

Desarrollo de recubrimientos para implantes dentales con sales de Ca y Sr, para optimizar los procesos iniciales de regeneración ósea

Autor: Iñaki García Arnáez
Directoras: Isabel Goñi
Mariló Gurruchaga

Donostia, 2021

A Iزارو...

*“Nie wolno
zostawiać świata
takim, jakim jest”*

*“Es inadmisibile
dejar el mundo tal y
como lo encontramos”*

Janusz Korczak

AGRADECIMIENTOS

Ha llegado el momento. Ese que no imaginaba cuando hace unos años empezaba una nueva historia. Hoy es el mañana del que ayer tenía miedo. Nervios y emoción a partes iguales.

Gracias, Isabel y Mariló, mis directoras de tesis, mis mantangorris. Me disteis esta oportunidad y confiasteis en mí. Hemos pasado mucho tiempo juntos, en la sonrisa y también en la lágrima. Horas de trabajo, esfuerzo, dedicación y maestros de la costura.

A todos los que han pasado por el laboratorio de Biomat. Gracias, Natalia, por no soltarme nunca de la mano durante todo el camino que empezamos juntos. Qué suerte tiene Elene de tenerte. Gracias, Oihana, por estar siempre dispuesta a echarme una mano. Gracias, Ainhoa, porque supiste encender mi luz cuando se había apagado.

A mis compañeros en la distancia, los de la UJI. Gracias, Julio, Fran, Andreia y Nuno. Suena a tópico, pero nada de esto habría sido posible sin vosotros. Queda pendiente una sagardotegi.

A mis compañeras del laboratorio de al lado. Gracias, Lidia, Nora e Itziar. Me habéis hecho sentir uno más del grupo. Lo que el Instron ha unido, que no lo separe nadie.

A mis compis de comedor y pintxo. Gracias, Itxaso, Vane, Borja, Naroa, Ariadna, Diego, Ester, Jakoba, Claudia, Lia, Oriol... Sois tantos los que habéis pasado durante estos años. Cada uno ha dejado algo en mí. Patataaaaaas.

A esas personas que la vida ha puesto a mi lado para llegar a ser lo que soy. Gracias, Álex, por esas charlas, ánimos, diaporamas y la victoria del sol. Gracias, Yanko, por adentrarme en el mundo polimérico. Sois corresponsables de que esté aquí y ahora.

A mi kuadri. Gracias, María, Jon, Leire, Javi, Iñigo y Nando. Es difícil recuperar con palabras todas las emociones que hay detrás de cada paso que hemos dado juntos. Paseos en moto, tardes de playa y concierto, casas rurales, un salvamento piscinítico, y Annabelle. Y es que hay veces que la vida se porta bien y te pone a personas que te hacen sonreír cuando más lo necesitas.

A Unai y Alberto (y a todos los que he conocido gracias a vosotros, Iván, Gonzalo, Raquel, Asier, Tania, Imanol, Eneko, Ekaitz...). Hay personas donde siembras y todo florece. Sois luz. Esa determinada luz que no puedo evitar seguir.

Gracias, Maité, mi klaine. Te convertiste en ese trocito de historia que me gusta contar. Unos tobosines, un fin de año adelantado, traspasar esa línea con una sonrisa y unos risketos. A veces no hace falta nada más.

A Itziar. Gracias por hacerme dar el paso, aunque sonara complicado. Por hacerme usar mi tiempo en cosas que amo. Por hacerme ver que pasarán miles de trenes y podré coger tantos como quiera.

Gracias, Ángel. Por ser de esas personas a las que preguntas si tienen un minuto y no se cuestionan para qué. Sé que la respuesta siempre es sí.

A Yoli. Gracias por pintar de colores el mundo (y la portada) y hacerlo siempre con esa sonrisa perpetua.

Sergio, Javi, gracias por tener disponible mi habitación en vuestra casa. Por hacerme ver que siempre hay una puerta que se abre para dejar atrás los tormentos. Por hacer que el fin del mundo sea un lugar al que volver junto a vosotros.

A mi pequeña de plata. Sin saberlo haces el mundo más bonito, suficiente para querer quedarme digamos que... para siempre. Brindo por esta historia nacida para hacernos volar, y porque le quiten la R a los viernes.

A mis acólitos. Gracias, Antonio y Lola. Estuvisteis a mi lado en la época más dura en la que la enfermedad era la protagonista. Y ahí seguís, como faros erguidos sin importar el oleaje.

A Joseba, Lupe y Jose Mari. Mi otra familia. En los momentos difíciles que la vida me ha brindado, siempre habéis hecho que la sonrisa venciera a la tristeza. Gracias por el lugar que me habéis dado y lo mucho que nos hemos querido (y nos queremos).

A mis incondicionales, mi familia. A Izaro. Nuestra luz de cada día, la que nos hace querer sonreír, la que pinta de colores nuestra historia y hace que nuestros ojos brillen de una manera especial. Solo sé que la sensación que tengo cuando estoy a tu lado no la tengo con nadie ni con nada. Eres ese alguien a quien quiero de mil maneras. A mis hermanas, Yolanda y Nerea. Valientes, apasionadas, curiosas, generosas, honestas, atentas, leales, nobles. La adversidad os ha llevado a forjar un corazón de verdad. Gracias porque si no fuera por el tiempo a vuestro lado, no volaría igual. Algunas veces la vida se escapa en un suspiro. No avisa. No deja dar el último beso ni el último abrazo. Gracias, aita, por ser ese faro que ilumina mi camino desde las estrellas. Y gracias a mi ama, el amor de mi vida. La que me abraza fuerte. La que siempre tiene razón. La que nunca se marcha. La que siempre está. La que me besa mejor que nadie. La que lo da absolutamente todo por mí, aunque duela. A la que quiero más de lo que demuestro. Te quiero, ama.

A todos los que alguna vez me hicieron brillar, aunque las nubes ganaran después. Qué bueno saber que jamás os iréis, aunque ya nunca volváis.

Y a todos los que no aparecen, pero tendrían que aparecer, gracias.

FINANCIACIÓN RECIBIDA

Esta tesis se ha realizado siendo beneficiario del Programa Predoctoral de Formación de Personal Investigador No Doctor del Departamento de Educación del Gobierno Vasco (PRE_2016_1_0141).

Además, este proyecto ha sido financiado a través de:

- Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MAT2017-86043-R y RTC-2017-6147-1).
- Ayudas a los grupos de investigación en la UPV/EHU (GIU-18/189).

Por último, un agradecimiento a la empresa Ilerimplant S.L., por su apoyo a esta investigación.

ÍNDICE

Capítulo 1. Introducción.....	19
1. Estado del arte.....	21
1.1. Tejido óseo y regeneración	30
1.2. Osteointegración.....	33
1.3. Adsorción de proteínas en los biomateriales.....	35
1.4. Factores que controlan la adsorción de proteínas.....	39
1.5. Implicaciones biológicas de la capa de proteínas.....	43
1.6. Caracterización de la capa de proteínas del biomaterial	53
1.7. Modificaciones superficiales en la implantología dental	57
1.8. Recubrimientos híbridos sol-gel.....	62
1.9. Vehículos de liberación de calcio y estroncio	66
1.10. Antecedentes del grupo	71
2. Objetivos.....	72
3. Diseño Experimental.....	73
Referencias.....	75
Capítulo 2. Materiales y técnicas experimentales	95
1. Materiales.....	97
2. Obtención de los recubrimientos	99
2.1. Síntesis por el método sol-gel	99
2.2. Aplicación, secado y curado de los recubrimientos	100
3. Técnicas experimentales	104
3.1. Caracterización morfológica	104
3.2. Adherencia	105
3.3. Caracterización química.....	106

3.4. Determinación del grado de hidrofilia/hidrofobia.....	108
3.5. Ensayo de degradación hidrolítica	109
3.6. Ensayos de liberación.....	110
3.7. Análisis proteómico de las proteínas adsorbidas en la superficie	111
3.8. Caracterización biológica <i>in vitro</i>	113
3.9. Análisis estadístico.....	116
Referencias.....	117
Capítulo 3. Recubrimientos dopados con Sr	121
1. Introducción	123
2. Resultados	125
2.1. Caracterización morfológica	125
2.2. Adherencia	127
2.3. Caracterización química.....	128
2.4. Determinación del grado de hidrofilia/hidrofobia.....	135
2.5. Ensayo de degradación hidrolítica	136
2.6. Ensayos de liberación.....	137
2.7. Análisis proteómico de las proteínas adsorbidas en la superficie	139
2.8. Caracterización biológica <i>in vitro</i>	149
3. Discusión	155
4. Resumen.....	165
Referencias.....	167
Capítulo 4. Recubrimientos dopados con Ca	173
1. Introducción	175
2. Resultados	177
2.1. Caracterización morfológica	177
2.2. Adherencia	179

2.3. Caracterización química.....	180
2.4. Determinación del grado de hidrofilia/hidrofobia.....	185
2.5. Ensayo de degradación hidrolítica	186
2.6. Ensayos de liberación.....	187
2.7. Análisis proteómico de las proteínas adsorbidas en la superficie	189
2.8. Caracterización biológica <i>in vitro</i>	196
3. Discusión	202
4. Resumen.....	210
Referencias.....	212
Capítulo 5. Recubrimientos dopados con Sr y Ca.....	219
1. Introducción	221
2. Resultados.....	223
2.1. Caracterización morfológica	223
2.2. Adherencia	227
2.3. Caracterización química.....	228
2.4. Determinación del grado de hidrofilia/hidrofobia.....	234
2.5. Ensayo de degradación hidrolítica	235
2.6. Ensayos de liberación.....	237
2.7. Análisis proteómico de las proteínas adsorbidas en la superficie	240
2.8. Caracterización biológica <i>in vitro</i>	251
3. Discusión	258
4. Resumen.....	267
Referencias.....	270
Capítulo 6. Evaluación biológica <i>in vivo</i>	277
1. Introducción	279
2. Materiales y métodos	281

2.1. Implantación en tibia.....	281
2.2. Implantación en cóndilo femoral	284
2.3. Estudio histológico.....	286
2.4. Estudio de biocompatibilidad.....	287
2.5. Estudio histomorfométrico.....	289
3. Resultados y discusión.....	289
3.1. Implantación en tibia de conejo	289
3.2. Implantación en cóndilo femoral de conejo	297
Referencias.....	301
Capítulo 7. Conclusiones generales	305
Anexos	311
Anexo 1. Tabla de proteínas (Sr).....	313
Anexo 2. Tabla de proteínas (Ca).....	319
Anexo 3. Tabla de proteínas (Sr + Ca)	323
Anexo 4. Listado de abreviaturas.....	331

Capítulo 1.

Introducción

1. Estado del arte

Según el último informe de Naciones Unidas (Perspectivas de la Población Mundial 2019: aspectos destacados, publicado por la División de Población del Departamento de Asuntos Económicos y Sociales), la población mundial está envejeciendo debido al aumento de la esperanza de vida al nacer y la disminución de los niveles de fecundidad, y a que el número de países que experimentan una reducción en el tamaño de su población está creciendo. En la mayoría de países del mundo se está dando un gran aumento en el número y la proporción de personas mayores. De hecho, a nivel global, la población mayor de 65 años crece a un ritmo más rápido que el resto de segmentos poblacionales. Para 2050, una de cada seis personas en el mundo (16 % de la población) tendrá más de 65 años, en comparación con una de cada once en 2019 (9 %). Se proyecta que la proporción de la población de 65 años y más se duplicará entre 2019 y 2050 en África septentrional y Asia occidental, Asia central y meridional, Asia oriental y sudoriental, y América Latina y el Caribe. Para 2050, una de cada cuatro personas residentes en Europa y América del Norte podría tener una edad de 65 años o superior. En 2018, por primera vez en la historia, las personas de 65 años o más, a nivel mundial, superaron en número a los niños menores de cinco años. Se proyecta que el número de personas de 80 años o más se triplicará, de 143 millones en 2019 a 426 millones en 2050. El envejecimiento de la población está a punto de convertirse en una de las transformaciones sociales más significativas del siglo XXI, con consecuencias para casi todos los sectores de la sociedad¹. Por lo tanto, han de surgir nuevos desafíos como solución a este problema.

En este sentido, una de las prioridades del programa Horizonte 2020 (H2020) ha estado dedicada a los retos de la sociedad y, específicamente, a la salud, cambio demográfico y bienestar. El objetivo principal ha sido abordar los principales problemas de salud pública presentes y emergentes para conseguir el bienestar de todos, a través de la prevención de enfermedades, así como un envejecimiento activo. De esta manera se quiere lograr una población que envejezca con una asistencia médica personalizada y una vida cotidiana activa, bien autónoma o asistida, durante el mayor tiempo posible². También, la nueva estrategia europea, aprobada recientemente para el periodo 2021-2027 -Horizon Europe-

contempla la innovación en salud durante todo el ciclo vital como uno de los pilares fundamentales³.

Como consecuencia, el desarrollo de nuevos medicamentos para combatir enfermedades asociadas al envejecimiento, o nuevos procesos quirúrgicos que sustituyan, refuercen o propicien la regeneración de diferentes partes del cuerpo, son estrategias que se contemplan para el logro de ese objetivo. Asimismo, el desarrollo de biomateriales para mejorar la vida humana, ya sea para el reemplazo de caderas disfuncionales o artríticas, arterias ateroscleróticas y dientes, o para la reparación de tejidos lesionados como el cartílago y la piel, es omnipresente. A medida que la población envejece, existe una creciente necesidad de reemplazar y reparar tejidos blandos y duros como huesos, cartílagos, vasos sanguíneos o incluso órganos enteros. Los biomateriales en la industria, actualmente, tienen un valor de miles de millones de dólares, con una tasa de crecimiento anual del 15 %.

Los biomateriales, sin duda, mejoran la calidad de vida de un número cada vez mayor de personas anualmente. La gama de aplicaciones es amplia e incluye reemplazos de articulaciones y extremidades, arterias y piel artificiales, lentes de contacto y dentaduras postizas. La implementación de estos materiales puede ser por razones médicas que reemplazan los tejidos enfermos y aumentan la esperanza de vida o pueden estar motivados por razones puramente estéticas (por ejemplo, implantes mamarios). La creciente demanda de biomateriales surge del envejecimiento de la población con mayores expectativas con respecto a su calidad de vida. En las últimas décadas, hemos sido testigos del desarrollo de diversos implantes y dispositivos médicos para reemplazar el tejido dañado irreversiblemente. Con el tiempo, la definición de la naturaleza esencial de un biomaterial ha cambiado, siendo un proceso que todavía está en curso^{4,5}.

Así, un biomaterial se puede definir como cualquier material utilizado para fabricar dispositivos con el fin de reemplazar una parte o una función del cuerpo de una manera segura, económica y fisiológicamente aceptable⁶. Aun así, a lo largo de los años, se han propuesto diferentes definiciones para este término. El concepto de biomaterial fue inicialmente entendido como un material diseñado para entrar en contacto con sistemas biológicos y evaluar, tratar, mejorar o reemplazar tejidos, órganos o funciones del cuerpo⁷. Años después, en 2009, D. F. Williams propuso una de las definiciones más

recientes. En su trabajo afirmaba que un biomaterial puede definirse como una sustancia que ha sido diseñada para tomar una forma que, por sí misma o como parte de un sistema complejo, se utiliza para dirigir, mediante el control de las interacciones con componentes de sistemas vivos, el desarrollo de cualquier procedimiento diagnóstico o terapéutico, en medicina humana o veterinaria⁸. Actualmente también se define como un material que está configurado para interactuar con estructuras biológicas para evaluar, aumentar, restaurar o curar tejidos, órganos o funciones alteradas⁹.

El desarrollo de nuevos biomateriales, con un mejor rendimiento, que permitan recuperar o sustituir algunas funciones biológicas, puede mejorar la calidad de vida de las personas, ayudándoles a estar saludables y activas, asegurando su bienestar.

Los materiales utilizados para aplicaciones biomédicas se podrían agrupar en tres tipos principales en función de la respuesta que provocan del tejido. En términos generales, los biomateriales inertes (más estrictamente, casi inertes ya que cada biomaterial e incluso el propio tejido del paciente provocan una respuesta inmune inicial) inducen una respuesta tisular nula o mínima, mientras que los materiales bioactivos fomentan la unión al tejido huésped y mejoran la integración del material estimulando el crecimiento de nuevo tejido. Los materiales biodegradables o biorreabsorbibles se incorporan inicialmente en el tejido circundante para disolverse completamente en el tiempo. Así, durante las décadas de 1960 y 1970 se desarrolló una primera generación de biomateriales para uso rutinario como implantes y dispositivos médicos. Hay muchos ejemplos de dispositivos médicos que han mejorado mucho la calidad de vida de los pacientes, como articulaciones artificiales, implantes dentales, lentes oculares o stents vasculares. Muchos de estos éxitos fueron accidentales y varios de los materiales utilizados fueron diseñados originalmente para otras aplicaciones¹⁰. Los implantes, a menudo, consistían en materiales utilizados para productos básicos que no necesariamente abordaban aspectos relacionados con la biocompatibilidad. Inicialmente, el desarrollo de implantes con un rendimiento mejorado se basaba en ensayos de prueba-error, ya que se sabía muy poco sobre la ciencia de los materiales y las interacciones biológicas. El objetivo de la investigación inicial en biomateriales era lograr una combinación apropiada de propiedades químicas y físicas similares a las del tejido reemplazado con una respuesta mínima de cuerpo extraño en el huésped¹¹. Por lo tanto, dentro de los sistemas metálicos, los implantes simples de carbono y vanadio, que evidenciaron su corrosión, fueron reemplazados por aceros

inoxidables cada vez superiores, y, posteriormente, por aleaciones de cobalto-cromo fuertemente pasivadas. Con respecto a los polímeros, los nylons y los poliésteres fueron sustituidos por materiales con menor probabilidad de degradarse, como el politetrafluoroetileno (PTFE), el polimetilmetacrilato (PMMA), el polietileno (PE) y las siliconas. En la década de 1980 existían más de cien implantes y dispositivos en uso clínico compuestos por unos 30 materiales diferentes¹¹. Una característica común de la mayoría de los biomateriales utilizados entonces fue su actividad biológica limitada, también conocida como "inercia". El principio subyacente de estos biomateriales era reducir la respuesta inmune al mínimo, no causar reacciones a cuerpos extraños y prevenir el rechazo biológico¹². Para muchos implantes, este paradigma sigue siendo válido hoy en día.

Sobre la base de una mejor comprensión de la respuesta a cuerpos extraños, en los años ochenta y noventa, el campo de los biomateriales comenzó a cambiar su énfasis en el uso de materiales principalmente inertes y evolucionó hacia el desarrollo de componentes bioactivos para provocar una respuesta biológica específica en la interacción del material/tejido^{13,14}. A mediados de la década de 1990, los materiales bioactivos habían alcanzado el uso clínico en una variedad de aplicaciones ortopédicas, dentales y cardiovasculares, incluidas diversas composiciones de metales (aleaciones de titanio, etc.) y biocerámicas. En consecuencia, nació el concepto de fijación bioactiva de implantes y el desarrollo de intercaras multifuncionales sofisticadas, aumentando la vida útil de los implantes¹⁴⁻¹⁶. Se había desarrollado, así, la segunda generación de implantes.

Los principales avances en los últimos años desde el punto de vista del conocimiento celular y molecular proporcionaron la base científica para el desarrollo de los biomateriales de tercera generación. Con la introducción de nuevos conceptos en biología molecular y los avances en proteómica, ha ido evolucionando lentamente la comprensión del concepto de biocompatibilidad¹⁷. Todo ello ha afectado significativamente a la forma de síntesis, diseño y uso de biomateriales. Al mismo tiempo, tanto las demandas clínicas como las expectativas de los pacientes han ido creciendo. Por lo tanto, el desarrollo de estrategias de tratamientos de vanguardia que alivien o, al menos, retrasen la necesidad de implantes podría abrir nuevas perspectivas. Esto representa el principal desafío para la comunidad de los biomateriales en el siglo XXI¹⁸. Como resultado, recientemente ha

surgido la cuarta generación de biomateriales, los llamados biomateriales inteligentes o biomiméticos (Figura 1.1).

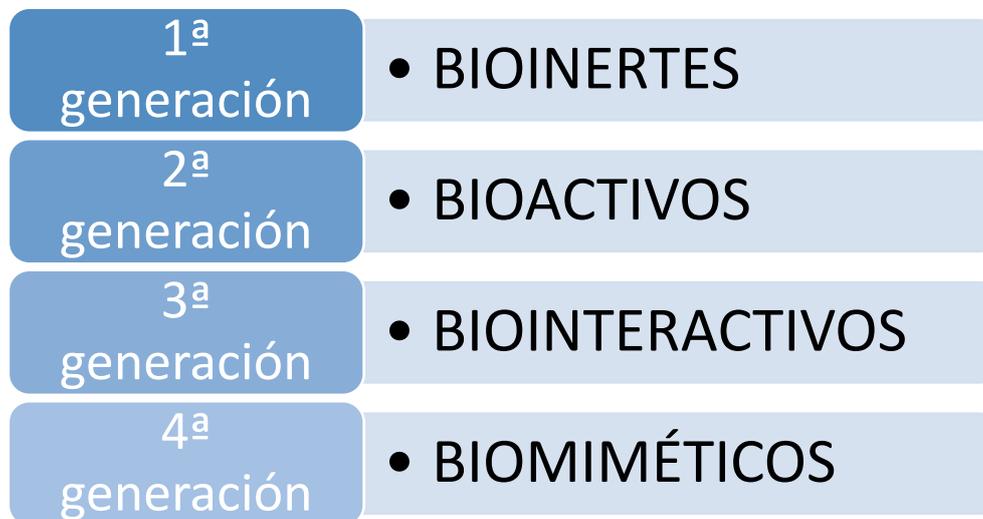


Figura 1.1. Evolución de los biomateriales.

Más de cincuenta años de investigación y desarrollo de nuevos biomateriales han logrado alargar la vida útil de una gran cantidad de dispositivos médicos, implantes y prótesis utilizados actualmente. Sin embargo, la medicina moderna, en general, ha logrado alargar la vida de los pacientes, que en realidad ha aumentado de forma más rápida que la extensión de la vida útil de los numerosos dispositivos médicos, implantes y prótesis. Por lo tanto, en el siglo XXI, un enfoque alternativo para la sustitución de tejidos aborda este desafío y el concepto se define en el campo de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa.

Para satisfacer la necesidad de una reparación a largo plazo y un buen resultado clínico, se necesita un cambio de paradigma de los métodos para reemplazar los tejidos con implantes permanentes a enfoques más biológicos que se centren en la reparación y reconstitución de la estructura y función del tejido¹⁸. Aunque los materiales inteligentes ya se han descrito de muchas maneras¹⁹⁻²³, no existe una definición general admitida para un biomaterial inteligente. Esto abre un nuevo debate en el que habría que preguntarse cuáles son los atributos clave que un material debe exhibir para denominarse inteligente. Las características clásicas de los biomateriales inteligentes se definen por sus efectos instructivos/inductivos o desencadenantes/estimulantes de las células y los tejidos mediante la capacidad de respuesta del material a estímulos internos o externos como el

pH, la temperatura y la fuerza iónica. Se pueden identificar diferentes estrategias de investigación que persiguen el objetivo de mejorar la regeneración de los tejidos: modificación de las propiedades superficiales, desarrollo de geometría tridimensional avanzada e ingeniería de sistemas de administración de fármacos o andamios específicos, que están cargados de factores de crecimiento y/o células. Desde un punto de vista clínico, un material/implante inteligente puede definirse como aquel que participa activamente en la regeneración del tejido dañado y responde y reacciona a los estímulos de su entorno de una manera valiosa²⁴.

Algunos investigadores apuntan a desarrollar biomateriales que tengan la disposición intrínseca de promover activamente la capacidad inherente de curación del cuerpo y su autorreparación^{25,26}. Los biomateriales inteligentes interactivos deben tener la capacidad de imitar la función de la matriz extracelular (ECM) para estimular la invasión celular, la adhesión y la proliferación²⁷.

Las características de la superficie, como la rugosidad, la topografía y la química, desempeñan un papel fundamental en las respuestas celulares específicas, como la adhesión, la migración, la proliferación y la diferenciación de las células progenitoras del tejido conectivo. Como consecuencia, la modificación de la superficie puede ser una tecnología clave para mejorar el rendimiento *in vivo* de los biomateriales. Por lo tanto, el enfoque de la investigación en los biomateriales en el siglo XXI debería ayudar a dilucidar la biología de la interacción de la célula/ECM y la interacción del material/ECM/célula²⁴.

Una de las principales características de los biomateriales es su biocompatibilidad, propiedad cuya definición también ha ido evolucionando. En la década de 1970, este concepto estaba asociado a la toxicología, estableciendo que un biomaterial no debe ser tóxico ni producir ningún daño al sistema biológico⁷. Williams propuso una versión más precisa de este término, definiendo la biocompatibilidad como la capacidad del biomaterial para realizar su función respecto a una terapia médica, sin provocar ningún efecto indeseable en el receptor de esa terapia, pero generando la mejor respuesta celular o tisular para esa situación específica²⁸. Sin embargo, en 2011, B. D. Ratner ofreció una nueva definición, considerando que la biocompatibilidad es la capacidad material para desencadenar y guiar localmente la cicatrización de heridas no fibróticas, así como la reconstrucción y la integración de tejidos²⁹.

Durante los últimos años, los avances tecnológicos han permitido un gran desarrollo y selección de los biomateriales más adecuados con respuestas biológicas específicas para cada aplicación. Concretamente, la investigación de esta tesis doctoral surge por la necesidad existente en el campo dental de mejorar los actuales sistemas de implantes que reemplazan el diente ausente. A pesar de los buenos resultados obtenidos con los implantes de titanio actuales, existe una tasa de fracaso que varía del 3 al 5 % para personas sanas y que alcanza hasta un 10 % para pacientes con factores de riesgo³⁰. Este problema es especialmente relevante en pacientes con mala calidad ósea, ya sea por su edad o por patologías sistémicas que deterioran el metabolismo óseo (osteoporosis, diabetes...). Esto sin tener en cuenta al sector de la población que, debido a problemas normalmente sistémicos, ni tan siquiera se le aplica esta terapia dental. En consecuencia, resulta crucial el desarrollo de implantes bioactivos que favorezcan el proceso de regeneración ósea, disminuyendo así el porcentaje de fallos y favoreciendo la universalización de esta terapia. Teniendo en cuenta que según la Sociedad Española de Periodoncia y Osteointegración (SEPA) las estimaciones más recientes indican que se colocan entre 1.2 y 1.4 millones de implantes dentales en España, los avances tecnológicos en este campo pueden tener un gran impacto en la sociedad³¹.

Así, se realizan grandes esfuerzos en el diseño y desarrollo de nuevos materiales para su aplicación en implantología dental. El desarrollo de estos nuevos biomateriales se basa en un complejo proceso de selección en el que, después de garantizar unas propiedades fisicoquímicas adecuadas, la evaluación biológica establece su eficacia en cada aplicación³².

La evaluación biológica del biomaterial se lleva a cabo a través de estudios *in vitro*, *in vivo* y clínicos. En la norma ISO 10993 se detallan los pasos a seguir para la evaluación biológica de un biomaterial. De esta manera, la experimentación *in vitro* se utiliza como método de detección inicial para caracterizar la biofuncionalidad del material. Esta caracterización tiene como objetivo evaluar la viabilidad celular, la proliferación y la diferenciación de una determinada línea celular a través del contacto directo o indirecto con el material utilizado³³. Después, los materiales con mejor rendimiento *in vitro* son seleccionados para ser ensayados en un modelo *in vivo*, observando así su comportamiento en un sistema biológico real.

Sin embargo, los cultivos celulares son relativamente simples en comparación con la complejidad de un tejido real. Por lo tanto, desafortunadamente, se evidencian problemas de correlación entre los resultados obtenidos en las evaluaciones *in vitro* e *in vivo*³⁴ (Figura 1.2).

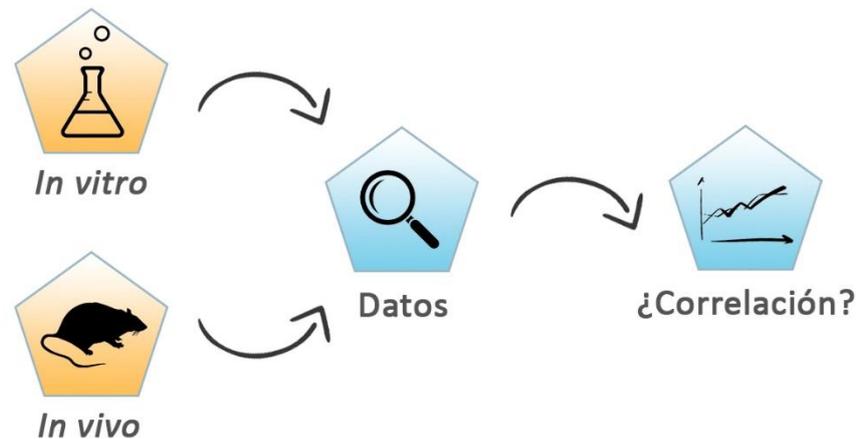


Figura 1.2. Procedimiento para la verificación de la correlación *in vitro*-*in vivo*.

A pesar del enorme esfuerzo que se está realizando para mejorar los implantes dentales y la implementación de una gran cantidad de ensayos asociados con este proceso, existe un número significativo de casos donde los resultados finales son contradictorios. De esta manera, un material que ha demostrado excelentes cualidades *in vitro* puede tener malos resultados *in vivo*. Este problema supone una gran pérdida de tiempo y de recursos económicos. Además, la experimentación animal conlleva problemas éticos en la sociedad, donde se ha detectado una creciente demanda social hacia su reducción o prohibición. De hecho, la directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010, aboga por la reducción del número de animales utilizados recurriendo a otros métodos y aplicando estrategias de experimentación tales como el uso de métodos *in vitro* u otros métodos que puedan reducir y perfeccionar la utilización de animales³⁵.

