



**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

5 Evaluación y comparación de la adsorción proteica entre superficies de NiTi con y sin tratamiento de oxidación

5.1 Objetivos	184
5.2 Introducción	185
5.2.1 Proteínas: generalidades	185
5.2.2 La albúmina y la fibronectina	186
5.2.2.1 La Albúmina	186
5.2.2.2 La Fibronectina	186
5.2.3 Las integrinas: receptores celulares	187
5.2.4 Proteínas y respuesta celular	188
5.2.5 Caracterización de la adsorción proteica	189
5.3 Adsorción de proteínas sobre TiO₂ y NiTi: estado del arte	189
5.4 Materiales y métodos	191
5.4.1 Materiales	191
5.4.2 Métodos	192
5.4.2.1 Radioactividad: generalidades	192
5.4.2.2 Marcaje radioactivo para el estudio de la adsorción proteica	193
5.4.2.3 Protocolo de marcaje radioactivo con ¹²⁵ I	193
5.4.2.4 Protocolo de adsorción	194
5.4.2.5 Protocolo de elución	196
5.4.2.6 Estadística	197
5.5 Resultados	197
5.5.1 Adsorción competitiva	197
5.5.2 Ensayo de elución	201

5.6 Discusión	202
5.7 Conclusiones	206

La afinidad de las proteínas para las superficies de NiTi NT y OT, y consecuentemente, la naturaleza de la capa proteica adsorbida es un elemento crucial de la respuesta biológica. Las células interactúan con la superficie del biomaterial a través de esta capa y, como consecuencia, la respuesta celular depende de estas interacciones.

Por esta razón, se eligió estudiar, en este capítulo, el proceso de adsorción proteica sobre las superficies de NiTi, y determinar la influencia del tratamiento OT sobre este proceso. Los mecanismos de adsorción proteica son complejos, involucrando interacciones físico-químicas diversas, y el plasma sanguíneo contiene una multitud de diferentes proteínas en concentraciones variadas. En consecuencia, el estudio exhaustivo de la adsorción proteica sobre una superficie se hace difícil y largo. Por esto, se eligió limitar el estudio a la adsorción competitiva entre dos proteínas comunes implicadas en los procesos de adhesión celular, la albúmina y la fibronectina, cuantificando la cantidad adsorbida de cada una en condiciones experimentales específicas, en función de la superficie.

5.1 Objetivos

Los objetivos de este capítulo son:

1. Cuantificar la adsorción de albúmina y de fibronectina sobre superficies de NiTi NT y OT, en condiciones experimentales competitivas.
2. Evaluar la influencia del tratamiento OT sobre la adsorción competitiva entre albúmina y fibronectina, en comparación con las superficies NT.
3. Evaluar la influencia de la composición química y/o fase de la aleación NiTi sobre la adsorción competitiva entre albúmina y fibronectina.
4. Estudiar las posibles correlaciones entre la adsorción proteica sobre las distintas superficies y sus características fisico-químicas.

5.2 Introducción

5.2.1 Proteínas: generalidades

Una proteína es un copolímero de aminoácidos enlazados por enlaces peptídicos, llamado también cadena polipeptídica. Existen más de 20 aminoácidos en la naturaleza, que tienen en común una estructura dentro de la cual se distinguen una función amina (NH_2) y una función ácido carboxílico (COOH) en el mismo carbono. Estos aminoácidos difieren por su radical, o grupos laterales, que tienen una polaridad, una hidrofobicidad y una carga diferente. La secuencia con la cual se encadenan los aminoácidos para formar la proteína representa la estructura primaria de la proteína (*figura 5.1*).

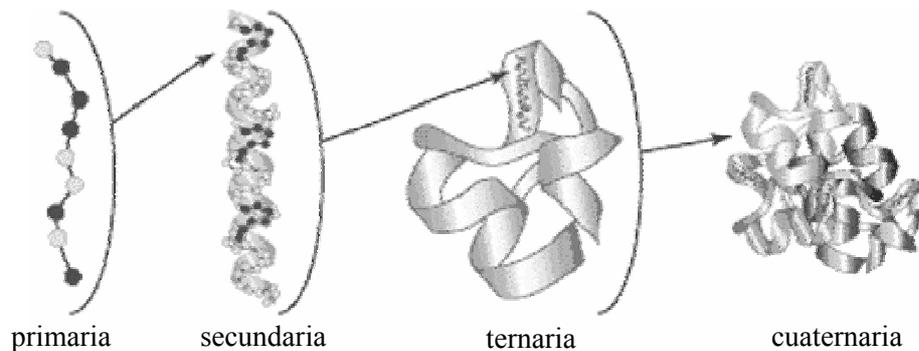


Figura 5.1: Los cuatro niveles estructurales de una proteína [adaptado de <http://www.piercenet.com/>]

Las estructuras secundarias y terciarias de la proteína están determinadas por las interacciones que existen entre los distintos aminoácidos. En concreto, la estructura secundaria se debe a interacciones locales entre los grupos de distintos aminoácidos que llevan a pliegues o estructuras que se repiten espacialmente en la cadena polipeptídica. Las dos más comunes son la hélice alfa y la hoja plegada beta. En cuanto a la estructura terciaria, es la configuración tridimensional global de la cadena polipeptídica, también determinada por las interacciones entre los diferentes grupos de los distintos aminoácidos que componen el polipéptido. La estructura tridimensional de la proteína le confiere una actividad biológica específica que le permite, por ejemplo, ser reconocida e interactuar con los receptores celulares. Finalmente, la estructura cuaternaria de la proteína se refiere a la asociación y ordenamiento espacial entre dos o más cadenas polipeptídicas, es decir que, las proteínas pueden ser monómeros (una cadena polipeptídica), dímeros (dos cadenas polipeptídicas), trímeros (tres cadenas polipeptídicas), etc.

5.2.2 La albúmina y la fibronectina

5.2.2.1 La Albúmina

La albúmina es una de las proteínas más abundantes del plasma sanguíneo, con una concentración de entre 35 y 55 mg/ml. Es una proteína globular relativamente pequeña, de unos 66 kDa de peso molar y con dimensiones aproximadas, si se representa dentro de un cilindro, de 120X27 Å [Hno94]. Su punto isoeléctrico está alrededor de pH 4,6 (albúmina humana), y consecuentemente lleva una carga global negativa a pH fisiológico. Es una proteína calificada de flexible, por los cambios estructurales que es capaz de sufrir cuando se adsorbe sobre un sustrato, perdiendo extensivamente las estructuras del tipo hélice alfa.

La albúmina es una proteína comúnmente utilizada como agente bloqueador para impedir las adsorciones inespecíficas sobre un sustrato [Knk05]; y es conocida para impedir la adsorción posterior de las proteínas del plasma sanguíneo, por lo que permite reducir la adhesión plaquetaria y la formación de trombos [Apa93], y reducir la adhesión celular en general.

5.2.2.2 La Fibronectina

La fibronectina es una proteína mucho más grande que la albúmina, con dimensiones de 600X60 Å, si se representa dentro de un cilindro, y un peso molar de 220 kDa. Es un dímero cuyas dos cadenas polipeptídicas, casi idénticas, están enlazadas covalentemente por puentes bisulfuros. Su punto isoeléctrico se sitúa entre 5,6 y 6,1 (fibronectina humana), de manera que lleva una carga global negativa a pH fisiológico. Dentro del plasma sanguíneo, es una proteína mucho menos abundante que la albúmina, con una concentración de entre 0,35 y 0,45 mg/ml, por lo que la relación entre la concentración en fibronectina y la concentración en albúmina, dentro del plasma sanguíneo, es de 1:100.

También es una proteína flexible que puede alterar su forma de manera significativa por el proceso de adsorción [Eca83]; [Uzv95]; [Vof05].

