

# Respuesta biológica *in vitro* del titanio grado médico.

## Estudio comparativo de cuatro tratamientos superficiales

### OBJETIVO

Determinar los cambios en la respuesta biológica *in vitro* del Ti6Al4V al aplicar cuatro tratamientos superficiales, mediante la determinación de la energía libre superficial, la adsorción y organización de fibronectina y la proliferación de fibroblastos.

### MATERIALES Y METODOS

#### **Preparación de las muestras**

Se emplearon discos de Ti6Al4V ELI de 2 mm de espesor y 10 mm de diámetro para su posterior uso en todos los ensayos descritos en el presente informe. A continuación se describe la preparación de cada una de las muestras estudiadas.

#### **a) Superficie pulida (P)**

Las muestras se pulieron mediante la aplicación sucesiva de distintos papeles de carburo de silicio. Seguidamente se pulieron con  $\gamma$ -alúmina.

#### **b) Superficie chorreada (S)**

Las muestras se trataron con un proceso de shot-blasting utilizando partículas de corindón blanco.

#### **c) Superficie anodizada (P/A)**

En primer lugar las muestras se pulieron siguiendo el procedimiento descrito en el apartado a). A continuación se procedió al anodizado de las muestras, conectándolas en el polo positivo (ánodo) de una fuente de alimentación de corriente continua y sumergiéndola en un electrolito conductor.

#### **d) Superficie Biomimetic Advanced Surface (BAS)**

Los discos se trataron con el procedimiento descrito en el apartado b) y posteriormente se anodizaron según el apartado c) considerando el incremento de área real producido por el tratamiento de shot-blasting. En el estudio se indica como S/A (BAS).

Documento elaborado por el **comité científico de AVINENT Implant System S.L.** <sup>(1)</sup> con la colaboración del **CREB** (Centre de Recerca en Enginyeria Biomèdica) <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> **Comité científico de AVINENT Implant System S.L.:** A. Cortina, C. Vendrell, E. Falcó, J. Serra

<sup>(2)</sup> **CREB:** A. Mestre



**Figura 1.** Microscopio electrónico Jeol JSM-640

Después de aplicar el tratamiento superficial correspondiente, cada muestra se lavó primero con acetona y después con etanol en ultrasonidos durante 10 minutos.

### **Microscopia electrónica de barrido**

Se empleó el microscopio electrónico de barrido JSM-640 (Jeol, Japón) (fig. 1) para obtener imágenes de las superficies preparadas aplicando un potencial de aceleración de 20kV. También se hizo uso del detector EDS (Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy), integrado en el microscopio, para analizar semicuantitativamente cada una de las superficies estudiadas.

# Respuesta biológica *in vitro* del titanio grado médico.

## Estudio comparativo de cuatro tratamientos superficiales

### Interferometría

Se caracterizó la rugosidad de las superficies tratadas mediante el uso de un microscopio interferométrico WYCO NT 1100 (Veeco, USA) funcionando en modo VSI (Vertical Scanning Interferometry) (fig. 2). Los parámetros superficiales obtenidos se resumen en la Tabla 1.



Figura 2. Microscopio interferométrico WYCO NT 1100.

SÍMBOLO	DEFINICIÓN	CÁLCULO
Ra	Valor medio de las irregularidades del perfil	$R_a = \frac{1}{NM} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N  Z_{ij} $
Rq	Media de la raíz cuadrada de las desviaciones del perfil	$R_q = \sqrt{\frac{1}{NM} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N Z^2(x_i, y_j)}$
Rt	Máxima distancia entre el pico más alto y el valle más profundo	$R_t = R_v + R_p$

Tabla 1. Descripción de los parámetros superficiales obtenidos mediante interferometría óptica.