Este problema se evidencia mejor cuando el tipo de material a analizar está destinado a la regeneración del tejido óseo, debido a la complejidad del sistema como tal. Estas pruebas *in vitro* se centran en la capacidad de formación ósea, olvidando otros aspectos vitales en el proceso que ocurren *in vivo*, como la interacción de las células óseas con las

células asociadas al sistema inmunitario³⁶. Hulsart-Billström evaluó la correlación entre los resultados *in vitro* e *in vivo* en un estudio multicéntrico y comparó los resultados de 93 materiales diferentes, encontrando una correlación sorprendentemente pobre *in vitro-in vivo* del 58 %³⁴. Resultados como estos, evidencian la necesidad de desarrollar nuevas metodologías que permitan evaluar los biomateriales con mayor certeza y, por lo tanto, reducir la necesidad de estudios *in vivo*. Por otro lado, algunos autores también señalan las limitaciones de la experimentación *in vivo* y los problemas que se encontrarían en su correlación posterior con los estudios clínicos. Este hecho refuerza la necesidad de desarrollar nuevas metodologías *in vitro*, que permitan obtener un mayor conocimiento de cómo se comportará un biomaterial cuando se implante en el cuerpo humano³⁷.

A este respecto, se están tomando diferentes medidas para intentar superar las limitaciones de los ensayos *in vitro*. Estas se basan en aumentar la complejidad del diseño de los cultivos celulares *in vitro* existentes y así obtener sistemas que reproduzcan mejor la respuesta biológica del cuerpo humano a un biomaterial. Existen diversas propuestas como el desarrollo de cocultivos, donde una mezcla de dos o más clases diferentes de células se hacen crecer juntas³⁶ o cultivos celulares en 3D^{38,39}.

Este tipo de propuestas alternativas se basan en la realización de caracterizaciones adicionales para obtener mayor información. En este sentido, se está intentando comprender cómo son las interacciones material/proteína/célula, ya que la respuesta del cuerpo a los biomateriales está condicionada, en gran medida, por la adsorción inicial de proteínas^{40,41}. El estudio de las interacciones proteína/biomaterial podría mejorar el conocimiento de las reacciones que se desencadenan tras una implantación, pudiendo tener gran utilidad para el futuro diseño de los biomateriales.

Con el fin de comprender de una manera satisfactoria las complejas interacciones entre los biomateriales en el campo de la regeneración ósea, se hace necesario un gran conocimiento tanto del tejido óseo, como de su regeneración y el papel crucial de proteínas y células en la remodelación de hueso periimplantar. Ello nos ayudará a diseñar los biomateriales bioactivos que pudieran ser más eficaces para inducir la osteointegración de los implantes dentales.

1.1. Tejido óseo y regeneración

El tejido óseo es un tejido conectivo con una organización jerárquica que comprende varios grados de escalas de longitud que van desde macrocomponentes a matrices nanoestructuradas⁴², dispuestas tanto en un patrón compacto (tejido óseo cortical) como en un patrón trabecular (hueso esponjoso). Más concretamente, los huesos maxilares están divididos en dos porciones: la porción basal o cuerpo del maxilar o mandíbula, y el proceso alveolar o hueso alveolar que es el que contiene los alveolos dentarios que alojan las raíces de los dientes. El tejido óseo alveolar también está formado por láminas compactas o corticales y una segunda parte más interna de origen medular o tejido esponjoso, y se encuentra en tabiques alveolares siendo un tejido compuesto por trabéculas, espículas y espacios medulares.

Este tejido está constituido por dos fases, una mineral y una orgánica. La composición híbrida del tejido óseo le confiere propiedades únicas, de manera que al mismo tiempo que muestra una buena resistencia mecánica y flexibilidad, este tejido se caracteriza por su rigidez. El hueso ejerce funciones importantes en el cuerpo, como la locomoción, la protección de los tejidos blandos y el almacenamiento de calcio y fosfato⁴³. La parte inorgánica constituye el 60-70 % de este tejido, y está formada por un conjunto de sales minerales y iones inorgánicos como fosfatos, carbonatos, calcio o magnesio, que se distribuyen en una matriz de nanocristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH}_2)$). Por otro lado, la parte orgánica está formada por fibras de colágeno, principalmente tipo I, así como otros tipos de proteínas como factores de crecimiento, osteocalcina, osteopontina o proteínas morfogenéticas óseas (BMPs). Además, este tejido contiene diferentes tipos de células, como preosteoblastos, osteoblastos y osteocitos, que provienen de la diferenciación de las células mesenquimales y los osteoclastos⁹, que son células polinucleadas derivadas de precursores hematopoyéticos, provenientes de la médula ósea.

El tejido óseo es metabólicamente activo, es decir, continúa remodelándose a lo largo de toda la vida. Esta remodelación incluye la eliminación de hueso mineralizado por los osteoclastos, seguida de la formación de matriz ósea por medio de los osteoblastos, que posteriormente se mineraliza. El ciclo de remodelado consiste en tres fases consecutivas: primero la resorción, durante la cual los osteoclastos digieren el hueso maduro; la reversión, en la que las células mononucleares aparecen en la superficie del hueso; y finalmente, la formación de hueso nuevo a partir del depósito de osteoblastos hasta cubrir

el hueso socavado (Figura 1.3). De esta forma se ajusta la arquitectura ósea a sus necesidades mecánicas y se reparan los pequeños daños que pueda sufrir la matriz ósea^{44,45}.

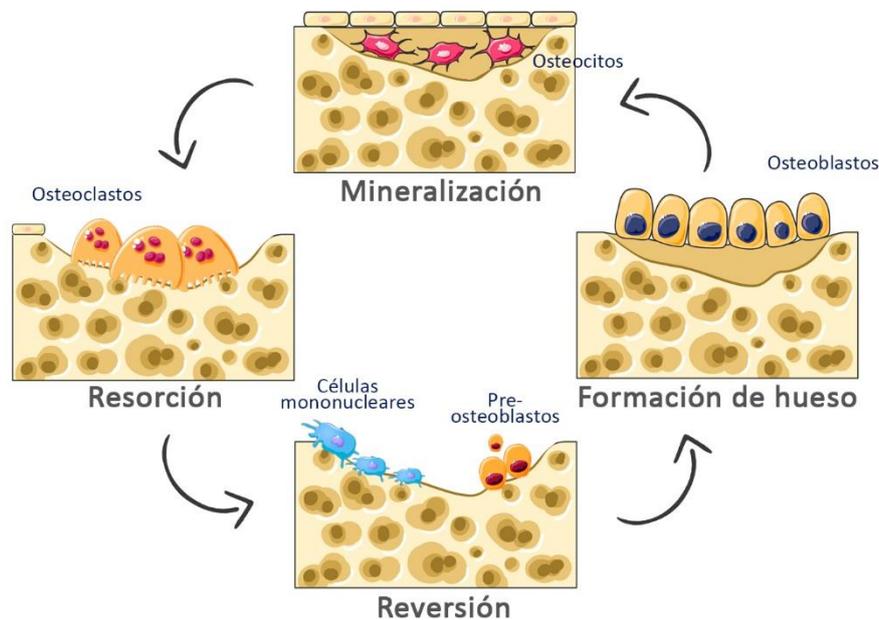


Figura 1.3. Ciclo de remodelado óseo.

Tras un trauma que afecte al hueso, como una fractura o un proceso quirúrgico, como es el caso de la implantología dental, los procesos biológicos de la regeneración ósea interactúan con los de respuesta a la implantación de un cuerpo extraño en un organismo vivo. El proceso de regeneración ósea es, por tanto, un sistema complejo compuesto por una serie de fases que involucran a una gran cantidad de células, moléculas y vías de señalización, que derivan en fenómenos de inflamación, coagulación, inducción ósea y conducción. Todos ellos interactúan entre sí, optimizando el tejido dañado para lograr la regeneración de este⁴⁶.

Estos fenómenos se activan en respuesta a un traumatismo tisular grave, como un defecto óseo derivado de la implantación de un cuerpo extraño en el organismo, sea cual sea el material del que está hecho. Por ejemplo, en el caso de la implantología dental ha existido la percepción de que los implantes dentales de titanio son inertes. Inerte es algo que químicamente tiene poca o ninguna capacidad de reacción. Por lo tanto, los implantes dentales de titanio, con esta definición, se comportarían como inertes cuando se colocan en tejidos vivos (hueso y encía), por lo que se integrarían sin problemas a través de un

proceso de curación normal de heridas. Desde un punto de vista inmunológico y curativo, esto es muy improbable. Los conocimientos básicos en medicina llevan a asumir que cualquier cuerpo extraño será inmediatamente señalado por el sistema inmune, produciéndose una cascada de reacciones en paralelo a una inflamación modulada, formando parte del proceso de reparación de tejidos. Aquí yace el dilema: si los implantes dentales de titanio son considerados química y biológicamente inertes, el proceso de osteointegración se percibe como un mero fenómeno de curación de heridas; si, por otro lado, se acepta que cualquier material que penetre en el cuerpo induce la activación del sistema inmune, la osteointegración también debe ser percibida como un proceso inflamatorio inmunomodulado, influyendo en gran medida en todo el proceso de curación⁴⁷.

Así, la regeneración ósea pasa por tres etapas biológicas superpuestas que siguen patrones específicos y que cambian activamente el comportamiento celular. Estas son la inflamación, la reparación y la remodelación (Figura 1.4)⁴⁸. Es el sangrado resultante de la implantación lo que provocará una cascada de procesos que iniciarán la regeneración del tejido afectado.

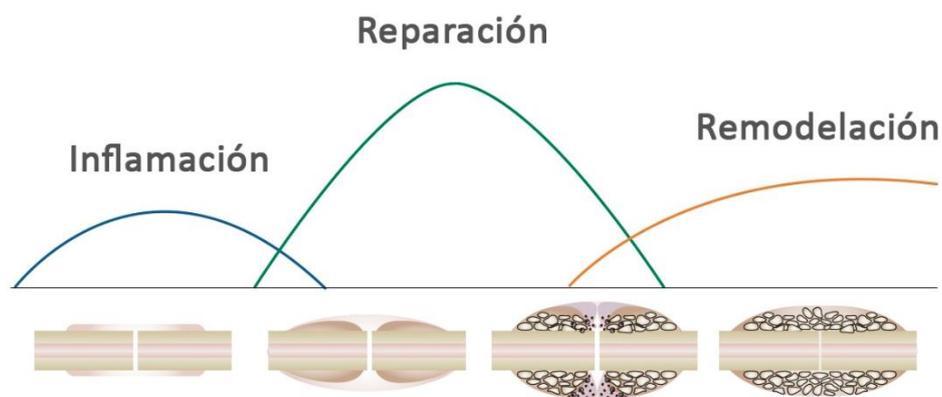


Figura 1.4. Etapas biológicas de la regeneración ósea.

Concretamente, en el caso específico de los procedimientos de implantación dental, la adecuada cicatrización de los tejidos blandos y duros después de la colocación del implante conducirá a la osteointegración⁴⁹.

1.2. Osteointegración

La osteointegración es importante para determinar el éxito de la colocación de un implante dental, ya que da como resultado la conexión estructural y funcional directa entre el hueso vivo, ordenado, y la superficie de un implante sometido a carga funcional⁵⁰. Este concepto ya fue definido por primera vez en 1985 por Brånemark, sin embargo, posteriormente modificó su propia definición, estableciendo que la osteointegración del implante es una coexistencia estructural y funcional, posiblemente de manera simbiótica, entre los tejidos biológicos diferenciados y los componentes sintéticos definidos y controlados que proporcionan funciones clínicas específicas duraderas sin iniciar un mecanismo de rechazo⁵¹. Hoy en día, se podría definir como la conexión firme, estable y duradera entre un implante y el hueso que lo rodea⁵².

Este complejo proceso biológico implica el modelado del hueso primario seguido de su posterior remodelación en hueso maduro, que se logra a través de una comunicación, localmente regulada, entre los osteoclastos (células que reabsorben el hueso) y los osteoblastos (células generadoras de hueso). La comunicación entre osteoclastos y osteoblastos también es importante para mantener la homeostasis ósea. Además, cualquier defecto en el acoplamiento de la resorción y la formación ósea puede conducir a la osteoporosis⁵³.

El proceso de regeneración ósea que sucede alrededor de los implantes es similar al de la cura de una fractura. En ambos casos, se observa la respuesta del sistema inmunitario, el proceso de neovascularización y el reclutamiento de células osteoprogenitoras. Sin embargo, durante la curación de una fractura ósea, estas células se diferencian tanto en condrocitos como en osteoblastos, llevando a cabo una osificación endocondral; mientras que cuando la regeneración ocurre alrededor de un implante, se diferencian únicamente en osteoblastos, dándose una osificación intramembranosa. Esto puede ser debido a la influencia del biomaterial en las respuestas moleculares y celulares⁵⁴.

A continuación, se explicarán las interacciones hueso/implante durante el proceso de curación, siempre partiendo de la premisa de que la intervención quirúrgica se ha realizado correctamente, logrando una adecuada estabilidad mecánica primaria del implante (contacto directo entre el implante y las paredes óseas), que no impide alcanzar un buen nivel de osteointegración⁵⁵.

El éxito de la integración del biomaterial en el entorno de un organismo vivo depende de varios factores, muchos de los cuales forman parte del microambiente generado poco después del momento de la implantación.

La bibliografía contempla ampliamente que cuando se implanta un nuevo biomaterial en el cuerpo, comienzan a ocurrir varias reacciones como: herida, interacción sangre/biomaterial, formación temporal de matriz y tejido granular, reacciones inflamatorias agudas y crónicas, formación de células gigantes de cuerpo extraño (FBGC) y, eventualmente, crecimiento de cápsula fibrosa^{17,56,57}. En los primeros pasos de la implantación, con la adsorción de proteínas en la superficie del biomaterial, comienzan a producirse las interacciones entre la sangre y el biomaterial, seguido de la formación alrededor del biomaterial de una matriz transitoria provisional basada en sangre, que es el trombo^{58,59}. El daño al tejido conectivo vascularizado provoca una inflamación y el desarrollo del trombo a través de la estimulación de los sistemas de coagulación extrínsecos e intrínsecos, el sistema del complemento, el sistema fibrinolítico, el sistema generador de cininas y de las plaquetas^{17,60}. El trombo preliminar se produce mediante la adsorción instantánea de una capa de proteínas sanguíneas en la superficie del biomaterial, lo que provoca, principalmente, que los constituyentes moleculares y celulares comiencen la cicatrización de las heridas y la respuesta a cuerpo extraño^{61,62}. Además, los factores proinflamatorios y bioactivos dentro de esta matriz estimulan fuertemente el inicio y la prevención de los constituyentes, relacionados con el control de las actividades de los macrófagos⁶³. En el siguiente paso de este proceso, las reacciones inflamatorias agudas y crónicas comienzan a sucederse de manera consecutiva, estando condicionadas por el tamaño del daño, el tipo de tejido u órgano dañado y, también, el grado de formación de la matriz provisional¹⁷. Los neutrófilos, como los leucocitos polimorfonucleares (PMN), son responsables de las respuestas inflamatorias agudas^{64,65}. Se ha demostrado que, según el grado de lesión en el sitio implantado, la fase aguda de la inflamación, generalmente, dura menos de una semana. Además, la fase crónica de la inflamación, que no suele durar más de dos semanas, se reconoce por la existencia de células mononucleares como monocitos, células plasmáticas y linfocitos^{17,66}. Durante las respuestas inflamatorias crónicas, además de la presencia de macrófagos, también se observa tejido granular, la infiltración de fibroblastos y la neovascularización⁶⁷. El tejido granular podría considerarse como el precursor de la formación de la cápsula fibrosa y separarse de la superficie del biomaterial a través de los constituyentes celulares de la

respuesta a cuerpo extraño. Se ha aceptado comúnmente que las reacciones inflamatorias en la intercara de un material biocompatible no deberían durar más de tres semanas^{68,69}.

Las propiedades del biomaterial podrían influir en el comportamiento de las células inmunes, condicionando esta reacción inmune. Según se dé el desarrollo de este proceso, la regeneración podría derivar en una formación ósea adecuada o provocar una reacción fibrótica⁷⁰.

Después comienza una fase proliferativa, caracterizada por la formación de la matriz extracelular y la angiogénesis. Al mismo tiempo, el sistema fibrinolítico asegura la degradación del coágulo de fibrina permitiendo la remodelación del tejido.

En la etapa inicial, gran parte del tejido reparador está compuesto de una fase de callo óseo blando derivado de los fibroblastos. La formación de los nuevos vasos sanguíneos permite la llegada de los nutrientes necesarios durante el proceso regenerativo. Las células progenitoras situadas en la periferia del tejido lesionado se unen a las proteínas de la matriz extracelular a través de la integrina. Seguidamente, se diferencian en osteoblastos, comenzando la formación de hueso nuevo con la secreción de una matriz de colágeno. La mineralización durante esta primera etapa es un proceso rápido y desorganizado⁷¹. Este nuevo hueso puede formarse directamente en las paredes óseas, proceso conocido como osteoconducción, o en lugares aislados dentro del área de regeneración (osteoinducción)⁷². Durante la fase de remodelación, este tejido óseo es retirado por los osteoclastos, reemplazándolo por hueso laminar. Este proceso puede durar incluso más de 6 meses⁷³.

1.3. Adsorción de proteínas en los biomateriales

La interacción de la superficie del biomaterial-implante con un sistema biológico determina el éxito o el fracaso del implante en el sujeto. Esta interacción puede ser positiva y promover la integración del biomaterial-implante (interacción directa entre la superficie del biomaterial y el tejido sin mediar tejido fibroso), o bien negativa, dando lugar a una inflamación crónica y aguda, alta producción de macrófagos, y provocar una respuesta denominada reacción a cuerpo extraño, que supone, en la mayor parte de los casos, el fracaso de la implantación. La comprensión de la secuencia de eventos

biológicos que tiene lugar tras la implantación, tales como la coagulación de la sangre, el desarrollo de infecciones, la respuesta inmune al cuerpo extraño, y, finalmente, el rechazo del implante, es crucial para el desarrollo de nuevos biomateriales⁷⁴.

El primer evento tras la introducción de los biomateriales en el huésped es la deposición de una monocapa de proteínas del plasma de la sangre en la superficie del material implantado. Cuando las células se aproximan a un biomaterial implantado, es poco probable que se produzca un contacto directo con su superficie. Más bien, la rápida adsorción de proteínas de la sangre (o suero) traduce la estructura y composición de la superficie extraña a un lenguaje biológico. Es a este lenguaje al que las células responden, contribuyendo de forma clave al resultado final de la implantación. Así, está aceptado que la adsorción de proteínas podría controlar, en gran medida, los primeros sucesos que ocurren en la intercara tejido/biomaterial^{58,75}. Debido a que las células dependen de ciertas proteínas específicas para su anclaje y de las instrucciones extracelulares, la composición de la capa adsorbida de proteínas es un mediador clave del comportamiento celular. De esta manera, si en la capa de proteínas adsorbidas están las proteínas requeridas, y con una conformación adecuada, podrán estimular una respuesta celular constructiva, favoreciendo la reparación de la herida y la integración en el tejido. Sin embargo, si las proteínas están en un estado irreconocible, pueden indicar la presencia de un material extraño para ser eliminado o aislado. Los estudios biológicos han demostrado que las proteínas de la matriz extracelular, debido a su formación no rígida, experimentan cambios conformacionales y de orientación después de la adsorción en la superficie del material⁷⁶. Se ha reconocido que los cambios conformacionales y de orientación de las proteínas tienen una gran influencia en la determinación de los tipos de ligandos accesibles para las comunicaciones con los receptores de la superficie celular⁵⁹. Las características de los biomateriales pueden tener un efecto directo en las respuestas celulares por la influencia de las propiedades superficiales de estos en la conformación y orientación de las proteínas⁷⁷.

La osteointegración, por ejemplo, requiere de un número suficiente de células preosteoblásticas (es decir, células madre mesenquimales), así como su posterior diferenciación y actividad biosintética. Por lo tanto, la osteointegración requiere que las proteínas encontradas por las células puedan apoyar o promover activamente estas actividades, después de la adhesión y la proliferación.

El plasma sanguíneo contiene cientos de proteínas diferentes, que están presentes en distintas concentraciones⁷⁸. Las proteínas son biopolímeros con una gran complejidad estructural y funcional. Esto hace que sea difícil establecer hipótesis simples sobre sus procesos de adsorción⁷⁵. Esta adsorción es un proceso termodinámico que ocurre espontáneamente cuando las soluciones acuosas que contienen proteínas entran en contacto con superficies sólidas. Una vez que el biomaterial entra en contacto con la sangre y los fluidos intersticiales, las moléculas de agua se anclan al biomaterial por medio de enlaces de hidrógeno dándose una hidratación superficial instantánea. En ese momento, las proteínas se difunden en esta nueva intercara creando la capa de proteínas que estimularán la respuesta celular (Figura 1.5). Durante este proceso de formación, se da la expulsión de moléculas de agua y/o proteínas inicialmente adsorbidas, provocando una disminución de su volumen. La expulsión de las moléculas de agua durante el proceso se debe al hecho de que la adsorción de cada proteína está asociada a un desplazamiento de agua, previamente adsorbida, equivalente al volumen de la proteína⁶¹.

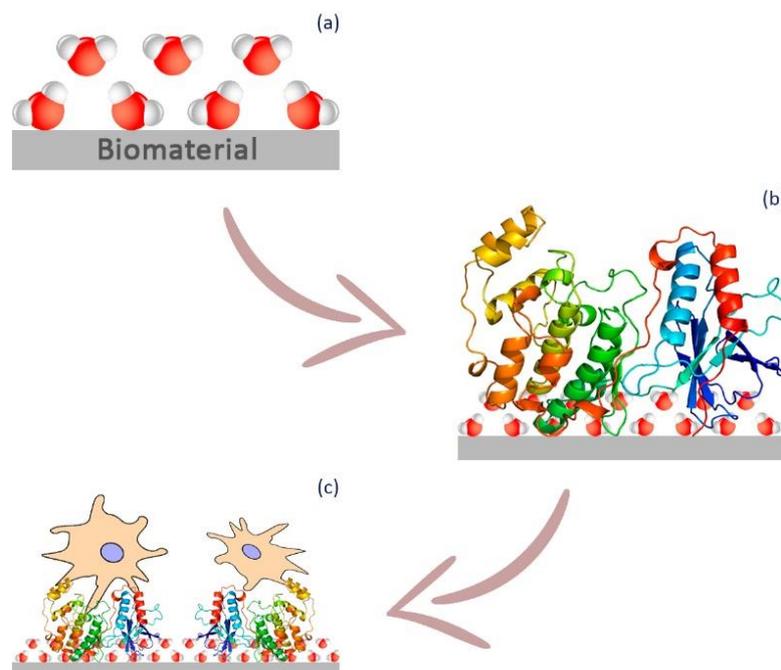


Figura 1.5. Esquema de los sucesos que se dan en la superficie de los biomateriales tras la implantación: (a) formación de la capa de agua, (b) adsorción de proteínas, y (c) adhesión celular.

Por lo tanto, la adsorción de proteínas dependerá de las interacciones superficie/agua/proteína. El desplazamiento de esas moléculas de agua requiere una cierta cantidad de energía que es función de las características químicas y energéticas de la superficie del biomaterial, de manera que, cuanto más hidrófobo sea el material, menor

será la energía necesaria para esta deshidratación⁷⁹. En general, las proteínas tienden a adherirse más fuertemente a sustratos no polares que a polares, a los de alta tensión superficial que a los de baja, y a los que tienen cargas que a los que no. Por estas razones, la afinidad de las proteínas por sustratos hidrófobos es mayor que por los hidrófilos, en la mayoría de los casos⁷⁵.

Por otro lado, en esta primera etapa, la adsorción aumenta con el tiempo y la concentración de proteínas, hasta alcanzar la cobertura de la superficie. Por lo tanto, la tasa de adsorción disminuye a medida que hay menos posiciones de unión disponibles, siendo este proceso cada vez más dependiente de la afinidad entre la proteína y el biomaterial⁸⁰.

Además, la composición de la capa proteínica podría variar con el tiempo como consecuencia de un desplazamiento competitivo, llamado "efecto Vroman"⁸¹ (Figura 1.6). Este efecto describe la naturaleza competitiva de las proteínas adsorbidas en una superficie determinada en función del peso molecular de las mismas⁸². Estas proteínas, en el momento de la implantación, provienen principalmente del plasma sanguíneo, uno de los primeros fluidos en contacto con la superficie del implante⁸³. Las proteínas con el mayor número de posiciones de anclaje tienen un mayor potencial de adsorción en la superficie del biomaterial. Sin embargo, en mezclas complejas de proteínas, como en este caso, las proteínas de menor tamaño y con mayor concentración tienen una mayor velocidad de difusión y, por lo tanto, alcanzan primero la superficie del biomaterial. Después, por causa del efecto Vroman, son desplazadas por proteínas de mayor peso molecular con mayor afinidad⁸⁴. Este efecto es una pieza más del complejo entramado de procesos que explican el comportamiento de las proteínas en contacto con intercaras sólidas⁷⁵. Por tanto, no es sencillo proponer modelos de mecanismos ni explicar este proceso competitivo en la intercara del biomaterial ya que existen multitud de procesos simultáneos en términos de adsorción, desorción, difusión o cambios conformacionales⁸⁵.

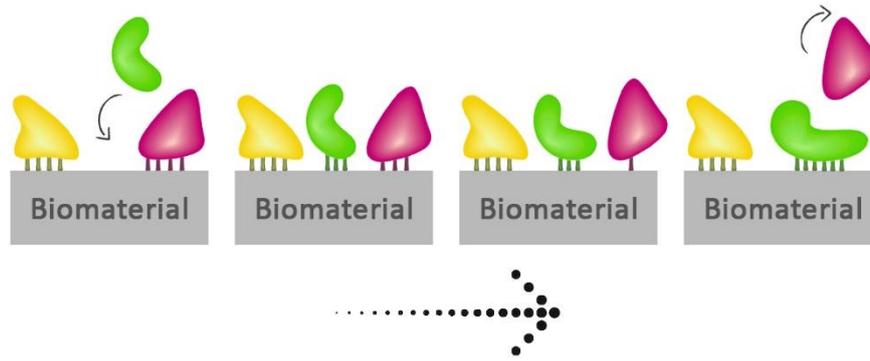


Figura 1.6. Esquema del efecto Vroman.

1.4. Factores que controlan la adsorción de proteínas

Diversos estudios establecen que la adsorción de proteínas está favorecida tanto termodinámicamente como por las características de polaridad y solubilidad de las proteínas. Son las tres principales fuerzas impulsoras que juegan un papel importante en la adsorción de las proteínas en las superficies de los biomateriales y, posteriormente, en las interacciones celulares⁸⁶. El impulso termodinámico para la adsorción de proteínas en la superficie de un biomaterial vendría dado por las adecuadas variaciones de entalpía y entropía para que el cambio de energía libre para ello sea negativo⁷⁷. El carácter ambivalente polar/no polar de las proteínas, determinado por sus aminoácidos y su carga, afectará a las interacciones de las proteínas y, por lo tanto, a su adsorción^{87,88}. Además, la adsorción de proteínas tiene una relación inversa a su solubilidad, es decir, a menor solubilidad de la proteína mayor probabilidad de adsorción⁸⁶.

De cualquier forma, la formación de la capa de proteínas depende de múltiples factores asociados a la solución de proteínas -como puede ser el plasma-, a las propiedades de la superficie del biomaterial y a las características de las proteínas. Por lo tanto, las condiciones en las que se lleva a cabo el proceso de adsorción influirán en la conformación de dicha capa.

Los principales factores externos referidos a la solución de proteínas son la temperatura, el pH y la fuerza iónica. La temperatura puede afectar tanto a la cinética de adsorción de las proteínas como a su equilibrio final. Una temperatura más alta induce a una difusión de proteínas más rápida y, por lo tanto, a mayores tasas de adsorción. Así que, un aumento

de la temperatura podría suponer una mayor cantidad de proteínas adsorbidas en la superficie del biomaterial⁸⁹. El pH establece la carga de la proteína dependiendo de su punto isoeléctrico (PI). Para un pH igual al PI, la proteína muestra un estado neutro ya que las cargas positivas y negativas están equilibradas. Cuando el pH disminuye o aumenta con respecto al PI, las proteínas tienen carga positiva o negativa, respectivamente. No hay que olvidar la importancia de las interacciones proteína/proteína, que no solo influyen en la adsorción sino también en su empaquetamiento. Por tanto, en función del pH, las fuerzas electrostáticas podrían afectar a la densidad de empaquetamiento de la capa final, siendo la masa total adsorbida generalmente la máxima en el punto isoeléctrico. Por otro lado, la fuerza iónica del entorno influye en este proceso de adsorción de forma que las repulsiones electrostáticas entre proteínas de igual carga pueden quedar apantalladas por efecto de los iones disueltos, permitiendo conformaciones de mayor densidad de empaquetamiento. Como consecuencia, la adsorción de proteínas cargadas en sustratos con carga opuesta se ve obstaculizada, mientras que la adsorción en sustratos con carga similar se ve favorecida⁷⁵.