Es reconocido su importante papel, junto con la vitronectina, como proteína adhesiva en el proceso de adhesión celular [Atg00]; [Gfe81]; [Gfe82]; [Hsc88]; [Hew94]; [Smd93], porque incorpora la secuencia RGD de aminoácidos (Arg-Gly-Asp). Esta es una de las mejores secuencias conocidas para que las células se adhieran mediante integrinas (definición ampliada en el apartado siguiente) específicas [Ans00]. Sin embargo, también se ha observado la adhesión de células osteoblásticas humanas al dominio de unión de la heparina que contiene la fibronectina [Knk05]. Este tipo de adhesión no está mediado por integrinas [Dmu95].

5.2.3 Las integrinas: receptores celulares

Las células son capaces de interactuar con las proteínas, mediante receptores celulares transmembranarios llamados integrinas. Estas integrinas están constituidas de dos unidades glicoproteicas, una cadena α y una cadena β , que no están enlazadas de manera covalente. Todas las integrinas tienen un dominio citoplásmico corto, un dominio transmembranario y un dominio extracelular largo. Las partes extracelulares de cada unidad α y β interaccionan entre ellas para formar un heterodimero funcional (*figura 5.2*). El dominio citoplásmico interactúa con el citoesqueleto y otras moléculas de señalización intracelulares, mientras que el dominio extracelular interactúa con las proteínas de la matriz extracelular (MEC) [Sbw05].

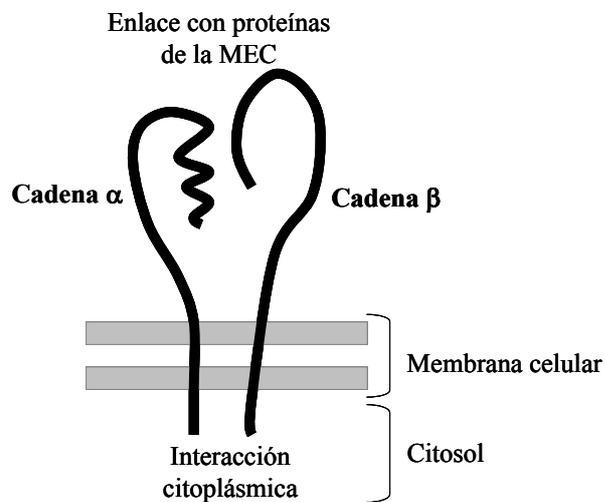


Figura 5.2: Estructura esquemática de una integrina, constituida por una cadena α y una cadena β , ambas con un dominio extracelular, uno transmembranario y uno citoplásmico (adaptado de [Sbw05]).

Se han descubierto 16 unidades α y 8 unidades β distintas [Ans00], las cuales pueden combinarse entre sí. Cada combinación tiene la capacidad de enlazarse con una o más proteínas, mientras que muchas proteínas pueden interactuar con más de una integrina. Sin embargo, las interacciones entre las integrinas y las proteínas se hacen de una manera específica, mediante el reconocimiento de una secuencia de aminoácidos determinada dentro de la proteína, por parte del heterodimero funcional de la integrina. Esto es el caso de la secuencia RGD, presente en las proteínas adhesivas, como la fibronectina, tal como se comentó anteriormente, que puede ser reconocida por varias integrinas, como por ejemplo $\alpha 5 \beta 1$ o $\alpha v \beta 1$.

La interacción entre una integrina y una proteína desencadena todo un proceso biológico de cascadas de señalización dentro de la célula, lo cual lleva a la regulación de muchas funciones celulares, tales como la adhesión, la motilidad y/o la diferenciación [Ans00]; [Sbw05]. De la

misma manera, la interacción entre una integrina y el citoesqueleto y/o moléculas de señalización puede activar o modificar la actividad de la integrina, mediante, por ejemplo, cambios en su conformación.

Las células pueden expresar una variedad de distintas integrinas. La expresión de integrinas por parte de la célula depende, entre otras cosas, de la madurez celular y de la composición química [Kcg04] y/o de la topografía [Btr02]; [Llb02]; [Stu96] del sustrato sobre el cual las células están adheridas.

Evidentemente, la respuesta celular depende de las integrinas expresadas, y de sus interacciones con las proteínas adsorbidas, por todos los mecanismos de señalización que se desencadenan a posteriori y que se han comentado anteriormente.

5.2.4 Proteínas y respuesta celular

Las interacciones que se sabe que ocurren durante el proceso de adsorción de una proteína sobre un sustrato son mayoritariamente interacciones no-covalentes, tales como enlaces de puente de hidrógeno, interacciones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas.

La adsorción proteica sobre distintos sustratos en las mismas condiciones experimentales, puede llevar a distintas respuestas celulares. Existen tres mecanismos que podrían explicar como las proteínas adsorbidas afectan a la respuesta celular.

El primer mecanismo se debe a la diferencia de afinidad que puede tener una misma proteína para distintos sustratos o a la diferencia de afinidad de distintas proteínas para un mismo sustrato, lo que puede resultar en distintas capas de proteínas adsorbidas en función del sustrato.

El segundo mecanismo está relacionado con la modulación de la actividad biológica por el proceso de adsorción. Es decir que puede haber la misma concentración de una determinada proteína sobre dos sustratos diferentes y, sin embargo, que se produzcan distintas respuestas celulares, debido a las distintas conformaciones que puede adoptar la proteína al adsorberse. La conformación de una proteína sobre un sustrato dependerá mayoritariamente de las características físico-químicas del sustrato y, consecuentemente, de las interacciones que pueda tener con la proteína, pero también de la concentración o densidad de proteínas sobre el sustrato. Al adsorberse sobre un sustrato, la proteína puede desnaturalizarse, es decir que se pueden alterar sus estructuras secundarias y terciarias, lo que puede afectar a su actividad biológica. Pero también puede mantener su estructura nativa. En el caso de la fibronectina, como se comentó en el capítulo 3, se mantiene generalmente su actividad biológica cuando se adsorbe sobre superficies hidrofílicas, y disminuye cuando las superficies son hidrofóbicas [Gfe82]; [Jil82]; [Lbs89].

Finalmente, el tercer mecanismo está relacionado con la activación superficial de una proteína debido a la adsorción. El ejemplo más conocido es el caso del fibrinógeno, sobre el que las plaquetas no se adhieren mientras está en circulación en la sangre y, sin embargo, es uno de los principales responsables de la agregación plaquetaria cuando está adsorbido sobre una superficie [Hor96]; [Sru91]. En algunos estudios también se observó una similar activación superficial para la fibronectina, aunque en otros mecanismos biológicos [Mgr05]; [Sbg02]; [Smd93].

5.2.5 Caracterización de la adsorción proteica

Existen muchos métodos distintos para caracterizar el proceso de adsorción proteica sobre una superficie. Los métodos más ampliamente utilizados son (i) el método de electroforesis, que permite separar las proteínas por masa y/o por carga; (ii) los ensayos ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays*), que son ensayos colorimétricos que se basan en conjugar una enzima con un anticuerpo específico de una determinada proteína; (iii) el marcaje fluorescente, que consiste en conjugar un fluorocromo con un anticuerpo específico de una determinada proteína, y de esta manera cuantificar su cantidad por fluorimetría o visualizarla por microscopía; (iv) la elipsometría, que permite determinar la evolución del grosor de la capa de proteína adsorbida en función del tiempo; y (v) el marcaje radioactivo, que se basa en marcar la proteína con un radioisótopo, y cuantificar la cantidad adsorbida mediante una medida de radioactividad. Cada uno de estos métodos tiene ventajas e inconvenientes, y la elección de uno u otro dependerá de la información buscada.