### Ensayo del ángulo de contacto y de la energía libre superficial

La determinación del ángulo de contacto se llevó a cabo mediante el equipo Data Physics OCA 15 (Data Physics Instruments GMBH, Alemania) con la ayuda del software SCA 20. El método utilizado fue el de la gota sésil con un volumen de líquido de 2  $\mu\text{l}$ . Los líquidos utilizados fueron agua ultrapura y diiodometano, realizándose las mediciones en atmósfera saturada del vapor del líquido empleado a temperatura ambiente. Los valores de la componente polar y dispersiva de la tensión superficial para los dos líquidos empleados se muestran en la Tabla 2.

LÍQUIDO	COMPONENTE DISPERSIVA ( $\gamma^d$ , en mN/m)	COMPONENTE POLAR ( $\gamma^p$ , en mN/m)
Agua ultrapura <sup>1</sup>	21.8	51
Diiodometano <sup>2</sup>	50.8	0

**Tabla 2.** Valores de la componente polar y dispersiva de la tensión superficial para los líquidos utilizados

La determinación de la energía libre superficial se realizó siguiendo el modelo propuesto por Owens-Wendt-Rabel-Kaelble (OWRK), que utiliza los ángulos de contacto obtenidos con un líquido polar y uno apolar.

$$\cos\theta = 2\sqrt{\gamma_S^D} \left( \frac{\sqrt{\gamma_L^D}}{\gamma_L} \right) + 2\sqrt{\gamma_S^P} \left( \frac{\sqrt{\gamma_L^P}}{\gamma_L} \right) - 1$$

**Ecuación 1.** Modelo generalizado de Owens-Wendt para el cálculo de las componentes polar y dispersiva de la energía libre superficial para un sólido. Siendo:  $\theta$  el ángulo de contacto entre el líquido y el sólido;  $\gamma_L$  y  $\gamma_S$ : tensión superficial del líquido y energía superficial del sólido respectivamente; y los superíndices D y P haciendo referencia a la componente dispersiva y polar respectivamente.

# Respuesta biológica *in vitro* del titanio grado médico.

## Estudio comparativo de cuatro tratamientos superficiales

### **Ensayo de organización de fibronectina**

Se obtuvo una solución de fibronectina (FN) a partir de plasma humano mediante cromatografía en columna (Millipore, USA). Como fase estacionaria se utilizó gelatina de sacarosa y como fase móvil una solución 4M de urea.

Las fracciones obtenidas se ajustaron a pH 9 con bicarbonato de sodio 0,1 M. La fibronectina se marcó mediante la adición de 10  $\mu$ l de una solución de FITC (isotiocianato de fluorescina) de 10 mg/ml en DMSO (sulfóxido de dimetilo) por cada ml de solución de proteína/urea/bicarbonato de sodio y la posterior incubación de la solución a temperatura ambiente durante 2 horas.

A continuación se separó la fibronectina marcada con FITC de la urea y de la proteína no marcada mediante cromatografía por exclusión de tamaño y se determinó su concentración mediante espectroscopia UV/Vis.

La solución de fibronectina marcada se diluyó en PBS (tampón fosfato salino) a una concentración de 20  $\mu$ g/ml. Se depositaron 100  $\mu$ l de dicha solución sobre cada uno de los discos P, S, P/A y S/A (BAS) y se incubó durante 30 minutos a 37° C.

Se empleó dodecil sulfato de sodio (SDS), diluido al 10% en agua y con NaOH 0,2 M para recuperar la fibronectina adsorbida durante una incubación de 24 h a temperatura ambiente. Cada experimento se repitió seis veces.

La cantidad de FITC-FN se determinó semicuantitativamente mediante espectrofluorimetría, utilizando como longitud de onda de excitación y emisión 494 y 518 nm respectivamente. Como blanco se utilizó una solución al 10% de SDS.

### **Fijación de la fibronectina adsorbida**

Para determinar las posibles diferencias generales en cuanto a la organización de fibronectina en las superficies P, S, P/A, S/A (BAS) se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior para adsorber la FITC-FN (2.5), se fijó mediante la incubación con paraformaldehído al 3% durante 10 minutos y se lavó con una solución de glicina 20mM en PBS.

