



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Desarrollo de superficies de titanio nanoestructuradas y evaluación de su efecto en cultivos celulares

Maria del Mar Ferrà Cañellas

Grado de Bioquímica

Año académico 2015-16

DNI del alumno: 4492361G

Trabajo tutelado por Joana Maria Ramis Morey
Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación.	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
		X		X

Palabras clave del trabajo:

Implantes, Nanoporos, TiO₂, Diámetro, Fibroblastos Gingivales Humanos, Colágeno, Adhesión Celular, mARN

Contenidos

Abreviaciones	III
Resumen.....	IV
Abstract	V
1.Introducción	1
1.1. Tejidos periodontales.....	1
1.2. Implantes dentales	2
1.3. Nanoestructuras.....	3
1.3.1. Formación de nanoestructuras	4
1.3.2. Transición de una morfología porosa a una morfología tubular	7
1.3.4. Factores que influyen en la formación de nanoestructuras	8
2. Objetivos y planteamiento experimental.....	10
3. Métodos	10
3.1. Formación de nanotubos y caracterización morfológica.....	10
3.2. Cultivo celular.....	11
3.3. Citotoxicidad.....	12
3.4. Adhesión celular	12
3.5. Actividad metabólica.....	13
3.6. Aislamiento de ARN y análisis de la expresión génica mediante RT-PCR	13
3.6.1. Aislamiento de ARN.....	13
3.6.2. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR.....	13
3.7. Cuantificación de colágeno	15
3.8. Análisis estadístico	16
4. Resultados y discusión	16
4.1. Obtención de nanoestructuras de diferente diámetro.....	16
4.2. Efecto in vitro de las diferentes superficies de TiO ₂ nanoestructuradas en cultivos celulares de fibroblastos gingivales humanos.	17
Conclusiones.....	22
Bibliografía	23

Abreviaciones

A	Antisentido
ACTBL2	Beta actina tipo 2
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ANOVA	Análisis de la varianza
ARN	Ácido ribonucleico
COL1A1	Colágeno tipo I alfa 1
COL3A1	Colágeno tipo III alfa 1
Cp	<i>Crossing point</i> o punto de cruce
DCN	Decorina
DMEM	Medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco
dsADN	ADN de doble cadena
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error estándar de la media
GAPDH	Glicealdehido-3-fosfato deshidrogenasa
HGF	Fibroblastos gingivales humanos
HSCs	Células madre hematopoyéticas
INT	Sal de monotetrazolio
LDH	Lactato deshidrogenasa
M	Metal
mARN	ARN mensajero
MEC	Matriz extracelular
MMP1	Metaloproteinasa de la matriz 1
MMPs	Metaloproteinasas de la matriz
MO	Óxido de un metal
MSCs	Células madre mesenquimales
NAD	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NP	Nanoporo
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
S	Sentido
SEM	Microscopio eléctrico de barrido
TFG	Trabajo Fin de Grado
TFG- β	Factor de crecimiento transformante beta
Ti	Titanio
TIMP1	Inhibidor tisular de la metaloproteinasas 1
TIMPs	Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas

Resumen

Uno de los aspectos en los que actualmente se están centrando más esfuerzos en implantología dental es en la consecución de un sellado efectivo alrededor del pilar del implante, con la finalidad de prevenir la aparición de periimplantitis, la mayor causa de fracasos de implantes dentales a largo plazo. La formación de nanoestructuras autoensambladas de óxido de titanio (TiO_2) constituye una posibilidad de mejora en este aspecto. La nanoestructuración de la superficies puede favorecer la formación de tejido blando alrededor del implante.

El método más utilizado para la formación de nanoestructuras es la oxidación anódica. Son muchos los factores que influyen en este proceso y que determinan el tamaño de diámetro de las nanoestructuras. En el presente trabajo se ha llevado a cabo la formación de nanoestructuras porosas de TiO_2 con diferentes tamaños de diámetro (26 a 64 nm) mediante oxidación anódica en electrólito orgánico con fluorhídrico, variando dos parámetros, el voltaje aplicado y el interespacio entre ánodo y cátodo. De tal manera que a mayor voltaje se han obtenido diámetros más grandes, y para obtener los diámetros más pequeños, además de utilizar voltajes pequeños se disminuyó el interespacio.

El efecto *in vitro* de las diferentes superficies de TiO_2 nanoestructuradas se evaluó en cultivos celulares de fibroblastos gingivales humanos (HGF). Los resultados obtenidos en este trabajo han mostrado la biocompatibilidad de estas nanoestructuras con esta línea celular, así como un efecto en el cultivo dependiente del diámetro del nanoporo. Los nanoporos de mayor diámetro (47 y 64 nm) muestran en general una mejor respuesta celular que los de menor diámetro (26 nm), en parámetros como la adhesión celular, actividad metabólica, expresión de genes relacionados con la producción y organización de la matriz extracelular, y finalmente del colágeno extracelular secretado. Cabe destacar que este efecto sin embargo presenta una dependencia de donante significativa.

Abstract

Nowadays one of the main aspects in which dental implant science has focused in is in the obtencion of an effective integration of implant abutment in order to prevent peri-implantitis, the most important cause of long-term failure of dental implants. Self-organized titanium dioxide (TiO₂) nanostructures arrays provide the possibility of improving the properties of implants. Nanostructured surfaces may promote soft tissue integration around the implant.

Electrochemical anodisation is the most widely used method to obtain TiO₂ nanostructures. There are many factors which affect the growth and the diameter of nanostructure formation. In this study, titanium dioxide nanoporous structures with different pore diameter (26 to 64 nm) were grown in an organic electrolyte containing fluoride by electrochemical oxidation, varying the applied voltage and the inter-electrode spacing. With higher voltage larger diameters were achieved, and to obtain the smaller diameters, apart from lowering the voltage a lower inter-electrode spacing was used.

Human gingival fibroblast (HGF) culture assays were carried out in order to analyze the effects of the different nanoporous diameters. The results derived from this study show the biocompatibility of the evaluated nanoporous surfaces with this line cell, as well as diameter size effects. Compared to smaller diameter nanoporous (26 nm), larger diameter nanoporous (47 and 64 nm) showed a better cellular behaviour involving cell adhesion, proliferation, gene expression (related with synthesis and organization of extracellular matrix) and extracellular collagen. However these effects had a significant dependence on the cell donor.

1.Introducción

1.1. Tejidos periodontales

La salud periodontal es uno de los aspectos de mayor importancia para la salud bucal. Los tejidos periodontales son una unidad funcional de tejidos que envuelven el diente o un biomaterial equivalente, como es el implante dental. Se diferencian dos componentes principales, los tejidos duros (cemento y hueso alveolar), y los tejidos blandos (ligamento periodontal y encía)^{1,2} (Figura 1).

El **cemento** es un tejido calcificado que cubre las raíces del diente, y que está compuesto principalmente por hidroxapatita cálcica. Las fibras del ligamento periodontal se encuentran alojadas en éste, facilitando la unión con el diente. Las células responsables de su formación son los cementoblastos, derivadas de fibroblastos del ligamento periodontal¹.

El **hueso alveolar**, formando parte del hueso mandibular y maxilar, posibilita el soporte de las raíces del diente. La matriz ósea de éste está formada por un andamiaje de colágeno con cristales de hidroxapatita. Las células que encontramos en este caso son osteoblastos, osteocitos y osteoclastos, encargados de la remodelación ósea continua y rápida característica del hueso alveolar¹.

El **ligamento periodontal** es un tejido fibroso muy denso encargado de la unión del diente con el hueso alveolar. Las fibras están compuestas mayoritariamente por colágeno de tipo I, y se encuentran insertadas tanto en el hueso alveolar como en el cemento. Encontramos diversos tipos celulares, osteoblastos, cementoblastos, y los más abundantes, fibroblastos del ligamento periodontal, encargados del mantenimiento de la homeostasis del tejido¹.



Figura 1. Representación de los tejidos periodontales que envuelven el diente¹.

La **encía** permite el sellado de la zona cervical del diente y el hueso alveolar. Se trata de una estructura epitelial mayoritariamente celular y un tejido conectivo con menor presencia celular y una gran red fibrosa. Éste último está compuesto principalmente por una

matriz extracelular (MEC) de colágeno, representando el colágeno tipo I un 65% y el de tipo III un 30%, entre otros. El tipo celular más abundante de este tejido conectivo gingival son los fibroblastos gingivales. Los fibroblastos son células mesenquimales, que habitualmente se identifican por su morfología en forma de huso. Son las células responsables de la producción y mantenimiento de los componentes de la MEC, pudiendo estar involucrados también en la regulación de la homeostasis en el tejido, inflamación o la reparación y regeneración de heridas^{1,2}.

1.2. Implantes dentales

Los implantes dentales son utilizados para substituir la pérdida de un diente. En los implantes dentales normalmente se diferencian tres partes: corona, pilar y tornillo del implante (*Figura 2*). Por una parte, la integración del tornillo del implante al tejido duro, proceso denominado osteointegración, asegura el soporte mecánico del implante, mientras que la integración del pilar del implante al tejido blando es importante para la protección bacteriana del hueso y del propio implante¹.

Respecto a este último punto, cabe recalcar la importancia de la integración del implante al tejido blando. Este hecho es fundamental para la curación de la herida alrededor del implante dental, a la vez que asegura el sellado entre el ambiente bucal y el implante, protegiéndolo de esta manera de la invasión bacteriana. Ahora bien, como se puede observar en la *Figura 2*, la integración con el tejido del diente natural y de los implantes se diferencia en que hay una falta de ligamento periodontal que conecte el implante con el hueso. Además, se observan diferencias sobre todo en la cantidad de fibras de colágeno, que no permiten la unión del implante al cemento, destacando el bajo número de fibroblastos y de vasos sanguíneos¹. Asimismo, mientras la fijación de las fibras de colágeno de las encías al diente ocurre con una orientación perpendicular, en el caso de los implantes ocurre de forma paralela, favoreciendo la infección bacteriana y la inflamación^{3,4}.