5.3 Adsorción de proteínas sobre TiO_2 y NiTi: estado del arte

Existen muy pocos estudios de adsorción proteica sobre superficies de NiTi. Se comparó la adsorción de fibrinógeno entre superficies de stents de NiTi y de acero inoxidable electropulidos [Tmb02], utilizando un modelo porcino *ex vivo*. De estos estudios, se concluyó que se adsorbe significativamente menos fibrinógeno sobre el NiTi, comparado con el acero inoxidable, y que este resultado está correlacionado con la disminución de la agregación plaquetaria observada sobre los stents de NiTi.

En otros trabajos, se sugirió que era de esperar un enriquecimiento en albúmina de la primera capa de proteínas adsorbida a las superficies de NiTi, en comparación con superficies que no contienen Ni, por la gran afinidad de esta proteína por el Ni [Sha02]. De hecho, la estructura molecular de la albúmina contiene un sitio específico para enlazar Ni, y se demostró que los iones Ni^{2+} añadidos a suero sanguíneo humano se enlazan a la albúmina [Lsa97]. Además, y de

acuerdo con los resultados anteriores, se observó que dentro de una misma categoría de superficie, precisamente electropulidas y atacadas químicamente, la adsorción de albúmina era proporcional a la concentración superficial en Ni [Shw04]. En este estudio, llevado a cabo a partir de una solución al 0,03% y durante 1h a 37°C, se obtuvieron cantidades de albúmina adsorbida sobre aleaciones de NiTi de fase austenítica de entre 30 y 120 ng/cm², dependiendo del tratamiento de superficie.

Por otra parte, se podrían comentar algunos de los estudios relativos a la adsorción de proteínas sobre superficies de TiO₂ y/o sobre aleaciones de Ti que podrían ser de interés para el presente trabajo. Así, la adsorción de fibronectina, sobre Ti6Al4V tratado superficialmente de distintas maneras, depende más de la composición química que de la mojabilidad de las superficies [Mrd04]. Los tratamientos térmicos que se emplearon en estos estudios incrementan ligeramente, en las condiciones del estudio, la adsorción de fibronectina. Además, se encontró una correlación entre el contenido en Al y las propiedades adhesivas de la fibronectina, la fibronectina adsorbida sobre superficies enriquecidas en Al promueve de manera significativa la adhesión de MG63, aún a concentraciones determinadas como no adhesivas, es decir que no estimulan la adhesión celular en comparación con el control. Estos resultados se podrían justificar, de acuerdo con los autores del trabajo, por el incremento de temperatura de superficies de alúmina que favorecería la formación de grupos hidroxilos ácidos, aumentando las cargas negativas superficiales, lo que, a su vez, puede provocar cambios conformacionales dentro de la estructura de la fibronectina [Mrd04].

También se ha estudiado la adsorción de albúmina humana (HSA) sobre superficies de TiO₂ de distintas energías superficiales [Sms04]. La HSA se adsorbe en multicapas sobre estas superficies (60 min de adsorción a 25°C de una solución de 4 mg/ml). Las superficies más hidrofóbicas, con una componente polar de 3,53 mN/m, adsorben una mayor cantidad (40 mg/m²) que las superficies más hidrofílicas (20 mg/m²), con una componente polar de 7,30 mN/m. Se determinó también que la capacidad de la HSA para desorberse de las superficies más hidrofóbicas es mayor comparado con las superficies más hidrofílicas, que contienen una concentración de grupos OH⁻ mayor. En estos estudios, se sugiere que el modo de interacción de la HSA con superficies de metal hidroxilado se hace por enlaces de puente de hidrógeno.

Finalmente, se ha sugerido en varios trabajos [Ell91]; [Ksk97] que las interacciones entre la HSA, con una carga global negativa a pH fisiológico, y las superficies de TiO₂ también cargadas negativamente a este mismo pH, se llevan a cabo mediante cationes divalentes, sobre todo los iones Ca²⁺, que actúan de puente entre las superficies de Ti y la proteína. Sin embargo, en ausencia de estos cationes, la HSA es también capaz de adsorberse sobre las superficies de Ti, con la participación de otro tipo de interacciones no específicas [Ksk97].

5.4 Materiales y métodos

5.4.1 Materiales

Se estudiaron discos de aleaciones de NiTi tratadas por el nuevo tratamiento de oxidación (OT), y no tratadas (NT), pulidos y lavados según las indicaciones detalladas en el apartado 1.5.5. Dos de estas aleaciones son martensíticas, Ale1 y Ale12, y una tercera, Ale27, es austenítica (*tabla 1.2*). También, se incluyeron discos de Ti puro en el estudio, preparados siguiendo el mismo protocolo que para las aleaciones de NiTi. Todos los materiales tienen un área superficial de aproximadamente 1,3 cm². Las áreas superficiales exactas de cada disco se calcularon y tomaron en cuenta en los cálculos finales.

Se usaron un mínimo de tres discos de cada grupo de material en cada ensayo.

Las proteínas utilizadas fueron la fibronectina (Fn) y la albúmina (Alb), tanto radioactiva (marcada con ¹²⁵I) como no radioactiva. Se utilizaron Alb humana (Sigma) y Fn humana (Sigma) en polvo para las proteínas no marcadas. Las soluciones proteicas correspondientes se prepararon diluyendo una cantidad definida de polvo en una solución tampón de *Isotonic Citrate Phosphate Buffered Saline solution* que contiene azida sódica como bactericida (CPBSzI, *tabla 5.1*), previamente desgasificada para evitar la desnaturalización de las proteínas. El citrato contenido en esta solución actúa a la vez de tampón y de quelator de iones Ca²⁺ para inhibir la acción de las proteasas, frecuentemente presentes en soluciones proteicas puras, y que degradan las proteínas. Además el CPBSzI también contiene NaI para evitar la incorporación de ¹²⁵I libre en las superficies de los materiales estudiados.

Tabla 5.1: Composición de la solución tampón CPBSzI utilizada en las disoluciones proteicas y durante los ensayos de adsorción (cantidades para fabricar 1 l).

Producto químico	Cantidad (peso en g)
Cloruro de sodio (NaCl)	6,43
Yoduro de sodio (NaI)	1,50
Ácido cítrico monohidrato (C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O)	2,10
Fosfato de sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄)	1,38
Hidróxido de sodio (NaOH)	1,57 aprox. para pH de 7,4
Azida sódica (NaN ₃)	0,20 (añadir después de tamponar)

La Fn humana marcada con ^{125}I (Fn- ^{125}I) que se empleó era de MP Biomedicals. Es Fn diluida en una solución de 0,1 M de fosfato de potasio que contiene 0,5% de *Bovine Serum Albumin* (BSA). En cuanto a la Alb marcada radioactivamente con ^{125}I (Alb- ^{125}I), se obtuvo siguiendo un protocolo específico detallado a continuación.

Todos los ensayos de adsorción se llevaron a cabo utilizando tubos de microcentrifugación y puntas para pipetear de baja retención (Fisherbrand), para garantizar el control de la concentración de la solución proteica durante los ensayos, evitando la pérdida de proteínas por adsorción en la superficie de los materiales fungibles.

5.4.2 Métodos

5.4.2.1 Radioactividad: generalidades

Un radioisótopo es un isótopo inestable, es decir, que emite materia y/o energía durante una transición hacia una forma más estable. En el caso del $^{125}_{53}\text{I}$, el radioisótopo utilizado en el presente trabajo para marcar las proteínas estudiadas, emite radiaciones gamma de muy baja energía cuando pasa a ser $^{125}_{52}\text{Te}$.

La actividad de un radionúclido, es decir, el número de átomos que se desintegran por unidad de tiempo, se mide en Becquerel (Bq) o en Curie (Ci). 1 Bq es 1 desintegración por segundo (dps), y 1 Ci representa $2,22 \cdot 10^{12}$ desintegraciones por minuto (dpm). La actividad específica de un radionuclido se expresa en dpm/mg.