Para la observación de la FITC-FN fijada se empleó un microscopio confocal (TCP SP5, Leica, Alemania) con un objetivo de 40 aumentos.

### **Ensayo de proliferación de fibroblastos**

Se utilizó un cultivo primario de fibroblastos procedentes del peritoneo de rata (RPFBs) como línea celular. Las células se mantuvieron en frascos para cultivo tipo T75 en un incubador humidificado a 37° C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante cuatro días. Se depositaron 10.000 células en cada una de las muestras, previamente esterilizadas con radiación gamma a 25 kGy, y sobre TCPS (Tissue Culture Polystyrene) que se utilizó como superficie de control. Después de 4 horas, 24 horas, 3 días y 7 días se añadió el reactivo WST (Roche) en cada uno de los pozos de cultivo con una proporción de 1:10 y se incubó durante 1 hora a 37° C y en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación se tomaron 100 µl de cada pozo y se determinó su absorbancia con un espectrofotómetro a 450 nm de longitud de onda.

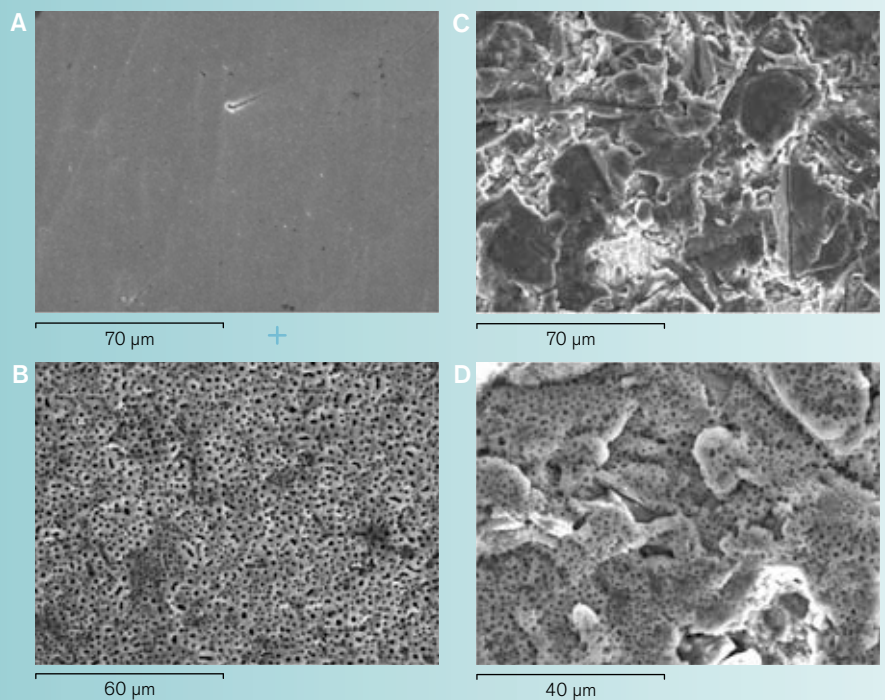
# Respuesta biológica *in vitro* del titanio grado médico.