Lógicamente, el tamaño, la carga o la estructura de las proteínas también influyen en este proceso. Se ha observado que las moléculas mayores, debido a su mayor área superficial, se comunican mejor en la intercara⁷⁷. Por ejemplo, Dee *et al.* observaron que la albúmina (67 kDa) interactuó con superficies de sílice en 77 sitios; sin embargo, el fibrinógeno (340 kDa) lo hizo en 703 sitios⁸⁶. Además, las cargas y su distribución en la superficie de la proteína, que se determina principalmente por la hidrofilia de los aminoácidos, pueden afectar significativamente a la adsorción de proteínas⁹⁰. Aparte de la carga y el tamaño de la proteína, el PI de las proteínas puede desempeñar un papel clave en su adsorción, ya que cerca de su PI, generalmente, exhiben más actividad superficial⁹¹. Asimismo, algunos estudios han demostrado que, al cambiar la conformación de la proteína, otros aminoácidos podrían presentarse en la superficie de la proteína, lo que alteraría posteriormente el comportamiento de las proteínas adsorbidas⁹². Igualmente, el desplegamiento de las proteínas, que es la posibilidad de generar más áreas para la interacción entre las proteínas y la superficie del biomaterial, es otro parámetro importante en el mecanismo de adsorción⁸⁶. Se ha demostrado que el desplegamiento de las proteínas tiene una relación inversa con la estabilidad de las proteínas, en otras palabras, las proteínas menos estables se despliegan más rápido^{93,94}. Generalmente, los aminoácidos hidrófilos polares y cargados se colocan en la capa externa de la proteína y los residuos hidrófobos en la

interna. Sin embargo, algunos residuos hidrófobos también podrían presentarse en la capa externa, en particular durante el proceso de desplegamiento⁸⁶. Del mismo modo, la accesibilidad de las proteínas para interactuar con la superficie es otro factor que debe tenerse en cuenta⁹⁵. Se ha establecido que, en general, las proteínas se adsorben en la superficie de los biomateriales a través de cuatro mecanismos de transporte principales, siendo estos la difusión, la convección térmica, el flujo y el transporte acoplado⁹⁶. Además, debido a la heterogeneidad tanto de la proteína como de la superficie, las proteínas podrían presentarse en la superficie de los biomateriales en varias formas de orientación, lo que les permite disminuir las interacciones repulsivas con las biomoléculas unidas anteriormente. Las diferentes orientaciones de las proteínas también tienen cierta importancia funcional⁹⁷. Por ejemplo, durante la adsorción de una proteína a la superficie del biomaterial, dependiendo de la orientación de la proteína, el sitio activo, que es esencial para la actividad catalítica de la proteína, podría ser inalcanzable⁸⁶. Tan pronto como las proteínas se acercan a la superficie de los biomateriales, las más propicias comienzan a conectarse con la superficie a través de fuerzas intermoleculares que incluyen enlaces iónicos, interacciones hidrófobas e interacciones de transferencia de carga⁹⁸. Sin embargo, debido al hecho de que, además de los aminoácidos, el agua también tiende a formar enlaces de hidrógeno en la superficie de los biomateriales, los enlaces de hidrógeno de estos podrían no tener un papel clave en este fenómeno⁸⁶. En general, determinar con precisión qué fuerzas intermoleculares controlan la interacción proteína/superficie depende, en gran medida, de la proteína específica, así como de las propiedades físicas, mecánicas y químicas de la superficie del biomaterial. Además, debido a los limitados sitios de unión en la superficie del biomaterial, existe una alta competencia entre las biomoléculas que se acercan a la superficie para la adsorción⁹⁰.

En función de las proteínas que constituyan la capa, las interacciones proteína/proteína y proteína/material podrían mostrar distintas afinidades, generando un empaquetamiento, orientación y contenido en agua diferente⁷⁵. El tipo, la conformación y la cantidad de estas proteínas no solo depende del organismo en el que se implanta el material, sino también de las características superficiales de dicho material. Por lo tanto, las propiedades químicas de la superficie, la humectabilidad y la rugosidad (Figura 1.7), entre otras, serán muy importantes en este aspecto.



Figura 1.7. Propiedades de los biomateriales que afectan a la adsorción de proteínas.

Tal y como se ha comentado en el apartado anterior, la humectabilidad de la superficie es un parámetro muy importante, que determina la cinética de adsorción y la cantidad de proteínas unidas al biomaterial⁹⁹. En la bibliografía hay consenso sobre una adsorción preferencial (a excepción de las glucoproteínas) en sustratos hidrófobos en comparación con los hidrófilos¹⁰⁰. Este fenómeno se explica considerando que las superficies altamente hidrófilas crean enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua en los primeros pasos de la interacción superficie/líquido (hidratación) y que las proteínas, para ser adsorbidas en la superficie, deben desplazar a las moléculas de agua, con cierto consumo de energía. Esto dificulta la interacción proteína/biomaterial, lo que podría aumentar la desorción de las proteínas. Así, la cantidad de proteínas será mayor, generalmente, en las superficies hidrófobas y menor en las hidrófilas¹⁰¹.

Por otro lado, la adsorción de proteínas en materiales cargados en la superficie puede ser inducida por la interacción electrostática entre la superficie y la proteína¹⁰². Se ha observado que la adsorción más baja de proteínas en la superficie la presentan superficies con alta humectabilidad y con carga superficial muy baja (sílice), mientras que para obtener una adsorción muy alta de proteínas se requiere una baja humectabilidad y una carga superficial moderada (alúmina). Además, debe considerarse que las proteínas pueden asumir diferentes configuraciones tras la adsorción en las distintas superficies¹⁰⁰.

La topografía es otro de los factores que influyen en cómo la proteína interactúa con la superficie del biomaterial, controlando la adsorción total de proteínas, la relación entre ellas, la distribución espacial, la conformación y la afinidad de la unión a la superficie¹⁰³. Como las proteínas tienen un tamaño nanométrico, la rugosidad a nivel nano, afectará más a la adsorción de proteínas que la rugosidad a nivel micro. Así, factores morfológicos como la rugosidad, la geometría o la porosidad del material a nivel nano condicionan la conformación y la composición de la primera capa⁸⁴. Se ha comprobado que la

nanotopografía de la superficie influye en la cantidad de proteínas unidas. Así, Eriksson *et al.*¹⁰⁴ observaron que la modificación de la topografía de la superficie a nanoescala tiene un papel fundamental en la regulación del comportamiento celular y en la mejora de la osteointegración. Los resultados presentados por Popat *et al.*¹⁰⁵ mostraron que las superficies de titanio nanotubular tienen un aumento del 40 % en el número de células en comparación con las superficies de titanio planas. Oh *et al.*¹⁰⁶ estudiaron los efectos de los nanotubos de TiO₂ sobre el comportamiento de los osteoblastos *in vitro* y descubrieron que la superficie modificada a nanoescala acelera significativamente la adhesión de los osteoblastos. Varios autores encontraron resultados similares, por ejemplo, en los trabajos de Bjursten *et al.*¹⁰⁷ y Brammer *et al.*¹⁰⁸. Por lo tanto, es evidente que la modificación de la superficie en el rango de la nanoescala mejora, significativamente, la adsorción de proteínas, la adhesión de las células osteoblásticas y, por lo tanto, la tasa de osteointegración¹⁰⁹. Estos resultados sugieren que las interacciones hueso/implante a nivel de nanoescala guiarán a la próxima generación de materiales de implantes para inducir una rápida cicatrización ósea^{110,111}.

Además de la topografía, la composición química de la superficie desempeña un papel importante en la absorción de proteínas en la superficie del implante, así como en la adhesión celular¹¹². Igualmente, la geometría de la superficie podría mostrar efectos importantes sobre la orientación de la proteína, lo que establece qué parte de la proteína interactúa con el material y qué parte está expuesta al medio¹¹³.

1.5. Implicaciones biológicas de la capa de proteínas

Una respuesta biológica adecuada a los materiales implantados es esencial para la regeneración e integración de los tejidos. Como se ha expuesto anteriormente, las características de la superficie podrían determinar la unión de las proteínas a los biomateriales, siendo este proceso lo primero que sucede tras la implantación. Por lo tanto, las células no interactuarían directamente con la superficie del material, sino que lo harían con la capa de proteínas adsorbidas en ella¹¹⁴. Esto se puede comprobar en el estudio que realizaron Lim *et al.*¹¹⁵ donde evidenciaron que la adhesión celular no se veía afectada por la nanotopografía en ausencia de suero. Por lo tanto, las células responden a las proteínas adsorbidas y no a la superficie del material⁸⁴. Consecuentemente, las

proteínas unidas al biomaterial tienen un papel fundamental en los eventos posteriores necesarios para la reparación del tejido.

Por lo tanto, se puede afirmar que el éxito de la osteointegración del implante requiere un desarrollo adecuado de los procesos de respuesta inmune, coagulación, fibrinólisis, angiogénesis y osteogénesis (Figura 1.8); y que, dependiendo de la composición de la capa de proteínas, estos fenómenos podrán ser, o no, estimulados positivamente. Es decir, bien se favorecerá la regeneración del tejido o bien, por el contrario, se podrá desarrollar una indeseada cápsula fibrosa u ocurrir un rechazo del material como tal.

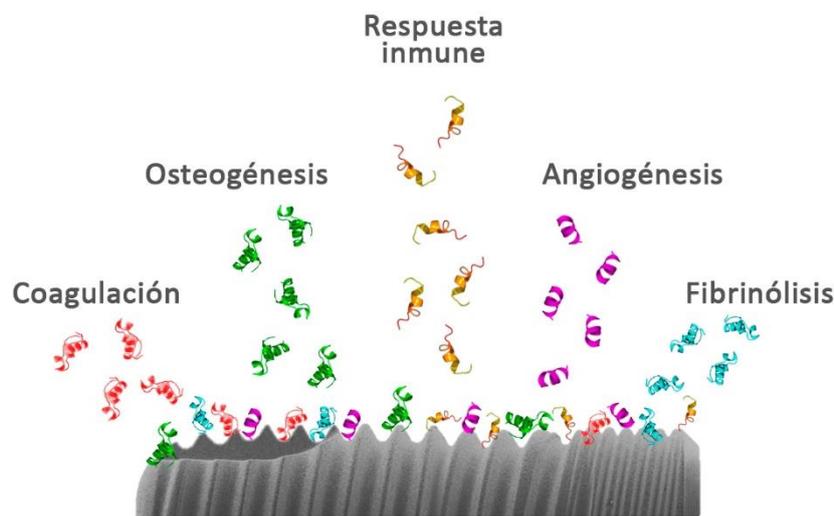


Figura 1.8. Procesos involucrados en la osteointegración.

En los siguientes puntos, se estudiarán con mayor profundidad las proteínas más importantes involucradas en dichos procesos.

1.5.1. Respuesta inmune: sistema del complemento

Esta fase está impulsada principalmente por las proteínas del complemento que desencadenan mecanismos de inmunidad innata y adquirida. El complemento está compuesto por una serie de proteínas sintetizadas en el hígado y en las superficies celulares en forma inactiva, también llamadas zimógenos¹¹⁶. Sigue una secuencia coordinada de sucesos e interacciones entre estos con el objetivo final de reconocer y opsonizar el patógeno, lo que lleva a su lisis y desencadena la respuesta inflamatoria. Dependiendo del tipo y la cantidad de proteínas involucradas, así como del tipo de reconocimiento de la superficie del patógeno, el sistema del complemento puede actuar

por distintas vías que derivan en la generación de C3-convertasas¹¹⁷. Cada una de las tres vías (la clásica, la alternativa y la de las lectinas) actúa en función del reconocimiento de las distintas moléculas de señalización.

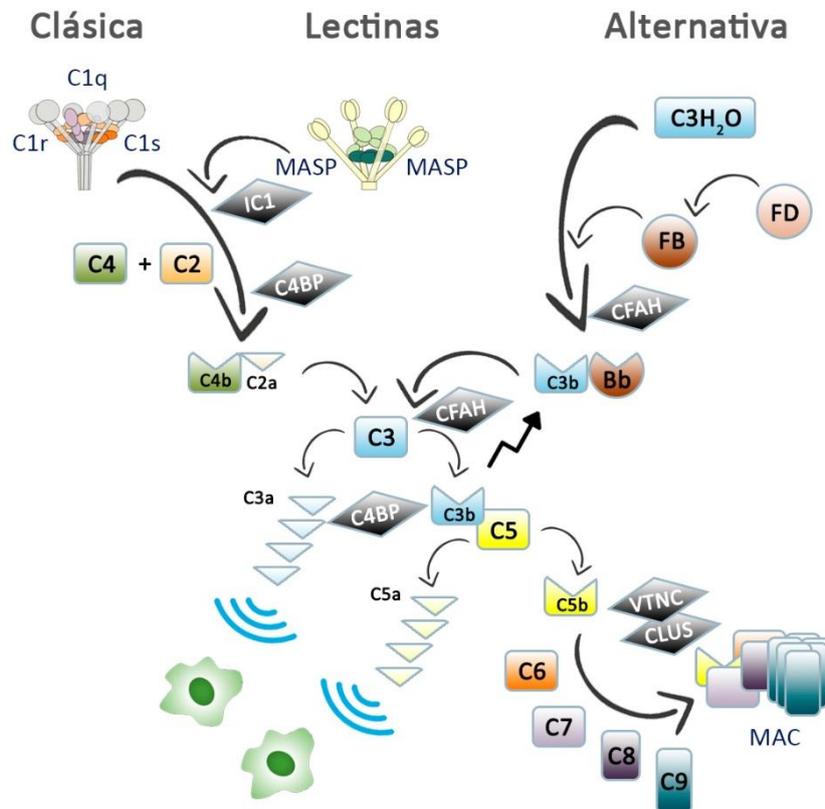


Figura 1.9. Vías de activación del sistema del complemento.
Las rombos simbolizan las proteínas inhibidoras y sus posibles sitios de acción.

Como se observa en la Figura 1.9:

(1) Las vías clásica y de lectinas se activan en una superficie objetivo (patógenos o células huésped estresadas/moribundas) después de un proceso de reconocimiento. La vía alternativa está basalmente permanentemente activa debido a la activación espontánea del componente central del complemento C3.

(2) Las tres vías convergen a nivel de escisión de C3 y generación de fragmentos de C3b, opsonizando las superficies objetivo.

(3) Se generan dos anafilatoxinas durante la activación del complemento, C3a y C5a, que tienen una potente actividad proinflamatoria.

(4) La vía terminal común continúa hasta la formación del complejo de ataque de membrana, que es capaz de activar las células huésped y lisar bacterias particulares.

La ruta clásica generalmente se inicia a partir de la interacción de C1q con pentraxinas, como la proteína C reactiva, o la unión del antígeno/anticuerpo con IgG o IgM, lo que conduce a la activación de C1r y la escisión de C2s. Después, se activan las proteasas de serina, lo que conduce a la escisión de C4 y C2, originando finalmente la C3-convertasa C4b2a, que hidroliza C3 originando C3a y C3b¹¹⁸. C3a tiene la función de reclutar células inflamatorias, mientras que C3b interactúa con C5, para formar el complejo de ataque a membrana (MAC) con C6, C7, C8 y C9. El MAC es una estructura que actúa como un canal a través de la membrana del patógeno, produciendo su lisis¹¹⁹.

En paralelo, la vía alternativa permite la generación de la convertasa soluble C3bBb por la activación espontánea de C3, por hidrólisis (C3H₂O) y la unión al Factor B a través del Factor D. Estas C3-convertasas activan C3, siendo esta proteína el componente central del sistema del complemento, en C3a y C3b. La C3b resultante se deposita, lo que lleva a la formación de más complejos C3bBb de la vía alternativa, amplificando la respuesta. C3b activa la escisión de C5 en C5a y C5b, iniciando la fase terminal. C5b interactúa con C6, C7, C8 y C9, que finalmente forma el complejo C5b-9¹²⁰. Las C3a y C5a generadas actúan como potentes quimioatrayentes, reclutando células inmunes como monocitos y macrófagos al sitio del biomaterial¹²¹.

Finalmente, la vía de las lectinas se basa principalmente en la unión de lectinas de unión a manosa (MASPs), ficolinas 1, 2 y 3, y colectinas a C4 y más tarde a C2, activándolas y obteniendo la C3-convertasa C4b2a al igual que en la vía clásica, siendo el resto de la vía muy similar, excepto en su activación inicial, donde no hay necesidad de presencia de anticuerpos¹²².

1.5.2. Coagulación: desde el punto de vista de la proteómica

El sistema de coagulación es un componente del proceso homeostático. El objetivo principal de los procesos de coagulación es formar una malla de fibrina hecha de una gran cantidad de plaquetas, que, en última instancia, conduce a la formación de un tapón hemostático, evitando el sangrado continuo^{123,124}.

La secuencia de coagulación comprende una serie de transformaciones de proenzimas en enzimas activadas, que culminan en la formación de trombina (IIa), que convierte el fibrinógeno soluble en fibrina insoluble. Con algunas excepciones, estas reacciones enzimáticas se producen en la superficie de los fosfolípidos de las células endoteliales activadas y en las plaquetas, en presencia de iones de calcio.

Este proceso se puede activar, principalmente, por dos vías: una intrínseca (por contacto) y otra extrínseca (por factores tisulares (TF)), que convergen en el punto de activación del factor X (FX), como se muestra en la Figura 1.10.

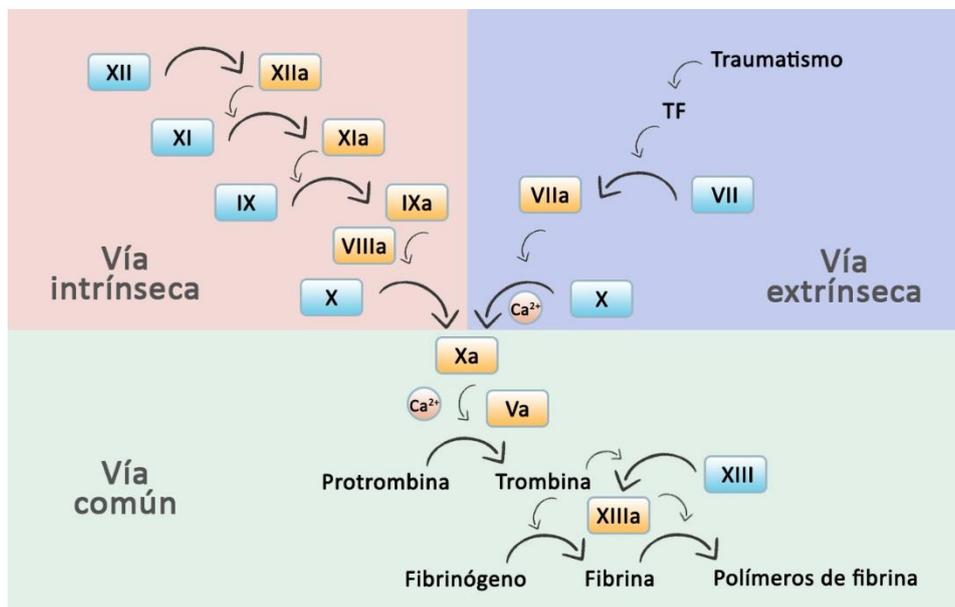


Figura 1.10. Esquema de la cascada de coagulación.

La vía extrínseca, generalmente, se activa en respuesta a un trauma, donde se produce TF, una lipoproteína celular, durante el mismo. El TF puede ser producido por macrófagos, células endoteliales y monocitos, entre otros, después de que el tejido haya sufrido un daño o deterioro, o en respuesta a ciertos estímulos inflamatorios como la liberación de TNF- α e interleucina-1 alfa (IL1- α)^{125,126}. TF activa al factor VII (FVII) para formar FVIIa, lo que lleva a la producción de complejo tenasa extrínseco (TF-FVIIa)¹²³, y al calcio para promover la conversión del FX a factor Xa (FXa).

La vía intrínseca se activa por contactos superficiales mixtos de proteínas como la precalicreína, el quininógeno y el factor XII (FXII), que da lugar a la activación del FXI. Una vez activado el FXI, posteriormente se activa el FIX, que actuará con el cofactor VIII para formar un complejo tenasa en la superficie de un fosfolípido para activar el FX. En

última instancia, esto conduce a la conversión de la protrombina en trombina, producto final de toda la cascada, responsable de la catálisis del fibrinógeno en fibrina. En este proceso de la regeneración ósea, intervienen múltiples factores de crecimiento de las plaquetas, como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1)¹²⁷.

Por último, las dos vías convergen en la vía común, donde una vez activado el FX junto con su cofactor (factor V), fosfolípidos tisulares, fosfolípidos de plaquetas y calcio, forma el complejo protrombinasa, que convierte la protrombina en trombina. Esta trombina escinde aún más el fibrinógeno circulante en fibrina insoluble y activa el factor XIII, que reticula covalentemente los polímeros de fibrina incorporados en el tapón de plaquetas. Esto crea una red de fibrina que estabiliza el coágulo y forma un tapón hemostático secundario definitivo^{128,129}.

La evidencia actual respalda la idea de que la ruta intrínseca no es una ruta paralela, pero, de hecho, aumenta la generación de trombina iniciada principalmente por la ruta extrínseca¹³⁰. Los modelos más recientes describen la coagulación como la sucesión de los siguientes pasos:

a) Iniciación

Se produce por la expresión de TF en un vaso dañado, que se une al factor VIIa para activar el factor IX y el FX. Esta activación del factor IX por el complejo TF-VIIa hace de puente entre las vías extrínseca e intrínseca clásicas. El factor Xa se une al factor II para formar trombina (factor IIa). La generación de trombina a través de esta reacción no es robusta y puede ser efectivamente terminada por el inhibidor de la vía TF.

b) Amplificación

Dado que la cantidad de trombina generada no es suficiente, existen numerosos circuitos de retroalimentación positiva que unen la trombina con las plaquetas. La trombina que se genera en la fase de iniciación activa aún más el factor V y el factor VIII, que sirve como cofactor en el complejo de protrombinasa y acelera la activación del factor II por FXa y de FXa por FIXa, respectivamente.

c) Propagación

Los complejos enzimáticos acumulados (complejo de tenasa y complejo de protrombinasa) en la superficie de las plaquetas soportan grandes cantidades de generación de trombina y activación de plaquetas. Esto asegura la generación continua de trombina y, posteriormente, fibrina para formar un coágulo suficientemente grande.

d) Estabilización

La generación de trombina conduce a la activación del factor XIII (factor estabilizador de la fibrina) que une covalentemente los polímeros de fibrina y proporciona resistencia y estabilidad a la fibrina incorporada en el tapón de plaquetas. Además, la trombina activa el inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI) que protege al coágulo de la fibrinólisis¹²⁹.

Un nivel adecuado de proteínas de coagulación es crucial para lograr un correcto desarrollo de este proceso¹³¹. Además del papel obvio de estas proteínas en la cascada de coagulación, también es notable su interacción con las células, como las células óseas¹³² y las plaquetas¹³³, que desempeñan un papel clave durante el proceso de coagulación de la sangre. La adhesión preferencial al biomaterial de proteínas como la vitronectina y el fibrinógeno puede provocar la unión a las plaquetas a través de la proteína de membrana GPIIb/IIIa, promoviendo la adhesión plaquetaria y la formación de agregados plaquetarios estables^{133,134}. Estas plaquetas contienen factores de crecimiento, como PDGF, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), que son conocidos por ayudar a la revascularización y la osteointegración¹³⁵. Por lo tanto, las propiedades de osteointegración superiores de algunos biomateriales podrían ser consecuencia de su comportamiento de trombogenicidad¹³⁶.

Por otro lado, los mediadores de la coagulación activan la producción de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y otros compuestos proinflamatorios. La interacción entre el sistema inmune y la cascada de coagulación supone que una coagulación excesiva podría contribuir a eventos inflamatorios^{137,138}. La vía de coagulación está regulada para evitar una formación de coágulos desproporcionada. La adsorción de proteínas anticoagulantes participa en el control de esta activación en cascada y asegura su correcto desarrollo. Un equilibrio adecuado entre las proteínas activadoras e inhibidoras de este complejo proceso es fundamental para obtener una

arquitectura de coágulo adecuada que agilice el proceso de regeneración. Los reguladores específicos del sistema de coagulación son proteínas como la antitrombina, proteínas C y S dependientes de la vitamina K, inhibidor de la vía del factor tisular, cofactor de heparina II, α 2-macroglobulina, α 2-antiplasmina, inhibidor de la proteína C o inhibidor de la tripsina del maíz¹³⁹⁻¹⁴¹.

Estos dos sistemas descritos hasta ahora, el sistema del complemento y el de coagulación, son un ejemplo más de que los fenómenos biológicos no se producen de una forma aislada. La convergencia entre el sistema del complemento y el sistema de coagulación se extiende mucho más allá de la naturaleza química del complemento y los componentes de coagulación, los cuales forman cascadas proteolíticas. Los actores del complemento mejoran directamente la coagulación. Estos efectos se complementan con las interacciones del complemento con otros mediadores inflamatorios que pueden aumentar la trombogenicidad de la sangre. Además, el complemento inhibe los factores anticoagulantes. La interferencia entre el complemento y la coagulación también está bien ilustrada por la capacidad de ciertas enzimas de coagulación para activar los componentes del complemento. De hecho, la activación del sistema del complemento está estrechamente relacionada con la hemostasia. Múltiples lazos que conectan ambos sistemas se activan simultáneamente para sincronizar una respuesta efectiva del huésped a amenazas como la infección o el sangrado. A menudo, este esfuerzo cooperativo y claramente beneficioso asegura la eliminación de los patógenos y previene el sangrado¹⁴².

1.5.3. Fibrinólisis

Intrínsecamente está relacionada con el sistema de coagulación. El sistema fibrinolítico es complejo y forma parte de los procesos de hemostasia, ya que degrada la fibrina, que es producto del proceso de coagulación y también el sustrato para el desarrollo de este proceso¹⁴³. A lo largo del desarrollo y la aparición de esta etapa, tienen lugar dos procesos principales: la generación de plasmina, una enzima con actividad proteolítica del plasma sanguíneo; y la posterior degradación de la fibrina por esta enzima¹⁴⁴. La plasmina se genera a partir del plasminógeno en la superficie de la célula o del coágulo de fibrina y se controla mediante los activadores del plasminógeno, a saber, el activador tisular del plasminógeno (tPA) y el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y se regula por una serie de mecanismos e inhibidores.

Entre estos, el tPA es el más conocido y estudiado, y se considera el mejor agente trombolítico para los accidentes cerebrovasculares isquémicos agudos¹⁴⁵. Es sintetizado y liberado por células endoteliales y su ensamblaje en la superficie de la fibrina permite la formación de un complejo tPA-plasminógeno, en el cual el plasminógeno se escinde, generando plasmina. Paralelamente, el uPA también es capaz de escindir al plasminógeno, aunque con menor afinidad¹⁴³. Finalmente, en la degradación de la fibrina se obtienen productos que tienen efectos inmunomoduladores¹⁴⁶ y tromborreguladores¹⁴⁷.

1.5.4. Angiogénesis

La angiogénesis es un proceso fundamental a través del cual se crean nuevos capilares sanguíneos de los vasos preexistentes. En este proceso, las células endoteliales, que forman los vasos sanguíneos, proliferan y migran formando nuevos canales. Este proceso es esencial durante la regeneración del tejido óseo, ya que la generación de los nuevos vasos garantiza el suministro de los nutrientes, la energía y las señales que el proceso requiere¹⁴⁸.

El déficit de oxígeno, debido a la destrucción de los vasos sanguíneos como resultado de un trauma, provoca una reacción impulsada por la subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1 α). Este hecho induce la respuesta de las células endoteliales a las señales angiogénicas. Como consecuencia de la señalización de integrinas, las células endoteliales migran al sitio de curación. Las proteasas liberan moléculas angiogénicas como el VEGF y el FGF, creando un ambiente propicio para la angiogénesis¹⁴⁹. El crecimiento de vasos sanguíneos comienza por la especialización de las células endoteliales en varios tipos de células. Por un lado, las células tip que guían el sentido del crecimiento y que casi no proliferan y por otro, las células stalk que crecen para ir formando el lumen de los nuevos vasos sanguíneos¹⁵⁰. Por lo tanto, las señales como la subunidad B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-B), la angiopoyetina-1 (ANG-1), el TGF- β , la proteína ephrin-B2 y la proteína NOTCH, así como ciertos inhibidores de la proteasa, a saber, los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) y el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), regulan la formación correcta de los nuevos vasos^{151,152}.

1.5.5. Osteogénesis

La osteogénesis consiste en el desarrollo de nuevo tejido óseo, donde juegan un papel crucial las células óseas¹⁵³. En este proceso interviene una gran cantidad de proteínas que tienen un papel fundamental en la respuesta celular osteoblástica y la consiguiente diferenciación.

Este proceso está altamente regulado por importantes vías de señalización como Wnt/ β -caterina, NOTCH, BMP/TGF- β , PI3K/Akt/mTOR, proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), PDGF, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), FGF y Ca²⁺, que resultan cruciales para la regeneración ósea. Las funciones de estas vías de señalización en la osteogénesis están ampliamente descritas en la bibliografía, interviniendo en su activación y desarrollo de mecanismos moleculares una amplia gama de proteínas¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Estas proteínas (BMPs, PDGFs e IGFs) actúan como moléculas de señalización y participan en la proliferación, diferenciación y maduración celular, regulando directamente la actividad de los osteoblastos y la reparación ósea posterior¹⁵⁵.

Las proteínas como el colágeno tipo I, la BMP-2, la BMP-7 y las metaloproteasas de matriz (MMPs) son clave en el desarrollo de este proceso^{157,158}.

Además, es necesario tener en cuenta la interacción entre la osteogénesis y los otros procesos clave en la regeneración ósea (es decir, la coagulación y la reacción inmune), ya que sus moléculas de señalización pueden mostrar importantes efectos reguladores en las células óseas. En este sentido, durante los últimos años, el campo de la osteoinmunología está estudiando las complicadas interacciones entre los sistemas inmunitario y esquelético¹⁵⁹. Las células inmunes, es decir, los macrófagos y las células T y B, llegan al sitio de curación y liberan diferentes moléculas inmunomoduladoras como las citoquinas y las quimioquinas, que finalmente afectan al proceso de regeneración ósea¹⁶⁰. Un entorno inmunitario óptimo podría garantizar la liberación adecuada de factores para lograr una regulación favorable de osteoblastos y osteoclastos^{161,162}. Por lo tanto, la adhesión de proteínas, como las proteínas del complemento, en el biomaterial podría afectar a las propiedades osteogénicas del mismo y, consecuentemente, a su capacidad de osteointegración¹⁶³.