No es de extrañar por tanto, que a pesar de la elevada tasa de éxito, el número absoluto de fracasos de implantes dentales resulte significativo, causando un impacto económico y social tanto en los pacientes como en los profesionales. Los casos que se dan suelen ser consecuencia de infecciones, que pueden ocasionar una pérdida ósea acelerada, con la consecuente pérdida del implante a largo plazo. Este tipo de afectación se conoce como enfermedades periimplantarias, que se definen como una infección e inflamación de la superficie del implante y de los tejidos periodontales que conlleva a la destrucción del tejido blando y del tejido óseo, con la consiguiente pérdida del implante¹. Podemos diferenciar entre mucositis periimplantal, lesión inflamatoria en la encía, o periimplantitis, que afecta a los tejidos periodontales. Así, las complicaciones que se pueden dar tras la implantación del implante dental, entre otras causas, pueden ser debidas a la pobre integración de éste al tejido blando, que no posibilita la protección bacteriana que se daría de forma natural.

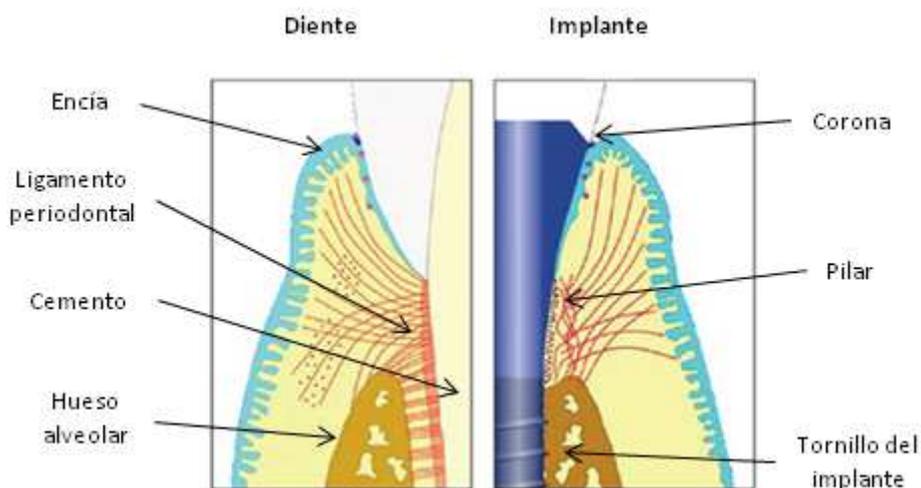


Figura 2. Comparación de los tejidos periodontales que envuelven el diente natural y un implante dental¹.

De esta manera, la prevención de la aparición de periimplantitis se conseguiría favoreciendo un sellado efectivo alrededor del pilar del implante, imitando la organización del tejido blando en la fijación natural de la encía al diente. Se ha visto como las propiedades de la superficie del implante tienen una influencia en la adhesión y diferenciación de células como los fibroblastos gingivales, de tal manera que algunos estudios han demostrado que una cierta rugosidad en la superficie del implante favorece la formación de tejido blando alrededor del pilar de los implantes¹. En ese caso, no es de extrañar que en la mejora de las características de los implantes se despierte interés por el desarrollo de superficies de titanio que mejoren esta integración.

Así pues, de entre las diferentes estrategias que se están desarrollando para favorecer la integración de las encías al implante, se encuentra la formación de estructuras a nanoescala⁵. La nanociencia otorga la posibilidad de mejorar las propiedades biológicas de los implantes mediante la formación de nanoestructuras en su superficie⁶. Recientes estudios han demostrado que células como los osteoblastos están más familiarizadas a un ambiente en nanoescala que en microescala. Por consiguiente, las nanoestructuras presentes en la superficie de los metales pueden tener efectos positivos en el comportamiento celular, como en la adhesión, proliferación, supervivencia y diferenciación⁷.

Es por ello que en el presente TFG nos planteamos si la nanoestructuración de superficies de titanio puede favorecer la formación de tejido blando alrededor del implante.

1.3. Nanoestructuras

Los orígenes de la formación de nanoestructuras datan del año 1991, con la creación de nanoestructuras de carbono por el grupo de Iijima⁸. Estos tipos de nanoestructuras se aplican sobretodo en el campo de la microelectrónica. A raíz de estos avances, y en busca de nanoestructuras con nuevas propiedades y aplicaciones, como biomédicas, fotoquímicas,

eléctricas o medioambientales⁹, la atención se centró en la formación de nanoestructuras de aluminio. Fue en el año 1995, por Masuda y Fukuda¹⁰, que se conseguían las primeras estructuras autoensambladas altamente ordenadas de óxido de aluminio, Al_2O_3 . En consecuencia, muchos de los principios de los mecanismos de formación de nanoestructuras de aluminio, se pudieron trasladar para la formación de éstas en otros metales⁹. De esta manera más adelante se propusieron otros candidatos que también fueran capaces de formar óxidos estables en su superficie, algunos metales de transición como puede ser el Titanio, Zinc, Tantalio, Vanadio, entre otros¹¹.

De entre éstos, no es de extrañar que el crecimiento de nanoestructuras autoensambladas del óxido de titanio, TiO_2 , este en el foco de las investigaciones actuales¹². El titanio es uno de los materiales más utilizados para implantes, debido a sus grandes propiedades, como una buena ductilidad, alta resistencia mecánica, resistencia a la corrosión, pero sobre todo por su excepcional biocompatibilidad^{6,9}. Por ende, el titanio es uno de los materiales más estudiados para la formación de nanoestructuras, con el objetivo de mejorar aún más las propiedades biológicas de éste⁶.

1.3.1. Formación de nanoestructuras

Podemos encontrar una gran variedad de métodos físico-químicos para la preparación de superficies nanoestructuradas, como puede ser la oxidación térmica, pulverización magnética, deposición de una capa atómica, láser pulsado, tratamientos hidrotérmicos, electrodeposición u oxidación anódica^{9,11}. Es precisamente esta última la más común en la formación de superficies nanoestructuradas. La oxidación anódica es una técnica económica, simple y muy versátil que permite la nanoestructuración de una gran variedad de metales y aleaciones de éstos, y su principal ventaja es la uniformidad y el control del tamaño de las nanoestructuras resultantes^{6,13}.

Por tanto, podemos definir la oxidación anódica como el proceso acelerado de oxidación electroquímica, que permite la formación de una capa de óxido en una superficie metálica susceptible. Habitualmente los experimentos de anodización se llevan a cabo en una celda electroquímica con dos o tres electrodos, donde encontramos una lámina del metal seleccionado como ánodo, una lámina de platino como cátodo, y en el caso de una celda con tres electrodos, un electrodo de referencia de plata^{12,13}. De esta manera, se aplica una corriente eléctrica mientras los electrodos están sumergidos en el electrolito, que puede ser acuoso u orgánico (*Figura 3*).

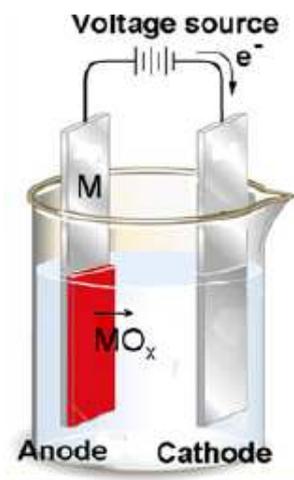
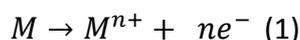


Figura 3. Esquematación de un experimento de anodización eléctrica. Se muestran dos electrodos sumergidos en el electrolito, al cual se le aplica una corriente eléctrica, originando la oxidación de la superficie del metal y la formación de una capa sólida de su óxido⁸.

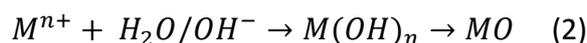
Cuando estos metales son expuestos a un cierto voltaje, tiene lugar la primera reacción de oxidación (Ecuación 1):



Llegados a este punto y dependiendo principalmente del electrolito y los parámetros de anodización, a continuación pueden tener lugar un total de tres reacciones^{8,9}:

I) El ión M^{n+} se disuelve en el electrolito; el metal se disuelve constantemente, de manera que se puede observar la corrosión de éste.

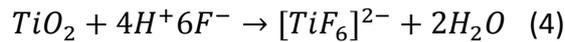
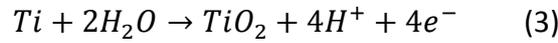
II) El ión M^{n+} reacciona con O^{2-} (procedente del agua en el electrolito) formando una capa compacta de óxido en la superficie del metal. Estableciéndose la siguiente reacción (Ecuación 2):



III) Bajo condiciones más específicas, se puede originar una competición entre la disolución y la formación del óxido, resultando en la formación de nanoestructuras autoensambladas del MO .

Cabe destacar que la posibilidad de crecer capas compactas de óxido de un grosor considerable mediante oxidación anódica ya se conocía desde hace más de 50 años⁸, no obstante no fue hasta el año 1999 que se obtuvieron las primeras nanoestructuras autoensambladas de TiO_2 por anodización en electrolitos con fluorhídrico¹⁴. Esto es debido a que el TiO_2 es un compuesto muy estable y tan solo unos pocos compuestos inorgánicos, como el HF o H_2O_2 , tienen la capacidad de disolverlo¹¹. Así parece ser que la adición de iones de fluorhídrico al electrolito puede ser la clave para la formación de nanoestructuras autoensambladas⁹.