## Estudio comparativo de cuatro tratamientos superficiales

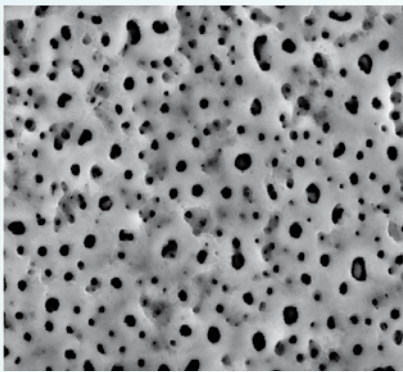
### RESULTADOS Y CONCLUSIONES

#### Microscopia electrónica de barrido

Las muestras pulidas (P) presentaban un superficie completamente lisa con la presencia de algunos defectos puntuales típicos del pulido (marcas de pulido) (fig. 3). Las muestras chorreadas (S) presentaban una superficie irregular con aristas afiladas y zonas brillantes correspondientes a la presencia de partículas de alúmina incrustadas en el metal. La superficie anodizada (A) presentaba una topografía homogénea formada por poros de 2-4 micras de diámetro aproximadamente. Las muestras S/A con la superficie BAS ofrecían una micromorfología superficial con una rugosidad importante, con la presencia de alguna partícula de alúmina embebida en el metal combinado con la presencia de poros debidos al proceso de anodizado. Se observó que las aristas de las microirregularidades de las muestras S/A (BAS) habían sido suavizadas por el proceso de anodizado, a diferencia de las de la muestra (S), donde eran más afiladas.



**Figura 3.** Imágenes de microscopia electrónica de las superficies estudiadas. A) Pulida, B) Anodizada, C) Chorreada y D) BAS.

20  $\mu$ m

**Figura 4.** Detalle de la porosidad de la superficie Biomimetic Advanced Surface (BAS).

Las muestras pulidas presentaban una composición química correspondiente a la aleación Ti6Al4V, con desviaciones debidas a la técnica de análisis utilizada. Las muestras anodizadas P/A y S/A (BAS) presentaban un contenido parecido en Ca y P de alrededor del 3% además de la presencia de sodio, presente en varias especies del electrolito. El alto contenido en oxígeno de las muestras anodizadas se debe a la oxidación del material y a la formación, principalmente, de óxidos de titanio. Las muestras chorreadas presentaban un contenido en aluminio superior a las pulidas debido a la presencia de partículas de alúmina incrustadas en la superficie.

### Interferometría

Como ya mostraron las imágenes de microscopía electrónica, el tratamiento de anodizado por plasma químico incrementa la rugosidad de las muestras lisas. Sin embargo, no hay diferencias relevantes en los parámetros superficiales estudiados entre las muestras chorreadas (S) y las muestras S/A (BAS) (Tabla 3). Como era de esperar, el tratamiento de chorreado incrementa significativamente la rugosidad.

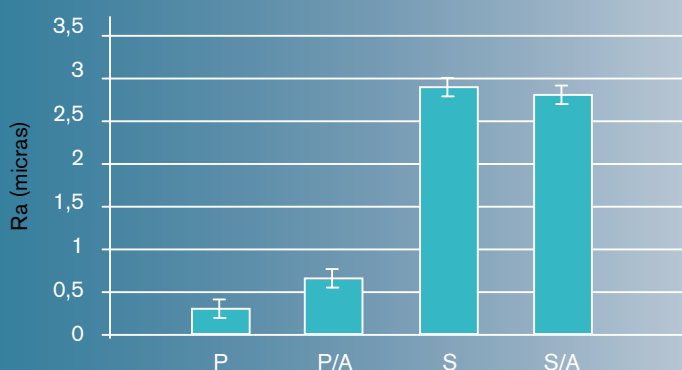
Beck et al. mostraron un comportamiento similar después de aplicar el anodizado por plasma químico en superficies lisas y rugosas obtenidas por proyección de partículas de vidrio. [3]

	P	P/A	S	S/A
$R_a$	$0.19 \pm 0.04$	$0.68 \pm 0.08$	$2.93 \pm 0.08$	$2.89 \pm 0.07$
$R_q$	$0.24 \pm 0.05$	$0.83 \pm 0.10$	$3.73 \pm 0.08$	$3.68 \pm 0.09$
$R_t$	$2.55 \pm 0.71$	$7.27 \pm 0.64$	$32.9 \pm 1.41$	$31.5 \pm 2.19$

**Tabla 3.** Parámetros topográficos obtenidos.

# Respuesta biológica *in vitro* del titanio grado médico.

## Estudio comparativo de cuatro tratamientos superficiales



**Figura 5.** Representación gráfica de los valores de Ra obtenidos. Nótese que el tratamiento de anodizado no causa variaciones significativas en el parámetro Ra en las muestras chorreadas.