1.6. Caracterización de la capa de proteínas del biomaterial

Se sabe que la adsorción de proteínas en la superficie de un biomaterial desempeña un papel crucial en la determinación de sus respuestas biológicas, como la biocompatibilidad y las interacciones celulares^{75,164,165}. Por ejemplo, en dispositivos cardiovasculares como los stents de arterias coronarias se han utilizado los biomateriales durante décadas. Sin embargo, esos stents han sido problemáticos debido a la formación de coágulos sanguíneos y a la reestenosis, que están relacionados con la adsorción de proteínas^{166,167}. Este caso concreto muestra que una mejor comprensión de la relación entre la adsorción de proteínas y las respuestas biológicas de los materiales sería un requisito previo en el desarrollo y el rendimiento final de los biomateriales^{8,61,168}. Además, el estudio de la adsorción competitiva de proteínas en la superficie también es importante, principalmente porque los biomateriales están expuestos a mezclas de proteínas, como el plasma sanguíneo, con diferentes afinidades para las superficies^{169,170}. Sin embargo, las metodologías actuales utilizadas en el estudio de la adsorción de proteínas como el radiomarcaje^{167,171}, la elipsometría óptica¹⁷², la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)^{173,174}, la espectroscopia mediante una guía de ondas ópticas (OWLS)¹⁷⁵, la espectroscopia de fluorescencia (como la fluorescencia de reflexión interna total o TIRF)^{176,177}, o la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR/ATR)^{178,179} analizan la adsorción de una sola proteína o las propiedades promedio de las mezclas de proteínas de la superficie. Ahora, con los avances en la tecnología, es posible determinar simultáneamente las identidades y las concentraciones de cientos de proteínas en una muestra biológica compleja usando la proteómica¹⁸⁰. Esta técnica se introdujo originalmente para estudiar la expresión de proteínas en las células y, en realidad, es una colección de técnicas que permiten el estudio simultáneo de numerosas proteínas en mezclas complejas, a través de la separación de estas y una identificación de alto rendimiento¹⁸¹⁻¹⁸⁴. La proteómica ha demostrado ser útil en el estudio de la adsorción de proteínas en las superficies de los biomateriales^{185,186}. Anteriormente, se estudió ampliamente la adsorción de algunas proteínas como la albúmina, la inmunoglobulina- γ (IgG) y el fibrinógeno^{187,188}. Sin embargo, se sabe que en la capa adsorbida hay otras muchas proteínas. Por ejemplo, la laminina y la queratina adsorbidas en varios biomateriales como el PMMA, pueden afectar a la proliferación de células epiteliales en el material¹⁸⁹.

El esfuerzo que se está realizando para comprender la interacción de los biomateriales con las proteínas es insuficiente. La mayor parte de las líneas de investigación actuales se basan en estudios donde se utiliza una única proteína (fibronectina, albumina, vitronectina...) o una mezcla de un pequeño número de estas⁴¹. Dichos sistemas son demasiado simples para reproducir los mecanismos tan complejos en los que se basa el proceso de adsorción de proteínas en las superficies, donde participan cientos de estas. La tecnología proteómica para el análisis de las proteínas adsorbidas en las superficies de los biomateriales se está aplicando cada vez más para una comprensión más completa de las respuestas biológicas en las superficies de los biomateriales.

Aunque esta técnica se ha utilizado desde principios del siglo XXI, su aplicación para caracterizar la dinámica de la adsorción/desorción de proteínas en las superficies de biomateriales acaba de comenzar. La proteómica se puede definir como el análisis a gran escala de proteínas, generalmente por métodos bioquímicos¹⁸². El método clásico de separación de proteínas para el análisis proteómico, desde la primera aparición de la técnica a mediados de la década de 1970, ha sido el uso de geles de poliacrilamida de una o dos dimensiones¹⁹⁰. Los métodos utilizados en la mayoría de estudios pueden ser divididos en dos categorías (Figura 1.11): métodos de separación de proteínas e identificación de proteínas por espectrometría de masas (MS).

La proteómica basada en la MS ha demostrado su eficacia en los estudios de proteínas a gran escala. Una vez que las proteínas se separan, visualizan y/o cuantifican, deben identificarse. Las manchas de las proteínas se extirpan de los geles y las proteínas se digieren en fragmentos mediante una proteasa específica como la tripsina. Los fragmentos se analizan mediante MS, en la cual las proteínas se identifican comparando la masa medida de los fragmentos de péptidos con la masa predicha de fragmentos de proteínas de las bases de datos, que están disponibles en Internet¹⁹¹. La función básica de un espectrómetro de masas es producir iones a partir de muestras neutras, llevarlos a la fase gaseosa, separarlos de acuerdo con su relación masa/carga (m/z) y detectar esos iones. A finales de la década de 1980 se introdujeron dos métodos de ionización importantes, la ionización por electroespray (ESI) y la desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI), que han resultado clave en algunos de los avances más significativos en el desarrollo de la proteómica. Por otro lado, los cinco tipos de analizadores son el tiempo de vuelo (TOF), la trampa iónica, el cuadrupolar, el Orbitrap y la resonancia de

ciclotrón iónico por transformada de Fourier (FTICR). Estos, generalmente, se utilizan en tándem para obtener un mayor grado de separación e identificación de los iones¹⁹².

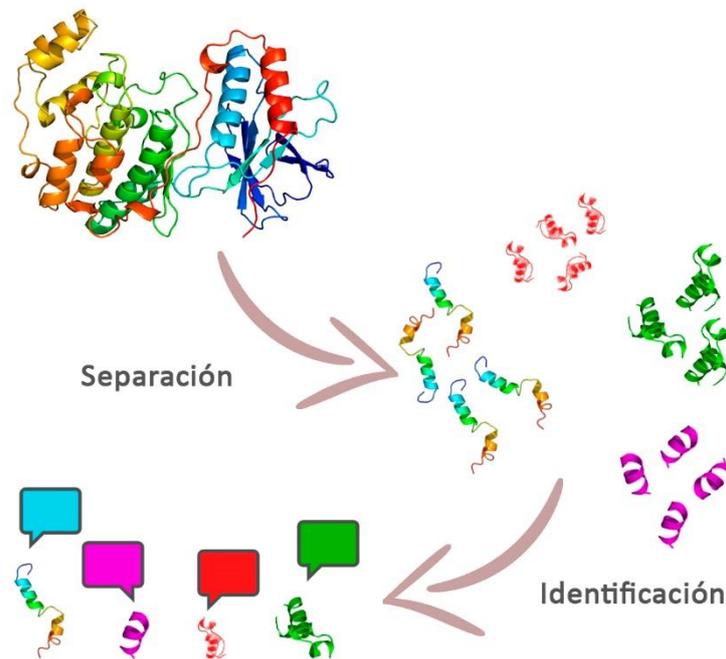


Figura 1.11. Procedimiento para el análisis proteómico.

El uso de la MS como técnica proteómica en el campo de los biomateriales está en auge y se van adoptando nuevas estrategias de medición para obtener una mejor sensibilidad y reproducibilidad y, así, poder analizar muestras más complejas¹⁹³. En este sentido, existen revisiones bibliográficas del uso de la MS MALDI-TOF para estudiar las interacciones proteína/biomaterial¹⁹⁴. Algunos estudios más recientes han optado por la combinación de MS/MS con cromatografía líquida (LC) como método de separación. Esta se ha convertido en una técnica potente en el campo proteómico, pudiendo detectar la presencia de pequeñas cantidades de proteínas con alta reproducibilidad^{41,195}. Por ello, esta técnica se ha empleado para descubrir biomarcadores relacionados con algunas enfermedades patológicas como la osteoporosis, la osteoartritis o los tumores óseos¹⁹⁶.

Por otro lado, la LC-MS/MS se ha aplicado en la investigación de los biomateriales de diferentes maneras. Algunos autores la han utilizado para estudiar los perfiles de proteínas expresadas de células cultivadas en nuevos materiales^{197,198}. Otro enfoque de esta técnica se centra en el análisis comparativo de los perfiles proteómicos expresados durante la regeneración ósea *in vivo* alrededor de los biomateriales¹⁹⁹. Del mismo modo, se han realizado estudios proteómicos para caracterizar la adsorción de proteínas en

biomateriales. Este tipo de trabajos se centra en la adsorción de proteínas en la superficie de las nanopartículas y en la evaluación de su toxicidad^{200–202}.

Finalmente, también se ha utilizado esta técnica para caracterizar la adsorción de proteínas en los biomateriales utilizados en implantología. Dodo *et al.* caracterizaron la capa de proteínas adsorbidas en una superficie rugosa de titanio tras ser incubada con plasma sanguíneo. El análisis por LC-MS/MS reveló que esta capa estaba compuesta, principalmente, de proteínas relacionadas con la adhesión celular y la coagulación²⁰³. Por otro lado, el análisis de las proteínas adsorbidas en el sulfonato sódico de poliestireno mostró un mayor nivel de adsorción de proteínas en esta superficie que en el titanio, después de incubarse con plasma rico en plaquetas²⁰⁴. Kaneko *et al.* determinaron qué proteínas del suero de rata se adsorbieron en dos materiales utilizados como sustitutos óseos, a saber, al fosfato octacálcico y la HA²⁰⁵. Igualmente, Sugimoto *et al.* analizaron las proteínas adheridas a la superficie del TiO₂ después de su incubación con proteínas extraídas del hueso de cerdo. Estos identificaron algunos componentes de la matriz extracelular, enzimas, factores de crecimiento y diversas proteínas con capacidad de mineralización²⁰⁶. Por otro lado, Abdallah *et al.* comprobaron que la química de la superficie de los biomateriales determina el perfil proteómico de la capa de proteínas adsorbidas¹⁸⁹. Swartzlander *et al.* estudiaron la adsorción de proteínas de suero bovino en distintos hidrogeles, concluyendo que la mayoría de las proteínas detectadas estaban relacionadas con una respuesta inflamatoria aguda. Estos resultados, además, se correspondían con la respuesta *in vivo* provocada por este tipo de materiales²⁰⁷. Finalmente, en estudios anteriores de nuestro grupo se analizaron las proteínas adsorbidas en diferentes superficies de titanio utilizadas en implantes dentales, concluyendo que las características fisicoquímicas podrían ser responsables de las diferencias observadas en dicha capa²⁰⁸.

Con todo, la LC-MS/MS tiene un gran potencial como técnica proteómica para realizar una caracterización de las proteínas adsorbidas en las superficies de los biomateriales.

1.7. Modificaciones superficiales en la implantología dental

Los implantes dentales se utilizan como raíces de dientes artificiales desde hace décadas para fijar y soportar supraestructuras protésicas desde coronas individuales hasta prótesis fijas y removibles. Se aplican tanto para sustituir huecos individuales como para el edentulismo. Sorprendentemente, desde los trabajos de Brånemark, Zarb, Albrektsson, Schulte, Schroeder y otros en el campo de la osteointegración²⁰⁹⁻²¹⁵, el titanio o la aleación de titanio sigue siendo el material utilizado mayoritariamente, a pesar de que recientemente se han desarrollado materiales alternativos que están generando un creciente interés, como el circonio. Debido a su superficie de color blanco, los implantes y los pilares de circonio se consideran estéticamente superiores a los de titanio de color gris y, por ello, tienen un gran interés científico y clínico²¹⁶⁻²²¹. Sin embargo, los implantes de titanio siguen siendo la mejor referencia para las aplicaciones de implantes orales, debido a su mayor biocompatibilidad y a su capacidad de osteointegración, es decir, a lograr un contacto íntimo y directo con el hueso. El objetivo perseguido sigue siendo lograr un contacto directo entre el hueso vivo y el implante inerte, con el objetivo de asegurar la función a largo plazo del dispositivo protésico anclado²²². Teniendo en cuenta la naturaleza transgingival de los implantes dentales que forman simultáneamente varias intercaras con el sistema biológico del huésped, a este tipo de implante se le puede llamar "implante híbrido"²²³ que consiste en: (a) el tejido óseo subgingival que forma una intercara con el cuerpo endoóseo del implante, (b) el tejido blando transgingival que forma una intercara con el cuello y la plataforma del implante, y (c) la última parte del sistema, que es visible a simple vista y que contiene el pilar o la supraestructura, donde la cavidad oral forma una intercara con su ambiente salival en la región transgingival y supragingival (Figura 1.12).

Cualquier superficie del implante dental debe optimizarse para cumplir con las diferentes demandas de las respectivas intercaras: en la intercara del tejido duro, se requieren propiedades osteogénicas para optimizar la osteointegración; en la intercara de los tejidos blandos, es necesaria la unión gingival con funcionalidad adhesiva celular para queratinocitos y fibroblastos para asegurar un sellado epitelial firme, que evite la infiltración bacteriana. Para ambas intercaras, se considera que el principal riesgo de infecciones graves, como la periimplantitis, es la colonización bacteriana²²⁴. La

inflamación va acompañada de una contaminación bacteriana de las superficies del implante seguida de una pérdida de osteointegración debida a una reacción inmunológica del huésped, llamada "pérdida ósea". Finalmente, la pérdida ósea extensiva da lugar a la pérdida del implante.



Figura 1.12. Estructura de un implante dental.

Por consiguiente, tanto trans como supragingivalmente, las intercaras implante/saliva deben tener funcionalidades antiadhesivas o antibacterianas para impedir la formación de biopelículas. Hay que tener en cuenta que la primera respuesta biológica a una intercara bidimensional implante/biosistema es una interfase tridimensional, que es la única existente inicialmente. Esta formación dinámica de una zona de transición entre dos fases está asociada, por ejemplo, a la hidratación y a la adsorción macromolecular^{225,226}. El desafío para las modificaciones avanzadas de la superficie en la región del implante trans y supragingival es lo que se ha denominado "carrera por la superficie", la competencia entre la colonización bacteriana y la integración tisular de dicha superficie tras la implantación²²⁷. Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha se han orientado hacia la mejora de la intercara biomaterial/hueso.

Desde el punto de vista actual, es sorprendente que las superficies de los implantes no se consideraran importantes para la osteointegración dentro de la primera década de la implantología dental. El papel de las características de la superficie ganó importancia ya

que, a principios de los años 80 del siglo pasado, Albrektsson *et al.* fueron pioneros en el concepto de osteointegración al atribuir a las propiedades de la superficie un posible papel en la respuesta biológica a un implante²²². Se enumeraron los requisitos para garantizar un anclaje implante dental/hueso directo y duradero, siendo estos: el material del implante, el diseño del implante, el estado del hueso, la técnica quirúrgica, las condiciones de carga del implante y el acabado del implante. Este último se especificó aún más al proponer superficies más rugosas que fueran beneficiosas en comparación con las más lisas. Igualmente, los autores añadieron que las uniones celulares, en teoría, podrían depender de la superficie del implante. Además, en ese momento, la importancia de este parámetro se consideraba difícil de evaluar. Hoy en día, la mayoría de las investigaciones sobre implantes de titanio se centran en optimizar las condiciones de su superficie y acelerar la osteointegración. Existen tres formas principales para modificar la superficie de los implantes dentales: morfológica, fisicoquímica y bioquímica.

La topografía y la rugosidad de las regiones de los implantes adyacentes al hueso se han optimizado durante las últimas décadas para mejorar el éxito a largo plazo. Se han desarrollado y aplicado una serie de modificaciones en la superficie de los implantes comercializados mediante diferentes métodos sustractivos o aditivos, que incluyen el granallado, el grabado ácido, la oxidación anódica electroquímica, el recubrimiento con fosfato de calcio, o diferentes combinaciones de estas técnicas, por ejemplo, granallado con tratamiento ácido. Un resultado importante de los estudios *in vitro* e *in vivo* centrados en la respuesta ósea fue que las superficies de titanio moderadamente rugosas, con una rugosidad media entre 1 y 2 μm , mejoraban la osteointegración respecto a las superficies más lisas o incluso más rugosas²²⁸. Un estudio reciente que comparaba superficies microrrugosas confirmó los efectos beneficiosos de las superficies moderadamente rugosas en la diferenciación y migración de osteoblastos²²⁹. Según otros estudios anteriores^{230–232} además de la topografía y la rugosidad de la superficie, otras propiedades, como la composición química o la energía superficial, influyen en las reacciones interfaciales de un biomaterial²³³, o más específicamente, en la formación de hueso *in vivo*. Schwartz y Boyan describieron un cambio de paradigma desde un pensamiento restringido a la biocompatibilidad y a los mecanismos de formación ósea, a estudiar el proceso en términos de curación de heridas²³⁴. Brevemente, este nuevo paradigma de curación de heridas abarca el acondicionamiento de proteínas séricas, la respuesta inflamatoria aguda con la formación del coágulo y la liberación de factores de curación

de heridas, el reclutamiento de células mesenquimales no diferenciadas a la superficie, su adhesión, proliferación, diferenciación osteoblástica, seguido de la producción y maduración de la matriz y la calcificación.

En cuanto a la humectabilidad de la superficie y a su energía superficial, no se han encontrado en bibliografía estudios sistemáticos de ambas propiedades de las superficies de los implantes dentales hasta principios del siglo XXI. Mientras que la mayor o menor humectabilidad producida por la rugosidad ha sido estudiada intensamente en los campos de la física y la química-física durante décadas²³⁵⁻²³⁷, en implantología tales interrelaciones han sido ampliamente desconocidas o no han sido tenidas muy en cuenta. Del mismo modo, el conocimiento disponible de la ciencia básica de la superficie sobre diferentes respuestas biológicas a las superficies hidrófilas frente a las hidrófobas, como en los procesos de adsorción de proteínas, obviamente no han sido consideradas en el caso de las modificaciones superficiales de los implantes comercializados. Hace ya más de diez años que se les atribuye una superficie altamente hidrófoba a los implantes dentales de titanio con un tratamiento combinado de granallado y grabado ácido²³⁸. Obviamente, de forma inconsciente, durante décadas, la optimización continua de la topografía de los implantes de titanio ha generado superficies microrrugosas que inducían muy poca humectabilidad²³⁹. Debido a los altos valores de ángulo de contacto, mayores que 120°, se hizo evidente que la topografía de los implantes tenía relación, de alguna manera, con la generación de esa mala humectabilidad.

Por otra parte, hay varios métodos disponibles para convertir las superficies hidrófobas de los implantes en hidrófilas, lo que, generalmente, permite la generación de superficies de titanio superhidrófilas altamente energéticas con ángulos de contacto con el agua muy bajos. Además, los primeros estudios de Robert E. Baier ya informaban sobre la importancia de las superficies de los implantes químicamente limpias y los tratamientos de descarga luminiscente de radiofrecuencia (RFGD) para lograr superficies descontaminadas con alta energía superficial²⁴⁰. Baier *et al.* observaron una gran influencia del estado inicial de limpieza de la superficie y de la energía libre superficial del implante en el proceso de curación y la generación de células del tejido huésped adyacente a la superficie del implante^{230,241}. En general, las superficies perfectamente limpias se caracterizan por tener enlaces químicos insaturados que causan un estado de superficie energética alto. La técnica RFGD se ha utilizado para limpiar y esterilizar las superficies de los implantes. Las capas de hidrocarburos, la contaminación residual más

común en superficies sólidas, pueden eliminarse de manera eficiente mediante este proceso de limpieza²⁴². Baier y Meyer informaron de que la simple inmersión de una muestra recién tratada con descarga luminiscente en agua hervida, desgasificada, y destilada por triplicado había sido suficiente para retener la mayor parte de las propiedades superficiales requeridas, durante períodos indefinidamente largos, con diferentes materiales²⁴³. Estos primeros estudios fueron el inicio de los siguientes enfoques desarrollados para mantener la hidrofilia de las superficies de los implantes durante tiempos de almacenamiento más largos o para mejorar la humectabilidad, mediante un tratamiento directo, para uso inmediato. Existen varios métodos que permiten la obtención de una fuerte hidrofilia de los implantes de titanio mediante tratamientos con plasma o fotofuncionalización ultravioleta A (UV-A) y ultravioleta-C (UV-C), inmediatamente antes de su uso²⁴⁴⁻²⁴⁹. Por otro lado, la superficie SLActive® fue desarrollada y lanzada al mercado en 2005 por el Instituto Straumann (Basilea, Suiza). El proceso SLActive® previene la contaminación atmosférica ambiental y conserva la superficie activada al procesar los tornillos del implante después del grabado ácido bajo gas protector y almacenarlos en una solución salina^{239,250,251}. Después del grabado ácido de los implantes de titanio, se espera un estado superficial insaturado. Este alto estado de superficie energética se caracterizó después del almacenamiento en solución salina²³⁹, obteniéndose ángulos de contacto con agua de 0°.

En caso de contacto con la atmósfera ambiental de un implante cuya superficie esté perfectamente limpia, se produce una fuerte unión de contaminantes que reducen la energía superficial²⁵². Por el contrario, el titanio activado almacenado en un líquido acuoso se hidroxila e hidrata y se asemeja al agua, mejorando su humectabilidad y su interacción con la capa de agua alrededor de las biomoléculas²⁵³. No tener en cuenta la energía superficial y la limpieza, pueden comprometer las etapas iniciales de la cicatrización del tejido después de la implantación²⁴¹. Estrictamente hablando, cualquier impureza, incluso causada por el proceso de fabricación, puede ser un posible desencadenante de ciertas respuestas celulares o moleculares desfavorables, que derivan en una pérdida ósea marginal temprana^{54,254}. Dichas impurezas se han encontrado en muchos sistemas de implantes que están en el mercado²⁵⁵.

Así, las propiedades fisicoquímicas de la superficie del implante como la energía superficial, la carga superficial, la composición química y la humectabilidad, son parámetros fundamentales^{256,257}. Estas propiedades pueden ser alteradas, principalmente,

mediante procesos de fabricación o mediante técnicas de recubrimiento. Algunas de estas técnicas de recubrimiento son: la proyección por plasma, la pulverización catódica, los recubrimientos sol-gel, la deposición electroforética y la precipitación biomimética²⁵⁸.

Esto se combina, a menudo, con la modificación bioquímica de la superficie de titanio. Estas modificaciones se realizan para imitar la arquitectura del hueso, así como para mejorar la formación del mismo y la osteointegración. Las modificaciones bioquímicas se logran de las siguientes maneras: recubrimientos de biomoléculas de señal osteoinductiva, recubrimientos de fosatos de calcio, recubrimientos de hidrogeles y superficies de titanio antibacterianas²⁵⁹.

En la próxima década, habría que esperar la disponibilidad de superficies inteligentes y adaptadas que optimicen las intercaras respectivas de los implantes, de acuerdo con sus requisitos funcionales, de una manera altamente específica²⁶⁰.

Hoy en día, la aplicación de recubrimientos híbridos de silicio en implantes dentales es una línea de investigación prometedora para lograr una adecuada funcionalización de la superficie, proporcionando determinadas características beneficiosas que permitan obtener una respuesta biológica deseable.

1.8. Recubrimientos híbridos sol-gel

La historia del proceso sol-gel empezó con la preparación de materiales inorgánicos como los vidrios y las cerámicas²⁶¹. Desde que en 1990 Brinker y Scherer desarrollaran extensamente esta técnica²⁶², la tecnología sol-gel ha evolucionado significativamente en todos los aspectos.

El proceso sol-gel se fundamenta en la hidrólisis y condensación de precursores metálicos. Éste consiste en la preparación de un sol (dispersión de partículas coloidales en un fluido), la gelificación del mismo y el secado del gel (sistema que tiene una fase líquida atrapada en una fase sólida que forma una red) para formar un sólido también llamado xerogel²⁶².

Básicamente, existen dos maneras de preparar este tipo de materiales: el método inorgánico y el método orgánico. El primero consiste en la dispersión de partículas

coloidales en un líquido para formar un sol, seguido de la gelificación (suspensión coloidal de partículas muy pequeñas, 1-100 nm) para formar una red en fase líquida continua. El segundo método, el más utilizado, comienza con una solución de metales monoméricos o precursores alcóxidos metaloides en un alcohol u otro disolvente orgánico de bajo peso molecular²⁶³. El proceso sol-gel se basa en dos reacciones básicas de hidrólisis y condensación. Es un proceso complejo que incluye varias etapas^{264,265}, como se observa en la Figura 1.13:

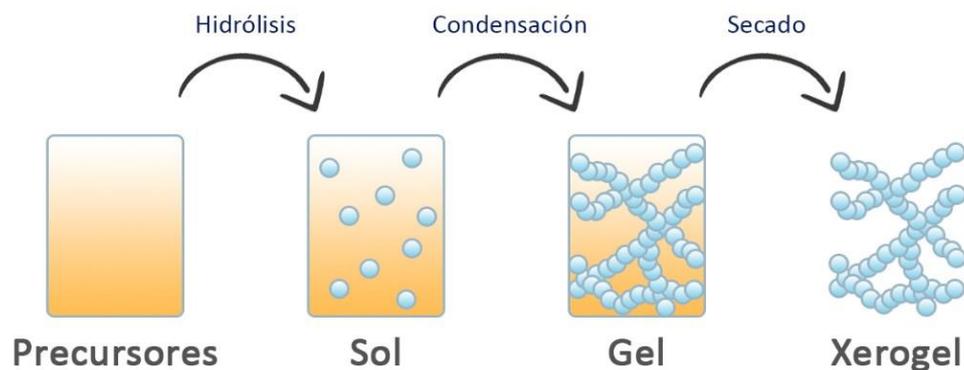
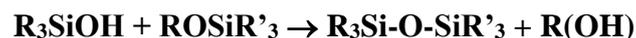
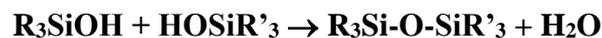


Figura 1.13. Etapas del proceso sol-gel.

- **Hidrólisis.** En esta reacción se genera un silanol, con al menos un grupo OH, al hidrolizarse la cadena alcoxi de los alcóxidos de silicio en presencia de agua.
- **Condensación.** Los grupos silanol condensan, o bien reaccionando con otros grupos silanol, o bien con un grupo alcoxi, para formar grupos siloxano (Si-O-Si) y agua o alcohol como subproductos de la reacción. Las reacciones de hidrólisis y condensación se dan de forma simultánea.



- **Gelificación.** Se da la formación del gel o red tridimensional, produciéndose un fuerte aumento de la viscosidad. Dentro de dicha red queda atrapado el resto de la solución.

- **Envejecimiento.** Tras un determinado tiempo de reposo, se produce la evolución y contracción de la red (debido a la salida de líquido de sus poros) mediante las reacciones de los grupos funcionales que permanecían en la misma.

- **Secado.** Se trata de la pérdida de agua, alcohol y otros componentes volátiles para dar lugar a una estructura porosa. Este proceso puede crear tensiones dentro del entramado por diferencia entre la velocidad de secado de las caras exteriores e interiores, produciéndose grietas superficiales en el material final.

- **Densificación.** Se obtiene tras la aplicación de un tratamiento térmico para favorecer el entrecruzamiento, mejorando las propiedades mecánicas y la estabilidad estructural del material.

Todo este proceso está afectado por las condiciones iniciales de reacción: pH, temperatura, efecto estérico de los sustituyentes de los precursores, relaciones molares de los reactivos, carácter hidrófobo o hidrófilo de los precursores, composición del disolvente...²⁶³. A continuación, se detalla la influencia de los dos parámetros más importantes: pH y relación molar.

Las reacciones de hidrólisis y condensación se dan utilizando un catalizador ácido o uno básico. Dependiendo de las condiciones de pH utilizadas, se formarán distintos tipos de redes. A pH bajo se da una hidrólisis lenta frente a la condensación. Esto hace que se formen moléculas lineales que se entrecruzan ocasionalmente. Bajo condiciones básicas, por el contrario, se da una hidrólisis rápida. En la condensación se obtienen partículas coloidales que se enlazan unas con otras formando una estructura tridimensional menos compacta. Esta estructura es más porosa que la que se obtiene en las condiciones ácidas²⁶⁶.

La relación molar agua:alcóxido también tiene influencia en la velocidad de hidrólisis y condensación. Además, determina la cantidad de enlaces siloxano que se forman. La ratio óptima depende del precursor seleccionado, esto es, si tiene 4 grupos hidrolizables, la ratio será 4, y si es un alcoxisilano trifuncional, la relación molar estequiométrica para que la hidrólisis sea completa será 3. Si se utiliza una cantidad baja de agua, la velocidad de hidrólisis disminuye, el material no llega a gelificar y el curado es complicado. Si se utilizan cantidades altas, el alcóxido queda diluido y aumenta el tiempo de reacción²⁶⁷.

Los materiales híbridos orgánico-inorgánicos (compuestos por una red inorgánica Si-O-Si con sustituyentes orgánicos) que se obtienen por esta técnica, combinan las propiedades deseadas de los polímeros orgánicos (tenacidad y elasticidad) con las de los sólidos inorgánicos (dureza y resistencia química)²⁶⁸.

Este método ofrece, igualmente, muchas ventajas: es sencillo, permite trabajar a temperaturas no muy elevadas, se pueden obtener recubrimientos con formas complejas (los precursores son líquidos), no precisa de etapa de lavado, ofrece una inmovilización efectiva de uno o más componentes bioactivos, permite un gran control de la composición química del recubrimiento, es muy versátil, requiere un sencillo equipamiento y su costo es razonable^{269,270}.

Además, se ha demostrado que estos materiales son compuestos biocompatibles con un gran potencial en aplicaciones biomédicas²⁷¹. Las redes de silicio que se forman muestran resultados prometedores para la regeneración ósea, ya que estos materiales refuerzan la fijación, proliferación y diferenciación de osteoblastos, aumentando la expresión de múltiples genes que conducen a la osteogénesis²⁷². Estos recubrimientos, durante su proceso de degradación, liberan ácido ortosilícico, que estimula la formación de colágeno tipo I confirmando al implante propiedades osteoinductoras^{273,274}. Del mismo modo, el silicio tiene un efecto positivo sobre el metabolismo óseo al mejorar la osteoblastogénesis^{275,276}. Son numerosos los ejemplos descritos en la bibliografía sobre la bondad de este tipo de recubrimientos orgánicos-inorgánicos al aplicarlos sobre implantes dentales de titanio^{277,278}. Es más, en nuestro grupo se han desarrollado diversos recubrimientos híbridos para esta aplicación²⁷⁹⁻²⁸¹.

Por último, estos híbridos son excelentes matrices para alojar una gran variedad de moléculas biológicas. Los compuestos orgánicos introducidos no necesitan ser un componente de la red, el sol-gel puede funcionar como portador de estos para su posterior liberación controlada. Desde que, en 1990, Braun *et al.* describieran la introducción de enzimas en matrices de sol-gel derivadas de TEOS, el uso de este tipo de materiales se extendió rápidamente a otros compuestos como anticuerpos, proteínas, factores de crecimiento, fármacos o biocidas²⁸². La adición de estas moléculas puede realizarse antes o después de la formación del sol, y con el proceso de secado, se logra el atrapamiento. En este sentido, varios autores han trabajado en la incorporación de un compuesto

osteogénico a estos biomateriales sol-gel, con el objetivo de aumentar sus efectos positivos durante la regeneración del tejido óseo^{283,284}.

