación de NiTi, sobre todo una vez las superficies han sido tratadas con OT.

A pesar de que en el ensayo de *attachment* las superficies OT presentan un número de células significativamente menor, las observaciones microscópicas indican que los MG63 adheridos se

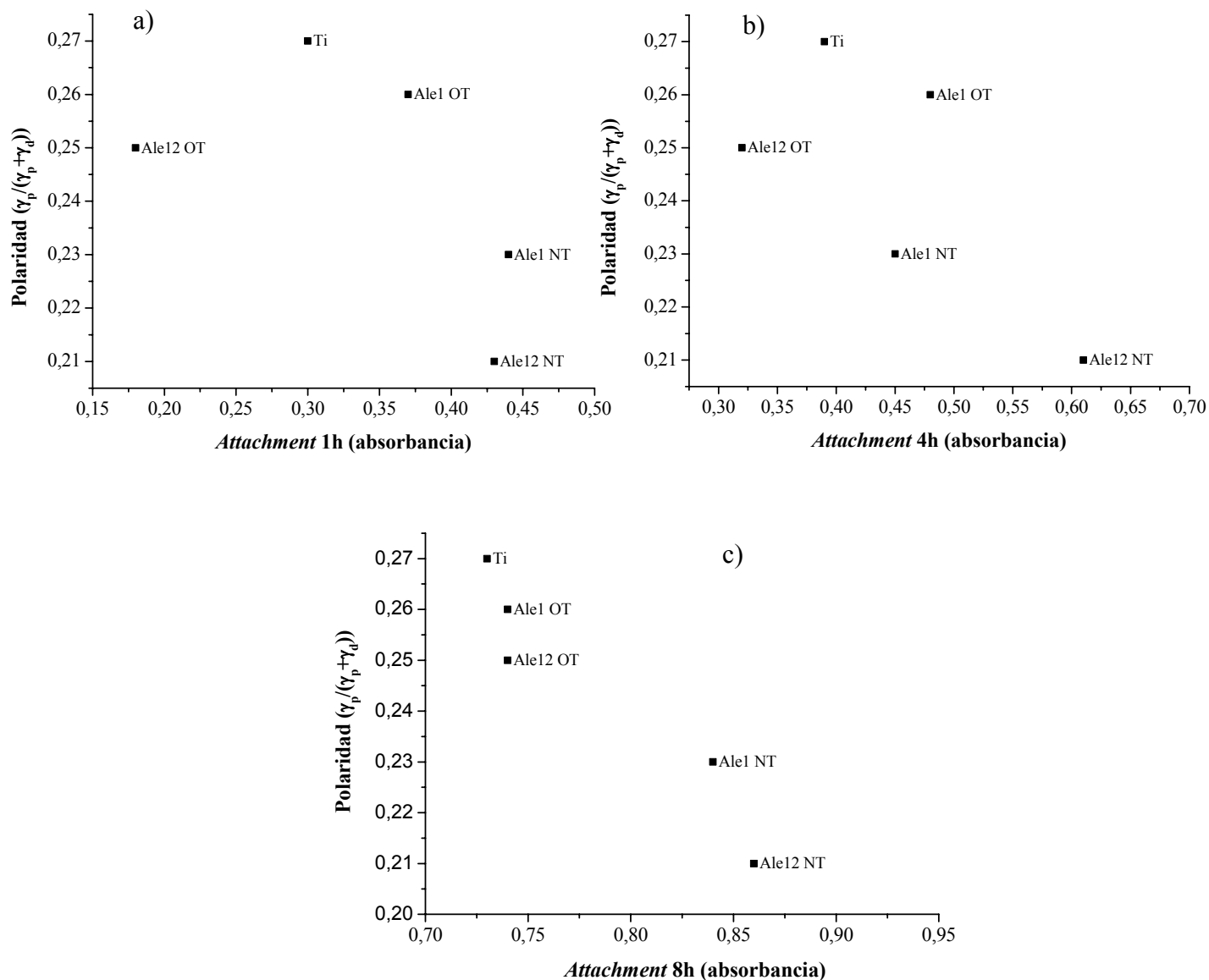


extienden más que en el caso de las superficies NT, sobre las cuales se quedan más redondeados. Además, también parece ser que los filamentos de actina se forman más rápido en las células en contacto con las superficies OT. En el caso de la Ale12, no se observó el citoesqueleto de las células (después de 5h de adhesión), lo que podría corroborar los resultados de mala adhesión a corto plazo (4h de adhesión, *figura 6.6 b*) del ensayo de *attachment*. En su trabajo de revisión bibliográfica, Anselme K. [Ans00] pone de manifiesto que el citoesqueleto de actina de osteoblastos adheridos sobre distintos sustratos se va organizando con el tiempo. La autora afirma que incluso al cabo de 6h de adhesión, la actina se ve distribuida de manera difusa, pero que a 12h de adhesión los microfilamentos son visibles.