### Determinación del ángulo de contacto y de la energía libre superficial

Para obtener los valores de energía libre superficial para cada una de las cuatro superficies estudiadas se utilizó el modelo propuesto por Owens-Wendt. Dicho modelo requiere la medida del ángulo de contacto con un líquido polar y un líquido apolar. Por tanto, se determinó el ángulo de contacto para cada superficie con agua (líquido polar) y con diiodometano (la parte polar se considera despreciable).

La Tabla 4 muestra los valores de los parámetros obtenidos para cada una de las superficies.

Muestra	Ángulos de contacto (°)		Energía superficial (mN/m)		
	$\Theta$ agua	$\Theta$ diiodometano	$\gamma^p_s$	$\gamma^d_s$	$\gamma_s$
P	21,01 ± 4,29	32,54 ± 5,39	28,74	47,13	<b>75,87</b>
P/A	12,72 ± 3,83	21,40 ± 6,75	30,04	49,11	<b>79,15</b>
S	44,37 ± 8,37	45,58 ± 5,08	19,23	44,33	<b>63,56</b>
S/A	0	15,01 ± 7,47	30,99	49,95	<b>80,94</b>

**Tabla 4.** Parámetros fisicoquímicos superficiales.

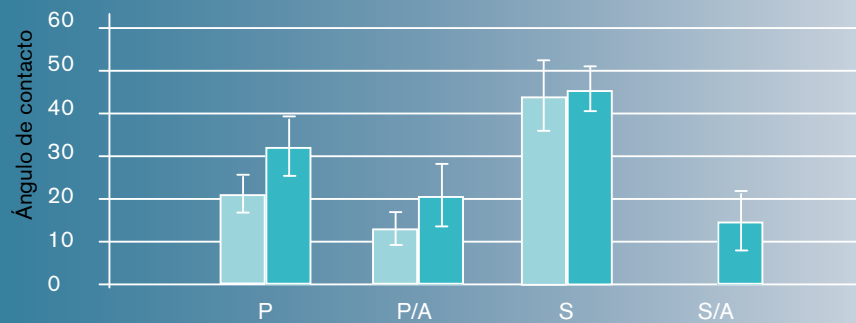


Figura 6. Valores del ángulo de contacto medio.

Como se puede observar, el anodizado por plasma químico disminuye el ángulo de contacto (aumenta la hidrofiliicidad) de la superficie lisa y de la chorreada. Este comportamiento se produjo con los dos líquidos empleados. Incluso las muestras S/A (BAS) presentaron un ángulo de contacto de  $0^\circ$  (*complete wetting*) cuando se utilizó agua para la medición. El chorreado incrementó el ángulo de contacto para la superficie no anodizada (P y S), pero incrementó la hidrofiliicidad en las superficies anodizadas (P/A y S/A (BAS)) (fig. 6).

El anodizado por plasma químico incrementó la energía superficial tanto en las muestras lisas como en las chorreadas, especialmente en la componente polar. El incremento de energía superficial fue mayor en las muestras chorreadas (fig. 7)



Figura 7. Valores obtenidos de energía superficial.