1.9. Vehículos de liberación de calcio y estroncio

En los últimos años, se ha puesto gran interés en obtener vehículos de liberación que induzcan la formación de hueso. Los recubrimientos híbridos sol-gel modifican la superficie de los implantes dentales, permitiendo la incorporación de compuestos bioactivos para su posterior liberación. El mayor conocimiento de todas las señales biológicas que intervienen en los procesos de regeneración ósea es básico para poder influir en dicha formación ósea. En este sentido, el dopado de estos materiales con iones que promuevan la cicatrización del tejido óseo, es una estrategia interesante para lograr las respuestas deseadas. De hecho, los iones Sr^{2+} y Ca^{2+} están relacionados con el metabolismo del hueso y juegan un papel fisiológico en la angiogénesis, crecimiento y mineralización de los tejidos óseos²⁸⁵ haciendo atractivo su uso como agentes bioactivos para estimular la regeneración de dicho tejido²⁸⁶.

El estroncio es un oligoelemento presente en el componente mineral del hueso (0.00044 % en masa del cuerpo) y juega un papel vital en la mineralización ósea^{287,288}. En los últimos años, el ranelato de estroncio se ha utilizado como tratamiento exitoso para la osteoporosis. Tanto los estudios *in vitro* como los estudios *in vivo* han demostrado que el ranelato de estroncio aumenta la formación ósea y disminuye la resorción ósea²⁸⁹. Sin embargo, la seguridad cardiovascular de este compuesto sigue siendo motivo de preocupación, ya que se ha descrito que ha producido un pequeño, pero significativo, aumento de los infartos de miocardio no fatales^{290,291}, lo que ha conducido a estrictas indicaciones y restricciones para su utilización²⁹². Varios estudios preclínicos, realizados tanto en modelos animales normales como osteoporóticos, junto con estudios *in vitro* previos, mostraron el efecto beneficioso del ranelato de Sr en el aumento de la arquitectura ósea y la resistencia ósea²⁹³⁻²⁹⁵. En consecuencia, para mejorar la reparación ósea, el Sr se ha incorporado recientemente en diferentes sustitutos óseos. Esta estrategia tiene como objetivo lograr un uso más seguro de su actividad osteoanabólica y antiosteoclástica, ya que las altas concentraciones se logran localmente, mejorando la formación ósea con menor impacto sistémico. La incorporación de iones Sr^{2+} en la red de

HA tiene una fuerte influencia en los parámetros de cristalinidad y estructura cristalina, dependiendo del nivel de sustitución de estroncio^{287,296}. La Sr-HA tiene una solubilidad más alta que la HA, aumentando así su bioactividad y liberando Sr²⁺, que lo hace extremadamente deseable para usar *in vivo*. Además, la Sr-HA libera el ion Ca²⁺, que activa los canales de calcio y estimula la respuesta celular²⁹⁷. Además, los estudios *in vitro* han demostrado que el Sr tiene una influencia directa en el efecto estimulante sobre el ADN y la síntesis de colágeno óseo²⁸⁸. Es más, la presencia precisa de Sr²⁺ ha supuesto una mejora de la proliferación y mineralización de osteoblastos *in vitro*²⁹⁸. Este catión regula los marcadores de expresión osteogénica como la fosfatasa alcalina (ALP), la RUNX2, el colágeno tipo I y la osteocalcina²⁹⁹. También algunos estudios *in vivo* han revelado la eficacia de los biomateriales dopados con Sr para estimular el crecimiento y la remodelación ósea³⁰⁰. Además, se ha demostrado que estos inducen la nueva formación de hueso³⁰¹. De hecho, su incorporación a hidroxiapatitas³⁰², hidrogeles³⁰³, biovidrios^{298,299} o híbridos^{283,304} ha mejorado el potencial de osteointegración de estos materiales.

Con todo, los estudios *in vivo* son escasos, y la mayoría de los informes no presentan un grupo de control adecuado. Si los materiales enriquecidos con Sr son efectivos y seguros aún es un tema de debate, y se necesita más información sobre el uso local de Sr, con criterios uniformes. El estudio de revisión realizado por Neves *et al.*³⁰⁰ sobre el efecto *in vivo* del Sr está de acuerdo con otras revisiones sobre otros elementos enriquecedores^{305,306} y con resultados *in vitro* previos con Sr³⁰⁷⁻³¹³, estableciendo que, en general, el Sr mejora la formación y remodelación ósea, lo que lleva a una mayor respuesta en comparación con materiales similares sin este elemento. El efecto del Sr está presente incluso en entornos osteoporóticos y algunos estudios describen mayores efectos en estos modelos osteoporóticos³⁰⁰. El efecto del Sr aparece, principalmente, en las etapas tardías de los diferentes estudios. De hecho, se observa una tendencia al alza en el número de estudios que describen un efecto mayor del Sr en la formación de hueso en los tiempos de estudio más largos, al analizar estos estudios de acuerdo con el tiempo de evaluación. Por lo tanto, las conclusiones de los estudios con tiempos más cortos pueden ser prematuras para diferenciar la reacción ósea entre el material con Sr y el control. Esto puede explicar por qué Cardemil *et al.*³¹⁴ no encontraron diferencias significativas, ya que su estudio terminó solo cuatro semanas después de la implantación. Sin embargo, algunos autores informaron una mejora significativa incluso en las semanas dos y cuatro de la

experimentación. Se puede argumentar que la respuesta al Sr puede estar influenciada por la cantidad de tiempo que el hueso está expuesto a este componente. Cuando se considera la remodelación ósea, hay menos resultados disponibles, y el número de estudios que describen una mayor formación y remodelación ósea es solo superior después de seis semanas.

Esto confirma los informes anteriores sobre el Sr, como un estimulador de la diferenciación ósea y la osteogénesis³⁰⁷⁻³¹³. Sin embargo, las condiciones óptimas para su uso, a fin de maximizar sus efectos beneficiosos, aún no se han determinado. Además, ningún estudio mostró una disminución de la formación o remodelación ósea, en cualquier período de tiempo, ya sea para modelos sanos o enfermos. La presencia de un efecto beneficioso del Sr, incluso en modelos osteoporóticos, puede mejorar su valor terapéutico, ya que en esos casos el deterioro de la osteogénesis es un desafío importante.

La tasa de liberación de Sr del biomaterial también se identificó como un posible factor que afecta a su actividad, ya que las células similares a los osteoblastos usan el estroncio liberado del biomaterial para sintetizar su matriz extracelular mineralizada³¹⁵. Así, Thormann *et al.*²⁹⁵ encontraron concentraciones más altas de Sr en zonas de mayor aumento de formación ósea, lo que la apoyaría esta teoría. De cualquier forma, se necesitan más estudios sobre la relación entre la concentración de Sr y la formación de hueso para precisar esta teoría. Neves *et al.*³⁰⁰ también mostraron que incluso pequeñas cantidades de Sr podrían ser suficientes para tener impacto en la formación y remodelación ósea. Algunos autores han encontrado diferencias significativas con solo el 0.1 % de este componente^{316,317}. Sin embargo, dos de los tres autores que específicamente compararon diferentes porcentajes de Sr, encontraron una respuesta mayor con concentraciones más altas de Sr^{318,319} confirmando informes *in vitro* previos³²⁰. El otro autor describió resultados similares³²¹. Los tres autores coinciden en que aún no se ha encontrado la dosis óptima de Sr. En cuanto a la información disponible sobre el impacto del Sr en la expresión génica, hablando en términos generales, se encontró poca variación, pero sí una disminución en la citoquina proinflamatoria IL-6, un estimulador del reclutamiento de osteoclastos y de la reabsorción ósea, relacionada con la alteración del metabolismo del hueso, lo que puede ayudar a explicar el efecto del Sr como promotor de la formación y remodelación ósea. El aumento de genes y proteínas involucrados en estos procesos, como la osteocalcina y la BMP, respalda también los efectos de formación ósea del Sr³²².

Como se comentado anteriormente, los efectos secundarios sistémicos del Sr han sido los responsables de una disminución del interés de la comunidad científica en la ingesta de este producto, y de un cambio en la aplicación local de este elemento²⁹⁰⁻²⁹². La revisión de Neves *et al.*³⁰⁰ encontró únicamente cuatro estudios sobre la repercusión sistémica de la aplicación del Sr de forma local. Mientras que uno de los estudios describe niveles mayores de Sr en muestras de orina y sangre³¹⁹, otro mostró una excreción urinaria similar de este elemento³²³. Los otros dos estudios no encontraron diferencias entre los grupos experimentales y los de control^{294,316}. Uno de los estudios describió valores mayores de Sr sérico, aunque los autores afirman que la concentración era 100 veces menor que la necesaria para producir efectos sistémicos²⁹⁴. Sin embargo, los efectos patológicos de estos hallazgos no son bien conocidos y aún son tema de debate para futuros estudios. Un total de 13 estudios informaron sobre los efectos locales, pero no se encontraron diferencias con respecto al control, y solo un estudio halló un aumento de la reacción inflamatoria. Además, el breve seguimiento de la mayoría de los estudios afecta a la capacidad de sacar conclusiones fiables sobre el efecto adverso a largo plazo del Sr. En conclusión, a la vista de su revisión, Neves *et al.*³⁰⁰ afirman que el Sr es un material de dopaje aparentemente seguro y efectivo para estimular la formación y remodelación ósea. Su efecto puede ser mayor y variable con el tiempo según la concentración aplicada. Además, su beneficio en modelos osteoporóticos aumenta la posibilidad de su valor terapéutico. Sin embargo, la gran cantidad de métodos, mediciones y protocolos encontrados en los estudios individuales incapacita el poder realizar una síntesis y análisis de datos confiables sobre el efecto del Sr. Es importante desarrollar modelos adecuados y seguir ciertas pautas de investigación en los estudios futuros, a fin de definir mejor la aplicación terapéutica de este elemento.

Por otro lado, el calcio es uno de los elementos más abundantes en el cuerpo humano y está involucrado en los múltiples procesos que se desarrollan en el organismo³²⁴. En este sentido, el tejido óseo es el mayor reservorio de calcio en el cuerpo, siendo uno de los principales componentes de la apatita biológica, la fase inorgánica de los huesos²⁸⁵. Con todo, su papel en la remodelación y recuperación del tejido óseo es fundamental³²⁵. El calcio, juega un papel esencial en la formación y resorción ósea, y en la coagulación de la sangre³²⁶. Las plaquetas son fundamentales en los procesos de hemostasia y coagulación sanguínea que preceden a la reparación del tejido. El calcio media la unión de los fosfolípidos de la membrana plaquetaria al factor Xa y al factor IXa, que son

necesarios para que funcionen los complejos de tenasa y protrombinasa. Estos complejos convierten la protrombina en trombina (factor IIa), lo que desencadena aún más la polimerización de la fibrina. Se ha demostrado que los iones de calcio en las superficies de TiO₂ pueden producir la activación de las plaquetas y la exocitosis de los gránulos plaquetarios, tanto densos como alfa³²⁷. La presencia de Ca en la superficie del implante también mejora la tasa de adsorción de proteínas, y actúa como sitio de unión para las proteínas en la superficie, proporcionando la principal fuerza impulsora para la adsorción de estas³²⁸. Ha sido ampliamente utilizado en el desarrollo de biomateriales para la ingeniería de tejidos óseos³²⁹ porque juega un papel esencial en la formación y resorción ósea.

Algunos estudios realizados con biomateriales dopados con sales de calcio han concluido que la liberación de estas confiere una bioactividad importante al biomaterial. Además, la utilización de andamios de fosfato cálcico, ayuda a la diferenciación de las células madre mesenquimales en la formación de nuevo hueso³³⁰. Del mismo modo, una alta concentración de calcio estimula la hormona paratiroidea (PTH) que mejora la osteogénesis, estimulando diferentes tipos de células como los preosteoblastos, los osteoblastos y los macrófagos, entre otras³³⁰. El calcio extracelular tiene un efecto estimulante sobre los osteoblastos mediante la activación del receptor sensor de calcio (CaR) que regula la actividad de estos y de los osteoclastos³³¹. De hecho, la activación de los canales de calcio se ha relacionado con el aumento de las expresiones de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-I o IGF-II) que regulan la proliferación de los osteoblastos³³². Otros estudios también han revelado que la presencia de calcio produce una sobreexpresión de marcadores osteogénicos como colágeno tipo I, la ALP, la BMP-2, la osteopontina y la osteocalcina³³³, creando un efecto positivo en la proliferación osteoblástica y en la remodelación ósea³³⁴. Sin embargo, estos efectos dependen de la concentración de calcio, ya que bajas concentraciones de este son adecuadas para la proliferación de osteoblastos, pero concentraciones altas favorecen la diferenciación y mineralización de estos³³⁵. Finalmente, el calcio tiene un papel importante en la formación de coágulos que también afectan al proceso de regeneración del tejido³³⁶.

Por lo tanto, este comportamiento hace interesante la incorporación de estos cationes en los recubrimientos sol-gel, con el objetivo de desarrollar materiales bioactivos con funcionalidades específicas.

1.10. Antecedentes del grupo

Nuestro grupo de investigación ha trabajado durante los últimos 10 años en aspectos relacionados con la regeneración ósea en el entorno de implantes, específicamente implantes dentales. La actividad investigadora se ha centrado en la obtención de recubrimientos a partir de la técnica sol-gel para ser aplicados sobre los implantes dentales y poder lograr una mejora en su osteointegración. Así destacan los trabajos publicados con distintos tipos de alcoxisilanos: recubrimientos híbridos a partir de tetraetoxisilano (TEOS) y viniltrietoxisilano (VTES)^{279,337}, y de metiltrimetoxisilano (MTMOS) y TEOS^{281,338}. Entre los recubrimientos utilizados es reseñable el uso de formulaciones que incorporaban el 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMS): aquellos sintetizados a partir de MTMOS y GPTMS³³⁹, y otros basados en MTMOS, TEOS y GPTMS³⁴⁰. Este último, el GPTMS, es uno de los más empleados en el desarrollo de materiales híbridos³⁴¹ y se utiliza cada vez más en la ingeniería de tejidos óseos³⁴² ya que tiene un anillo epoxi en su estructura que permite funcionalizar el biomaterial y modificar sus propiedades fisicoquímicas³⁴³. Además, este anillo susceptible a un ataque nucleófilo facilita la incorporación de moléculas orgánicas, como pueden ser los principios activos osteogénicos, en la red mediante enlaces covalentes³⁴⁴. No obstante, a pesar de los prometedores resultados *in vitro* obtenidos en nuestro grupo²⁸¹ y tras haber dopado el recubrimiento con sales de Sr³⁴⁵ y Ca³⁴⁶, investigaciones realizadas posteriormente concluyeron que altas concentraciones de GPTMS mostraban un efecto inflamatorio que podría perjudicar la biocompatibilidad de los recubrimientos³⁴⁷. En el estudio proteómico se observó una mayor afinidad de las proteínas relacionadas con el sistema del complemento cuanto mayor era el porcentaje de GPTMS. La adsorción significativamente mayor de la ficolina-2 (FCN2) y de la proteína C-reactiva (CRP), dos activadores principales de distintas vías del complemento (de lectinas y clásica, respectivamente), muestra que esta formulación tiene un mayor potencial para desencadenar una mayor respuesta inflamatoria³⁴⁸. En un intento de evitar la señalización de inflamación de los recubrimientos base utilizados para realizar la liberación controlada de distintos iones y moléculas, se probó la formulación con una relación molar de MTMOS del 70 % y de TEOS del 30 %, que mostró resultados prometedores tanto *in vitro* como *in vivo*²⁸¹. Los estudios *in vitro* presentaron una mayor proliferación y mineralización para este recubrimiento, mientras que los ensayos *in vivo* manifestaron que dicho recubrimiento parece mejorar la capacidad de regeneración ósea ya que se da

una formación más temprana de nuevas espículas óseas. Además, los parámetros de respuesta del organismo frente a un cuerpo extraño estudiados, como el estado de la médula ósea, la presencia de células gigantes y la evolución de la cápsula fibrosa, demostraron la biocompatibilidad de los materiales desarrollados y su potencial uso en terapia dental.

2. Objetivos

A la vista de esta revisión, uno de los desafíos en la investigación de materiales consiste en desarrollar materiales y/o superficies que incrementen la tasa de éxito de los implantes dentales, pudiendo además recortar los tiempos de recuperación de la funcionalidad, así como su universalización, es decir, que sea posible la implantación en aquellos pacientes que tengan mayores dificultades de regeneración ósea bien debido a la edad o a cualquier enfermedad que pueda interferir negativamente en este proceso, ampliando así el abanico de pacientes potenciales de llevar implantes dentales y mejorar su funcionalidad bucodental y calidad de vida.

En ambos casos, promover el proceso de osteointegración del implante es la mejor solución. Entre las alternativas para encarar las posibles soluciones y con el fin de evitar las limitaciones anteriores, una de las opciones más interesantes es la modificación de las superficies metálicas mediante recubrimientos que consigan la mejora de la osteointegración. Así, el objetivo general de esta tesis doctoral es el **desarrollo de recubrimientos osteoinductores biofuncionales, obtenidos vía sol-gel, que promuevan la osteointegración del implante dental, utilizando la caracterización proteómica para anticipar la respuesta *in vivo*.**

Para conseguir este objetivo, se plantean diferentes vías de actuación que se complementan entre sí y constituyen los tres objetivos específicos del trabajo:

- Desarrollo de nuevos recubrimientos biocompatibles, que promuevan procesos de regeneración ósea. Para ello se adicionarán sales de estroncio y de calcio sobre el recubrimiento base que actuará como vehículo de liberación controlada.

- Caracterización de las propiedades fisicoquímicas, así como de la biocompatibilidad (mediante proteómica y experimentación *in vitro* e *in vivo*) de cada uno de los recubrimientos desarrollados.
- Establecimiento de correlaciones entre los patrones de proteínas adheridas al biomaterial y los respectivos patrones biológicos *in vitro*, para establecer biomarcadores proteínicos capaces de anticipar la respuesta del material *in vivo*.

Con estos objetivos se pretende, además de desarrollar recubrimientos que promuevan la osteointegración de los implantes dentales, predecir el comportamiento *in vivo* de los biomateriales, mediante la identificación de las proteínas adsorbidas en las diferentes superficies, realizando una caracterización más rápida y reduciendo la experimentación animal. En suma, se trata de validar una nueva metodología basada en el desarrollo de nuevos sistemas para poder acelerar sus ensayos clínicos y comercialización final.

3. Diseño Experimental

El diseño experimental llevado a cabo para la consecución de estos objetivos se esquematiza en la siguiente figura:

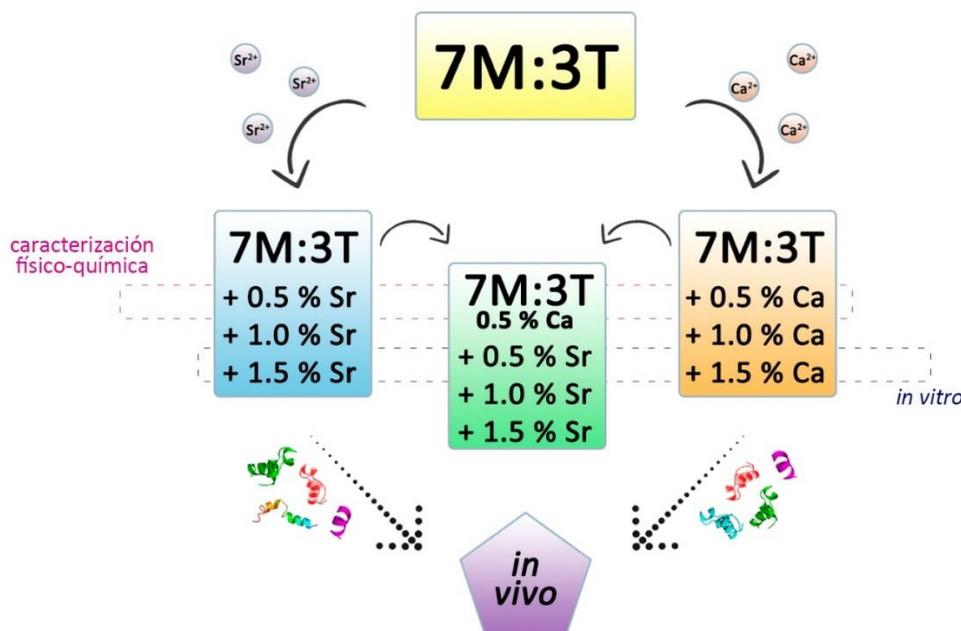


Figura 1.14. Representación esquemática del diseño experimental.

El primer paso para lograr el objetivo final es protocolizar el desarrollo de los diferentes recubrimientos híbridos sol-gel y su caracterización físico-química, proteómica y biológica *in vitro* para así optimizar el uso de estos como vehículos de liberación de compuestos osteogénicos (**Capítulo 2**).

En el **Capítulo 3** se dopa el recubrimiento híbrido sol-gel 7M:3T, desarrollado anteriormente por nuestro grupo de investigación, con distintas cantidades del compuesto osteogénico SrCl₂. Tras la caracterización inicial, se realiza el análisis proteómico para identificar el cambio de proteínas adheridas al recubrimiento por el efecto de la adición de Sr. También se evalúan los efectos del aumento del contenido de Sr en los ensayos *in vitro* (PCR y ELISA) con osteoblastos y macrófagos.

Tras la incorporación de Sr, el Ca es el protagonista en el **Capítulo 4**. Aquí se adicionan concentraciones crecientes de CaCl₂ en la red sol-gel de silicio. Después de las primeras caracterizaciones, se analizan las proteínas adsorbidas en estas superficies modificadas con Ca para reconocer cuáles son aquellas que se han adherido preferentemente. Igualmente se estudia el comportamiento *in vitro* de los nuevos biomateriales en contacto con las células.

La estrategia utilizada para detectar la validez de los biomateriales basada en conocer cómo varían los patrones de proteínas en nuevos biomateriales se vuelve a utilizar en el **Capítulo 5**, incorporando diferentes proporciones de Sr y una cantidad fija de Ca. También se realizan los diferentes ensayos físico-químicos y se analiza el comportamiento *in vitro* con respecto al potencial osteogénico de los recubrimientos sintetizados.

Finalmente, en el **Capítulo 6**, se efectúa una evaluación biológica de las consecuencias locales después de la implantación *in vivo*. Para ello se realizan estudios histológicos, de biocompatibilidad e histomorfométricos de los biomateriales sintetizados. Este tipo de experimentación es un paso necesario y previo a los ensayos clínicos a realizar antes de su posible comercialización.

Referencias

1. Envejecimiento Naciones Unidas. <https://www.un.org/es/sections/issues-depth/ageing/index.html>.
2. H2020. <http://eshorizonte2020.cdti.es/index.asp?MP=87&MS=715&MN=2>.
3. Next, T. H. E. Horizon Europe - Investing to shape our future. (2019).
4. Larry L, H. & Julia M, P. Third-generation biomedical materials. *Science (80-)*. **295**, 1014–1017 (2002).
5. Williams, D. F. There is no such thing as a biocompatible material. *Biomaterials* **35-38**, 10009–10014 (2014).
6. Schacht, E. *Biomaterials. Verhandelingen - Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België* vol. 66 (2004).
7. Williams, D. F. *The Williams Dictionary of Biomaterials*. (Liverpool University Press, 1999). doi:10.5949/UPO9781846314438.
8. Williams, D. F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* **30**, 5897–5909 (2009).
9. Collignon, A. M., Lesieur, J., Vacher, C., Chaussain, C. & Rochefort, G. Y. Strategies developed to induce, direct, and potentiate bone healing. *Front. Physiol.* **8**, 1–8 (2017).
10. Ratner, B. D. & Bryant, S. J. Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **6**, 41–75 (2004).
11. Hench, L. L. Biomaterials. *Science (80-)*. **208**, 826 LP – 831 (1980).
12. Huebsch, N. & Mooney, D. J. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature* **462**, 426–432 (2009).
13. Hench, L. L. & Thompson, I. Twenty-first century challenges for biomaterials. *J. R. Soc. Interface* **7**, (2010).
14. Hench, L. L. Biomaterials: A forecast for the future. *Biomaterials* **19**, 1419–1423 (1998).
15. Hench, L. L. & Wilson, J. Surface-active biomaterials. *Science (80-)*. **226**, 630 LP – 636 (1984).
16. Burns, J. W. Biology takes centre stage. *Nat. Mater.* **8**, 441–443 (2009).
17. Anderson, J. M., Rodriguez, A. & Chang, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin. Immunol.* **20**, 86–100 (2008).
18. Hutmacher, D. W. Regenerative medicine will impact, but not replace, the medical device industry. *Expert Rev. Med. Devices* **3**, 409–412 (2006).
19. Anderson, D. G., Burdick, J. A. & Langer, R. Smart Biomaterials. *Science (80-)*. **305**, 1923 LP – 1924 (2004).
20. Boyan, B. D. & Schwartz, Z. Are calcium phosphate ceramics ‘smart’ biomaterials? *Nat. Rev. Rheumatol.* **7**, 8–9 (2011).
21. Furth, M. E., Atala, A. & Van Dyke, M. E. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials* **28**, 5068–5073 (2007).
22. Mieszawska, A. J. & Kaplan, D. L. Smart biomaterials - regulating cell behavior through signaling molecules. *BMC Biol.* **8**, 2–4 (2010).

23. Yuan, H. *et al.* ‘Smart’ biomaterials and osteoinductivity. *Nat. Rev. Rheumatol.* **7**, 1 (2011).
24. Holzapfel, B. M. *et al.* How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 581–603 (2013).
25. Place, E. S., Evans, N. D. & Stevens, M. M. Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nat. Mater.* **8**, 457–470 (2009).
26. Jakob, F. *et al.* In situ guided tissue regeneration in musculoskeletal diseases and aging: Implementing pathology into tailored tissue engineering strategies. *Cell Tissue Res.* **347**, 725–735 (2012).
27. Rosso, F., Giordano, A., Barbarisi, M. & Barbarisi, A. From Cell-ECM Interactions to Tissue Engineering. *J. Cell. Physiol.* **199**, 174–180 (2004).
28. Williams, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* **29**, 2941–2953 (2008).
29. Ratner, B. D. The biocompatibility manifesto: Biocompatibility for the twenty-first century. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **4**, 523–527 (2011).
30. Corada, E. S. España es líder en implantología a nivel mundial. (2017).
31. El problema de la periimplantitis en España: haciendo memoria. https://www.sepa.es/web_update/el-problema-de-la-periimplantitis-en-espana-haciendo-memoria/ (2019).
32. Henkel, J. *et al.* Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions-A 21st Century Perspective. *Bone Res.* **1**, 216–248 (2013).
33. Gurav, N., Buranawat, B. & Di Silvio, L. Biological Characterization of Biomaterials: In vitro Tests. in *Surface Tailoring of Inorganic Materials for Biomedical Applications* (eds. Rimondini, L., Bianchi, C. & Vernè, E.) 207–223 (2012). doi:10.2174/978160805462611201010207.
34. Hulsart-Billström, G. *et al.* A surprisingly poor correlation between in vitro and in vivo testing of biomaterials for bone regeneration: Results of a multicentre analysis. *Eur. Cells Mater.* **31**, 312–322 (2016).
35. D.O.U.E. Directiva 2010/63/UE. *D.O.U.E. L* **276**, 33–79 (2010).
36. Kohli, N. *et al.* Bone remodelling in vitro: Where are we headed?: -A review on the current understanding of physiological bone remodelling and inflammation and the strategies for testing biomaterials in vitro. *Bone* **110**, 38–46 (2018).
37. Bailey, J., Thew, M. & Balls, M. An Analysis of the Use of Animal Models in Predicting Human Toxicology and Drug Safety. *Altern. to Lab. Anim.* **42**, 181–199 (2014).
38. Duval, K. *et al.* Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology* **32**, 266–277 (2017).
39. Justice, B. A., Badr, N. A. & Felder, R. A. 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays. *Drug Discov. Today* **14**, 102–107 (2009).
40. Allen, L. T. *et al.* Surface-induced changes in protein adsorption and implications for cellular phenotypic responses to surface interaction. *Biomaterials* **27**, 3096–3108 (2006).

41. Othman, Z., Cillero Pastor, B., van Rijt, S. & Habibovic, P. Understanding interactions between biomaterials and biological systems using proteomics. *Biomaterials* **167**, 191–204 (2018).
42. Stevens, M. M. Biomaterials for bone Materials that enhance bone regeneration have a wealth of potential. *Bone* **11**, 18–25 (2008).
43. Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J. & Cerri, P. S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res. Int.* **2015**, (2015).
44. Hadjidakis, D. J. & Androulakis, I. I. Bone remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1092**, 385–396 (2006).
45. Liao, X. *et al.* Bone Physiology, Biomaterial and the Effect of Mechanical/Physical Microenvironment on MSC Osteogenesis: A Tribute to Shu Chien's 80th Birthday. *Cell. Mol. Bioeng.* **4**, 579–590 (2011).
46. Krishnan, V., Vogler, E. A., Sosnoski, D. M. & Mastro, A. M. In vitro mimics of bone remodeling and the vicious cycle of cancer in bone. *J. Cell. Physiol.* **229**, 453–462 (2014).
47. Trindade, R., Albrektsson, T., Tengvall, P. & Wennerberg, A. Foreign Body Reaction to Biomaterials: On Mechanisms for Buildup and Breakdown of Osseointegration. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* **18**, 192–203 (2016).
48. Claes, L., Recknagel, S. & Ignatius, A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat. Rev. Rheumatol.* **8**, 133–143 (2012).
49. Villar, C. C., Huynh-Ba, G., Mills, M. P. & Cochran, D. L. Wound healing around dental implants. *Endod. Top.* **25**, 44–62 (2011).
50. Salvi, G. E. *et al.* Temporal sequence of hard and soft tissue healing around titanium dental implants. *Periodontol. 2000* **68**, 135–152 (2015).
51. Branemark, P.-I. Osseointegration and its experimental background. *J. Prosthet. Dent.* **50**, 399–410 (1983).
52. Schenk, R. K. & Buser, D. Osseointegration: a reality. *Periodontol. 2000* **17**, 22–35 (1998).
53. Xiao, W. *et al.* Bone Remodeling Under Pathological Conditions. in *Frontiers of Oral Biology* vol. 18 17–27 (2015).
54. Colnot, C. *et al.* Molecular analysis of healing at a bone-implant interface. *J. Dent. Res.* **86**, 862–867 (2007).
55. Bosshardt, D. D., Chappuis, V. & Buser, D. Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: current knowledge and open questions. *Periodontology 2000* vol. 73 22–40 (2017).
56. Gretzer, C. *et al.* The inflammatory cell influx and cytokines changes during transition from acute inflammation to fibrous repair around implanted materials. **5063**, (2012).
57. Luttkhuizen, D. T., Harmsen, M. C. & Luyn, M. J. A. Van. Cellular and Molecular Dynamics in the Foreign Body Reaction. *Tissue Eng.* **12**, 1955–1970 (2006).
58. Wang, K., Zhou, C., Hong, Y. & Zhang, X. A review of protein adsorption on bioceramics. *Interface Focus* vol. 2 259–277 (2012).
59. Maskarinec, S. A. & Tirrell, D. A. Protein engineering approaches to biomaterials design. *Current Opinion in Biotechnology* vol. 16 422–426 (2005).
60. Ratner, B. D. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine.* Elsevier (Elsevier, 2004).