La actividad A de un radionúclido a un tiempo t (en día) determinado, depende de la actividad original A_0 y de una constante de desintegración radioactiva λ (ecuación 5.1). λ depende del tiempo de vida media $T_{1/2}$ (en día) específico del radionúclido (ecuación 5.2), que corresponde al tiempo necesario para que la actividad original disminuya un 50%.

$$A = A_0 e^{-\lambda t} \quad \text{ecuación 5.1}$$

$$\lambda = \frac{0.693}{T_{1/2}} \quad \text{ecuación 5.2}$$

El ^{125}I tiene un $T_{1/2}$ de 60 días.

Las radiaciones gamma se miden mediante un contador gamma, que percibe un número determinado de desintegraciones por minuto en función de su eficiencia. Los resultados obtenidos se expresan en cuentas por minuto (cpm).

5.4.2.2 Marcaje radioactivo para el estudio de la adsorción proteica

La utilización de la radioactividad es un método cuantitativo extremadamente preciso, pero no aporta ninguna información sobre la conformación de las proteínas adsorbidas.

Uno de los radioisótopos más comúnmente utilizado para marcar proteínas es el ^{125}I , por varias razones. Primero, emite radiaciones gamma que pueden ser detectadas directamente por un contador gamma, al contrario de los emisores beta, como ^{14}C y ^3H , que necesitan una preparación de muestra especial. Y segundo, en contraste con el radioisótopo ^{131}I , el ^{125}I se detecta mucho más eficientemente y además tiene una vida media de 60 días, en comparación con los 8 días del ^{131}I . También, las radiaciones gamma emitidas por ^{125}I son menos penetrantes que las del ^{131}I y, en consecuencia, no se necesita tanto apantallamiento para poder trabajar con él.

Por la alta actividad específica que se puede obtener marcando una proteína con ^{125}I , se pueden detectar cantidades muy pequeñas, imposibles de detectar por otro tipo de técnica.

5.4.2.3 Protocolo de marcaje radioactivo con ^{125}I

El principio de base para marcar proteínas con radioisótopos es utilizar un agente oxidante para transformar $^{125}\text{I}^-$ en una especie reactiva, del tipo $^{125}\text{I}_2$ o $^{125}\text{I}^+$. A continuación, estas especies reactivas se incorporarán a los residuos de tirosina que contiene la proteína. Un marcaje radioactivo eficiente y de buena calidad resulta en una incorporación alta del radioisótopo inicial dentro de las moléculas de proteína (debería incorporarse un promedio de un átomo de ^{125}I por molécula de proteína), sin desnaturalizar ni alterar la proteína [Bai96]. Por esta razón, es importante seguir un protocolo bien establecido para el cual se comprobaron que las condiciones experimentales y, en particular, las condiciones oxidantes, eran adecuadas.

En el presente trabajo, la Alb humana, diluida (10 mg/ml) en una solución tampón de Borato 1X (tabla 5.2), se marcó con ^{125}I (Na^{125}I , Amersham Biosciences, 100 mCi/ml) según la técnica del monoclóruo de yodo (ICI) de MacFarlane [Mac58], modificada por Helmkamp et al. [Hgb60] y Horbett et al. [Hsr85]. Se usó una relación molar de 1:3 entre la solución de ICI y la solución de albúmina.

La incorporación de ^{125}I en la Alb se llevó a cabo a 0°C . Se añadió aproximadamente 1 mCi de ^{125}I en 0,5 ml de solución de borato 2X (tabla 5.2). A continuación, se añadió a esta solución, una mezcla de ICl/NaCl (11,3 μl de ICl en 0,5 ml de 2M NaCl). Finalmente, se añadió a la solución resultante 0,5 ml de la solución de Alb. Se dejó reaccionar durante unos 20 minutos. Después de la reacción, se separaron, por cromatografía de exclusión, las moléculas de ^{125}I no incorporadas de la Alb- ^{125}I , haciendo pasar la solución a través de una columna Econo-Pac® (BioRad).

Se logró de esta manera una incorporación del 87% de la ^{125}I inicial en la solución de Alb, obteniendo una actividad promedia de 8.10^8 cpm/ml. Se conservó la solución de Alb- ^{125}I a -70°C hasta su posterior utilización, en el margen de dos semanas después del día de fabricación.

Tabla 5.2: Composición de las soluciones tampón Borato 1X y 2X utilizadas durante el proceso de marcaje radioactivo de la albúmina (cantidades para fabricar 50 ml).

Producto químico	Cantidad (peso en g)	
	Borato 1X	Borato 2X
NaCl	0,47	0,94
H ₃ BO ₃	0,62	1,24
pH	7,75	8

5.4.2.4 Protocolo de adsorción

Todos los discos metálicos se sonicaron durante 10-15 minutos en sucesivos baños de cloruro de metileno (2 veces), acetona (2 veces) y metanol (2 veces), antes de cada ensayo.

Cada disco fue colocado individualmente en un tubo de microcentrifugación de 2 ml. Se sumergieron los discos en 300 μl de solución tampón CPBSzI desgasificada durante 2 horas. Se cambió la solución por 750 μl de una solución fresca de CPBSzI desgasificada y precalentada a 37°C . Todos los tubos se colocaron en un baño termostático, en el cual se controló la temperatura a 37°C durante todo el ensayo.

Se prepararon las soluciones proteicas de Alb y Fn, para llegar a una concentración equivalente al 1% de la concentración plasmática, es decir unos 0,4 mg/ml y 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente.

Para estudiar la adsorción competitiva entre la Fn y la Alb en función de las superficies, se separaron los discos de materiales en dos grupos. El primer grupo recibió una solución proteica constituida por una mezcla de Fn y Alb- ^{125}I , con una actividad específica aproximada de 30 cpm/ng. En cuanto al segundo grupo, recibió la misma mezcla proteica, pero en este caso con Alb y Fn- ^{125}I , con una actividad específica aproximada de 150 cpm/ng. En ambos casos, las

concentraciones finales de cada proteína correspondían a las concentraciones iniciales de 0,4 mg/ml para la Alb, y 4 µg/ml para la Fn.

En cada caso, se añadieron las correspondientes soluciones proteicas con intervalos de tiempo controlado entre cada tubo, asegurando una mezcla homogénea mediante un pipeteo suave. Se dejaron incubar a 37°C durante dos horas, antes de enjuagar rigurosamente cada disco, respetando el mismo intervalo de tiempo con el que se había empezado el proceso de adsorción. La etapa de enjuague es crucial para tener fiabilidad en los resultados. Para ello, se utilizó un sistema compuesto de un tubo conectado a una reserva de solución tampón CPBSzI, con una válvula pasa/no pasa (*figura 5.3*). Se conectaron a la salida de este tubo, los tubos de microcentrifugación en los cuales estaban los discos de material, y se abrió la válvula durante 3 segundos, repitiendo la operación tres veces. De esta manera, la solución tampón hizo girar los discos en el interior del tubo de microcentrifugación, asegurando un enjuague enérgico. La solución tampón usada en cada pasada se desechó.

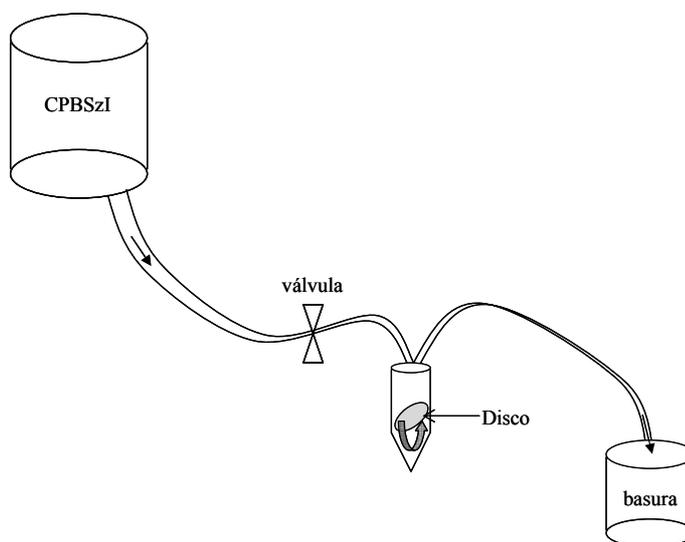


Figura 5.3: Esquema del sistema utilizado para el enjuague después de la adsorción proteica.