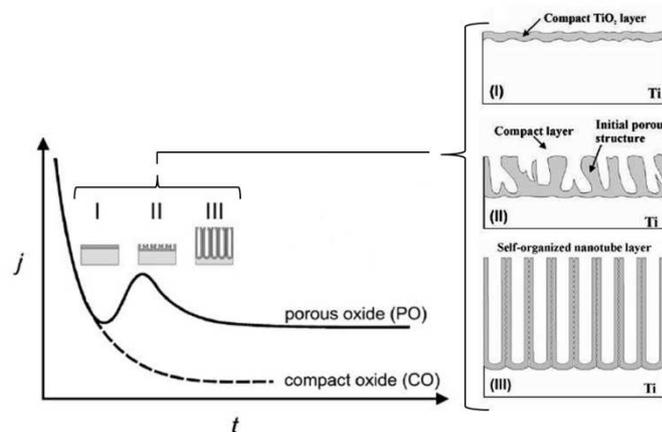
En consecuencia, muchos autores concuerdan en que la formación de nanoestructuras de TiO_2 en electrolitos con fluorhídrico responde a dos procesos opuestos^{6,14,15}. El primero es la oxidación de la lámina de Ti para la formación de la capa compacta de TiO_2 (Ecuación 3), y el segundo proceso es la disolución química de esta capa de óxido (Ecuación 4):



El ión fluoruro F^- en estas reacciones juega un papel muy importante debido a dos efectos fundamentales. Por una parte, por la habilidad de formar los complejos solubles $[TiF_6]^{2-}$, y por otra parte, por la capacidad de atravesar la capa de TiO_2 y ser transportado a través de ésta por el campo eléctrico, compitiendo con el transporte de iones O^{2-} . Este hecho lleva a la disolución de la capa de óxido, dado que se evita la precipitación del titanio con el oxígeno, y se favorece la formación de $[TiF_6]^{2-}$, impidiendo así la formación de la capa compacta de TiO_2 ⁸. Algunos autores afirman que se forma una capa rica en fluorhídrico en la interfase del metal y el óxido, que podría tener un papel relevante en la morfología de la nanoestructura⁹.

Como consecuencia, la formación de las nanoestructuras en electrolitos con fluorhídrico tiene un comportamiento muy singular en el que se diferencian tres fases, que a la vez representan una curva voltaje-tiempo muy característica (*Figura 4*). En la primera fase, se origina la capa compacta del óxido, equivalente a la caída exponencial del gráfico. En la segunda fase, la superficie se ha activado parcialmente y ha empezado el crecimiento al azar de los poros. En la última fase, transcurrido un cierto tiempo los poros individuales interaccionan mutuamente y se inicia una "competición" por el voltaje disponible. Este entorno lleva a una situación en la cual los poros se autoordenan para recibir de manera unitaria la misma corriente disponible⁸.

Figura 4. Curva voltaje-tiempo representativa del proceso de formación de nanoestructuras^{8,9}. (I) fase en la que se origina la capa compacta de óxido. (II) fase con crecimiento al azar de poros. (III) fase en la cual los poros se autoordenan.



1.3.2. Transición de una morfología porosa a una morfología tubular

Hay que tener en cuenta, que en la literatura muchas veces en referencia a las nanoestructuras se diferencia entre nanoporos y/o nanotubos. Por una parte, algunos autores afirman que la distinción entre ambas morfologías, porosa o tubular, a día de hoy no está totalmente esclarecida, y que la diferencia entre ambas es cuestión de semántica, usando los términos indistintamente⁹.

Por otra parte, otros autores defienden que durante el proceso de formación de nanoestructuras, existe una transición continua desde una morfología porosa hexagonal a una morfología tubular (*Figura 5*). Parece ser que la explicación más aceptada es el hecho que durante el crecimiento del óxido, se produce la acumulación del fluorhídrico en los bordes de las estructuras, entre los poros, de tal manera que estas regiones son más susceptibles a la disolución química del óxido. Con el paso del tiempo, la disolución selectiva del óxido origina una morfología en forma de v "*v-shaped*", en la que la parte superior de los tubos formados tiene las paredes mucho más delgadas que la parte inferior⁸ (parece ser que la disolución de la capa interna de TiO_2 es más rápida en la parte superior⁹). Se originan así los "espacios" entre las estructuras, llevando a la formación de morfologías tubulares individuales.

La formación de nanotubos está definida por las condiciones electroquímicas en que se realiza la anodización. Se considera que la evolución a la morfología tubular del óxido está determinado principalmente por la concentración del fluoruro y el contenido de agua en el electrolito, que determinarán la agresividad química de éste y por tanto la disolución de las paredes entre los poros^{9,16,17}. El contenido de agua en el electrolito tiene un doble efecto en la formación de las nanoestructuras, por una parte es necesaria para la formación de la capa de óxido, pero por otra parte también acelera la disolución de ésta misma⁹. Si hay un bajo contenido en agua, se podrá observar la transición a nanotubos debido a que no se ha podido formar capa de óxido de gran espesor, por lo que las paredes van a ser más delgadas, hecho que facilita su disolución¹³. Ahora bien, si aumentamos el contenido de agua se producirá una mayor disolución de las paredes, hecho que también conduce a la formación de nanotubos¹⁶.

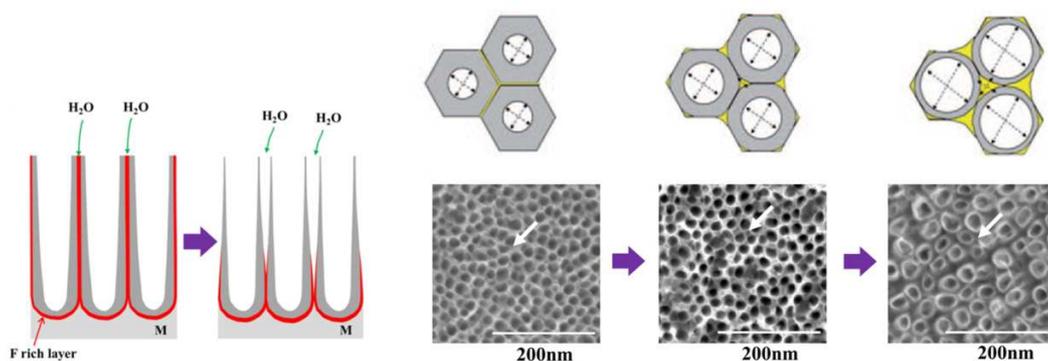


Figura 5. Transición de nanoestructuras con una morfología porosa a una tubular^{9,13}.

Es en este punto que entra en juego otro factor muy importante en la transición de la morfología, y del cual muchos autores no tienen en cuenta en sus investigaciones, como es el envejecimiento del electrólito. El envejecimiento del electrólito implica anodizaciones repetidas de láminas de prueba, previas a la anodización con la lámina de Ti. Se ha demostrado que en electrólitos nuevos, sin previas anodizaciones, hay muchas limitaciones en la formación de las nanoestructuras, y sobre todo en su transición a la morfología tubular. Este hecho puede ser debido a las diferencias en las propiedades del electrólito que se originan tras las anodizaciones, sobre todo en cuanto a la concentración de agua y fluoruro, factores más limitantes en la transición¹⁷. Con el envejecimiento se consigue incrementar la concentración de $[TiF_6]^{2-}$ en el electrólito a la vez que alcanzar un contenido de agua estable, adecuado para la morfología tubular.

Vemos entonces como el envejecimiento del electrólito es un factor muy importante a tener en cuenta, y que no es sencillo establecer las condiciones ideales para la transición de morfología, con lo que en muchos experimentos, esta morfología tubular no se llega a conseguir, y se obtiene la morfología porosa hexagonal.

1.3.4. Factores que influyen en la formación de nanoestructuras

A partir de lo descrito anteriormente, se anticipa que son muchos los factores que determinan la formación de las nanoestructuras. Además, los citados factores no solamente pueden afectar a la formación específica de la morfología tubular, sino también pueden tener un efecto directo en muchos más aspectos morfológicos como es la longitud, el grosor o bien el diámetro de las nanoestructuras.

En primer lugar, uno de los factores clave que influyen la formación de las nanoestructuras es la **composición del electrólito**. Los ensayos de anodización del Ti se realizan tanto con electrólitos **acuosos** como **orgánicos**, siendo las soluciones de glicerol o etilenglicol los electrólitos orgánicos más comunes. Las estructuras formadas en estos electrólitos presentan diferencias debido sobre todo a la viscosidad del electrólito, puesto que afectará a la movilidad de los iones presentes en la solución y así a la conductividad eléctrica del ensayo, siendo más baja en electrólitos orgánicos⁹. Se ha visto como los nanotubos formados en electrólitos orgánicos, debido al bajo contenido de agua, tienden a ser en comparación con los acuosos, más largos, con diámetros más grandes, y paredes más estrechas^{9,13}. Otro aspecto del electrólito a tener en cuenta es la **concentración de agua** y de **fluoruro**, cuyo papel en la transición a una morfología tubular ya se ha comentado. Resulta que además, ambos parámetros presentan efectos opuestos en la formación de las nanoestructuras, de tal manera que mientras el incremento del porcentaje de agua en el electrólito resulta en un diámetro mayor pero una longitud menor de los tubos, el incremento de la concentración de fluoruro resulta en tubos con menor diámetro, pero un incremento en su longitud¹⁶.

Otros factores de gran influencia en la morfología de las nanoestructuras son el **tiempo** y el **voltaje de la anodización**. Por una parte, se ha demostrado que un incremento en el tiempo de la anodización incrementa la uniformidad y distribución de los poros, teniendo un efecto lineal sobre su longitud¹³. Sin embargo se ha visto que este efecto puede ser limitado, puesto que se establece un equilibrio entre el crecimiento del óxido y su degradación. Por ejemplo, la longitud de los tubos en un electrólito con pH bajo está limitada a unos 500-600 nm⁹. Este efecto se observa sobre todo en electrólitos orgánicos, con bajo contenido en agua^{9,13}. Por otra parte, el voltaje aplicado en la anodización es el factor más importante que determina el diámetro de los tubos. Se ha visto que el diámetro de los tubos incrementa de forma dependiente a medida que incrementa el voltaje de la anodización¹³. En particular, en el caso de las nanoestructuras de TiO₂ se puede obtener una gran variedad en los diámetros de los nanotubos. Este nivel de control amplía aún más las posibles aplicaciones de las nanoestructuras, principalmente biomédicas⁸.

Se ha demostrado que la **temperatura de la anodización** también es importante para definir la morfología final de los nanotubos. Puede tener influencia tanto en el grosor como en la longitud de los tubos. Algunos autores han publicado que con un cambio de temperatura de 50 a 5°C, tanto el grosor como la longitud de los nanotubos incrementaba de forma significativa¹³.