61. Vogler, E. A. Protein adsorption in three dimensions. *Biomaterials* **33**, 1201–1237 (2012).
62. Schulz, G. E. & Schirmer, R. H. Principles of protein structure. (1979).
63. Meylan, E., Tschopp, J. & Karin, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* **442**, 39–44 (2006).
64. Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C. & Jaillon, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* vol. 11 519–531 (2011).
65. Kolaczowska, E. & Kuberski, P. Neutrophil recruitment and function. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159–175 (2013).
66. Anderson, J. M. Inflammatory Response to Implants. *ASAIO J.* **34**, 101–107 (1988).
67. Xia, Z. & Jiang, T. A review on macrophage responses to biomaterials. *Biomed. Mater.* **1**, 1–9 (2006).
68. Sheikh, Z., Brooks, P. J., Barzilay, O., Fine, N. & Glogauer, M. Macrophages, foreign body giant cells and their response to implantable biomaterials. *Materials (Basel)*. **8**, 5671–5701 (2015).
69. Rahmati, M. & Mozafari, M. A critical review on the cellular and molecular interactions at the interface of zirconia-based biomaterials. *Ceram. Int.* **44**, 16137–16149 (2018).
70. Hotaling, N. A., Tang, L., Irvine, D. J. & Babensee, J. E. Biomaterial Strategies for Immunomodulation. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **17**, 317–349 (2015).
71. Williams, D. F. Tissue-biomaterial interactions. *J. Mater. Sci.* **22**, 3421–3445 (1987).
72. Albrektsson, T. & Johansson, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur. Spine J.* **10**, S96–S101 (2001).
73. Terheyden, H., Lang, N. P., Bierbaum, S. & Stadlinger, B. Osseointegration – communication of cells. *Clin. Oral Implants Res.* **23**, 1127–1135 (2012).
74. Raffaini, G. & Ganazzoli, F. Understanding the performance of biomaterials through molecular modeling: Crossing the bridge between their intrinsic properties and the surface adsorption of proteins. *Macromol. Biosci.* **7**, 552–566 (2007).
75. Rabe, M., Verdes, D. & Seeger, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **162**, 87–106 (2011).
76. Young, B. R., Pitt, W. G. & Cooper, S. L. Protein adsorption on polymeric biomaterials: II. Adsorption kinetics. *J. Colloid Interface Sci.* **125**, 246–260 (1988).
77. Latour, R. Biomaterials: Protein–Surface Interactions. *Encycl Biomater Biomed Eng* **1**, 270–278 (2005).
78. Lynch, I. *et al.* The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. *Adv. Colloid Interface Sci.* **134–135**, 167–174 (2007).
79. Wei, Q. *et al.* Protein interactions with polymer coatings and biomaterials. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **53**, 8004–8031 (2014).
80. Wilson, C. J., Clegg, R. E., Leavesley, D. I. & Pearcy, M. J. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: A review. *Tissue Eng.* **11**, 1–18 (2005).

81. Krishnan, A., Siedlecki, C. A. & Vogler, E. A. Mixology of protein solutions and the Vroman effect. *Langmuir* **20**, 5071–5078 (2004).
82. Vroman, L. & Adams, A. L. Identification of rapid changes at plasma–solid interfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* **3**, 43–67 (1969).
83. Park, J. Y. & Davies, J. E. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clin. Oral Implants Res.* **11**, 530–539 (2000).
84. Firkowska-Boden, I., Zhang, X. & Jandt, K. D. Controlling Protein Adsorption through Nanostructured Polymeric Surfaces. *Adv. Healthc. Mater.* **7**, 1–19 (2018).
85. Kastantin, M., Langdon, B. B. & Schwartz, D. K. A bottom-up approach to understanding protein layer formation at solid-liquid interfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **207**, 240–252 (2014).
86. Dee, K. C., Puleo, D. A. & Bizios, R. *An introduction to tissue-biomaterial interactions.* John Wiley & Sons (Wiley-Liss, 2003).
87. Rimola, A., Corno, M., Garza, J. & Ugliengo, P. Ab initio modelling of protein-biomaterial interactions: Influence of amino acid polar side chains on adsorption at hydroxyapatite surfaces. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **370**, 1478–1498 (2012).
88. Anand, G., Sharma, S., Dutta, A. K., Kumar, S. K. & Belfort, G. Conformational transitions of adsorbed proteins on surfaces of varying polarity. *Langmuir* **26**, 10803–10811 (2010).
89. Koutsoukos, P. G., Norde, W. & Lyklema, J. Protein adsorption on hematite (α -Fe₂O₃) surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **95**, 385–397 (1983).
90. Vladkova, T. G. *Surface engineering of polymeric biomaterials.* (Smithers Rapra, 2013).
91. Kim, J. Protein adsorption on polymer particles. *J. Biomed. Mater. Res.* **21**, 4373–4381 (2002).
92. Ouberaï, M. M., Xu, K. & Welland, M. E. Effect of the interplay between protein and surface on the properties of adsorbed protein layers. *Biomaterials* **35**, 6157–6163 (2014).
93. Ahmad, S., Kumar, V., Ramanand, K. B. & Rao, N. M. Probing protein stability and proteolytic resistance by loop scanning: A comprehensive mutational analysis. *Protein Sci.* **21**, 433–446 (2012).
94. Tiana, G. Understanding the determinants of stability and folding of small globular proteins from their energetics. *Protein Sci.* **13**, 113–124 (2004).
95. Saptarshi, S. R., Duschl, A. & Lopata, A. L. Interaction of nanoparticles with proteins: Relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J. Nanobiotechnology* **11**, 1–12 (2013).
96. Chinn, J. A. & Slack, S. M. Biomaterials: Protein Surface Interactions. *Biomed. Eng. Handbook. Boca Rat. CRC Press LLC* 1597–1608 (2000).
97. Harrison, E. T., Weidner, T., Castner, D. G. & Interlandi, G. Predicting the orientation of protein G B1 on hydrophobic surfaces using Monte Carlo simulations. *Biointerphases* **12**, 02D401 (2017).
98. Hashmi, S. *Comprehensive materials processing.* (Newnes, 2014).
99. Quinn, A., Mantz, H., Jacobs, K., Bellion, M. & Santen, L. Protein adsorption kinetics in different surface potentials. *Epl* **81**, (2008).

100. Spriano, S. *et al.* How do wettability, zeta potential and hydroxylation degree affect the biological response of biomaterials? *Mater. Sci. Eng. C* **74**, 542–555 (2017).
101. Sethuraman, A., Han, M., Kane, R. S. & Belfort, G. Effect of surface wettability on the adhesion of proteins. *Langmuir* **20**, 7779–7788 (2004).
102. Silva-Bermudez, P. & Rodil, S. E. An overview of protein adsorption on metal oxide coatings for biomedical implants. *Surf. Coatings Technol.* **233**, 147–158 (2013).
103. Luong-Van, E. *et al.* Review: Micro- and nanostructured surface engineering for biomedical applications. *J. Mater. Res.* **28**, 165–174 (2013).
104. Eriksson, C., Lausmaa, J. & Nygren, H. Interactions between human whole blood and modified TiO₂-surfaces: Influence of surface topography and oxide thickness on leukocyte adhesion and activation. *Biomaterials* **22**, 1987–1996 (2001).
105. Popat, K. C., Leoni, L., Grimes, C. A. & Desai, T. A. Influence of engineered titania nanotubular surfaces on bone cells. *Biomaterials* **28**, 3188–3197 (2007).
106. Oh, S. *et al.* Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO₂ nanotubes. *J Biomed Mater Res* **78A**, 97–103 (2006).
107. Bjursten, L. M. *et al.* Titanium dioxide nanotubes enhance bone bonding in vivo. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **92**, 1218–1224 (2010).
108. Brammer, K. S. *et al.* Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO₂ nanotube surface. *Acta Biomater.* **5**, 3215–3223 (2009).
109. Brett, P. M. *et al.* Roughness response genes in osteoblasts. *Bone* **35**, 124–133 (2004).
110. Bressan, E. *et al.* Nanostructured surfaces of dental implants. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 1918–1931 (2013).
111. McMahon, R. E., Wang, L., Skoracki, R. & Mathur, A. B. Development of nanomaterials for bone repair and regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **101 B**, 387–397 (2013).
112. Tagaya, M., Ikoma, T., Hanagata, N. & Tanaka, J. Analytical investigation of protein mediation between biomaterials and cells. *Mater. Express* **2**, 1–22 (2012).
113. Giambianco, N., Martines, E. & Marletta, G. Laminin adsorption on nanostructures: Switching the molecular orientation by local curvature changes. *Langmuir* **29**, 8335–8342 (2013).
114. Lynch, I. Are there generic mechanisms governing interactions between nanoparticles and cells? Epitope mapping the outer layer of the protein-material interface. *Phys. A Stat. Mech. its Appl.* **373**, 511–520 (2007).
115. Lynch, I. Are there generic mechanisms governing interactions between nanoparticles and cells? Epitope mapping the outer layer of the protein-material interface. *Phys. A Stat. Mech. its Appl.* **373**, 511–520 (2007).
116. Nesargikar, P. N., Spiller, B. & Chavez, R. THE COMPLEMENT SYSTEM: HISTORY, PATHWAYS, CASCADE AND INHIBITORS. **2**, 103–111 (2012).
117. Kerr, M. The complement system. *Biochem. Educ.* **9**, 82–88 (1981).
118. Arumugam, T. V *et al.* Complement mediators in ischemia – reperfusion injury. **374**, 33–45 (2006).

119. Janeway, C. J., Travers, P. & Walport, M. The complement system and innate immunity. in *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* 61–81 (Garland Science, 2001).
120. Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K. & Lambris, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* **11**, 785–797 (2010).
121. Ekdahl, K. N. *et al.* Innate immunity activation on biomaterial surfaces: A mechanistic model and coping strategies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 1042–1050 (2011).
122. Héja, D. *et al.* Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. **109**, (2012).
123. Xiao, Y., Shiu, H., Goss, B., Lutton, C. & Crawford, R. Formation of Blood Clot on Biomaterial Implants Influences Bone Healing. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **20**, (2014).
124. G, C. & S, F. The Two Faces of Thrombosis: Coagulation Cascade and Platelet Aggregation. Are Platelets the Main Therapeutic Target? *J. Thromb. Circ. Open Access* **03**, (2017).
125. Bouchard, B. A. & Tracy, P. B. Platelets, leukocytes, and coagulation. *Curr. Opin. Hematol.* **8**, (2001).
126. Ernofsson, M., Thelin, S. & Siegbahn, A. Monocyte tissue factor expression, cell activation, and thrombin formation during cardiopulmonary bypass: A clinical study. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **113**, 576–584 (1997).
127. Fréchette, J. P., Martineau, I. & Gagnon, G. Platelet-rich plasmas: Growth factor content and roles in wound healing. *J. Dent. Res.* **84**, 434–439 (2005).
128. Hall, J. E. *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. (Elsevier Health Sciences, 2010).
129. Palta, S., Saroa, R. & Palta, A. Overview of the coagulation system. *Indian J. Anaesth.* **58**, 515–523 (2014).
130. Triplett, D. Coagulation and Bleeding Disorders: Review and Update. *Clin. Chem.* **46**, 1260–1269 (2000).
131. Monroe, D. M. & Hoffman, M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 41–48 (2006).
132. Lerner, U. H. Regulation of bone metabolism by the kallikrein-kinin system, the coagulation cascade, and the acute-phase reactants. *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol.* **78**, 481–493 (1994).
133. Xu, L. C., Bauer, J. W. & Siedlecki, C. A. Proteins, platelets, and blood coagulation at biomaterial interfaces. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **124**, 49–68 (2014).
134. Ariëns, R. A. S. Novel mechanisms that regulate clot structure/function. *Thromb. Res.* **141**, S25–S27 (2016).
135. Hong, J., Azens, A., Ekdahl, K. N., Granqvist, C. G. & Nilsson, B. Material-specific thrombin generation following contact between metal surfaces and whole blood. *Biomaterials* **26**, 1397–1403 (2005).
136. Hong, J. *et al.* Titanium is a highly thrombogenic biomaterial: possible implications for osteogenesis. *Thromb. Haemost.* **82**, 58–64 (1999).
137. Hulander, M. *et al.* Blood interactions with noble metals: Coagulation and immune complement activation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **1**, 1053–1062 (2009).

138. Chu, A. J. Blood coagulation as an intrinsic pathway for proinflammation: A mini review. *Inflamm. Allergy - Drug Targets* **9**, 32–44 (2010).
139. Sanchez, J., Lundquist, P., Elgue, G. & Olsson, P. Measuring the degree of plasma contact activation induced by artificial materials. *Thromb. Res.* **105**, 407–412 (2002).
140. Ziedins, K. & Mann, K. Molecular Basis of Blood Coagulation. in *Hematology (Seventh Edition)* 1885–1905 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-323-35762-3.00126-8.
141. Weidmann, H. *et al.* The plasma contact system, a protease cascade at the nexus of inflammation, coagulation and immunity. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1864**, 2118–2127 (2017).
142. Markiewski, M. M., Nilsson, B., Nilsson Ekdahl, K., Mollnes, T. E. & Lambris, J. D. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends Immunol.* **28**, 184–192 (2007).
143. Chapin, J. C. & Hajjar, K. A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev.* **29**, 17–24 (2015).
144. Kolev, K. & Longstaff, C. Bleeding related to disturbed fibrinolysis. *Br. J. Haematol.* **175**, 12–23 (2016).
145. Baratloo, A. *et al.* Tissue Plasminogen Activator: A Literature Review. *Arch. Neurosci.* **3**, (2016).
146. Jennewein, C. *et al.* Novel aspects of fibrin(ogen) fragments during inflammation. *Mol. Med.* **17**, 568–573 (2011).
147. Pandi, L. *et al.* Two families of synthetic peptides that enhance fibrin turbidity and delay fibrinolysis by different mechanisms. *Biochemistry* **48**, 7201–7208 (2009).
148. Folkman, J. & Shing, Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* **267**, 10931–10934 (1992).
149. Hoeben, A. N. N. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol. Rev.* **56**, 549–580 (2004).
150. Serra, H. *et al.* PTEN mediates Notch-dependent stalk cell arrest in angiogenesis. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
151. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**, 298–307 (2011).
152. McMahon, G. A. *et al.* Plasminogen Activator Inhibitor-1 Regulates Tumor Growth and Angiogenesis *. **276**, 33964–33968 (2001).
153. Triffitt, J. T., Joyner, C. J., Oreffo, R. O. C. & Virdi, A. S. Osteogenesis: Bone development from primitive progenitors. in *Biochemical Society Transactions* vol. 26 21–27 (1998).
154. Majidinia, M., Sadeghpour, A. & Yousefi, B. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. *J. Cell. Physiol.* **233**, 2937–2948 (2018).
155. Hayrapetyan, A., Jansen, J. A. & van den Beucken, J. J. J. P. Signaling Pathways Involved in Osteogenesis and Their Application for Bone Regenerative Medicine. *Tissue Eng. Part B Rev.* **21**, 75–87 (2014).
156. Senarath-Yapa, K., Li, S., Meyer, N. P., Longaker, M. T. & Quarto, N. Integration of multiple signaling pathways determines differences in the osteogenic potential and tissue regeneration of neural crest-derived and mesoderm-derived calvarial bones. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 5978–5997 (2013).

157. Kirkham, G. & Cartmell, S. Genes and Proteins Involved in the Regulation of Osteogenesis. *Top. Tissue Eng.* **3**, 1–22 (2007).
158. Pope, F. M., Nicholls, A. C., McPheat, J., Talmud, P. & Owen, R. Collagen genes and proteins in osteogenesis imperfecta. *J. Med. Genet.* **22**, 466–478 (1985).
159. Nicolin, V., De Iaco, D. & Valentini, R. Osteoimmunology represents a link between skeletal and immune system. *Ital. J. Anat. Embryol.* **121**, 37–42 (2016).
160. Ono, T. & Takayanagi, H. Osteoimmunology in Bone Fracture Healing. *Curr. Osteoporos. Rep.* **15**, 367–375 (2017).
161. Amarasekara, D. S. *et al.* Regulation of osteoclast differentiation by cytokine networks. *Immune Netw.* **18**, 1–18 (2018).
162. Nanes, M. S. Osteoimmunology and the Osteoblast. in *Osteoimmunology* 71–81 (Elsevier, 2016).
163. Chen, Z. *et al.* Osteoimmunomodulation for the development of advanced bone biomaterials. *Mater. Today* **19**, 304–321 (2016).
164. Satzer, P., Svec, F., Sekot, G. & Jungbauer, A. Protein adsorption onto nanoparticles induces conformational changes: Particle size dependency, kinetics, and mechanisms. *Eng. Life Sci.* **16**, 238–246 (2016).
165. Chen, H., Yuan, L., Song, W., Wu, Z. & Li, D. Biocompatible polymer materials: Role of protein-surface interactions. *Prog. Polym. Sci.* **33**, 1059–1087 (2008).
166. Lau, K. W., Mak, K. H., Hung, J. S. & Sigwart, U. Clinical impact of stent construction and design in percutaneous coronary intervention. *Am. Heart J.* **147**, 764–773 (2004).
167. Gorbet, M. B. & Sefton, M. V. Biomaterial-associated thrombosis. in *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. Edited by Robert W. Colman, Jack Hirsh, Victor J. Marder and Edwin W. Salzman. J.B. 751 (Lippincott Williams & Wilkins, 2006).
168. Tang, L., Ugarova, T. P., Plow, E. F. & Eaten, J. W. Molecular determinants of acute inflammatory responses to biomaterials. *Trans. Annu. Meet. Soc. Biomater. conjunction with Int. Biomater. Symp.* **1**, 9 (1996).
169. Horbett, T. A. & Brash, J. L. Proteins at Interfaces: an overview. in *Proteins at Interface II: Fundamentals and Applications* 1–23 (American Chemical Society, 1995).
170. Brash, J. L. Role of plasma protein adsorption in the response of blood to foreign surfaces. in *Blood compatible materials and devices: Perspectives towards the 21st century* 3–24 (Technomic, 1991).
171. Deyme, M., Baszkin, A., Proust, J. E., Perez, E. & Boissonnade, M. M. Collagen at interfaces I. In situ collagen adsorption at solution/air and solution/polymer interfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* **20**, 951–962 (1986).
172. Mollmann, S. H., Elofsson, U., Bukrinsky, J. T. & Frokjaer, S. Displacement of adsorbed insulin by tween 80 monitored using total internal reflection fluorescence and ellipsometry. *Pharm. Res.* **22**, 1931–1941 (2005).
173. Huang, Y.-W. & Gupta, V. K. A SPR and AFM study of the effect of surface heterogeneity on adsorption of proteins. *J. Chem. Phys.* **121**, 2264–2271 (2004).
174. Song, S. H. *et al.* Experimental and Numerical Investigation on Impact Performance of Carbon Reinforced Aluminum Laminates. *J. Mater. Sci. Technol.* **26**, 327–332 (2010).

175. Calonder, C., Tie, Y. & Van Tassel, P. R. History dependence of protein adsorption kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 10664–10669 (2001).
176. Lok, B. K., Cheng, Y.-L. & Robertson, C. R. Protein adsorption on crosslinked polydimethylsiloxane using total internal reflection fluorescence. *J. Colloid Interface Sci.* **91**, 104–116 (1983).
177. Sinmazçelik, T., Avcu, E., Bora, M. Ö. & Çoban, O. A review: Fibre metal laminates, background, bonding types and applied test methods. *Mater. Des.* **32**, 3671–3685 (2011).
178. Schmidt, M. P. & Martínez, C. E. Kinetic and conformational insights of protein adsorption onto montmorillonite revealed using in situ ATR-FTIR/2D-COS. *Langmuir* **32**, 7719–7729 (2016).
179. Vaidya, S. S. & Ofoli, R. Y. Adsorption and Interaction of Fibronectin and Human Serum Albumin at the Liquid–Liquid Interface. *Langmuir* **21**, 5852–5858 (2005).
180. Geyer, P. E. *et al.* Plasma proteome profiling to assess human health and disease. *Cell Syst.* **2**, 185–195 (2016).
181. Abbott, A. A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. *Nature* **402**, 715–720 (1999).
182. Pandey, A. & Mann, M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405**, 837–846 (2000).
183. Corthals, G. L., Wasinger, V. C., Hochstrasser, D. F. & Sanchez, J. The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophor. An Int. J.* **21**, 1104–1115 (2000).
184. Rabilloud, T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *PROTEOMICS Int. Ed.* **2**, 3–10 (2002).
185. Derhami, K., Zheng, J., Li, L., Wolfaardt, J. F. & Scott, P. G. Proteomic analysis of human skin fibroblasts grown on titanium: novel approach to study molecular biocompatibility. *J. Biomed. Mater. Res.* **56**, 234–244 (2001).
186. Kim, J., Scott, E. A. & Elbert, D. L. Proteomic analysis of protein adsorption: serum amyloid P adsorbs to materials and promotes leukocyte adhesion. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **75**, 199–209 (2005).
187. Green, R. J., Davies, M. C., Roberts, C. J. & Tendler, S. J. B. Competitive protein adsorption as observed by surface plasmon resonance. *Biomaterials* **20**, 385–391 (1999).
188. Tsai, W., Grunkemeier, J. M. & Horbett, T. A. Human plasma fibrinogen adsorption and platelet adhesion to polystyrene. *J. Biomed. Mater. Res.* **44**, 130–139 (1999).
189. Abdallah, M. N. *et al.* Biomaterial surface proteomic signature determines interaction with epithelial cells. *Acta Biomater.* **54**, 150–163 (2017).
190. O’Farrell, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007–4021 (1975).
191. Pennington, S. R. & Dunn, M. J. *Proteomics: from protein sequence to function.* (Garland Science, 2001).
192. Nice, E. C., Rothacker, J., Weinstock, J., Lim, L. & Catimel, B. Use of multidimensional separation protocols for the purification of trace components in complex biological samples for proteomics analysis. *J. Chromatogr. A* **1168**, 190–210 (2007).
193. Domon, B. & Aebersold, R. Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science (80-.)*. **312**, 212 LP – 217 (2006).

194. Griesser, H. J. *et al.* Surface-MALDI mass spectrometry in biomaterials research. *Biomaterials* **25**, 4861–4875 (2004).
195. Fröhlich, T. & Arnold, G. J. Proteome research based on modern liquid chromatography – tandem mass spectrometry: separation, identification and quantification. *J. Neural Transm.* **113**, 973–994 (2006).
196. Calciolari, E. & Donos, N. The use of omics profiling to improve outcomes of bone regeneration and osseointegration. How far are we from personalized medicine in dentistry? *J. Proteomics* **188**, 85–96 (2018).
197. Power, K. A., Fitzgerald, K. T. & Gallagher, W. M. Examination of cell-host-biomaterial interactions via high-throughput technologies: A re-appraisal. *Biomaterials* **31**, 6667–6674 (2010).
198. Xu, J. *et al.* Comparative proteomics profile of osteoblasts cultured on dissimilar hydroxyapatite biomaterials: An iTRAQ-coupled 2-D LC-MS/MS analysis. *Proteomics* **8**, 4249–4258 (2008).
199. Calciolari, E. *et al.* Protein expression during early stages of bone regeneration under hydrophobic and hydrophilic titanium domes. A pilot study. *J. Periodontal Res.* **53**, 174–187 (2018).
200. Serpooshan, V. *et al.* Protein Corona Influences Cell-Biomaterial Interactions in Nanostructured Tissue Engineering Scaffolds. *Adv. Funct. Mater.* **25**, 4379–4389 (2015).
201. Fröhlich, E. Role of omics techniques in the toxicity testing of nanoparticles. *J. Nanobiotechnology* **15**, 1–22 (2017).
202. Lai, Z. W., Yan, Y., Caruso, F. & Nice, E. C. Emerging techniques in proteomics for probing nano-bio interactions. *ACS Nano* **6**, 10438–10448 (2012).
203. Dodo, C., Senna, P., Custodio, W., Leme, A. & Cury, A. Proteome analysis of the plasma protein layer adsorbed to a rough titanium surface. *Biofouling* **29**, (2013).
204. Oughlis, S. *et al.* Development of proteomic tools to study protein adsorption on a biomaterial, titanium grafted with poly(sodium styrene sulfonate). *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **879**, 3681–3687 (2011).
205. Kaneko, H. *et al.* Proteome analysis of rat serum proteins adsorbed onto synthetic octacalcium phosphate crystals. *Anal. Biochem.* **418**, 276–285 (2011).
206. Sugimoto, K. *et al.* Proteomic analysis of bone proteins adsorbed onto the surface of titanium dioxide. *Biochem. Biophys. Reports* **7**, 316–322 (2016).
207. Swartzlander, M. D. *et al.* Linking the foreign body response and protein adsorption to PEG-based hydrogels using proteomics. *Biomaterials* **41**, 26–36 (2015).
208. Romero-Gavilán, F. *et al.* Proteome analysis of human serum proteins adsorbed onto different titanium surfaces used in dental implants. *Biofouling* **33**, 98–111 (2017).
209. Adell, R., Hansson, B. O., Brånemark, P. I. & Breine, U. Intra-osseous anchorage of dental prostheses: II. Review of clinical approaches. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* **4**, 19–34 (1970).
210. Albrektsson, T. & Wennerberg, A. The impact of oral implants-past and future, 1966-2042. *J. Can Dent Assoc* **71**, 327 (2005).
211. Brånemark, P.-I. *et al.* Intra-osseous anchorage of dental prostheses: I. Experimental studies. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* **3**, 81–100 (1969).

212. Brånemark, P. I. *et al.* Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Suppl.* **16**, 1–132 (1977).
213. Schroeder, A., Stich, H., Straumann, F. & Sutter, F. The accumulation of osteocementum around a dental implant under physical loading. *Schweizerische Monatsschrift für Zahnheilkunde= Rev. Mens. suisse d'odonto-stomatologie* **88**, 1051–1058 (1978).
214. Schulte, W. & Heimke, G. The Tübinger immediate implant. *Quintessenz* **27**, 17–23 (1976).
215. Zarb, G. A. *Proceedings of the Toronto Conference on Osseointegration in Clinical Dentistry*. (Mosby, 1983).
216. Al-Radha, A. S. D., Dymock, D., Younes, C. & O'Sullivan, D. Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion. *J. Dent.* **40**, 146–153 (2012).
217. Tuna, T., Wein, M., Swain, M., Fischer, J. & Att, W. Influence of ultraviolet photofunctionalization on the surface characteristics of zirconia-based dental implant materials. *Dent. Mater.* **31**, e14–e24 (2015).
218. Al-Radha, A. S. D., Younes, C., Diab, B. S. & Jenkinson, H. F. Essential oils and zirconia dental implant materials. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **28**, 1497–1505 (2013).
219. Kohal, R. J. *et al.* Osteoblast and bone tissue response to surface modified zirconia and titanium implant materials. *Dent. Mater.* **29**, 763–776 (2013).
220. RJ, K. & Klaus, G. A zirconia implant-crown system: a case report. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* **24**, 147–153 (2004).
221. Kohal, R.-J., Klaus, G. & Strub, J. R. Zirconia-implant-supported all-ceramic crowns withstand long-term load: a pilot investigation. *Clin. Oral Implants Res.* **17**, 565–571 (2006).
222. Albrektsson, T., Brånemark, P.-I., Hansson, H.-A. & Lindström, J. Osseointegrated Titanium Implants: Requirements for Ensuring a Long-Lasting, Direct Bone-to-Implant Anchorage in Man. *Acta Orthop. Scand.* **52**, 155–170 (1981).
223. Rupp, F., Geis-Gerstorfer, J. & Geckeler, K. E. Dental implant materials: Surface modification and interface phenomena. *Adv. Mater.* **8**, 254–257 (1996).
224. Fickl, S., Kerschull, M., Calvo-Guirado, J. L., Hürzeler, M. & Zuhr, O. Experimental Peri-Implantitis around Different Types of Implants – A Clinical and Radiographic Study in Dogs. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* **17**, e661–e669 (2015).
225. Geckeler, K. E., Rupp, F. & Geis-Gerstorfer, J. Interfaces and interphases of (bio)materials: Definitions, structures, and dynamics. *Adv. Mater.* **9**, 513–518 (1997).
226. Vogler, E. A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **74**, 69–117 (1998).
227. Gristina, A. G. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science (80-.)*. **237**, 1588 LP – 1595 (1987).
228. Wennerberg, A. & Albrektsson, T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin. Oral Implants Res.* **20**, 172–184 (2009).
229. Andrukhov, O. *et al.* Proliferation, behavior, and differentiation of osteoblasts on surfaces of different microroughness. *Dent. Mater.* **32**, 1374–1384 (2016).