Al final del enjuague, todos los discos se colocaron en tubos para contador gamma (Falcon 2052, 5 ml, 12x75 mm) tapados y llenos de solución tampón.

Se determinó la actividad de cada disco mediante una medida de radioactividad con un contador gamma Packard Cobra II (Packard Instrument Company). El ruido del aparato se tomó en cuenta para corregir las medidas de radioactividad obtenidas y calcular las cantidades exactas de cada proteína en ng/cm² para cada grupo de material. El área real de cada muestra, obtenido mediante las medidas de interferometría del capítulo 3, fue el que se tomó en cuenta en estos cálculos.

5.4.2.5 Protocolo de elución

La solubilización de una proteína mediante la formación de complejos entre la proteína y un surfactante es un mecanismo por el cual se puede remover una proteína de una superficie. Los ensayos que consisten en hacer resorber una proteína de una superficie dentro de una solución tampón conteniendo un surfactante, también llamados ensayos de elución, pueden aportar mucha información sobre la fuerza de adhesión de la proteína con el substrato. Son fáciles de realizar y muy económicos. Sin embargo, la explicación clara de los resultados obtenidos no es simple, ya que todavía no son conocidos todos los mecanismos por los cuales un surfactante interacciona con unas proteínas adsorbidas y puede llevar a su desorción parcial.

Muchos factores afectan a la capacidad que tiene una proteína de ser solubilizada por la acción de un surfactante. Entre ellos están la naturaleza y concentración del surfactante, la concentración superficial de la proteína, el tiempo de residencia de la proteína sobre el substrato antes del ensayo de elución, y las condiciones de pH y temperatura durante el ensayo de elución [Rap89]; [Rho90b]. En general, esta capacidad disminuye al aumentar el tiempo de residencia de una proteína [Bho86]; [Ngi00]; [Rho90]; [Sho89], ya que ésta es susceptible de reordenarse estructuralmente con el tiempo, con el fin de sobrepasar las condiciones electrostáticas desfavorables de una superficie repelente, y consecuentemente de ser más fuertemente adsorbida a medida que pasa el tiempo. Este fenómeno, también conocido como relajación, lleva a un incremento de los puntos de contacto por molécula entre la proteína y el substrato.

Sin embargo, no se pueden generalizar el efecto de los otros factores que afectan a la elución, ya que dependen del tipo de proteína y/o de substrato.

Llevando a cabo un ensayo de elución en las mismas condiciones experimentales de naturaleza y concentración de surfactante, pH, temperatura, tiempo de elución y tiempo de adsorción de las proteínas, con distintos tipos de superficies, se pueden sacar conclusiones sobre la fuerza de adhesión de estas proteínas en función del substrato. Las diferencias obtenidas en función del substrato podrían indicar diferencias de conformación de las proteínas [Tcg01].

Un ensayo de elución se llevó a cabo, en el presente trabajo, después de medir la radioactividad de cada disco, excepto de la Ale27 (por problemas técnicos). Para ello, se añadió SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) en la solución tampón, con una concentración de 0,35% (en vol.). Después de 48h, se sacaron los discos de la solución, se enjuagaron y se midió la radioactividad restante. La cantidad de proteínas remanente se calculó tomando en cuenta el “decay” (disminución de la actividad con el tiempo) de ^{125}I .

5.4.2.6 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 $p < 0.05$. En caso de que los resultados obtenidos por el método de multicomparación fuesen al límite de significación, se aplicó el test de t-student sólo entre dos grupos de valores, siempre con un valor de significación $p < 0.05$.

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

5.5 Resultados

5.5.1 Adsorción competitiva

Los resultados obtenidos para la adsorción competitiva entre fibronectina y albúmina muestran claramente que el tratamiento térmico OT favorece, tanto la adsorción de fibronectina como de albúmina, comparado con las superficies de NiTi NT (*figuras 5.4 a y 5.4 b, respectivamente*), con diferencias estadísticamente significativas.

En el caso de la fibronectina, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes superficies de NiTi OT, ni tampoco entre las superficies de NiTi NT (*figura 5.5 a*). En cuanto al Ti, adsorbe significativamente más fibronectina que las superficies de NiTi NT, pero menos que las Ale1 OT sin diferencias estadísticamente significativas con Ale12 OT y Ale27 OT.

En el caso de la albúmina, la adsorción sigue la misma tendencia para el grupo de superficies de NiTi OT y NT, con un incremento gradual $Ale27 < Ale12 < Ale1$ (*figura 5.5 b*), con diferencias estadísticamente significativas entre las superficies OT. Además la Ale1 NT adsorbe más albúmina que las demás superficies NT. El Ti adsorbe más albúmina que todas las demás superficies, excepto las superficies Ale1 OT, con las que no existen diferencias significativas.

La cantidad total de proteínas adsorbidas es mayor en el caso de las superficies de NiTi OT y del Ti, comparado con las superficies de NiTi NT (*tabla 5.3*).

Tabla 5.3: Cantidad total de proteínas adsorbidas después de 2h de adsorción a 37°C, en función de la superficie estudiada.

	Cantidad total de proteínas adsorbidas (ng/cm ²)	
	No tratadas (NT)	Tratadas (OT)
Ale1	83,4	170
Ale12	49	118
Ale27	37,5	88,7
Ti	179,2	-

La cantidad de albúmina adsorbida sobre todas las superficies estudiadas es significativamente mayor a la cantidad de fibronectina adsorbida (*figura 5.6*). Sin embargo, calculando la relación entre la cantidad adsorbida de albúmina respecto a la fibronectina, se observa que en todos los casos, excepto para Ale1 OT, el valor obtenido es inferior a los 100 correspondiente a la relación entre ambas proteínas en la solución proteica inicial (*figura 5.7*). Además, el tratamiento OT disminuye aún más esta relación, comparado con las superficies NT, con diferencias estadísticamente significativas sólo para la Ale1.

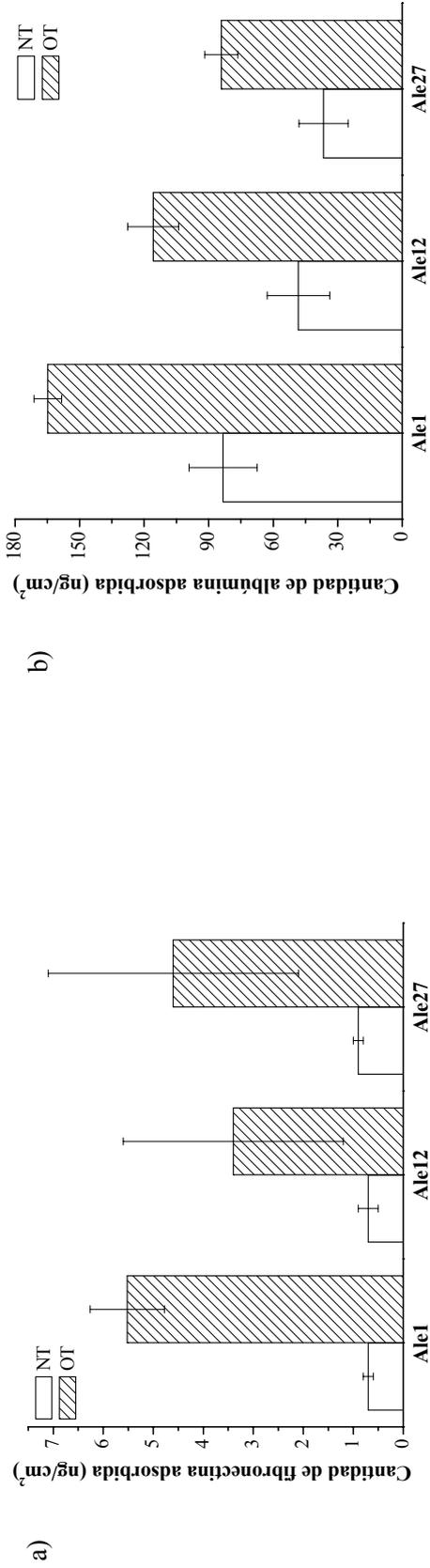


Figura 5.4: a) Influencia del tratamiento OT sobre la adsorción de fibronectina, y b) sobre la adsorción de albúmina, en función de la superficie estudiada. En ambos casos existen diferencias estadísticamente significativas entre las superficies NT y OT. Las aleaciones están ordenadas de menor a mayor contenido en Ni.