Otro factor que afecta a la morfología y al cual puede no prestarse mucha atención, es el **interesespacio entre el ánodo y el cátodo** durante el proceso de anodización. Este factor tiene consecuencias sobre todo en la conductividad y concentración del electrólito, en especial en electrólitos orgánicos, efecto que se observa sobre todo en el interesespacio de las nanoestructuras y en el diámetro^{13,18}.

El **grosor del metal a anodizar**, como pueden ser las láminas de Ti, también puede afectar a la morfología de las nanoestructuras formadas. De esta manera, con láminas muy delgadas, se puede llegar a un equilibrio entre la anodización y la disolución del óxido resultando en la formación de nanotubos, ahora bien con láminas con demasiado grosor solamente se llevaría a cabo la disolución y no se formarían nanotubos¹³.

Por último, se debe tener en cuenta también los **tratamientos pre o post anodización** que pueden mejorar la morfología de las nanoestructuras, como pueden ser el pulido de la lámina o la doble anodización¹³. En ésta última, se lleva a cabo un primer paso de formación de nanoestructuras. A continuación la capa formada se elimina, permaneciendo en la superficie de la lámina un especie de guía que marcarán el inicio del crecimiento de los nanoporos durante el segundo paso de anodización, generando una nueva capa uniforme de nanotubos. Este procedimiento es habitual cuando se utilizan electrólitos con etilenglicol o un pH alto, condiciones en las que aparecen en la superficie de los nanotubos un precipitado inesperado, que dificulta la formación de una superficie uniforme y/o su uso en algunas aplicaciones biomédicas¹².

2. Objetivos y planteamiento experimental

El objetivo del proyecto en el que se enmarca el presente TFG es desarrollar superficies de titanio que mejoren la integración de la encía al pilar del implante, evitando así complicaciones a largo plazo y el posterior fracaso del implante. Para ello, se pretenden desarrollar nanoestructuras que además de mejorar la integración de la encía al implante, también disminuyan la adhesión bacteriana y formación de biofilms. Un estudio reciente ha descrito que los nanoporos de pequeño diámetro tienen mayor efecto que nanotubos del mismo diámetro, en sus efectos antibacterianos¹⁹.

De esta manera, el presente TFG se definieron dos objetivos específicos:

1 Formación controlada de nanoestructuras porosas autoensambladas de TiO₂ con diferentes tamaños de diámetro.

Para lograr este objetivo, se probaron diferentes condiciones durante el proceso de oxidación anódica de láminas de Ti. Así, se varió el voltaje aplicado y el interespacio entre ánodo y cátodo y se caracterizaron las superficies obtenidas por microscopía electrónica.

2 Evaluar la biocompatibilidad y el efecto *in vitro* de las diferentes superficies de TiO₂ nanoestructuradas en cultivos celulares de fibroblastos gingivales humanos.

Con este fin, se realizaron cultivos celulares de fibroblastos gingivales humanos (HGF), un buen modelo de estudio debido a sus características y funciones, implicadas precisamente en la generación de MEC, que posibilita el sellado en el diente natural. Se utilizaron dos donantes diferentes y se evaluó el efecto de las diferentes superficies obtenidas sobre la toxicidad, actividad metabólica, producción de colágeno y expresión génica.

3. Métodos

3.1. Formación de nanotubos y caracterización morfológica

Los nanotubos autoensamblados de TiO₂ se han formado en láminas de titanio por oxidación anódica, haciendo uso de una célula electroquímica con dos electrodos y una fuente de alimentación (Metrohm Autolab BV, Utrecht, Holanda). El método se ha optimizado en base a estudios previos²⁰⁻²². Antes de la anodización, las láminas de titanio se limpiaron por sonicación en acetona, etanol y agua, 5 min respectivamente, y secadas con corriente de nitrógeno. Para este procedimiento se utilizaron como ánodo, láminas de Ti (99,7% de pureza) de 8,5 cm de largo x 0,7 cm de ancho y de 0,127 mm de grosor (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Como cátodo se utilizó el electrodo de platino (Metrohm). La anodización se realizó a temperatura ambiente en un electrolito orgánico compuesto por 0,1 M NH₄F (Sigma-Aldrich), 1M H₂O y etilenglicol de pureza 99,5% (Sigma-Aldrich), previamente

envejecido durante 6 horas y media. Se llevó a cabo una doble anodización de la lámina de Ti a diferentes voltajes, una primera anodización de 30 min y una segunda de 10 min, con un paso de depilación intermedio con celo Scotch® Magic™ (3M, Cergy-Pontoise, France) (Figura 6). Para conseguir diferentes diámetros de nanoporos se realizaron las anodizaciones a distintos voltajes y distancias entre los electrodos: NP-A (1ª anodización 35V, 2ª anodización 1 V, ambas a una distancia de 2,5cm), NP-B (1ª anodización 60V, 2ª anodización 10 V, a una distancia de 5cm), NP-C (1ª anodización 60V, 2ª anodización 60V, a una distancia de 5cm). La condiciones de voltaje y tiempo fueron modificados y monitorizados continuamente haciendo uso del software Nova 2.0 (Metrohm). Antes de su utilización para el cultivo celular, las muestras fueron pasteurizadas a 90 °C 30 min²³.

Para caracterizar los diferentes nanotubos resultantes se realizó un recubrimiento con oro, y se tomaron fotografías mediante microscopia electrónica de barrido con un microscopio HITACHI S-3400N (Hitachi High-Technologies Europe, Krefeld, Alemania) en modo de electrones secundarios, a 40 Pa de presión y 15 kV de voltaje de aceleración. La medida del tamaño de los diámetros de los nanotubos se realizó evaluando un total de 60 nanoporos diferentes de cada muestra haciendo uso de la herramienta del software de ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

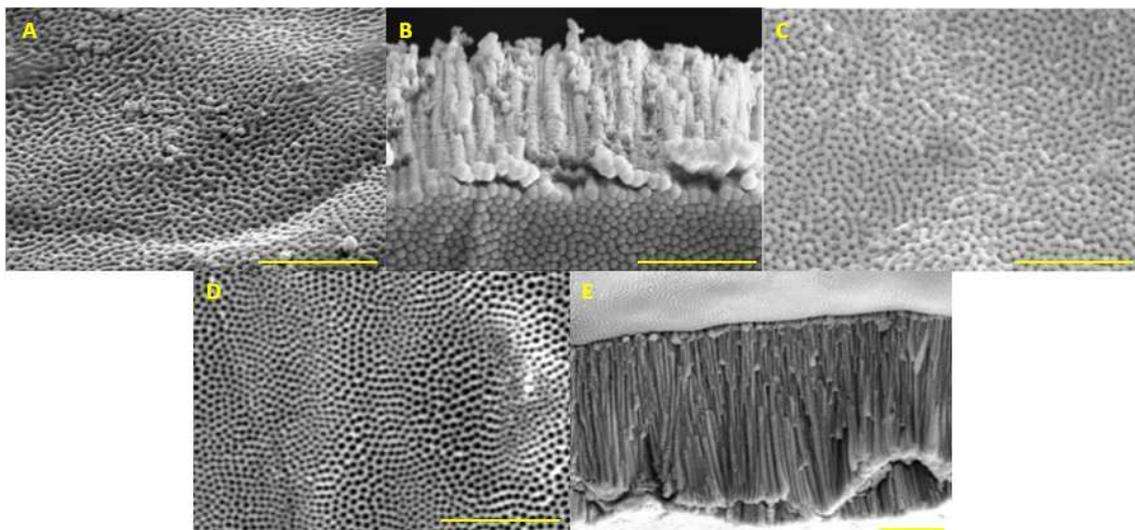


Figura 6. *Imágenes de microscopia electrónica de barrido (SEM) del proceso de formación de nanoestructuras de Ti. A) Nanoporos tras el primer paso de anodización. B) Nanoporos presentes en el celo Scotch® tras la depilación de los nanoporos. C) Nanoporos en la lámina de Ti tras el proceso de depilación. D) Nanoporos formados tras el segundo paso de anodización. E) Extremos de los nanoporos formados sobre la lámina de Ti después de la doble anodización. La barra amarilla indica un tamaño de 2 μm.*

3.2. Cultivo celular

Se utilizaron dos donantes diferentes de fibroblastos gingivales humanos (HGF) (Provitro GmbH, Berlín, Alemania): HGF-A (27 años, mujer, caucásica, número de lote 313X100401) y HGF-C (47 años, hombre, caucásico, número de lote 323X070501). Las células

se sembraron a una densidad de 7×10^3 células/muestra, cultivadas en unas condiciones estándar de 37°C y atmósfera húmeda de 5% de CO₂ y en un medio de cultivo DMEM GlutaMAX con bajos niveles de glucosa (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) suplementado con un 10% (v/v) de suero fetal bovino (Biosera, Boussens, Francia), 100 µg/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Biowest, Nuaille, Francia). El cambio de medio se realizó cada dos días. A partir del primer cambio de medio, el medio se suplementó con 50 µg/ml de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich). El ácido ascórbico es esencial para la síntesis de hidroxiprolina, que es a su vez necesaria para estabilizar la triple hélice del colágeno²⁴. Así, al suplementar el medio se favorece la deposición del colágeno secretado, puesto que de no hacerlo el procolágeno no se procesaría y sería descartado con cada cambio de medio²⁵.

3.3. Citotoxicidad

La presencia de actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) en los medios de cultivo tras 48h de incubación se utilizó como un indicador de muerte celular. La LDH es un enzima citoplasmático estable, presente en todas las células, que cataliza la conversión de lactato a piruvato. La LDH se libera cuando se daña la membrana plásmica. Así, los niveles de actividad LDH liberada al medio de cultivo se utiliza como un indicador de citotoxicidad.