230. Baier, R. E., Meyer, A. E., Natiella, J. R., Natiella, R. R. & Carter, J. M. Surface properties determine bioadhesive outcomes: methods and results. *J. Biomed. Mater. Res.* **18**, 337–355 (1984).
231. Kasemo, B. & Lausmaa, J. Biomaterial and implant surfaces: a surface science approach. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **3**, 247–259 (1988).
232. Baier, R. E. The role of surface energy in thrombogenesis. *Bull. N. Y. Acad. Med.* **48**, 257–272 (1972).
233. Kasemo, B. & Lausmaa, J. Material-tissue interfaces: the role of surface properties and processes. *Environ. Health Perspect.* **102**, 41–45 (1994).
234. Schwartz, Z. & Boyan, B. D. Underlying mechanisms at the bone–biomaterial interface. *J. Cell. Biochem.* **56**, 340–347 (1994).
235. Herminghaus, S. Roughness-induced non-wetting. *EPL (Europhysics Lett.)* **52**, 165–170 (2000).
236. Marmur, A. Contact Angle Wettability and Adhesion. in *A guide to the equilibrium contact angles maze* vol. 6 3–18 (Brill/VSP Leiden, 2009).
237. Quéré, D. Wetting and roughness. *Annu. Rev. Mater. Res.* **38**, 71–99 (2008).
238. Rupp, F., Scheideler, L., Rehbein, D., Axmann, D. & Geis-Gerstorfer, J. Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications. *Biomaterials* **25**, 1429–1438 (2004).
239. Rupp, F. *et al.* Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **76**, 323–334 (2006).
240. DePalma, V. A., Baier, R. E., Ford, J. W., Gott, V. L. & Furuse, A. Investigation of three-surface properties of several metals and their relation to blood compatibility. *J. Biomed. Mater. Res.* **6**, 37–75 (1972).
241. Doundoulakis, J. H. Surface analysis of titanium after sterilization: Role in implant-tissue interface and bioadhesion. *J. Prosthet. Dent.* **58**, 471–478 (1987).
242. Baier, R. E. *et al.* Radiofrequency gas plasma (glow discharge) disinfection of dental operative instruments, including handpieces. *J. Oral Implantol.* **18**, 236–242 (1992).
243. Baier, R. E. & Meyer, A. E. Implant surface preparation. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **3**, 9–20 (1988).
244. Giljean, S., Bigerelle, M., Anselme, K. & Haidara, H. New insights on contact angle/roughness dependence on high surface energy materials. *Appl. Surf. Sci.* **257**, 9631–9638 (2011).
245. Henningsen, A. *et al.* Photofunctionalization and non-thermal plasma activation of titanium surfaces. *Clin. Oral Investig.* **22**, 1045–1054 (2018).
246. Duske, K. *et al.* Cold atmospheric plasma in combination with mechanical treatment improves osteoblast growth on biofilm covered titanium discs. *Biomaterials* **52**, 327–334 (2015).
247. Duske, K. *et al.* Atmospheric plasma enhances wettability and cell spreading on dental implant metals. *J. Clin. Periodontol.* **39**, 400–407 (2012).
248. Canullo, L. *et al.* Implant abutment cleaning by plasma of argon: 5-year follow-up of a randomized controlled trial. *J. Periodontol.* **87**, 434–442 (2016).

249. Choi, S.-H. *et al.* Time-dependent effects of ultraviolet and nonthermal atmospheric pressure plasma on the biological activity of titanium. *Sci. Rep.* **6**, 33421 (2016).
250. Buser, D. *et al.* Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J. Dent. Res.* **83**, 529–533 (2004).
251. Schwarz, F. *et al.* Potential of chemically modified hydrophilic surface characteristics to support tissue integration of titanium dental implants. *J. Biomed. Mater. Res. Part B* **88**, 544–557 (2009).
252. Kasemo, B. & Lausmaa, J. Biomaterial and implant surfaces: on the role of cleanliness, contamination, and preparation procedures. *J. Biomed. Mater. Res.* **22**, 145–158 (1988).
253. Textor, M., Sittig, C., Frauchiger, V., Tosatti, S. & Brunette, D. M. Properties and biological significance of natural oxide films on titanium and its alloys. in *Titanium in medicine* 171–230 (Springer, 2001).
254. Albrektsson, T. *et al.* Is marginal bone loss around oral implants the result of a provoked foreign body reaction? *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* **16**, 155–165 (2014).
255. Duddeck, D., Maghaireh, H., Faber, F.-J. & Neugebauer, J. SEM surface analyses of 120 sterile-packed implants. *Clin Implant Dent Relat Res* **16**, 817–826 (2014).
256. Hallab, N. J., Bundy, K. J., O'Connor, K., Moses, R. L. & Jacobs, J. J. Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion. *Tissue Eng.* **7**, 55–70 (2001).
257. Zhao, G. *et al.* High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **74**, 49–58 (2005).
258. Kokubo, T. & Takadama, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* **27**, 2907–2915 (2006).
259. Subramani, K. & Mathew, R. T. Titanium Surface Modification Techniques for Dental Implants—From Microscale to Nanoscale. in *Micro and Nano Technologies* (eds. Subramani, K. & Ahmed, W. B. T.-E. N. in D.) 85–102 (William Andrew Publishing, 2012). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-7862-1.00006-7>.
260. Rupp, F., Liang, L., Geis-Gerstorfer, J., Scheideler, L. & Hüttig, F. Surface characteristics of dental implants: A review. *Dent. Mater.* **34**, 40–57 (2018).
261. Klein, L. C., Aparicio, M. & Jitianu, A. T. A.-T. T.-. Handbook of sol-gel science and technology: processing, characterization and applications. (2018) doi:10.1007/978-3-319-32101-1 LK - <https://ehu.on.worldcat.org/oclc/1039717342>.
262. Brinker, C. J., Scherer, G. W. & Scherer, G. W. *Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing. TA - TT* - (Academic Press, 1990).
263. Wang, D. & Bierwagen, G. P. Sol-gel coatings on metals for corrosion protection. *Prog. Org. Coatings* **64**, 327–338 (2009).
264. Ciriminna, R. *et al.* The sol-gel route to advanced silica-based materials and recent applications. *Chem. Rev.* **113**, 6592–6620 (2013).
265. Wright, J. D., Sommerdijk, N. A. J. M. & Wright John D., J. D. W. *Sol-gel materials: chemistry and applications. Advanced chemistry texts; 4 TA - TT* - (CRC Press, 2001).

266. Buckley, A. M. & Greenblatt, M. The sol-gel preparation of silica gels. *J. Chem. Educ.* **71**, 599–602 (1994).
267. Parashar, G., Srivastava, D. & Kumar, P. Ethyl silicate binders for high performance coatings. *Prog. Org. Coatings* **42**, 1–14 (2001).
268. Hofacker, S., Mechtel, M., Mager, M. & Kraus, H. Sol-gel: A new tool for coatings chemistry. *Prog. Org. Coatings* **45**, 159–164 (2002).
269. Brinker, C. J., Hurd, A. J., Schunk, P. R., Frye, G. C. & Ashley, C. S. Review of sol-gel thin film formation. *J. Non. Cryst. Solids* **147–148**, 424–436 (1992).
270. Jitianu, A., Britchi, A., Deleanu, C., Badescu, V. & Zaharescu, M. Comparative study of the sol-gel processes starting with different substituted Si-alkoxides. *J. Non. Cryst. Solids* **319**, 263–279 (2003).
271. Tsuru, K. *et al.* Sol-gel synthesis and in vitro cell compatibility analysis of silicate-containing biodegradable hybrid gels. *Key Eng. Mater.* **361-363 I**, 447–450 (2008).
272. Łączka, M., Cholewa-Kowalska, K. & Osyczka, A. M. Bioactivity and osteoinductivity of glasses and glassceramics and their material determinants. *Ceram. Int.* **42**, 14313–14325 (2016).
273. Gupta, R. & Kumar, A. Bioactive materials for biomedical applications using sol-gel technology. *Biomed. Mater.* **3**, 034005 (2008).
274. Arcos, D. & Vallet-Regí, M. Sol-gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration. *Acta Biomater.* **6**, 2874–2888 (2010).
275. Kim, E. J., Bu, S. Y., Sung, M. K. & Choi, M. K. Effects of silicon on osteoblast activity and bone mineralization of MC3T3-E1 cells. *Biol. Trace Elem. Res.* **152**, 105–112 (2013).
276. Wiens, M. *et al.* The role of biosilica in the osteoprotegerin/RANKL ratio in human osteoblast-like cells. *Biomaterials* **31**, 7716–7725 (2010).
277. Catauro, M., Bollino, F., Papale, F., Ferrara, C. & Mustarelli, P. Silica-polyethylene glycol hybrids synthesized by sol-gel: Biocompatibility improvement of titanium implants by coating. *Mater. Sci. Eng. C* **55**, 118–125 (2015).
278. Catauro, M. *et al.* Silica/quercetin sol-gel hybrids as antioxidant dental implant materials. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **16**, 1–11 (2015).
279. Hernández-Escolano, M. *et al.* Synthesis of hybrid sol-gel materials and their biological evaluation with human mesenchymal stem cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **24**, 1491–1499 (2013).
280. Juan-Díaz, M. J. *et al.* Development of hybrid sol-gel coatings for the improvement of metallic biomaterials performance. *Prog. Org. Coatings* **96**, 42–51 (2016).
281. Martínez-Ibáñez, M. *et al.* Biological characterization of a new silicon based coating developed for dental implants. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **27**, 80 (2016).
282. Avnir, D., Coradin, T., Lev, O. & Livage, J. Recent bio-applications of sol-gel materials. *J. Mater. Chem.* **16**, 1013–1030 (2006).
283. Almeida, J. C. *et al.* A biocompatible hybrid material with simultaneous calcium and strontium release capability for bone tissue repair. *Mater. Sci. Eng. C* **62**, 429–438 (2016).

284. Martínez-Ibañez, M. *et al.* Design of nanostructured siloxane-gelatin coatings: Immobilization strategies and dissolution properties. *J. Non. Cryst. Solids* **481**, 368–374 (2018).
285. Hoppe, A., Güldal, N. S. & Boccaccini, A. R. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* **32**, 2757–2774 (2011).
286. Mouriño, V. & Boccaccini, A. R. Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. *J. R. Soc. Interface* **7**, 209–227 (2010).
287. Bigi, A., Boanini, E., Capuccini, C. & Gazzano, M. Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals. *Inorganica Chim. Acta* **360**, 1009–1016 (2007).
288. Gerstenfeld, S. *et al.* Effect of strontium on bone metabolism in hemodialysis patients. *Nefrol. Publ. Of. la Soc. Esp. Nefrol.* **23**, 52–56 (2003).
289. Li, Z. Y. *et al.* Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite. *Biomaterials* **28**, 1452–1460 (2007).
290. Cooper, C., Fox, K. M. & Borer, J. S. Ischaemic cardiac events and use of strontium ranelate in postmenopausal osteoporosis: a nested case–control study in the CPRD. *Osteoporos. Int.* **25**, 737–745 (2014).
291. Abrahamsen, B., Grove, E. L. & Vestergaard, P. Nationwide registry-based analysis of cardiovascular risk factors and adverse outcomes in patients treated with strontium ranelate. *Osteoporos. Int.* **25**, 757–762 (2014).
292. Reginster, J.-Y. *et al.* Efficacy and safety of currently marketed anti-osteoporosis medications. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **28**, 809–834 (2014).
293. Hulsart-Billström, G. *et al.* Osteogenic potential of Sr-doped calcium phosphate hollow spheres in vitro and in vivo. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **101**, 2322–2331 (2013).
294. Baier, M. *et al.* Strontium enhances osseointegration of calcium phosphate cement: a histomorphometric pilot study in ovariectomized rats. *J. Orthop. Surg. Res.* **8**, 16 (2013).
295. Thormann, U. *et al.* Bone formation induced by strontium modified calcium phosphate cement in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats. *Biomaterials* **34**, 8589–8598 (2013).
296. Ravi, N. D., Balu, R. & Sampath Kumar, T. S. Strontium-substituted calcium deficient hydroxyapatite nanoparticles: synthesis, characterization, and antibacterial properties. *J. Am. Ceram. Soc.* **95**, 2700–2708 (2012).
297. Curran, D. J., Fleming, T. J., Towler, M. R. & Hampshire, S. Mechanical parameters of strontium doped hydroxyapatite sintered using microwave and conventional methods. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **4**, 2063–2073 (2011).
298. Hesaraki, S., Gholami, M., Vazehrad, S. & Shahrabi, S. The effect of Sr concentration on bioactivity and biocompatibility of sol-gel derived glasses based on CaO-SrO-SiO₂-P₂O₅ quaternary system. *Mater. Sci. Eng. C* **30**, 383–390 (2010).
299. Isaac, J. *et al.* Effects of strontium-doped bioactive glass on the differentiation of cultured osteogenic cells. *Eur. Cells Mater.* **21**, 130–143 (2011).
300. Neves, N., Linhares, D., Costa, G., Ribeiro, C. C. & Barbosa, M. A. In vivo and clinical application of strontium-enriched biomaterials for bone regeneration. *Bone Jt. Res.* **6**, 366–375 (2017).

301. Jiménez, M., Abradelo, C., San Román, J. & Rojo, L. Bibliographic review on the state of the art of strontium and zinc based regenerative therapies. Recent developments and clinical applications. *J. Mater. Chem. B* **7**, 1974–1985 (2019).
302. Li, Y. *et al.* The effect of strontium-substituted hydroxyapatite coating on implant fixation in ovariectomized rats. *Biomaterials* **31**, 9006–9014 (2010).
303. Su, W. T., Chou, W. L. & Chou, C. M. Osteoblastic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth induced by thermosensitive hydrogels with strontium phosphate. *Mater. Sci. Eng. C* **52**, 46–53 (2015).
304. Omar, S. *et al.* Sol-gel hybrid coatings with strontium-doped 45S5 glass particles for enhancing the performance of stainless steel implants: Electrochemical, bioactive and in vivo response. *J. Non. Cryst. Solids* **425**, 1–10 (2015).
305. Bose, S., Roy, M. & Bandyopadhyay, A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol.* **30**, 546–554 (2012).
306. Qiu, Z.-Y., Noh, I.-S. & Zhang, S.-M. Silicate-doped hydroxyapatite and its promotive effect on bone mineralization. *Front. Mater. Sci.* **7**, 40–50 (2013).
307. Bonnelye, E., Chabadel, A., Saltel, F. & Jurdic, P. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone* **42**, 129–138 (2008).
308. Chattopadhyay, N., Quinn, S. J., Kifor, O., Ye, C. & Brown, E. M. The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast proliferation. *Biochem. Pharmacol.* **74**, 438–447 (2007).
309. Atkins, G. J., Welldon, K. J., Halbout, P. & Findlay, D. M. Strontium ranelate treatment of human primary osteoblasts promotes an osteocyte-like phenotype while eliciting an osteoprotegerin response. *Osteoporos. Int.* **20**, 653–664 (2009).
310. Brennan, T. C. *et al.* Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 1291–1300 (2009).
311. Choudhary, S., Halbout, P., Alander, C., Raisz, L. & Pilbeam, C. Strontium ranelate promotes osteoblastic differentiation and mineralization of murine bone marrow stromal cells: involvement of prostaglandins. *J. Bone Miner. Res.* **22**, 1002–1010 (2007).
312. Zhu, L.-L. *et al.* Induction of a program gene expression during osteoblast differentiation with strontium ranelate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**, 307–311 (2007).
313. Fromigué, O., Hajj, E., Barbara, A. & Marie, P. J. Essential role of nuclear factor of activated T cells (NFAT)-mediated Wnt signaling in osteoblast differentiation induced by strontium ranelate. *J. Biol. Chem.* **285**, 25251–25258 (2010).
314. Cardemil, C. *et al.* Strontium-doped calcium phosphate and hydroxyapatite granules promote different inflammatory and bone remodelling responses in normal and ovariectomised rats. *PLoS One* **8**, e84932 (2013).
315. Kokesch-Himmelreich, J., Schumacher, M., Rohnke, M., Gelinsky, M. & Janek, J. ToF-SIMS analysis of osteoblast-like cells and their mineralized extracellular matrix on strontium enriched bone cements. *Biointerphases* **8**, 17 (2013).

316. Jebahi, S. *et al.* Antioxidative/oxidative effects of strontium-doped bioactive glass as bone graft. In vivo assays in ovariectomised rats. *J. Appl. Biomed.* **10**, 195–209 (2012).
317. Jebahi, S. *et al.* The potential restorative effects of strontium-doped bioactive glass on bone microarchitecture after estrogen-deficiency induced osteoporosis: physicochemical and histomorphometric analyses. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **56**, 533–540 (2013).
318. Dagang, G., Kewei, X. & Yong, H. The influence of Sr doses on the in vitro biocompatibility and in vivo degradability of single-phase Sr-incorporated HAP cement. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **86**, 947–958 (2008).
319. Zhang, Y. *et al.* Strontium-incorporated mesoporous bioactive glass scaffolds stimulating in vitro proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells and in vivo regeneration of osteoporotic bone defects. *J. Mater. Chem. B* **1**, 5711–5722 (2013).
320. Christoffersen, J., Christoffersen, M. R., Kolthoff, N. & Bärenholdt, O. Effects of strontium ions on growth and dissolution of hydroxyapatite and on bone mineral detection. *Bone* **20**, 47–54 (1997).
321. Li, X. *et al.* A novel resorbable strontium-containing α -calcium sulfate hemihydrate bone substitute: a preparation and preliminary study. *Biomed. Mater.* **9**, 45010 (2014).
322. Rahman, M. S., Akhtar, N., Jamil, H. M., Banik, R. S. & Asaduzzaman, S. M. TGF- β /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Res.* **3**, 15005 (2015).
323. Tarafder, S., Davies, N. M., Bandyopadhyay, A. & Bose, S. 3D printed tricalcium phosphate bone tissue engineering scaffolds: effect of SrO and MgO doping on in vivo osteogenesis in a rat distal femoral defect model. *Biomater. Sci.* **1**, 1250–1259 (2013).
324. Berridge, M. J., Bootman, M. D. & Lipp, P. Calcium - A life and death signal. *Nature* **395**, 645–648 (1998).
325. Flynn, A. The role of dietary calcium in bone health. *Proc. Nutr. Soc. TA - TT -* **62**, 851–858 (2003).
326. Romero-Gavilán, F. *et al.* Proteomic analysis of calcium-enriched sol-gel biomaterials. *J. Biol. Inorg. Chem.* **24**, 563–574 (2019).
327. Anitua, E., Prado, R., Orive, G. & Tejero, R. Effects of calcium-modified titanium implant surfaces on platelet activation, clot formation, and osseointegration. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **103**, 969–980 (2015).
328. Guo, C. Y., Matinlinna, J. P. & Tang, A. T. H. Effects of surface charges on dental implants: past, present, and future. *Int. J. Biomater.* **2012**, 1–5 (2012).
329. Venkatraman, S. K. & Swamiappan, S. Review on calcium-and magnesium-based silicates for bone tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **108**, 1546–1562 (2020).
330. Barradas, A. M. C. *et al.* A calcium-induced signaling cascade leading to osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Biomaterials* **33**, 3205–3215 (2012).
331. Marie, P. J. The calcium-sensing receptor in bone cells: A potential therapeutic target in osteoporosis. *Bone* **46**, 571–576 (2010).

332. Honda, Y., Fitzsimmons, R. J., Baylink, D. J. & Mohan, S. Effects of extracellular calcium on insulin-like growth factor II in human bone cells. *J. Bone Miner. Res. TA - TT* - **10**, 1660–1665 (2009).
333. Dvorak, M. M. & Riccardi, D. Ca²⁺ as an extracellular signal in bone. *Cell Calcium* **35**, 249–255 (2004).
334. Habibovic, P. & Barralet, J. E. Bioinorganics and biomaterials: Bone repair. *Acta Biomater.* **7**, 3013–3026 (2011).
335. Maeno, S. *et al.* The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials* **26**, 4847–4855 (2005).
336. Gessmann, J., Seybold, D., Peter, E., Schildhauer, T. A. & Köller, M. Plasma clots gelled by different amounts of calcium for stem cell delivery. *Langenbeck's Arch. Surg.* **398**, 161–167 (2013).
337. Hernández-Escolano, M. *et al.* The design and characterisation of sol–gel coatings for the controlled-release of active molecules. *J. sol-gel Sci. Technol.* **64**, 442–451 (2012).
338. Juan-Díaz, M. J. *et al.* Study of the degradation of hybrid sol-gel coatings in aqueous medium. *Prog. Org. Coatings* **77**, 1799–1806 (2014).
339. Juan-Díaz, M. J. *et al.* Development of hybrid sol-gel coatings for the improvement of metallic biomaterials performance. *Prog. Org. Coatings* **96**, 42–51 (2016).
340. Romero-Gavilán, F. *et al.* Control of the degradation of silica sol-gel hybrid coatings for metal implants prepared by the triple combination of alkoxy silanes. *J. Non. Cryst. Solids* **453**, 66–73 (2016).
341. Gabrielli, L. *et al.* Epoxide opening versus silica condensation during sol–gel hybrid biomaterial synthesis. *Chem. Eur. J.* **19**, 7856–7864 (2013).
342. Valliant, E. M. & Jones, J. R. Softening bioactive glass for bone regeneration: sol–gel hybrid materials. *Soft Matter* **7**, 5083–5095 (2011).
343. Gabrielli, L. *et al.* Exploring GPTMS reactivity against simple nucleophiles: chemistry beyond hybrid materials fabrication. *Rsc Adv.* **4**, 1841–1848 (2014).
344. Carboni, D., Pinna, A., Malfatti, L. & Innocenzi, P. Smart tailoring of the surface chemistry in GPTMS hybrid organic–inorganic films. *New J. Chem.* **38**, 1635–1640 (2014).
345. Romero-Gavilán, F. *et al.* The effect of strontium incorporation into sol-gel biomaterials on their protein adsorption and cell interactions. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **174**, (2019).
346. Romero-Gavilán, F. *et al.* Proteomic analysis of calcium-enriched sol–gel biomaterials. *J. Biol. Inorg. Chem.* **24**, (2019).
347. Araújo-Gomes, N. *et al.* Complement proteins regulating macrophage polarisation on biomaterials. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **181**, 125–133 (2019).
348. Araújo-Gomes, N. Protein adsorption and macrophage polarization as biocompatibility markers for biomaterial design. (UJI, 2018).

Capítulo 2.

Materiales y técnicas
experimentales

En este trabajo, se propone la síntesis de recubrimientos híbridos tipo sol-gel, partiendo de la combinación de dos precursores de silicio con distintos grupos funcionales orgánicos, que aumenten la biocompatibilidad y la osteointegración de los implantes dentales. Esta investigación es continuación de estudios anteriores de nuestro grupo de investigación^{1,2}.

Los precursores silícicos tienen una estructura del tipo $R'_nSiOR_{(4-n)}$, donde R' es la cadena orgánica que permanecerá en el material final y le proporcionará propiedades específicas, y OR es el grupo alcoxi que, a través de las reacciones de hidrólisis y condensación del proceso sol-gel, conducirá a la formación de una red polisiloxánica.

El sol obtenido se aplicará en sustratos diferentes, en función de la caracterización posterior que se vaya a realizar.

1. Materiales

Los precursores seleccionados para formar la red polisiloxánica son el metiltrimetoxisilano (MTMOS, Sigma-Aldrich) y el tetraetoxisilano (TEOS, Sigma-Aldrich). En la Figura 2.1 se muestra un esquema de la estructura molecular de cada uno de ellos.

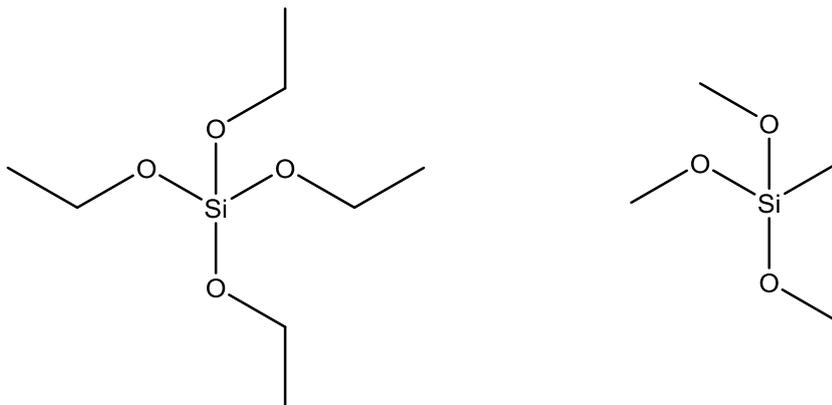


Figura 2.1. Estructura molecular de los precursores de silicio TEOS (izquierda) y MTMOS (derecha).

El MTMOS es un silicato orgánicamente modificado con tres grupos alcoxi y un grupo funcional orgánico (metilo) que permanece intacto tras la síntesis. La importancia de éste radica en que mejora la biocompatibilidad del sistema. Por otro lado, el TEOS es un ortosilicato altamente hidrófilo con cuatro grupos alcoxi que favorecen la degradación de la red siloxánica creada y, por tanto, la liberación de silicio del material.

Se selecciona el recubrimiento con una relación molar de MTMOS del 70 % y de TEOS del 30 % porque en estudios previos se ha comprobado que promueve el proceso de osteointegración, ya que es en este recubrimiento donde se observa mayor diferenciación de las células madre mesenquimales a células óseas³, y en los estudios *in vivo* realizados a partir de la implantación en tibia de conejo, demostró buenas propiedades osteointegrativas y, cualitativamente, la actividad osteogénica era alta, induciendo el crecimiento de nuevas espículas de tejido óseo desde la región cortical hacia la cavidad medular⁴.

Se añaden dos elementos diferentes a las formulaciones, Sr y Ca, como se ha comentado anteriormente y en distintas proporciones. Se agregarán en forma de sales, concretamente SrCl₂ (Sigma-Aldrich) y CaCl₂ (Sigma-Aldrich).

Se han sintetizado recubrimientos híbridos cargados con 0.5, 1 y 1.5 % en peso de SrCl₂ y CaCl₂, respectivamente. También se han dopado con diferentes mezclas de estas sales (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Formulaciones utilizadas y nomenclatura de las mismas.

Nomenclatura	% SrCl ₂	% CaCl ₂
7M:3T	-	-
7M:3T-0.5Sr	0.5	-
7M:3T-1Sr	1	-
7M:3T-1.5Sr	1.5	-
7M:3T-0.5Ca	-	0.5
7M:3T-1Ca	-	1
7M:3T-1.5Ca	-	1.5
7M:3T-0.5Sr-0.5Ca	0.5	0.5
7M:3T-1Sr-0.5Ca	1	0.5
7M:3T-1.5Sr-0.5Ca	1.5	0.5

Los materiales se han obtenido como recubrimientos sobre distintos sustratos o como film libre, en función del tipo de ensayo de caracterización a realizar. Los sustratos utilizados fueron los siguientes:

- Placas de acero inoxidable 316L (50 mm x 50 mm), suministradas por Ramón Navarrete Soria S.A.
- Portaobjetos de vidrio para microscopio (76 mm x 26 mm x 1 mm, Menzel-Gläser).
- Moldes de teflón ($\varnothing = 50$ mm y 2.2 mm de profundidad), proporcionados por Mecanizados Suguz S.L.U.
- Discos de titanio cpTi, grado IV ($\varnothing = 10$ y 12 mm, y 1.2 mm de espesor), suministrados por GMI-Ilerimplant S.L.
- Miniimplantes de titanio cpTi, grado IV (4 mm de longitud, y 3 mm y 2 mm de diámetro en la cabeza y en el cuerpo, respectivamente), abastecidos por GMI-Ilerimplant S.L.

2. Obtención de los recubrimientos

2.1. Síntesis por el método sol-gel

Para obtener el recubrimiento base se ha preparado una disolución de los precursores en isopropanol (Sigma-Aldrich) con una relación en volumen alcohol:precursor 1:1. La elección de este disolvente se debe a que se mejora la miscibilidad entre los precursores ya que estos son insolubles en agua.

A esta disolución mantenida en agitación (300 r.p.m.) con un agitador magnético, se le añade, gota a gota, la cantidad estequiométrica necesaria de agua para que se produzca la hidrólisis de los grupos alcoxi presentes en los precursores empleados. El agua se añade acidificada hasta pH 1, mediante la adición de HNO_3 (Sigma-Aldrich), con el fin de catalizar la reacción.

La agitación se mantiene durante 1 h para permitir la completa hidrólisis de todos los grupos y, a su vez, comienzan a darse las diferentes reacciones de condensación. Transcurrido este tiempo, se detiene la agitación y se mantiene 1 h en reposo para que el sistema se estabilice, continúen las reacciones de condensación y se dé la gelificación. Estos tiempos de reacción, así como los de reposo han sido fijados en base a estudios previos³. La síntesis descrita se representa, de forma esquemática, en la Figura 2.2.



Figura 2.2. Esquema de la síntesis de los recubrimientos.

Los recubrimientos dopados con las sales de estroncio y calcio se sintetizan siguiendo la metodología descrita anteriormente, pero con un paso previo. En este caso, la cantidad requerida (0.5, 1 y 1.5 % en peso de sal respecto a los silanos) se disuelve en el agua acidificada, que sirve como catalizador de la reacción.

2.2. Aplicación, secado y curado de los recubrimientos

Una vez realizada la síntesis, el sol obtenido bien se deposita sobre el sustrato seleccionado para poder obtener el recubrimiento o bien se vierte sobre un molde de teflón para la obtención de la película libre.

Todos los sustratos requieren un pretratamiento antes de depositar el sol sobre ellos. Cada uno de ellos se basa en un protocolo diferente:

- A las placas de acero inoxidable 316L se les realiza un tratamiento superficial consistente en el desbastado con papel de lija de grano 220, en cuatro direcciones en forma de cruz y aspa, con el fin de aumentar la adherencia del recubrimiento. Posteriormente, se limpian en repetidas ocasiones, primero con agua destilada y jabón y

por último con acetona para eliminar los posibles restos orgánicos. Se secan al aire y se guardan en un lugar limpio y seco hasta su uso.