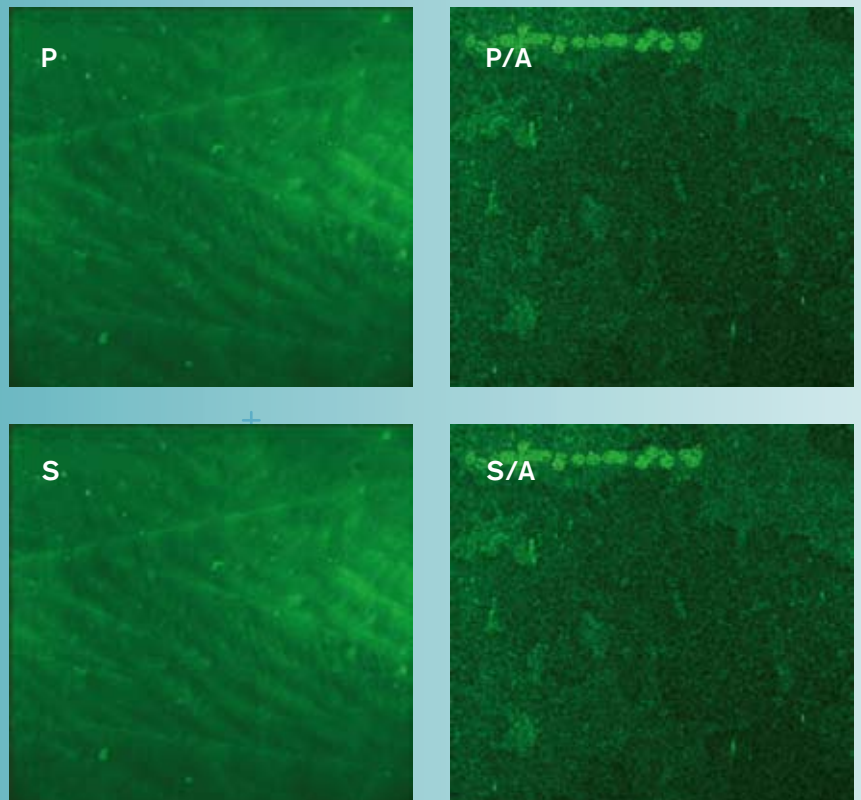
# Respuesta biológica *in vitro* del titanio grado médico.

## Estudio comparativo de cuatro tratamientos superficiales

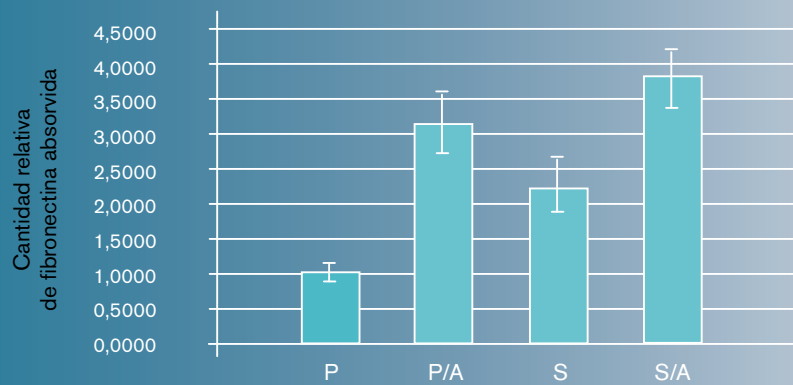
Existen varios estudios donde se especifica la preferencia de utilizar superficies con una elevada energía superficial para implantes endoóseos, debido a que un aumento de la hidrofiliidad mejora la interacción entre el implante y el medio biológico, produciendo un incremento en la diseminación celular y en la capa celular. [4, 5, 6, 7, 8, 9] Eriksson et al. realizaron ensayos *in vivo* donde relacionaron la hidrofiliidad de un implante y su capacidad de osteointegración. [10] Por lo tanto, la hidrofiliidad de una superficie es uno de los factores que determinan la biocompatibilidad de un biomaterial y es directamente dependiente de la energía superficial.

### Organización de fibronectina adsorbida (FITC-FN)

La observación de la FITC-FN adsorbida en las superficies P, P/A, S y S/A (BAS) se realizó mediante microscopia confocal (fig. 8).