La determinación de LDH en los sobrenadantes se realizó mediante un test enzimático colorimétrico comercial después de 30 min de incubación de 50 µl de medio de cultivo junto con 50 µl de mezcla de reacción a temperatura ambiente, midiendo la oxidación de NADH a 490 nm en presencia de piruvato, según las indicaciones del fabricante del kit (Cytotoxicity Detection kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

Los resultados se presentan relativos a la actividad de células crecidas sobre plástico (control negativo, 0% de muerte celular) y a las células crecidas sobre plástico y tratadas con Tritón X-100 1% (surfactante no iónico, control positivo, 100% de muerte celular). Se analizaron 6 replicados (n=6) para cada grupo y donante.

3.4. Adhesión celular

La adhesión celular se cuantificó usando PrestoBlue®, reactivo de viabilidad de células vivas basado en resazurina (Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU). Cuando el reactivo de PrestoBlue® se añade al medio, el ambiente reductor en las células viables convierte el reactivo en un colorante rojo fluorescente intenso, cambio que puede ser determinado espectrofotométricamente.

Para determinar la adhesión celular, las láminas de Ti de los diferentes grupos se montaron en flexiPERM® (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania), en los cuales se sembraron HGF del donante C a una densidad de 7×10^3 células/pocillo. Se realizaron sextuplicados de cada grupo. Transcurridos los 30 min de adhesión, el medio fue aspirado, y las células lavadas dos veces con PBS (Biowest, Nuaille, Francia) y a continuación se añadieron 100 µl de medio de

cultivo fresco en cada pocillo, junto a 10 µl de PrestoBlue®. Al mismo tiempo y con las mismas condiciones se preparó una curva estándar por triplicado (contiene una cantidad de células conocida). Tanto las muestras como el estándar se incubaron 24h a 37°C, 5% de CO₂. Al día después, se realizó la lectura de la absorbancia del medio a 570 nm y 600 nm. Los cálculos se realizaron siguiendo el protocolo del fabricante. El número de células se calculó por extrapolación²⁶.

3.5. Actividad metabólica

Se determinó la actividad metabólica total en los días 7 y 14 de cultivo de HGF-A y HGF-C sobre diferentes láminas de Ti de cada grupo en placas de 24 pocillos. Se realizaron 6 replicados (n=6) de cada donante y grupo. Se añadieron 10 µl de PrestoBlue a las células con 100 µl de medio de cultivo y se realizó la lectura de la absorbancia a 570 nm y 600 nm después de una incubación de 30 min a 37°C. Los cálculos se realizaron siguiendo el protocolo del fabricante y se representaron respecto al Ti.

3.6. Aislamiento de ARN y análisis de la expresión génica mediante RT-PCR

3.6.1. Aislamiento de ARN

El ARN total se aisló utilizando el reactivo *Tripure*® (disolución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), mediante extracción fenol-cloroformo y posterior precipitación por antisolventia con isopropanol, de acuerdo con el protocolo del fabricante. La extracción fenol-cloroformo se usa ampliamente para aislar ácidos nucleicos y se basa en la separación por diferencia de solubilidad del ARN, el ADN y las proteínas en dos fases líquidas inmiscibles entre sí. En primer lugar, las células se lisan con isotiocianato de guanidina, lo que provoca su disrupción y desnaturaliza nucleasas endógenas. Al añadir cloroformo sobre la muestra se produce la separación en tres fases: 1) fase acuosa que contiene ARN, 2) interfase blanca que contiene ADN y 3) fase orgánica que contiene proteínas. De esta manera, se separa la fase acuosa del resto, se añade isopropanol para precipitar el ARN y se lava el precipitado con etanol 75%.

El ARN total se cuantificó mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro *Nanodrop* (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Mediante el kit "High Capacity RNA to ADNc" (Applied Biosystems), se realizó de cada muestra la transcripción inversa de la misma cantidad de ARN a 37 °C durante 60 min con un volumen final de 20 µl²⁷. Para llevar a cabo la RT-Q-PCR se hizo una dilución 1/7 de cada ADNc obtenido.

3.6.2. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR

La reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR) es una técnica cuantitativa, sensible y rápida para la detección de secuencias específicas de ARN mensajero

(mARN). La RT-PCR utiliza el ADNc como un “molde” para amplificar (replicar) los genes seleccionados utilizando cebadores específicos (*primers* o iniciadores). La cuantificación de los genes específicos se puede realizar gracias a la monitorización de la reacción de amplificación mediante la detección por fluorescencia del *SYBR green*, un compuesto de la familia de las cianinas que se añade a la mezcla de reacción y que se intercala en el ADN bicatenario (dsADN) emitiendo fluorescencia. El incremento en la señal de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN sintetizado durante cada ciclo de amplificación. El ciclo en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina punto de corte (*C_p*, crossing point) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN diana presente en la muestra. De esta manera, valores bajos de *C_p* se relacionan con elevados niveles de ADN inicial. Para cuantificar relativamente los niveles de mARN de cada gen, se construyen curvas de calibrado para cada gen de referencia y de interés.

La RT-PCR se realizó para dos genes de referencia, el gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la β -actina, y para genes diana relacionados con la formación de MEC de los fibroblastos, descritos más adelante. Las secuencias de los distintos cebadores utilizados se muestran en la *Tabla 1*.

La RT-PCR se llevó a cabo mediante el Lightcycler 480® (Roche Diagnostics, Alemania), usando para la detección el SYBR Green. Para cada reacción, se añadieron 7 μ l del “Lightcycler-FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I”, 0,5 μ M de cada primer específico (el sentido y el antisentido) y 3 μ l de la disolución de ADNc en un volumen total de 10 μ l. Se siguió el programa estándar de PCR con una etapa de preincubación para la desnaturalización de la doble cadena de ADNc (95°C), seguido de 45 ciclos con 3 etapas: una etapa de desnaturalización (95°C), una etapa de hibridación del primer (60°C) y una etapa de elongación (72°C), de 10 segundos cada una. En cada ensayo se incluyó un control negativo sin ADNc molde^{28,29}.

Se calcularon las eficiencias de las reacciones desde las pendientes obtenidas con el software Lightcycler 480. A partir de los productos de la PCR obtenidos se llevó a cabo un análisis de la curva de *melting* para confirmar la especificidad de la reacción. Se construyeron curvas de calibrado para cada gen evaluado, para poder determinar la cuantificación de su expresión relativa. A partir de los *C_p* de las muestras problema y las curvas de calibrado se pueden cuantificar los niveles relativos de mARN, que se expresan como un ratio entre el gen diana y la media de los genes de referencia.

Los genes diana elegidos definen distintos aspectos relacionados con las funciones de los fibroblastos gingivales, como la producción y organización de la matriz extracelular. En el presente trabajo se estudiaron los siguientes:

- Colágeno I α 1 (COL1A1) y colágeno III α 1 (COL3A1): El tejido conjuntivo gingival está constituido por una red densa de fibras de colágeno que proporciona firmeza a la encía y sujeción al diente y al hueso alveolar. El colágeno tipo I y III son colágenos fibrilares. El de

tipo I representa el 90 % del colágeno de todo el cuerpo y el de tipo III se asocia a cicatrices no fibrosas¹.

- Decorina (DCN): Pequeño proteoglicano del tipo dermatán sulfato constituyente de la MEC. Se une a las fibrillas de colágeno tipo I y a las fibras TFG-β (transforming growth factor beta), facilitando el ensamblaje de la matriz. Por tanto, la falta de decorina inhibe la formación de fibrillas de colágeno y su organización¹.

- Metaloproteinasa de matriz extracelular I (MMP1): Las MMPs son unos de los enzimas más importantes en la remodelación de la MEC. Degradan proteínas de la matriz tales como colágeno y fibronectina en condiciones normales. Concretamente la MMP1 o colagenasa I, es específica del colágeno tipo I y III^{1,30}.

- Inhibidor de Metaloproteinasa I (TIMP1): Los TIMPs pueden inactivar permanentemente a las MMPs favoreciendo su degradación. TIMP se une a MMPs y como resultado el complejo formado es reconocido por un receptor específico y fagocitado por macrófagos³⁰.

Tabla 1. Cebadores utilizados en la RT-PCR de los genes de referencia y los genes diana²⁷. S: sentido. A: antisentido. pb: pares de bases.

Gen	Secuencia del cebador (5'-3')	Tamaño (pb)	GenBank nº de acceso
Colágeno I α1 (COL1A1)	S: AGAGCATGACCGATGGATTC A: TTCTTGAGGTTGCCAGTC	122	NM_000088.3
Colágeno III α1 (COL3A1)	S: GGCCTACTGGCCTGGTGGT A: CCACGTTACCAGGGGCACC	190	NM_000090.3
Metaloproteinasa de la matriz extracelular I(MMP1)	S: TGTCAGGGGAGATCATCGGGAC A: TGGCCGAGTTATGAGCTGCA	177	NM_002421.3
Inhibidor de Metaloproteinasa I(TIMP1)	S: TTCCGACCTCGTCATCAGGG A: TAGACGAACCGGATGTCAGC	144	NM_003254.2
Decorina (DCN)	S: ATCTCAGCTTTGAGGGCTCC A: GCCTCTCTGTTGAAACGGTC	146	NM_001920.3
Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	S: TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC A: AAG GGA CTT CCT GTA ACA A	87	NM_002046.3
β-Actina (ACTBL2)	S: CTG GAA CGG TGA AGG TGA CA A: AAG GGA CTT CCT GTA ACA A	140	NM_001101.3

3.7. Cuantificación de colágeno

Después de 14 días de cultivo celular, las células fueron lavadas con H₂O, incubadas 1h a temperatura ambiente y congeladas a -80 °C durante 1h. Una vez descongeladas se realizaron alícuotas de 100 µl en una placa de 96 pocillos. Posteriormente las células fueron incubadas a 37 °C en una atmósfera húmeda *overnight* seguido de una incubación de 24 h a 37 °C en una atmósfera seca. El colágeno fue teñido con 0,1% (w/v) Sirius Red F3BA (Sigma-Aldrich) en ácido pícrico saturado (Sigma-Aldrich) durante 1 h a temperatura ambiente. Se

realizó un lavado con 10 mM HCl y el colorante fue solubilizado con 0,1 M NaOH. La lectura de la absorbancia se llevó a cabo a 540 nm. Los resultados se compararon con un estándar de colágeno (Calf skin type I Collagen, Sigma-Aldrich) incluido en el ensayo^{31,32}. Se realizaron triplicados de los dos donantes (n=6).