Las diferencias observadas en el capítulo 4 entre los valores de energía superficial en función, tanto de la composición química como del tratamiento superficial, podrían ser, en parte, responsables del comportamiento celular observado. Además, estas diferencias de energía superficial, y sobre todo del carácter polar de la superficie, demostraron una buena correlación con la adsorción de proteínas, y particularmente de albúmina (*capítulo 5*). Sin embargo, no se encontró ninguna correlación directa entre polaridad y *attachment*, como lo han sugerido distintos autores [Hbo01]; [Prj03]. En particular, se han determinado correlaciones entre adhesión, o fuerza de adhesión, de fibroblastos y polaridad fraccional (relación entre la componente polar y la energía superficial total), con una polaridad fraccional óptima entre 0,3 y 0,5.

En el presente estudio, graficando el *attachment* en función de la polaridad fraccional de cada tipo de superficie y en función del tiempo, se observa una evolución del perfil de la gráfica (*figuras 6.15 a-6.15 c*). Mientras que a 1h y 4 h de adhesión, los puntos son muy dispersos, a 8h de adhesión parece que los distintos tipos de superficies se distribuyen en dos únicos grupos distintos: las superficies de NiTi NT, y las superficies de NiTi OT junto con el Ti puro. Más adelante, después de 24h de adhesión, ya no aparecen diferencias de adhesión entre Ale1 NT, Ale1 OT y Ti (*figura 6.7 a*). Sin embargo, a todos los tiempos, las superficies de NiTi NT, con una polaridad fraccional más baja, dieron mejores resultados de adhesión.

Estos resultados podrían indicar que, en el caso de las superficies NT, la buena adhesión celular a corto plazo sea debida a interacciones electrostáticas y/o polares, entre la capa de proteínas adsorbidas y las células, que favorecen la adhesión celular, pero que la naturaleza de la capa proteica, distinta a la de las superficies OT, no sea tan favorable a la extensión celular. En el caso de las superficies OT, la atracción electrostática no tan favorable podría ser compensada por una interacción, entre las proteínas adsorbidas y los MG63, más favorable que en el caso de las NT. Lo que podría explicar también que con el tiempo, las diferencias de adhesión entre NT y OT desaparecen.



**Figura 6.15:** Relación entre los resultados del ensayo de attachment a a) 1h, b) 4h, y c) 8h y la polaridad fraccional de cada superficie estudiada.

### 6.6.2 Proliferación y diferenciación

Los resultados de proliferación demuestran que las superficies de NiTi, NT y OT, no son citotóxicas. Además, las diferencias de adhesión observadas hasta 8h no afectaron a la proliferación de los osteoblastos MG63. No existen diferencias estadísticamente significativas entre las distintas superficies de NiTi NT, OT y Ti puro durante el ensayo de proliferación, hasta 9 días.

Los resultados de ALP y osteocalcina sugieren que el tratamiento térmico de las superficies favorece una rápida diferenciación de los osteoblastos MG63 comparado con las demás superficies, incluso del control negativo. Sin embargo, los resultados de diferenciación obtenidos para las superficies de NiTi OT son debidas a que la cantidad de proteínas total en los lisados celulares del decimoprimer día es significativamente menor a la de los demás materiales. Esto es probablemente debido a la disminución sustancial del número de células presentes el decimoprimer día, en comparación con el noveno día, lo cual indicaría que la estimulación con vitamina C y dexametasona fue muy efectiva, parando la proliferación de los MG63, y dirigiéndoles hacia un estado de maduración más avanzado.