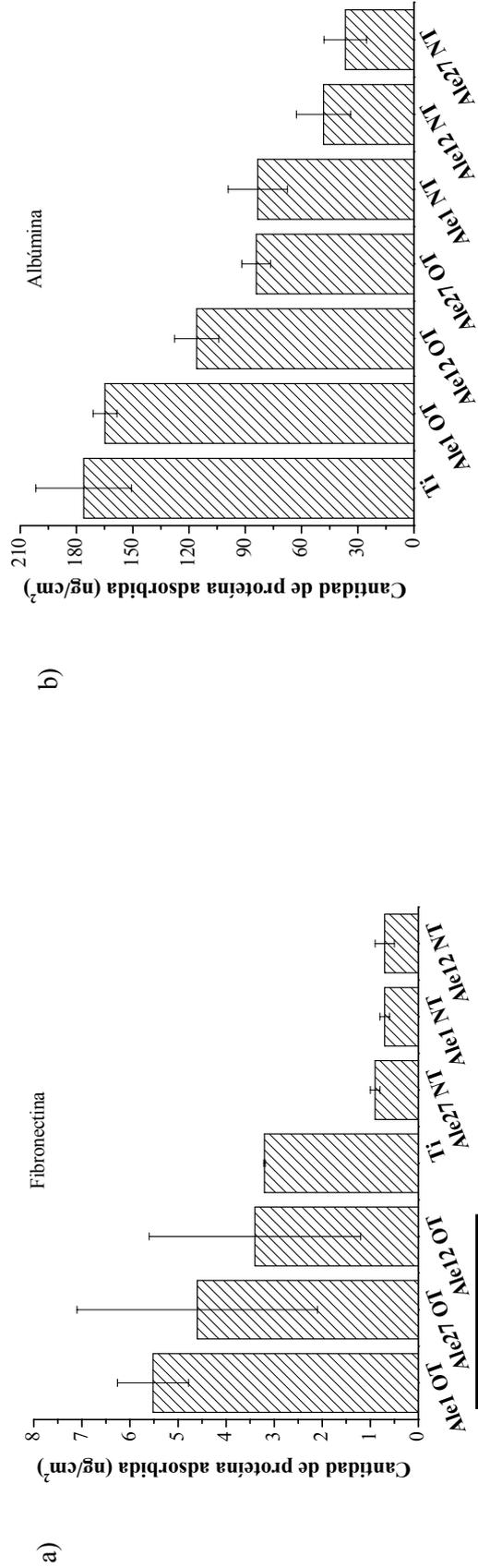


Figura 5.5: Resultados de un ensayo competitivo. Los grupos unidos con una misma barra horizontal no tienen diferencias estadísticamente significativas: a) Cantidad de fibronectina adsorbida. Existen diferencias estadísticamente significativas entre las superficies OT y NT, pero no dentro de un mismo grupo de superficies; b) Cantidad de albúmina adsorbida. Existen diferencias estadísticamente significativas entre las superficies OT y NT, excepto entre Ale27 OT y Ale1 NT, con la tendencia Ale1 > Ale12 > Ale27 en ambos casos.

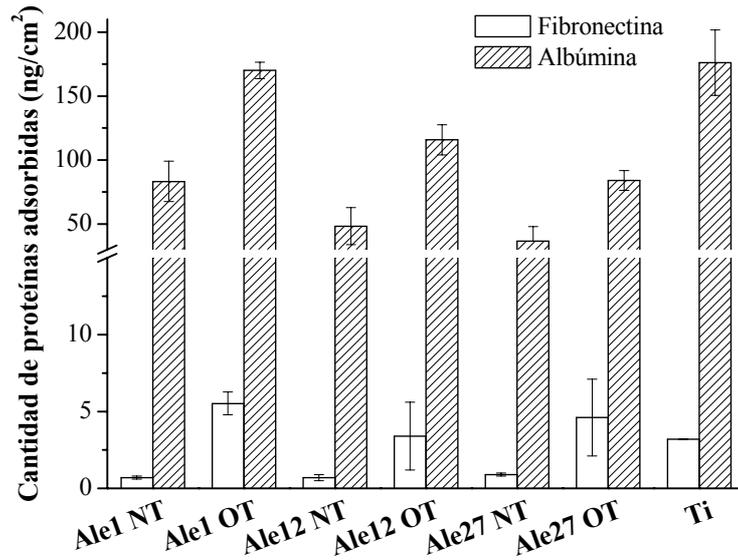


Figura 5.6: Comparación entre la cantidad de albúmina adsorbida y la cantidad de fibronectina adsorbida de forma competitiva sobre las distintas superficies estudiadas. En todos los casos, se adsorbe más albúmina que fibronectina, con diferencias estadísticamente significativas.

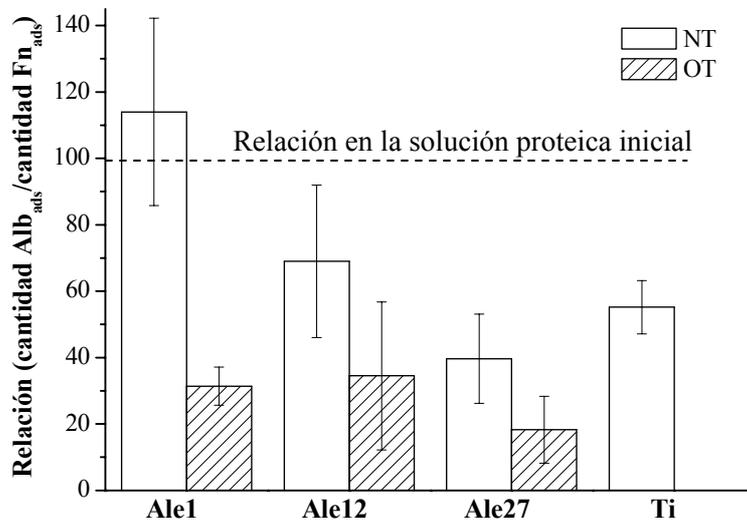


Figura 5.7: Relación entre la cantidad de albúmina adsorbida y la cantidad de fibronectina adsorbida en función de la superficie estudiada, e influencia del tratamiento OT sobre esta relación. La relación entre ambas proteínas Alb_{ads}/Fn_{ads} dentro de la solución inicial es de 100. Solamente se observan diferencias estadísticamente significativas entre las superficies NT y OT en el caso de Ale1.

5.5.2 Ensayo de elución

Los resultados obtenidos del ensayo de elución muestran que la fuerza de adhesión de la fibronectina es mayor en el caso de las superficies de NiTi OT, comparado con las superficies NT y el Ti (figura 5.8).

La composición química de la aleación de NiTi NT parece afectar a la fuerza de adhesión de esta proteína. La fibronectina está adsorbida en la superficie de Ale12 NT con menor fuerza que sobre Ale1 NT. Sin embargo, esta diferencia ya no es visible después del tratamiento OT. La fibronectina está adsorbida sobre el Ti puro con una fuerza intermedia entre la Ale1 NT y Ale12 NT, y menor que las superficies OT.