**Figura 8.** Organización de FITC-FN en las muestras P, P/A, S y S/A (BAS). Imágenes de microscopia confocal a 40x.



**Figure 9.** Amount of FITC-FN absorbed relative to the P samples.

Las superficies P/A, S y S/A tenían un intensidad mayor que las muestras P, indicando una mayor adsorción de FITC-FN. Las muestras S presentaban una distribución de FITC-FN heterogénea, con puntos con una elevada intensidad, indicando una mayor acumulación de fibronectina, y puntos ligeramente oscuros, donde la adsorción era menos favorable. Las muestras S/A (BAS) mostraban una intensidad más homogénea que las muestras solamente chorreadas, a pesar de ofrecer una rugosidad similar, pero con diferencias significativas en la energía libre superficial (80,94 y 63,56 mN/m respectivamente).

Los resultados cuantitativos de la cantidad de FITC-FN adsorbida se muestran en la Figura 9. Se aprecia que el tratamiento de anodizado por plasma químico incrementa la cantidad de proteína adsorbida comparando las muestras P/A y S/A (BAS) con P y S. El proceso de chorreado duplicó la cantidad de proteína adsorbida respecto a las muestras P. Hay que considerar que tanto el tratamiento de chorreado como el de anodizado incrementan el área real de las muestras, y por tanto las muestras P/A, S y S/A (BAS) ofrecen una mayor superficie disponible para la adsorción.

# Respuesta biológica *in vitro* del titanio grado médico.

## Estudio comparativo de cuatro tratamientos superficiales

### **Proliferación de fibroblastos**

Se observó un aumento con el tiempo de la proliferación de las células fibroblásticas en todas las superficies estudiadas P, P/A, S y S/A (BAS), siendo la única diferencia entre ellas la velocidad de proliferación de dichas células.

### REFERENCIAS

[1] Erbil Y. Surface tension of polymers. In; *CRC Handbook of surface and colloid chemistry*. Boca Raton. FL: CRC Press: 1997, p.292.

[2] Vanoss C. J., Lu L., Chaudhury M. K., Good R. J. *Estimation of the polar parameters of the surface tension of liquids by contact-angle measurements on gels*. J. Colloid. Interf. Sci. 1989, 128:333-9.

[3] Beck U., Lange R., Neumann H.-G. *Micro-plasma textured Ti-implant surfaces*. Biomol. Eng. In press 2006.

[4] G. Zhao, Z. Schwartz, M. Wieland, F. Rupp, J. Geis-Gerstorfer, D. L. Cochran, B. D. Boyan. *High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure*. Published On line 27 May 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

[5] Schrader ME. *On adhesion of biological substances to low-energy solid-surfaces*. J. Colloid. Interface Sci. 1982, 20:773-784.

[6] Schakenraad J. M., Busscher H. J., Wildevuur C. R., Arends J. *The Influence of substratum surface free energy on growth and spreading of human fibroblasts in the presence and absence of serum proteins*. J. Biomed. Mater. Res. 1986, 20:773-784.

[7] Baier R. E., Meyer A. E., Natiella J. R., Natiella R. R., Carter J. M. *Surface properties determine bioadhesive outcomes: methods and results*. J. Biomed. Mater. Res. 1984, 18:327-355.

[8] Hurbert T. A., Ratner B. D., Schakenraad J. M., Schoen F. J. *Some background concepts. In Ratner B., Hoffman A., Schoen F., Lemons J., Editors. Biomaterials Science. An introduction to materials in medicine.* New York. Academic Press; 1996, p.133-164.

[9] Kilpadi D. V., Lemons J. E. *Surface energy characterization of unalloyed titanium implants.* J. Biomed. Mater. Res. 1994, 28:1419-1425.

[10] Eriksson C., Nygren H., Ohlson K. *Implantation of hydrophilic and hydrophobic titanium discs in rat tibia: cellular reactions on the surface during the first 3 weeks in bone.* Biomaterials 2004, 25:4759-4766.