3.8. Análisis estadístico

Todos los datos se representan como valores medios \pm EEM (error estándar de la media). Las pruebas de normalidad se realizaron mediante el test de Kolmogorov-Smirnov para asumir distribuciones paramétricas o no paramétricas. El efecto de los diámetros de los nanoporos se evaluó mediante un análisis ANOVA y cuando los resultados mostraban efectos interactivos significativos, se realizó un análisis post hoc mediante t-Student para buscar las diferencias significativas entre los grupos experimentales^{31,32}. El análisis estadístico se realizó con el software SPSS para Windows versión 17 (SPSS, Chicago, IL USA). Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con valores de $p \leq 0,05$. Para realizar las representaciones gráficas se utilizó el software GraphPad Prism v 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

4. Resultados y discusión

4.1. Obtención de nanoestructuras de diferente diámetro

La formación controlada de nanoestructuras porosas autoensambladas de TiO₂ de diferentes diámetros, ha sido el primer paso necesario para posteriormente evaluar la respuesta celular de HGF a estas nanoestructuras. Así pues, en la *Figura 7*, se muestra la caracterización de las nanoestructuras obtenidas. Por un lado podemos ver como las imágenes de SEM revelan que tras el proceso de oxidación anódica, llevado a cabo bajo las condiciones específicas seleccionadas (explicadas en el apartado de Métodos), obtenemos nanoporos bien definidos en las superficies tratadas, mostrando gran diferencia con las superficies de Ti sin tratar. Además ya se observan las diferencias en el diámetro de éstos, siendo las diferencias entre los grupos significativas. Así pues, los nanoporos del grupo A (NP-A), mostraron un diámetro de $26,4 \pm 0,8$ nm, los del grupo B (NP-B) de $47,2 \pm 0,9$ nm y finalmente los del grupo C (NP-C) de $64,1 \pm 1,7$ nm. Estos resultados, respaldan la dependencia del diámetro de los nanoporos al voltaje aplicado durante la anodización^{9,13} y al interespacio entre el ánodo y el cátodo^{9,18}. Por una parte, se observó que a mayor voltaje se obtenía un mayor diámetro de poro. Los nanoporos de mayor diámetro (NP-C), se obtuvieron aplicando el voltaje más alto en la 2ª anodización, de 60 V. Al cambiar este a 10 V (NP-B), el tamaño del poro se vio reducido significativamente. Si bien durante el desarrollo del presente trabajo observamos que a partir de un voltaje determinado y en las condiciones de anodización que utilizábamos, disminuir el voltaje no resultaba en un menor diámetro de poro (datos no mostrados). Por consiguiente, disminuimos el interespacio entre el ánodo y el

cátodo, además de aplicar voltajes más pequeños (1ª anodización 35V, 2ª anodización 1V), consiguiendo obtener así diámetros más pequeños (NP-A), demostrando que el factor del interespacio entre los electrodos juega también un papel importante en determinadas condiciones. A pesar que en nuestro caso disminuir el interespacio nos permitió conseguir un grupo de superficies con diámetros significativamente más pequeños, estudios publicados describen como el aumento del interespacio se traduce en una disminución del diámetro del poro¹⁸, si bien el resto de condiciones de anodización difieren de las utilizadas en este trabajo. Estos resultados ponen de manifiesto que el efecto del interespacio entre los electrodos es dependiente de las otras condiciones del ensayo, ya sea el voltaje, tiempo de anodización, tipo de electrolito, etc.

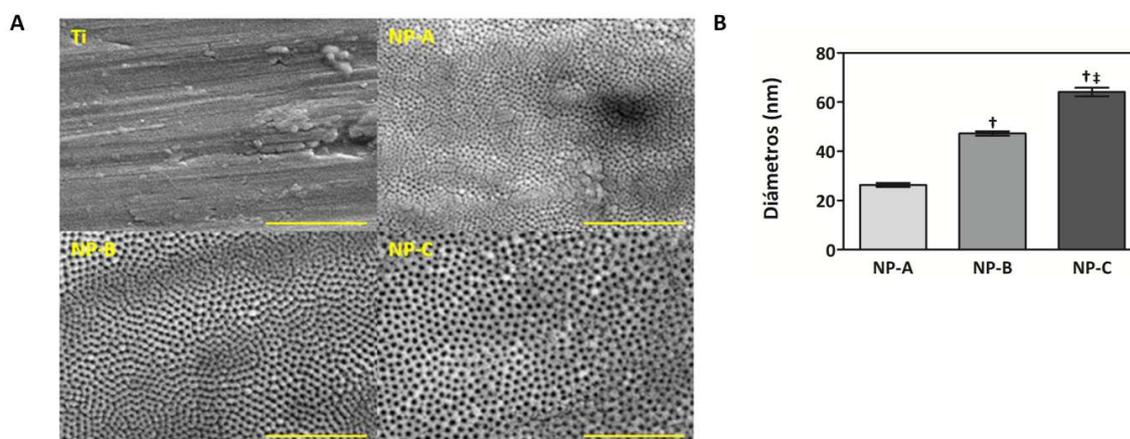


Figura 7. Caracterización de los nanoporos de TiO₂. A) Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la superficie de Ti y nanoporos de TiO₂ de diferente diámetro. La barra amarilla indica un tamaño de 2 μm. B) Medición de diámetros (nm) de los nanoporos de TiO₂ formados sobre las láminas de Ti con diferentes condiciones de anodización. Se representan las medias ± EEM. Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante análisis post hoc (*t* de Student): † *p*<0.05 respecto a NP-A; †‡ *p*<0.05 respecto a NP-B.

4.2. Efecto in vitro de las diferentes superficies de TiO₂ nanoestructuradas en cultivos celulares de fibroblastos gingivales humanos

En primer lugar se valoró la **citotoxicidad** celular después de 48 horas de cultivo, para comprobar si alguna de las superficies resultaban ser tóxicas (Figura 8). Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas de las distintas superficies respecto al control negativo (células cultivadas sobre plástico) y de todos los grupos respecto al control positivo (estadística no mostrada en el gráfico), así como diferencias entre los grupos de nanoporos. Si bien cabe destacar que en ninguno de los casos los valores de actividad LDH superan el 30%, límite establecido como indicador de citotoxicidad para los implantes médicos según la ISO-10993:5. De esta manera, podemos afirmar que tanto el Ti como los diferentes nanoporos estudiados no son citotóxicos en células HGF. Estos resultados muestran que la formación de nanoestructuras mediante el proceso de anodización utilizado no altera esta característica del Ti. Cabe añadir, que para eliminar los restos del electrolito que podrían resultar tóxicos, antes de su utilización en los cultivos, las láminas se mantuvieron un mínimo

de 24 h en etanol. No obstante, cabe destacar que en otros estudios, la formación de nanoestructuras en la superficie de Ti sí que ha mostrado efectos tóxicos para las células, si bien este efecto podría estar relacionado con el diámetro de las nanoestructuras. Así, nanoestructuras con diámetros mayores de 100 nm inducirían la muerte celular²⁰.

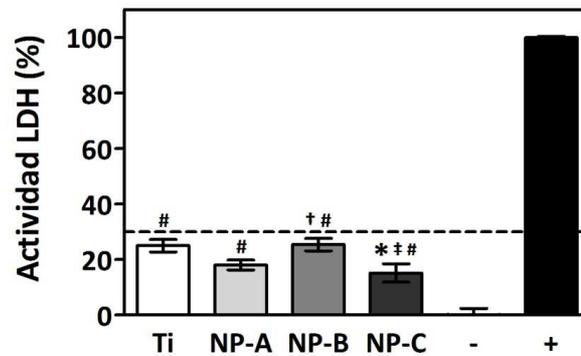


Figura 8. Evaluación de la citotoxicidad en fibroblastos gingivales humanos cultivados sobre diferentes superficies de Ti. La citotoxicidad se ha evaluado mediante el análisis de la actividad LDH en el medio de cultivo después de 48h de incubación de HGF sobre las distintas superficies. El control positivo (+) (100% de citotoxicidad) corresponde a la medida de LDH en el medio de células tratadas con el surfactante 1% de Tritón X-100 cultivadas sobre plástico. El control negativo (-) (0% de citotoxicidad) corresponde a la medida de LDH de células cultivadas sobre plástico. Se representan las medias \pm EEM (n=12). Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante análisis post hoc (t de Student): * $p < 0.05$ respecto a Ti; † $p < 0.05$ respecto a NP-A; ‡ $p < 0.05$ respecto a NP-B; # $p < 0.05$ respecto al control negativo (-).

En segundo lugar, se evaluó el efecto de los nanoporos sobre la **adhesión celular**. La *Figura 9* representa el número de células adheridas a las diferentes láminas después de 30 min. Se observan diferencias significativas respecto al titanio con los grupos NP-B y NP-C, que demuestran como la presencia de nanoporos en la superficie favorecen la adhesión celular. Se aprecia como los nanoporos de mayor diámetro son los que presentan mayor adhesión celular. Estos resultados contrastan con los primeros estudios que se realizaron sobre el efecto del diámetro de las nanotubos en las células³³, en el cual se vio como uno de los factores más dependientes del diámetro, era efectivamente la adhesión celular, de tal manera que, diámetros entre 15-30 nm ejercían un efecto positivo sobre la adhesión. En cambio, a partir de diámetros más grandes a 50 nm, la adhesión celular se vio reducida de manera importante.

Posteriormente se evaluó el efecto de las diferentes superficies en la **actividad metabólica** a los 7 y 14 días de cultivo (*Figura 10*). Se observan también diferencias en la actividad metabólica dependiendo del grupo. Es importante resaltar que se muestran diferencias dependientes de donante, pues se observa que los donantes no tienen el mismo comportamiento frente a las diferentes superficies. Así, el donante HGF-C muestra una respuesta similar a la vista en la adhesión celular, y en cambio el donante HGF-A tiene una respuesta diferente. Asimismo, tampoco se observa grandes diferencias en el porcentaje de

actividad entre el cultivo del día 7 y día 14, este hecho sea probablemente debido a que se ha alcanzado la confluencia en las superficies³⁴.