Sin embargo, todas estas diferencias no son estadísticamente significativas.

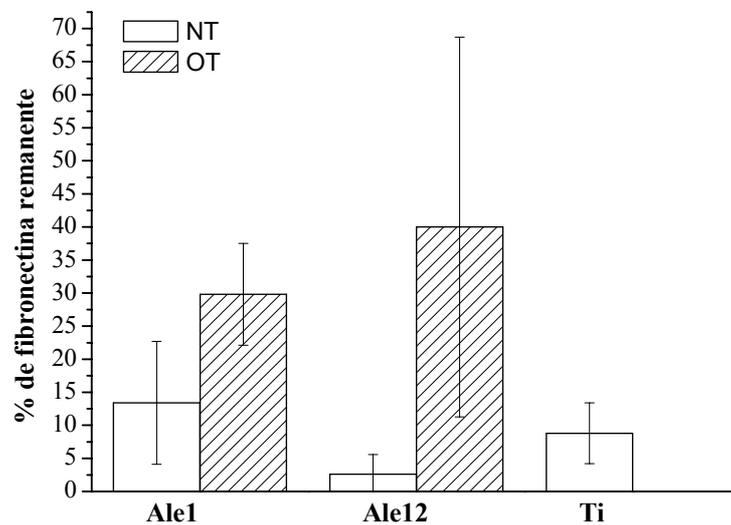


Figura 5.8: Resultados del ensayo de elución, llevado a cabo durante 48h en una solución al 0,35% en vol. de SDS. % de fibronectina remanente sobre las distintas superficies estudiadas, respecto a la cantidad inicial.

En el caso de la albúmina, no parecen afectar ni la composición química, ni el tratamiento de superficie (figura 5.9). Además, esta proteína está adsorbida de manera más débil sobre el Ti puro, en comparación con todas las demás superficies, tanto NT como OT.

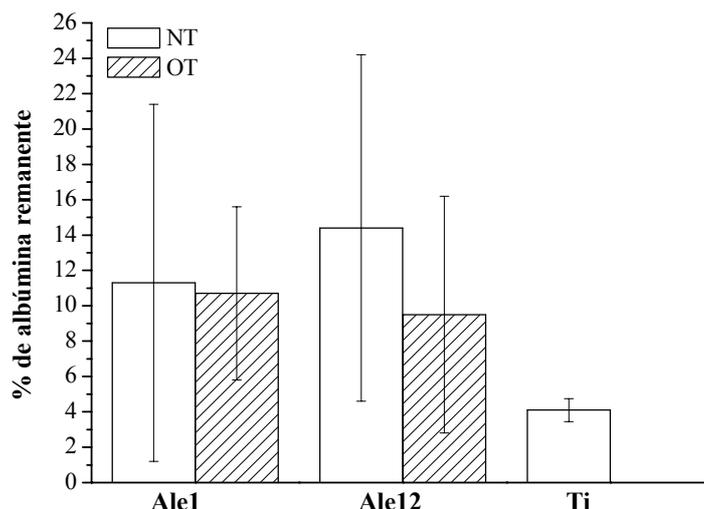


Figura 5.9: Resultados del ensayo de elución, llevado a cabo durante 48h en una solución al 0,35% de SDS. % de albúmina remanente sobre las distintas superficies estudiadas, respecto a la cantidad inicial.

5.6 Discusión

Los resultados obtenidos respecto a la albúmina muestran claramente que la adsorción de esta proteína sobre las distintas superficies estudiadas no es proporcional al contenido en Ni, tal y como se observó con anterioridad [Shw04], y ya se ha comentado anteriormente. Al contrario, los valores obtenidos para las superficies de NiTi NT muestran que la tendencia es inversa, ya que las muestras con mayor contenido en Ni (Ale27>Ale12>Ale1, *tabla 1.4*) son las que menos albúmina adsorben (Ale27<Ale12<Ale1). Además, las aleaciones de NiTi NT también adsorben menos albúmina que las superficies de Ti puro. Sin embargo, las cantidades adsorbidas en el presente trabajo oscilan entre 30 y 180 ng/cm² dependiendo de la superficie, lo cual está de acuerdo con los 30-120 ng/cm² de otros estudios [Shw04].

A pesar de que no se comprobó en este estudio, por falta de material y tiempo, se asume que no hubo lugar ningún tipo de adsorción preferencial de las proteínas marcadas con ¹²⁵I en comparación con las proteínas no radioactivas. La Fn-¹²⁵I es comercial, así que se asume que es de buena calidad, es decir que tiene la misma estructura y reactividad que la proteína nativa. En cuanto a la albúmina, se marcó siguiendo un protocolo preciso definido y utilizado desde hace muchos años en el laboratorio donde se llevaron a cabo los estudios. Por esta razón, también se asume su buena calidad. Además, en otro trabajo [Sms04], se comprobó que no ocurría adsorción preferencial de la Alb-¹²⁵I, comparado con la albúmina no radioactiva, sobre superficies de TiO₂. Por lo que se pueden asumir las mismas condiciones en el presente estudio.

La adsorción de albúmina parece estar más relacionada con la energía superficial, con una excelente correlación de tipo lineal con la componente polar de las superficies (*figura 5.10*). Cuanto mayor es la componente polar de la energía superficial, mayor es la adsorción de albúmina. Este resultado está de acuerdo con un antiguo trabajo de Baszkin et al. [Bly80] que indica una mayor adsorción de albúmina, gammaglobulina y fibrinógeno a medida que la relación entre la componente polar y la componente dispersiva incrementa hacia la unidad. Sin embargo, estos resultados son contradictorios con los resultados de Sousa et al. [Sms04], en el que se observa una mayor adsorción de albúmina cuanto menor es la componente polar. En este estudio, también indican que la adsorción de la albúmina, después de 1h de adsorción, se realiza en multicapas, lo cual podría parecer un resultado cuestionable ya que la formación de multicapas es muy poco habitual, excepto a altas concentraciones proteicas, y también podría reflejar un enjuague insuficiente.

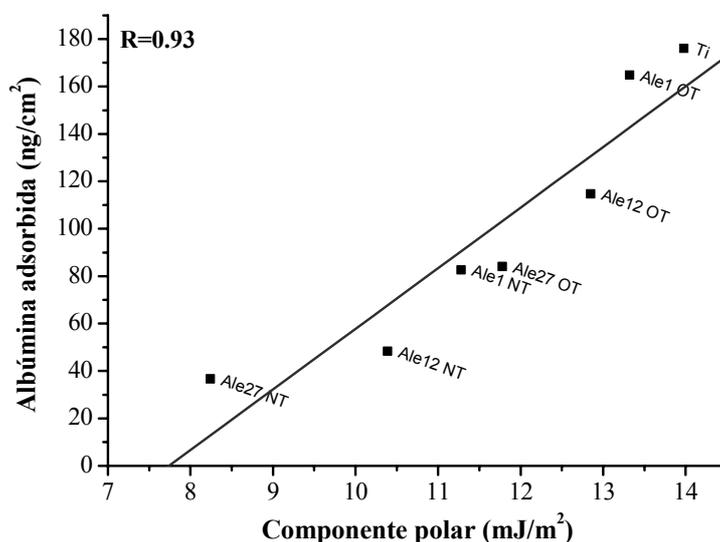


Figura 5.10: Correlación entre la componente polar de las superficies estudiadas y la cantidad de albúmina adsorbida, con un coeficiente de correlación lineal de 0,93.