La diferencia de respuesta biológica observada entre las superficies OT y NT podría ser, en parte, debida a la mayor liberación de iones Ni al medio, y a su incorporación dentro de la célula, en el caso de las superficies NT, tal como se observó en el *capítulo 4*. Pero no solamente, ya que el NiTi OT presenta también una mejor respuesta celular de cara a la diferenciación que el C y el Ti puro. Podría ser que la liberación de iones Ti, no determinada en el presente estudio, afecte también negativamente a la diferenciación osteoblástica, y que el óxido formado por OT en superficie del NiTi sea más protector que el óxido natural del Ti. En varios trabajos se observó una alteración fenotípica de diferentes células, incluyendo una disminución significativa, en comparación con el control negativo, de la secreción de osteocalcina [Tpu95] por parte de células provenientes de médula ósea de rata, aún a concentraciones de iones de Ti subletales de 1,25 ppm. Sin embargo, los iones  $Ti^{4+}$  no afectaron a la actividad de la fosfatasa alcalina. Además, en el trabajo de Schuster et al. [Sca04], se detectó una disminución en la cantidad de diferentes lípidos de monocitos de línea humana THP-1, debida a la presencia de iones de Ti.

Esta diferencia de respuesta biológica también podría ser debida a las diferencias de carácter físico-químico, tales como la composición química y polaridad, y también diferencias en la estructura cristalina del óxido, entre las distintas superficies. Estas diferencias han influido sobre la naturaleza de la capa proteica adsorbida, lo cual a su vez, ha afectado a la respuesta celular.

Por otra parte, aunque se observó que la rugosidad no influyó sobre la adhesión celular, podría ser que en el caso de la diferenciación, haya afectado positivamente. Tal como se comentó en el *capítulo 3*, el aumento de rugosidad de las superficies OT, comparativamente con las superficies NT y Ti, y a pesar de ser en la escala nanométrica, podría favorecer la diferenciación de los osteoblastos. Sin embargo, la rugosidad del control negativo no se ha determinado.

En el caso del control negativo, que presenta una excelente adhesión celular, incluso a 1h, podría ser que la fuerza de adhesión de las MG63 al substrato sea demasiado grande e impida una actividad celular normal, que disminuya o ralentiza la diferenciación de las células, tal y como afirman Wilson et al. [Wcl05].

Se podrían esperar variaciones en los resultados del ensayo de ALP y osteocalcina en función de la composición química de las aleaciones de NiTi. Los resultados de *attachment*, y las observaciones microscópicas indican diferencias entre la Ale1 y la Ale12 que podrían implicar una ralentización del proceso de maduración de los MG63 en el caso de las Ale12.

En cualquier caso, los resultados indican una buena citocompatibilidad a corto plazo de las aleaciones de NiTi, incluso no tratadas. Sin embargo, debido a la presencia de una mayor cantidad de Ni en el interior de las células cultivadas sobre las superficies NT, existe un riesgo de genotoxicidad o de oxidación de los tejidos circundantes a más largo plazo, tal y como se comentó en el capítulo 4. Además, las superficies OT podrían llevar a una mineralización y osteogenesis más rápida y podrían ser de un gran interés para aplicaciones ortopédicas o dentales.

## 6.7 Conclusiones

- Las aleaciones NiTi estudiadas, tratadas por OT y sin tratar, demostraron una buena citocompatibilidad para los osteoblastos MG63, en las condiciones del presente estudio, sin inhibición de adhesión, de proliferación y de diferenciación.
- Las superficies de NiTi NT favorecieron el *attachment* de los MG63 hasta tiempos de 8h, probablemente por el efecto de su menor polaridad y de sus cargas electrostáticas sobre la capa de proteínas adsorbidas.
- La composición química del NiTi también influyó sobre la respuesta celular.
- Las superficies de NiTi OT favorecieron la diferenciación de los osteoblastos, incrementando tanto la actividad de la fosfatasa alcalina como los niveles de osteocalcina.
- Este último resultado podría ser relevante en el caso de utilizar las superficies de NiTi tratadas por el nuevo tratamiento de oxidación en aplicaciones dentales y/o ortopédicas, para las cuales la osteointegración podría verse acelerada, en comparación con las superficies sin tratamiento.
- Finalmente, la rugosidad y la topografía de las superficies no es un factor determinante para la adhesión y proliferación celular. Sin embargo, la mayor rugosidad de las superficies NiTi OT podría haber participado en la mejora de la diferenciación osteoblástica observada.