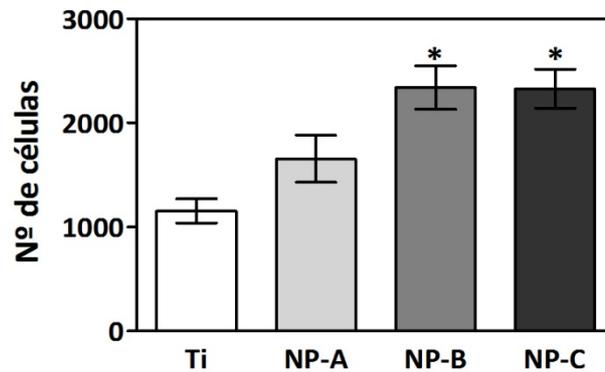


Figura 9. Adhesión celular de HGF-C sobre las diferentes superficies de Ti. Se muestra el número de células adheridas 30 min después de su siembra. Se representan las medias \pm EEM, se utilizó un único donante (n=6). Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante análisis post hoc (t de Student): * $p < 0.05$ respecto a Ti; † $p < 0.05$ respecto a NP-B.

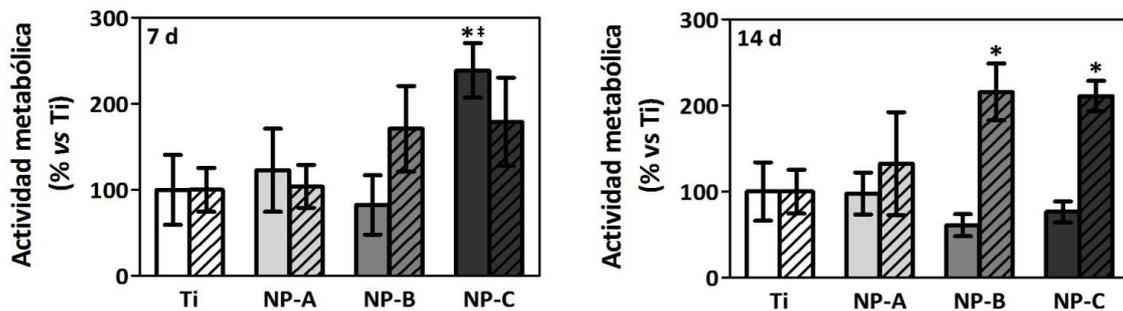


Figura 10. Actividad metabólica de HGF sobre las diferentes superficies de Ti después de 7 y 14 días de cultivo. Se utilizaron dos donantes, HGF-A (barras lisas) y HGF-C (barras rayadas). Se representan las medias \pm EEM, con n=6 de cada donante. Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante análisis post hoc (t de Student): * $p < 0.05$ respecto a Ti; † $p < 0.05$ respecto a NP-B.

Se puede observar una tendencia a que los nanoporos de mayor diámetro (NP-B y NP-C) favorezcan la adhesión celular (Figura 9) e induzcan un aumento en la actividad metabólica (Figura 10). Este hecho, contrasta con la literatura consultada, puesto que muchos autores afirman que efectivamente hay una dependencia de diámetro, pero que son las nanotubos de menor diámetro (~15 nm) las que favorecen fuertemente la adhesión celular, proliferación y diferenciación. Así, se ha sugerido que este efecto podría ser debido a la formación de complejos de integrinas que median las interacciones celulares con la superficie. Estos complejos tienen unos 10 nm de diámetro, por lo que en el caso que las superficies tengan nanoporos de ~15 nm permitirían que se ajustaran perfectamente en las aberturas de los nanotubos de este diámetro. Este efecto se ha manifestado en tipos celulares como células madre mesenquimales (MSCs), células madre hematopoyéticas

(HSCs), células endoteliales, osteoclastos y osteoblastos, demostrando que este efecto puede ser un comportamiento universal^{9,14,20}. Sin embargo, nuestros resultados no se ajustan a este comportamiento, puesto que los nanoporos de menor diámetro son los que han presentado peores resultados la adhesión y actividad metabólica. Estas diferencias pueden ser debidas a que exista un efecto según el tipo celular o bien un efecto de donante. También hay que recordar, que en este trabajo, no hemos alcanzado un diámetro de 15 nm y que los estudios celulares publicados se han realizado con nanotubos y no con nanoporos.

En estudios anteriores, se ha visto como las células responden a la nanomodificación de la superficie presentando cambios en la morfología, adhesión, orientación, proliferación, e incluso en la señalización y expresión génica³⁴. De esta manera, se quiso evaluar también el efecto de los nanoporos de TiO₂ sobre los **niveles de expresión de mARN** de genes relacionados con las funciones de los fibroblastos gingivales, como la producción y organización de la matriz extracelular. Los resultados obtenidos se representan en la *Figura 11*. Por una parte, se analizaron genes como COL1A1 y COL3A1, cuyos productos representan los compuestos mayoritarios de la MEC, y cuya secreción es precisamente la característica principal de los fibroblastos²². Al mismo tiempo se analiza la expresión de la decorina, proteoglicano necesario para el ensamblaje de la matriz. En relación a estos genes, los resultados obtenidos muestran un comportamiento dependiente de donante. Parece ser que no hay una adaptación uniforme en ambos donantes, de manera que en el donante HGF-C sí que se observa una mayor expresión de estos genes en las superficies con nanoporos en relación con el Ti, al contrario que con el donante HGF-A. De esta manera, podemos decir que para el donante C, la expresión de ambos tipos de colágeno y de decorina se ve aumentada en las superficies con nanoporos, mostrando al mismo tiempo una dependencia con el diámetro de éstos. Aunque las diferencias no hayan sido significativas, parece ser que también hay una tendencia a que los nanoporos de mayor diámetro, NP-B y NP-C, favorezcan más la expresión de estos genes que los nanoporos de menor diámetro. Estos resultados concuerdan con otros estudios previos que demostraban que las superficies con nanotubos promovían significativamente la expresión del COL1A1 en HGF²².

Por otra parte, también se evaluaron los niveles de mARN del gen de la MMP1 y su inhibidor TIMP1. Ambas proteínas están involucradas en la constante remodelación de la MEC. Los resultados obtenidos, no muestran una influencia significativa de las superficies nanoestructuradas en la expresión de estos genes, aunque puede destacar el aumento de la expresión de TIMP1 en el grupo de NP-A. No obstante, al analizar el ratio de MMP1/TIMP1 no se aprecian diferencias significativas de las superficies tratadas con el Ti. Por consiguiente, nuestros resultados indican que las nanoestructuras evaluadas no tienen un efecto claro en la expresión de estos genes.

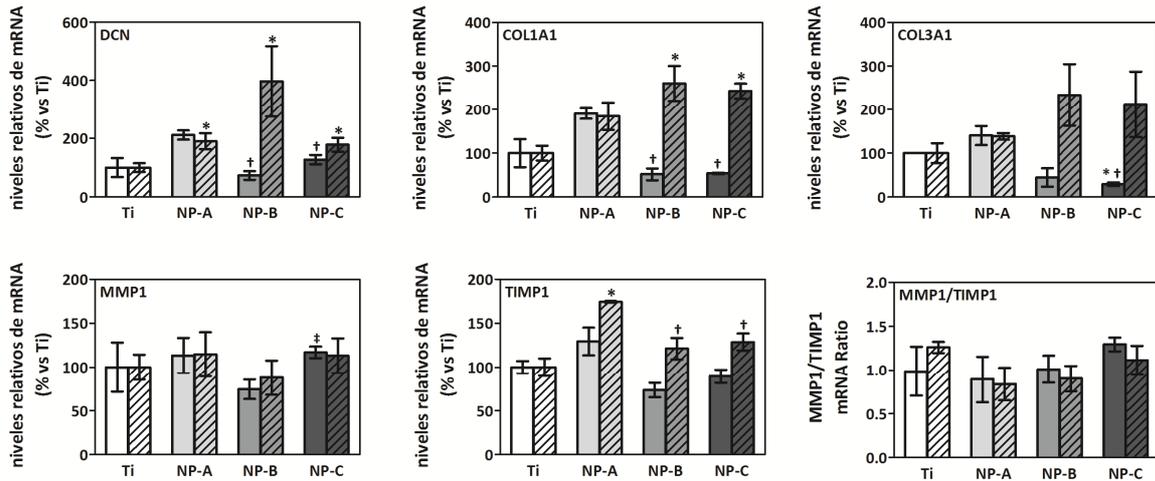


Figura 11. Niveles de expresión de mRNA de DCN, COL1A1, COL3A1, MMP1, TIMP1. Análisis de los niveles de mRNA se realizó tras 14 días de cultivo celular de HGF-A (barras lisas) y HGF-C (barras rayadas) en las diferentes superficies de Ti. Los resultados han sido normalizados con genes de referencia (β -actina y GAPDH) y expresados como porcentaje del control (Ti), que representa el 100%. Se representan las medias \pm EEM ($n=3$ para cada donante). Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante análisis post hoc (*t* de Student): * $p<0.05$ respecto a Ti; † $p<0.05$ respecto a NP-A; ‡ $p<0.05$ respecto a NP-B.

Por último, se evaluaron los niveles de **colágeno extracelular** a los 14 días de cultivo. Como hemos comentado, el colágeno es el mayor componente de la MEC, por ende, evaluar la secreción de éste, puede servir para establecer el nivel de matriz sintetizada en la superficie de las láminas. En estudios previos, se ha visto como la modificación de la superficie de Ti puede mejorar la capacidad de secreción de colágeno de HGF^{22,35}, sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo, representados en la *Figura 12*, no muestran diferencias significativas entre los grupos de nanoporos y las superficies de Ti sin modificar. Por tanto, la presencia de nanoporos de TiO₂ no supone un efecto significativo en los niveles extracelulares de colágeno, a excepción del grupo NP-A, el cual presenta un descenso en su secreción.