En el caso de la fibronectina, la correlación entre la adsorción y la energía de superficie no es de carácter lineal, indicando claramente una diferencia entre el grupo de las superficies de NiTi NT, y el grupo de las superficies de NiTi OT y el Ti puro (*figura 5.11*). Esto podría indicar que las interacciones entre las superficies y la fibronectina, también podrían estar afectadas por otro factor, tal como las cargas superficiales y/o la composición química. Scotchford et al. [Sgc02] observaron que la adsorción de fibronectina era mayor sobre superficies cargadas negativamente, menor sobre superficies polares no cargadas y no detectadas sobre superficies no polares hidrofóbicas. En el capítulo 3, se observó una gran similitud entre el potencial zeta de las superficies de NiTi OT y el Ti, que son mucho más cargadas negativamente a pH fisiológico que las superficies de NiTi NT.

Además, MacDonald et al. [Mrd04] sugirieron que un incremento de las cargas negativas superficiales podría afectar la conformación de la fibronectina adsorbida y conferirle una mayor actividad biológica, tal como lo observaron sobre superficies de Ti6Al4V con mayor contenido en Al. Lo cual podría representar un beneficio adicional del tratamiento OT.

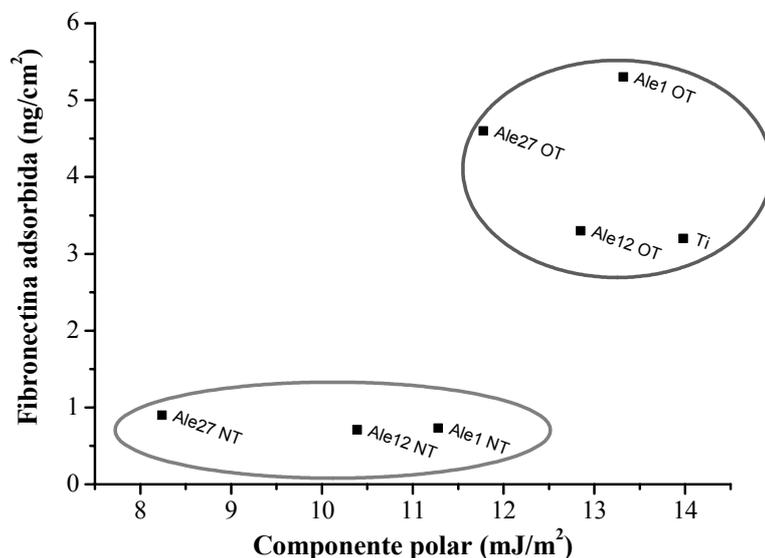


Figura 5.11: Cantidad de fibronectina adsorbida en función de la componente polar de cada tipo de superficie.

Los valores obtenidos para el Ti puro son más cercanos a los valores obtenidos para las superficies de NiTi OT que NT, tanto para la fibronectina como para la albúmina, confirmando que las interacciones entre proteínas y superficies están relacionadas con las características físico-químicas de las superficies y corroborando las conclusiones de los capítulos anteriores según las cuales el tratamiento OT permite obtener un óxido en la superficie de las aleaciones de NiTi muy parecido al óxido nativo del Ti puro. Sin embargo, la comparación de las relaciones entre cantidad de albúmina adsorbida y cantidad de fibronectina adsorbida muestra que el valor obtenido en el caso del Ti es mayor que el que se obtiene para las superficies de NiTi OT, y más parecido a las superficies NT (figura 5.7). En todos los casos, excepto para la Ale1 NT, esta relación es inferior a 100, correspondiente a la relación en la solución proteica inicial, lo cual indica una mayor afinidad de la fibronectina para las superficies comparado con la albúmina.

A pesar de que no se puedan extrapolar estos resultados al caso más complejo de la adsorción proteica a partir de plasma o suero sobre estas mismas superficies, el hecho de que la fibronectina tenga más afinidad para las superficies tratadas por OT, en comparación con las superficies NT, podría ser beneficioso para favorecer y/o mejorar la adhesión celular, puesto que, tal y como se comentó en la introducción, es una de las principales proteínas adhesivas

conocidas. Para esta propiedad, los resultados indicarían también que las superficies de NiTi OT tendrían un comportamiento incluso mejor que el Ti puro.

Los resultados de elución ponen en evidencia que la fibronectina tiene una fuerza de adhesión que depende de la superficie, lo cual podría indicar unas diferencias de conformación en función de las superficies. Esto podría ser en parte debido a que las interacciones entre esta proteína y las superficies estudiadas en el presente trabajo son de distintas naturalezas, pudiendo llevar a interacciones con distintos lugares dentro de la misma molécula de fibronectina en función de la superficie. Lo cual podría, a su vez, estar relacionado con las diferencias físico-químicas de las distintas superficies, y que fueron caracterizadas en el capítulo 3. El tratamiento OT aumenta esta fuerza de adhesión con el sustrato, comparado con las superficies NT y con el Ti. En el caso de la albúmina, no parecen existir diferencias de fuerza de adhesión significativas entre las superficies de NiTi NT y OT, con lo cual se podría decir que esta proteína adopta la misma conformación sobre ambas superficies. La fuerza de adhesión de la albúmina sobre el Ti es menor que sobre las superficies de NiTi. En este caso, podría existir una diferencia de conformación entre los dos tipos de superficie. Esto podría ser debido a que la densidad de proteínas totales adsorbidas sobre las superficies de Ti, mayor que la de las demás superficies (*tabla 5.3*), limita o impide la relajación de las moléculas de albúmina con el tiempo, por falta de espacio. Esto implica que la albúmina mantiene una conformación más “densa”, con pocos puntos de contactos con la superficie.

Varios trabajos relacionaron directamente cambios observados en la respuesta celular con diferencias en la adsorción proteica. Se observó, por ejemplo, que se adsorbe más vitronectina sobre superficies hidrofílicas (oxidadas) de poliestireno, en comparación con superficies sin tratar, lo cual favorece una mejor adhesión celular [Sdj93], y una mejor migración de osteoblastos [Dmg98], en el caso de las superficies hidrofílicas. Otros trabajos observaron un incremento en la adhesión y proliferación, de células de la médula ósea, directamente relacionado con un incremento en la adsorción de fibronectina [Dkl01]. Por todo ello, las diferencias observadas, tanto entre las superficies de NiTi NT y las superficies de NiTi OT, como entre estas superficies y el Ti puro, podrían dejar esperar una respuesta celular distinta en función de las superficies, a pesar de que la composición de la capa proteica adsorbida en el caso real (*in vitro* o *in vivo*) no se pueda extrapolar con estos resultados.

5.7 Conclusiones

- El tratamiento OT afecta a la adsorción proteica, incrementando la cantidad de albúmina y de fibronectina adsorbidas sobre las superficies de NiTi OT, e incrementando la afinidad de estas superficies por la fibronectina, comparado con las superficies NT.

- Las cantidades de albúmina y de fibronectina adsorbidas sobre las superficies de Ti puro son más cercanas a los valores obtenidos para las superficies de NiTi OT, comparado con las superficies de NiTi NT. Sin embargo, la relación entre la cantidad de albúmina adsorbida y la cantidad de fibronectina adsorbida sobre el Ti es más cercana a la relación obtenida en el caso de las superficies NT.

- La albúmina se adsorbe proporcionalmente al valor de la componente polar de la energía superficial de las superficies estudiadas, mientras que en el caso de la fibronectina, otros tipos de factores, tales como las cargas superficiales y/o la composición química, podrían contribuir adicionalmente en los mecanismos de adsorción.

- No existe un patrón claro de fuerza de adsorción de las proteínas estudiadas, excepto que, con respecto a todo el resto de las superficies, la fibronectina se une con mayor fuerza a las superficies NiTi OT. Lo cual podría indicar unas diferencias de conformación de la fibronectina en función de la superficie.

- Estos resultados sugieren que el tratamiento OT afecta a la cantidad y composición de la capa proteica adsorbida, así como probablemente a la conformación de las proteínas adsorbidas. Todo ello permite esperar diferencias en la respuesta celular, derivadas del tratamiento OT.