Si comparamos estos resultados con los obtenidos en la expresión génica del colágeno, vemos como no presentan el mismo comportamiento. En primer lugar, en la expresión génica veíamos una dependencia de donante que no se observa en la secreción de colágeno. En segundo lugar, la expresión génica sí que resultaba ser mayor en los nanoporos respecto al grupo control, hecho que no se reproduce en los niveles extracelulares de colágeno. Una posible explicación para estas diferencias es que la medida del colágeno extracelular es el resultado de la acumulación de su secreción durante los 14 días de cultivo, mientras que el análisis de la expresión génica corresponde tan solo a los niveles de mRNA presentes el día 14, es decir en un momento concreto del cultivo. Por tanto, es posible que el perfil de expresión génica sea variable a lo largo del cultivo celular, de tal manera que aunque se observaban diferencias en los niveles de mRNA a día 14, en la cuantificación del colágeno acumulado a lo largo de todo el cultivo éstas no se manifiestan. De esta manera,

podríamos afirmar que las superficies nanoestructuradas no suponen una mejora en cuanto a los niveles de colágeno extracelular. También cabe resaltar, que como se observaba en la expresión génica, parece haber una dependencia con el diámetro del nanoporo, resultando ser el de menor diámetro, NP-A, el que presenta tanto menor secreción de colágeno como menor expresión, y por tanto menor formación de MEC.

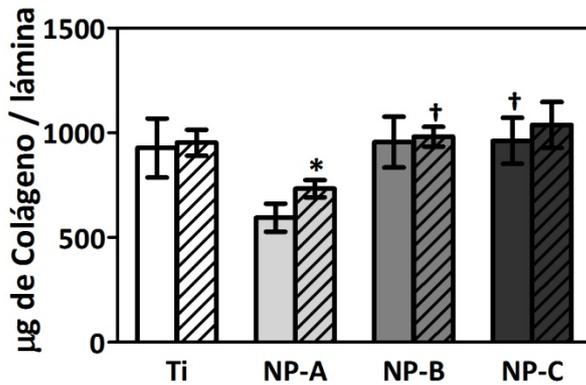


Figura 12. Niveles de colágeno extracelular tras 14 días de cultivo celular. Colágeno extracelular después de 14 días de cultivo de HGF-A (barras lisas) y HGF-C (barras rayadas) en las diferentes superficies de Ti evaluadas. Se representan las medias \pm EEM ($n=3$ por donante). Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante análisis post hoc (t de Student): * $p<0.05$ respecto a Ti; † $p<0.05$ respecto a NP-A.

Conclusiones

- I. Mediante el proceso de oxidación anódica y bajo condiciones específicas de anodización, se obtienen nanoporos autoensamblados de TiO_2 bien definidos. Modificando las condiciones del voltaje aplicado y el interespacio entre electrodos, se alcanzan diferentes diámetros de éstos.
- II. Todas las superficies evaluadas (con nanoporos de diámetro medio de 26, 47 y 64nm) son biocompatibles con los fibroblastos gingivales humanos.
- III. Existe un efecto del diámetro de nanoporo sobre los parámetros de adhesión celular, actividad metabólica, expresión génica y colágeno extracelular. Algunos efectos sin embargo, presentan una dependencia de donante.
- IV. Los nanoporos de mayor diámetro (47 y 64 nm) muestran en general una mejor respuesta celular que los nanoporos de menor diámetro (26 nm).

Bibliografía

1. Gomez-Florit, M. Testing of biomolecules and novel surfaces for periodontal and peri-implant regeneration. (2015).
2. Bartold, P. M. Periodontal tissues in health and disease: introduction. *Periodontol.* 2000 **40**, 7–10 (2006).
3. Abrahamsson, I., Berglundh, T., Wennström, J. & Lindhe, J. The peri-implant hard and soft tissues at different implant systems. A comparative study in the dog. *Clin. Oral Implants Res.* **7**, 212–9 (1996).
4. Buser, D. *et al.* Soft Tissue Reactions to Non-Submerged Unloaded Titanium Implants in Beagle Dogs. *J. Periodontol.* **63**, 225–235 (1992).
5. Angelica, M. D. & Fong, Y. Nanotechnology Approaches for Better Dental Implan. *October* **141**, 520–529 (2008).
6. Li, B. *et al.* Influence of nanostructures on the biological properties of Ti implants after anodic oxidation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **25**, 199–205 (2014).
7. Minagar, S., Wang, J., Berndt, C. C., Ivanova, E. P. & Wen, C. Cell response of anodized nanotubes on titanium and titanium alloys. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **101A**, 2726–2739 (2013).
8. Macak, J. M. *et al.* TiO₂ nanotubes: Self-organized electrochemical formation, properties and applications. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **11**, 3–18 (2007).
9. Roy, P., Berger, S. & Schmuki, P. TiO₂ Nanotubes: Synthesis and Applications. *Angew. Chemie Int. Ed.* **50**, 2904–2939 (2011).
10. Masuda, H. & Fukuda, K. Ordered metal nanohole arrays made by a two-step replication of honeycomb structures of anodic alumina. *Science* **268**, 1466–8 (1995).
11. Nanoröhren, T. Growth of anodic self-organizes titanium dioxide nanotube layers. (2008).
12. Macak, J. M., Albu, S. P. & Schmuki, P. Towards ideal hexagonal self-ordering of TiO₂ nanotubes. *Phys. status solidi – Rapid Res. Lett.* **1**, 181–183 (2007).
13. Kulkarni, M. *et al.* Titanium nanostructures for biomedical applications. *Nanotechnology* **26**, 062002 (2015).
14. Liu, X., Chu, P. K. & Ding, C. Surface nano-functionalization of biomaterials. *Mater. Sci. Eng. R Reports* **70**, 275–302 (2010).
15. Guo, Z., Li, X., Zhang, X., Guan, Z. & He, T. Controlled morphology modulation of anodic TiO₂ nanotubes via changing the composition of organic electrolytes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 11502 (2014).
16. Acevedo-Peña, P., Lartundo-Rojas, L. & González, I. Effect of water and fluoride content on morphology and barrier layer properties of TiO₂ nanotubes grown in ethylene glycol-based electrolytes. *J. Solid State Electrochem.* **17**, 2939–2947 (2013).
17. Gulati, K., Santos, A., Findlay, D. & Losic, D. Optimizing Anodization Conditions for the Growth of Titania Nanotubes on Curved Surfaces. *J. Phys. Chem. C* **119**, 16033–16045 (2015).
18. Yoriya, S. Effect of inter-electrode spacing on electrolyte properties and morphologies of anodic TiO₂ nanotube array films. *Int. J. Electrochem. Sci.* **7**, 9454–9464 (2012).
19. Narendrakumar, K. *et al.* Adherence of oral streptococci to nanostructured titanium surfaces. *Dent. Mater.* **31**, 1460–1468 (2015).
20. Park, J. *et al.* TiO₂ Nanotube Surfaces: 15 nm-An Optimal Length Scale of Surface Topography for Cell Adhesion and Differentiation. *Small* **5**, 666–671 (2009).
21. Minagar, S., Li, Y., Berndt, C. C. & Wen, C. The influence of titania–zirconia–zirconium titanate nanotube characteristics on osteoblast cell adhesion. *Acta Biomater.* **12**, 281–289 (2015).
22. Liu, X. *et al.* Effects of titania nanotubes with or without bovine serum albumin loaded on human gingival fibroblasts. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 1185 (2014).
23. Gomez-Florit, M. *et al.* Quercitrin-nanocoated titanium surfaces favour gingival cells against oral bacteria. *Sci. Rep.* **6**, 22444 (2016).

24. Alberts, B. *Biología molecular de la célula*. (2010). Omega (Barcelona).
25. Chen, C. Z. & Raghunath, M. Focus on collagen: in vitro systems to study fibrogenesis and antifibrosis _ state of the art. *Fibrogenesis Tissue Repair* **2**, 7 (2009).
26. Córdoba, A., Monjo, M., Hierro-Oliva, M., González-Martín, M. L. & Ramis, J. M. Bioinspired Quercitrin Nanocoatings: A Fluorescence-Based Method for Their Surface Quantification, and Their Effect on Stem Cell Adhesion and Differentiation to the Osteoblastic Lineage. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 16857–16864 (2015).
27. Gómez-Florit, M. *et al.* Differential response of human gingival fibroblasts to titanium- and titanium-zirconium-modified surfaces. *J. Periodontal Res.* **49**, 425–436 (2014).
28. Gómez-Florit, M., Monjo, M. & Ramis, J. M. Quercitrin for periodontal regeneration: effects on human gingival fibroblasts and mesenchymal stem cells. *Sci. Rep.* **5**, 16593 (2015).
29. Gómez-Florit, M. *et al.* Human gingival fibroblasts function is stimulated on machined hydrided titanium zirconium dental implants. *J. Dent.* **42**, 30–38 (2014).
30. Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M. & Werb, Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, 1–24 (2011).
31. Gómez-Florit, M., Monjo, M. & Ramis, J. M. Identification of Quercitrin as a Potential Therapeutic Agent for Periodontal Applications. *J. Periodontol.* **85**, 966–974 (2014).
32. Gómez-Florit, M., Ramis, J. M. & Monjo, M. Anti-fibrotic and anti-inflammatory properties of melatonin on human gingival fibroblasts in vitro. *Biochem. Pharmacol.* **86**, 1784–1790 (2013).
33. Park, J., Bauer, S., von der Mark, K. & Schmuki, P. Nanosize and Vitality: TiO₂ Nanotube Diameter Directs Cell Fate. *Nano Lett.* **7**, 1686–1691 (2007).
34. Brammer, K. S. *et al.* Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO₂ nanotube surface. *Acta Biomater.* **5**, 3215–3223 (2009).
35. Wang, X. *et al.* Selective responses of human gingival fibroblasts and bacteria on carbon fiber reinforced polyetheretherketone with multilevel nanostructured TiO₂. *Biomaterials* **83**, 207–218 (2016).