- Los portaobjetos de vidrio se limpian introduciéndolos en un baño de ultrasonidos (Selecta Ultrasons-P) en una disolución de ácido nítrico al 25 % en volumen durante 15 min. Posteriormente, se realiza un lavado con agua destilada y se introducen nuevamente en el baño de ultrasonidos en agua destilada. Se vuelven a lavar con agua destilada y se secan en estufa a 80 °C. Después se introducen en un desecador durante 15 min y se utilizan una vez hayan alcanzado la temperatura ambiente.

- Los moldes de teflón se limpian con agua destilada y acetona para eliminar posibles impurezas.

- Los discos de titanio fueron proporcionados libres de impurezas y esterilizados por radiación UV. Estos tienen una topografía heterogénea como resultado de un pretratamiento de la superficie con la técnica combinada de granallado con partículas de óxido de aluminio de 4 μm y un ataque ácido sumergiendo los discos en ácido sulfúrico durante 1 h, con el objetivo de simular los tratamientos aplicados sobre implantes dentales. Todos los discos fueron posteriormente lavados con ultrasonidos en acetona, etanol y agua purificada (18.2 Ω) sucesivamente (20 min en cada baño); y finalmente secados a vacío. Están dispuestos en un embalaje de 10 unidades y se mantienen así hasta el momento de recubrirlos.

- Los miniimplantes de titanio reciben el mismo tratamiento que los discos. Estas prótesis constan de un doble envase, siendo el envase secundario de plástico técnico y el envase primario de vidrio Pyrex®. Este último contiene un soporte de titanio donde se aloja únicamente el miniimplante dental.

Después de preparar las diferentes superficies, en función del ensayo a realizar y el sustrato a recubrir, se utilizan distintas técnicas para la deposición del sol sobre el sustrato. Las técnicas empleadas han sido “flow-coating”, “drop-coating” y “dip-coating”.

- En la técnica de “flow-coating” el sol se vierte con una pipeta Pasteur de forma continua sobre la superficie que se encuentra inclinada 45° respecto a la horizontal, tal y como se muestra en la Figura 2.3. El proceso se repite 3 veces para asegurar que toda la superficie ha sido recubierta. Tanto las placas de acero inoxidable como los portaobjetos

de vidrio, se han recubierto mediante esta técnica, aunque en estos últimos se realiza por las dos caras.

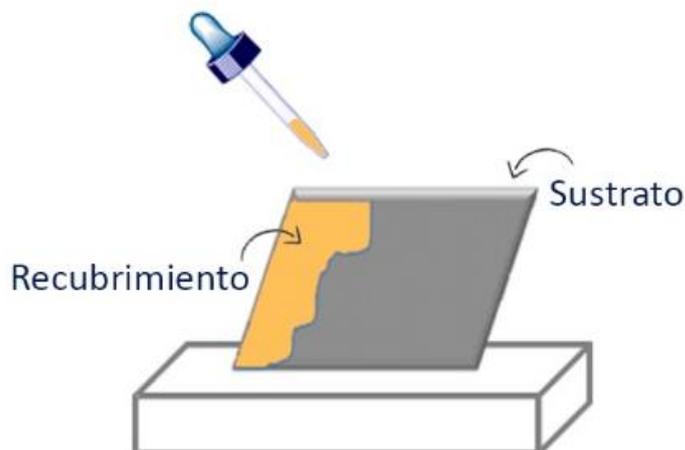


Figura 2.3. Técnica de deposición “flow-coating”.

El espesor del recubrimiento depende del ángulo de inclinación del sustrato, de la viscosidad del sol y de la velocidad de evaporación del disolvente. Una ventaja de este método es que los sustratos grandes, aun no siendo planos, pueden ser recubiertos con bastante facilidad. Por otra parte, un inconveniente es que el espesor del recubrimiento no es uniforme¹⁶.

- Los portaobjetos de vidrio también se recubren mediante la técnica de “drop-coating” (Figura 2.4). En este caso, se depositan 500 μL del sol sobre la superficie de estos dejando que se expanda homogéneamente por toda ella.

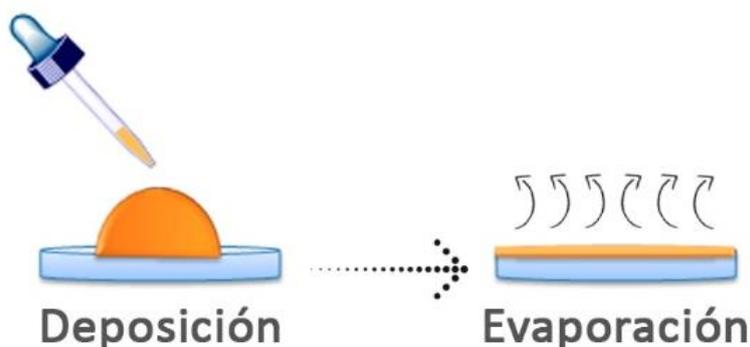


Figura 2.4. Técnica de deposición “drop-coating”.

- La técnica de “dip-coating” puede describirse como un proceso en el que el sustrato se sumerge en un líquido, donde tras un tiempo de inmersión previamente establecido, se retira a una velocidad definida (Figura 2.5). En este caso se ha utilizado un dip-coater ND-DC 11/1 150 (Nadetech Innovations S.L.). Esta técnica se ha utilizado para recubrir los discos y los miniimplantes de titanio. Estos sustratos se introdujeron en el sol a una velocidad de inmersión de 60 mm/min, se mantuvieron en la solución durante 1 minuto y finalmente se retiraron a una velocidad de extracción de 100 mm/min.

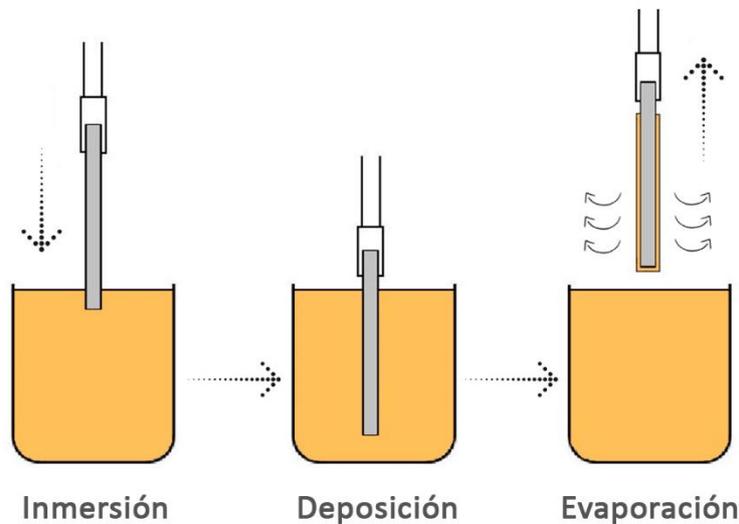


Figura 2.5. Técnica de deposición “dip-coating”.

- Para obtener una película libre, se vierten 3 mL de sol-gel sobre un molde de teflón antiadherente, obteniéndose films de bajo espesor, a los que posteriormente se les aplican los procesos correspondientes.

Una vez depositado el sol sobre el sustrato seleccionado o vertido sobre el molde de teflón, se hace un tratamiento térmico de curado en estufa con el objetivo de promover las reacciones de condensación y la eliminación de los disolventes de la red (agua, alcohol...), dándose las etapas de secado y densificación. Los sustratos se introducen en la estufa a 80 °C, durante 2 h. De esta manera, la red se hace más densa y solidifica.

3. Técnicas experimentales

3.1. Caracterización morfológica

3.1.1. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

La topografía de la superficie de las muestras se ha caracterizado mediante Microscopia Electrónica de Barrido (SEM). Esta técnica se basa en la interacción de un haz de electrones con el material a estudiar. Esta cantidad de energía hace que se desprendan los electrones de la superficie (llamados secundarios) y estos son captados por detectores que forman una imagen de alta calidad.

Para llevar a cabo el análisis se recubren discos de titanio de 12 mm. Posteriormente, se recurre a un Sputter Coater (BALTEC SCD500) para realizar un recubrimiento fino por sputtering con platino a la muestra. De esta manera, se logra aumentar su conductividad y la observación por SEM es óptima.

Se utiliza un Microscopio de Barrido Electrónico (Leica-Zeiss LEO 440) adquiriendo las imágenes a un voltaje de 15 kV.

3.1.2. Perfilometría óptica

La rugosidad del biomaterial es un parámetro importante en el anclaje celular. Para caracterizar esta propiedad, se utiliza un Perfilómetro modelo Dektak 6 (Veeco Instruments Inc) que permite la caracterización del perfil y de la rugosidad de las muestras.

Se realizan recubrimientos en discos de titanio de 12 mm y se toman 3 medidas de cada uno de los materiales sintetizados, obteniendo el perfil y los parámetros de rugosidad.

3.2. Adherencia

Para la realización de este ensayo se preparan recubrimientos obtenidos sobre placas de acero. Primero se realiza una inspección visual de las muestras obtenidas para apreciar la ausencia o presencia de grietas o poros, la uniformidad de las características superficiales, la transparencia y el brillo; y, posteriormente, se determina la adherencia del film depositado.

La adherencia del recubrimiento al sustrato metálico se analiza mediante la técnica de “corte por enrejado”. La norma ISO 2409 determina que hay que colocar la placa recubierta sobre una superficie plana y rígida, y realizar 2 cortes en cuadrícula, empleando una cuchilla, y ejerciendo una presión uniforme que sea necesaria y suficiente para alcanzar el material del soporte sin dañarlo excesivamente. En este caso se ha utilizado una cuchilla de paso de 2 mm con 6 cortes (Neurtek Instruments S.A.). Posteriormente, se cepilla la zona ensayada con una brocha suave 5 veces en cada sentido de cada diagonal de la cuadrícula. A continuación, se pega una tira de cinta adhesiva sobre la cuadrícula, presionando firmemente sobre ella, se despega después de 90 s tirando rápidamente del extremo no adherido con un ángulo lo más aproximado a 180°. Finalmente, se observa la superficie con un microscopio óptico (Leica M165C) y se compara su aspecto con el esquema de la Figura 2.6 para determinar el grado de adherencia.

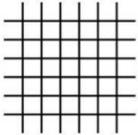
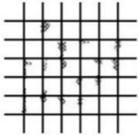
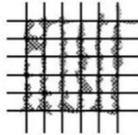
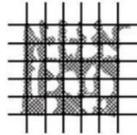
Apariencia					
Desprendimiento	0 %	<5 %	<15 %	<35 %	<65 %
Clasificación	0	1	2	3	4

Figura 2.6. Clasificación según la norma ISO 2409.

3.3. Caracterización química

Los materiales se caracterizaron químicamente mediante dos técnicas: espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR/ATR) y Resonancia Magnética Nuclear del átomo de silicio (^{29}Si -RMN) en estado líquido y en estado sólido. Para la FTIR/ATR y para la RMN en estado sólido, se ha necesitado el film libre pulverizado.

3.3.1. FTIR/ATR

Con la espectroscopia FTIR/ATR se puede estudiar la red siloxánica formada en los recubrimientos base y en los dopados. Aquí, el recubrimiento hecho polvo se coloca en el accesorio de ATR del equipo (Nicolet 6700 FT-IR). Los espectros se obtienen por transmisión en el intervalo $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ (correspondiente a la región del infrarrojo medio).

3.3.2. ^{29}Si -RMN

La espectroscopia de RMN del átomo de silicio se emplea para realizar el seguimiento de las reacciones implicadas en el proceso sol-gel y para estudiar el grado de entrecruzamiento de la película final.

Mediante ^{29}Si -RMN en estado líquido se realiza el seguimiento de las reacciones de hidrólisis y condensación que se dan durante el proceso sol-gel. El estudio se lleva a cabo en un espectrómetro Bruker AVANCE NEO 500 equipado con una sonda BBOF con gradientes en el eje Z. Todos los espectros se registraron a temperatura ambiente, empleando una secuencia CPMG con un filtro de T2 de 5 ms, para poder eliminar las señales provenientes del tubo. La frecuencia de ^{29}Si empleada fue 99.362 MHz. Se registraron 71K puntos con una ventana espectral de 17857 Hz, tiempo de adquisición de 1 s y tiempo de espera de 20 s.

Se registra un espectro antes y después de añadir el agua acidificada con la sal necesaria disuelta (para determinar las posiciones base de las bandas de cada precursor) y uno cada hora, durante 3 h, para poder analizar la variación de las bandas tras las reacciones.

Para ello, se añade el alcohol y los precursores en un tubo de RMN. También se agrega una disolución 2.5 mM de acetilacetato de cromo, $\text{Cr}(\text{acac})_3$ (Sigma-Aldrich), en metanol deuterado, d-MeOH (Sigma-Aldrich), como agente de relajación de spin, permitiendo adquirir los espectros del átomo de silicio en un menor periodo de tiempo¹⁷. Se añade un 5 % de la cantidad total de la mezcla de esta disolución y otro 5 % de d-MeOH puro.

Por otro lado, mediante ^{29}Si -RMN en estado sólido se caracteriza la estructura final del recubrimiento tras el curado. En este caso el análisis se realiza en un espectrómetro Bruker 400 Avance III WB PLUS equipado con una sonda de 4 mm MASDVT 400WB BL4 de tres canales. Se utilizaron rotores de zirconio y la velocidad de giro de las muestras fue de 10 KHz. Para la adquisición del espectro de silicio (79.5 MHz) se utilizó la secuencia de pulsos CPMAS (Cross Polarization Magic-Angle Spinning) y un pulso de r.f de 40 KHz, además de un tiempo de contacto de 2 ms y un tiempo entre pulsos de 5 s. La anchura espectral fue de 32 KHz.

Para la identificación de las diferentes especies que se forman, se emplea el sistema de anotación desarrollado por Lippmaa *et al*¹⁸. A los átomos de silicio se les denomina Q o T en función del número de átomos de oxígeno a los que estén unidos, esto es, Q si está unido a cuatro (como en el caso del TEOS) y T si lo está a tres (MTMOS). Del mismo modo, a cada letra (Q o T) se le añade un subíndice que indica el número de átomos de oxígeno que a su vez están unidos a otro átomo de silicio, por lo tanto, este muestra el número de formaciones siloxano respecto de cada átomo de silicio. Por consiguiente, las especies con un grado mayor de condensación serán aquellas con el subíndice más alto.

Para las estructuras T_n se esperan desplazamientos químicos entre -40 y -80 ppm y para las estructuras Q_n entre -80 y -120 ppm. Las especies con mayor grado de condensación presentan un desplazamiento químico a valores más negativos¹⁹.

A continuación, se muestran las posibles estructuras que pueden coexistir durante el proceso sol-gel (Figura 2.7).

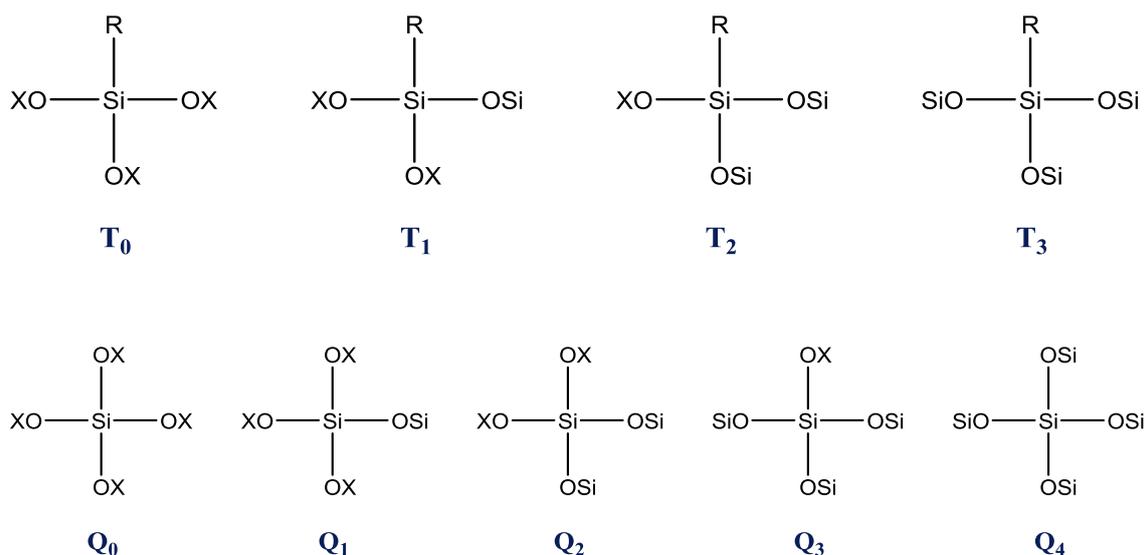


Figura 2.7. Estructuras que pueden coexistir durante el proceso sol-gel.

3.4. Determinación del grado de hidrofilia/hidrofobia

Una propiedad importante de los materiales para aplicaciones biomédicas es la hidrofilia de las superficies, ya que de ella puede depender la adsorción de proteínas y, consecuentemente, el comportamiento celular. Tal y como indican diversos autores, la adherencia de las proteínas es mayor en superficies hidrófobas²⁰. Por el contrario, diversos estudios afirman que las superficies hidrófilas, al contrario que las hidrófobas, tienden a mejorar las primeras etapas de la adhesión celular, la proliferación, la diferenciación y la mineralización ósea²¹. También es una propiedad que influye en los fenómenos de degradación y, por tanto, en la liberación de los agentes introducidos.

La medida comparativa de la hidrofilia/hidrofobia de los distintos films obtenidos se determina mediante la medida del ángulo de contacto que se forma entre una gota de agua ultrapura y el recubrimiento estudiado. Una superficie hidrófoba es aquella donde el ángulo de contacto entre la gota y la superficie del sustrato es mayor de 65°. Por el contrario, si el ángulo de contacto es menor de 65°, se considera una superficie hidrófila²².

Para ello se recubren discos de titanio de 12 mm con cada una de las formulaciones. Se emplea un goniómetro (Dataphysics OCA 20) que cuantifica el ángulo formado entre el perímetro de la gota dispensada y el recubrimiento. Como líquido se utiliza agua milli-Q y las gotas se forman aplicando una dosificación media de 1 µL/s y un volumen de gota

de 10 μL . Las medidas se realizan con ayuda del software SCA20 a temperatura ambiente y exactamente 10 s después de la deposición de la gota sobre el recubrimiento. Se emplean 5 discos por recubrimiento depositando 2 gotas en cada uno. Se mide tanto el ángulo derecho como el izquierdo (Figura 2.8), de forma que para cada recubrimiento se obtienen 20 medidas.

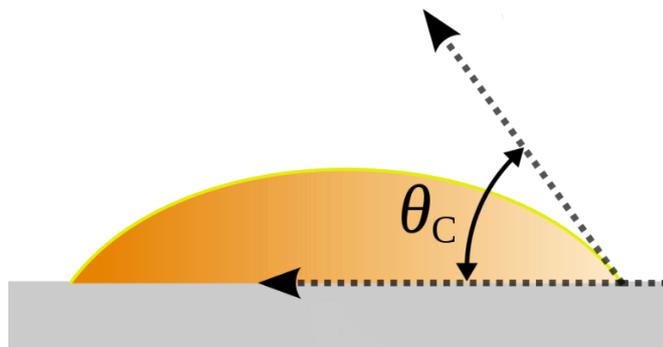
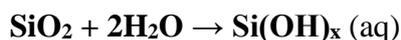


Figura 2.8. Esquema del ángulo de contacto entre una gota y una superficie.

3.5. Ensayo de degradación hidrolítica

Los recubrimientos sol-gel obtenidos son materiales biodegradables, ya que en contacto con un medio acuoso degradan hidrolíticamente^{23,24}. Los productos liberados son reabsorbidos por el organismo y, concretamente, los basados en sílice tienen propiedades osteogénicas²⁵. Del mismo modo, el fenómeno de degradación es determinante en la cinética de la liberación de los agentes introducidos, ya que gran parte de la liberación se produce asociada a este fenómeno. Ahí radica la importancia del estudio de la cinética de degradación.

La degradación ocurre mediante la reacción de hidrólisis que se detalla a continuación:



Para la realización de este ensayo se preparan recubrimientos obtenidos sobre portaobjetos de vidrio mediante el proceso “flow-coating”. El procedimiento de estudio de la degradación consiste en la introducción de la muestra en 50 mL de agua destilada, durante un tiempo determinado, en una estufa a 37 °C (simulando la temperatura fisiológica). La cinética de degradación se estima mediante la pérdida de masa del

recubrimiento durante un periodo de 8 semanas, concretamente, se extraen a los 7, 14, 28, 42 y 56 días, secándolas a vacío durante 24 h y midiendo el porcentaje de pérdida de masa en cada periodo a través de la ecuación 2.1, donde M_a corresponde a la masa de la muestra antes de su inmersión en agua destilada y M_d a la masa tras la inmersión y posterior secado. El ensayo se realiza por triplicado.

$$\text{Pérdida de masa (\%)} = \frac{M_a - M_d}{M_a} \quad [\text{Ec. 2.1}]$$

3.6. Ensayos de liberación

Tal y como se ha mencionado en el apartado anterior, los recubrimientos se degradan hidrolíticamente en contacto con un medio acuoso, liberando diferentes productos. En este caso, los recubrimientos basados en sílice liberan Si (IV). Este silicio desprendido en bajas concentraciones mejora la actividad de los osteoblastos²⁶ que son las células encargadas de la regeneración ósea.

Con este estudio se cuantifica la cantidad de silicio que libera cada recubrimiento, obteniendo una relación con la velocidad de osteoinducción de los materiales sintetizados y la proliferación y crecimiento de los osteoblastos.

Del mismo modo, los recubrimientos obtenidos se pueden emplear como sistemas de liberación controlada de calcio y estroncio. Esta propiedad puede resultar de gran importancia ya que la liberación local disminuye el riesgo de efectos secundarios derivados de la administración por vía oral, y además puede mejorar la eficacia al administrarse localmente en la zona de interés. Dicha liberación se produce, como se ha mencionado con anterioridad, como consecuencia de la degradación hidrolítica del material.

Para la realización de este ensayo se preparan recubrimientos obtenidos sobre portaobjetos de vidrio mediante el proceso “drop-coating”, depositando 0.5 mL del sol. Estos se sumergen en 50 mL de agua milli-Q y se conservan en una estufa a 37 °C durante un tiempo de 4 semanas. Se toman alícuotas de 500 µL que se llevan a matraces aforados de 10 mL, a las 2, 4, 8, 24, 72, 168, 336, 504 y 672 h. El ensayo se realiza por triplicado.

El análisis cuantitativo de los diferentes elementos se ha realizado mediante espectroscopia de emisión con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES).

El equipo utilizado (Horiba Jobin Yvon, Activa) tiene un nebulizador concéntrico de cuarzo Meinhard, una cámara de pulverización de tipo Scott y una conexión de vaina de cuarzo estándar entre la cámara de pulverización y la antorcha. Diariamente, el ICP-AES se verificó utilizando una solución estándar de 5.0 mg/L que contiene Al, Cd, K, Mg y Zn. Se comprobó que la robustez del plasma (relación de intensidad para las líneas Mg 280.270 y 285.213) fuera superior a 6.0. La resolución máxima se verificó utilizando las líneas Cd 226.502 y K 766.490 (ancho de pico inferior a 12 y 22 pm para el Cd y el K, respectivamente). Finalmente, la estabilidad del sistema se determinó utilizando las siguientes líneas: Al 396.152, Cd 226.502, Pb 220.353 y K 766.490 nm, para que la Desviación Estándar Relativa fuera inferior al 3.0 % en mediciones de 2 h.

3.7. Análisis proteómico de las proteínas adsorbidas en la superficie

3.7.1. Obtención de la capa de proteínas adheridas

Cada disco de titanio de 12 mm de diámetro fue incubado en un pocillo de una placa de 24 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) con 2 mL de suero humano, obtenido de plasma AB masculino (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), durante 180 min a 37 °C y un 5% de CO₂. Pasado este tiempo, el suero fue retirado y las muestras fueron sometidas a un proceso de 5 lavados consecutivos con 200 µL de agua milli-Q y un lavado final con 200 µL de una disolución de NaCl 100 mM en Tris-HCl 50 mM, a pH 7, con el objetivo de eliminar las proteínas no adsorbidas. La elución final se obtuvo sumergiendo el disco en una disolución de dodecilsulfato sódico (SDS) al 4 %, ditioneitol (DTT) 100 mM y un tampón de bicarbonato de trietilamonio 0.5 M (TEAB; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). El método experimental está basado en un estudio previo de Kaneko *et al*²⁷. Se llevaron a cabo un total de 3 réplicas independientes para cada tipo de superficie, estando cada réplica constituida por la mezcla de la elución de 4 discos distintos. Además, se cuantificó la cantidad total de proteína en el suero antes del ensayo, empleando el kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó una concentración de 51 mg/mL.

3.7.2. Ensayo de proteómica

Las muestras con las eluciones de proteína se enviaron al grupo de Proteómica del Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias (CIC bioGUNE) de Derio (Bizkaia). Allí fueron resueltas en un 10 % de gel de poliacrilamida, empleando una célula de electroforesis Mini-Protean II (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). El gel fue teñido empleando la tinción comercial SYPRO Ruby (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Seguidamente el gel fue lavado y cada banda fue cortada en 4 partes. Cada una de estas partes fue sometida a un proceso de digestión con tripsina siguiendo un protocolo estándar²⁸. Los péptidos obtenidos fueron resuspendidos en ácido fórmico al 0.1 % y analizados mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS). La separación de los péptidos fue llevada a cabo en un sistema de cromatografía líquida nanoAcquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) conectado a un espectrómetro SYNAPT G2-Si (Waters). Las muestras fueron cargadas en precolumnas Symmetry 300 C18 UPLC (5 μ m, 180 μ m \times 20 mm, Waters) conectadas a columnas BEH130 C18 (1.7 μ m, 75 μ m \times 200 mm, Waters). Las columnas fueron equilibradas con un 3 % de acetonitrilo y 0.1 % de ácido fórmico. Los péptidos fueron eluidos utilizando un gradiente creciente del 3 % al 50 % de acetonitrilo en 60 min con un flujo de 300 nL/min. Se utilizó un espectrómetro SYNAPT G2-Si ESI Q-Mobility-TOF (Waters) equipado con una cámara de movilidad iónica (T-Wave-IMS), para analizar los péptidos. Los datos de LC-MS fueron recogidos en modo HDDA, que mejora las intensidades de señal usando la separación por movilidad iónica. La identificación de las proteínas se llevó a cabo con el buscador MASCOT Search Engine (Matrix Science, London, UK; <http://www.matrixscience.com>) a través del software Proteome Discoverer v.1.4 (Thermo Fisher Scientific). La tolerancia en la medida de la masa de los péptidos fue de 10 ppm, y de 0.2 Da para los fragmentos. La carbamidometilación de cisteínas fue seleccionada como modificación fija y la oxidación de la metionina como modificación variable.

Se empleó el programa informático Progenesis QI (Nonlinear Dynamics, Newcastle-upon-Tyne, UK) para llevar a cabo el análisis diferencial de las proteínas identificadas entre las superficies estudiadas. Los archivos originales fueron importados al programa y se seleccionó una de las muestras como referencia, con la cual se alinearon las masas precursoras en el resto de muestras. Las muestras se agruparon en las categorías experimentales apropiadas y se compararon. Las diferencias entre los grupos solo se

consideraron para las abundancias de péptidos con un valor de ANOVA $p < 0.05$ y una ratio > 1.3 en cualquier dirección. Las proteínas fueron consideradas como diferenciales siguiendo estos mismos parámetros estadísticos. Además, las proteínas detectadas fueron clasificadas respecto a las funciones empleando la base de datos PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships, www.pantherdb.gov/) y DAVID (the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, david.ncifcrf.gov).

3.8. Caracterización biológica *in vitro*

Se han llevado a cabo diferentes ensayos *in vitro* con el objetivo de evaluar el comportamiento de los recubrimientos en contacto con las células. Con ello se determina la idoneidad del recubrimiento para su uso como material biomédico. Los ensayos *in vitro* han sido realizados en el grupo de Polímeros y Materiales Avanzados (PIMA) del Departamento de Ingeniería de Sistemas Industriales y Diseño de la Universitat Jaume I (UJI) de Castellón.

Las líneas celulares utilizadas han sido la de osteosarcoma de ratón de laboratorio (MC3T3-E1) y la de macrófagos de ratón murino (RAW 264.7). Los cultivos celulares de osteoblastos y macrófagos se han realizado según el protocolo propuesto por Romero-Gavilán *et al*¹³.

3.8.1. Citotoxicidad

La citotoxicidad del biomaterial se evaluó siguiendo la norma ISO 10993-5. Se realizó el ensayo “Titer Proliferation” (Promega, Madison, WI) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Como control negativo, se utilizó un pocillo solo con células. Como control positivo, las células se incubaron en látex, un compuesto tóxico para estas. Si la viabilidad celular de los osteoblastos se reduce en más de un 70 % en el periodo de tiempo analizado respecto al control, se puede concluir que el material es citotóxico.

Para realizar el ensayo se requiere de una tripsinización del cultivo celular y de una siembra celular en una placa de 96 pocillos, donde la densidad será de 10000 células/pocillo. Los discos se esterilizan por radiación UV durante 20 min por cada una de sus caras. Después se les añade 1 mL de Suero Fetal Bobino (FBS) y se conservan

durante 24 h a 37 °C, siendo esto el extracto del material. Tras realizar todo el protocolo, se finaliza leyendo la absorbancia a 490 nm, obteniendo los valores de densidad óptica (OD).

Una vez realizada la lectura, se determina la viabilidad celular 100 % utilizando la ecuación 2.2, donde cuanto mayor es el valor de este parámetro, mayor es el potencial citotóxico de la muestra.

$$\text{Viabilidad } 100 \% = \frac{100 \times OD_{\text{extracto}}}{OD_{\text{blanco}}} \quad [\text{Ec. 2.2}]$$

3.8.2. Proliferación celular

Para determinar la proliferación celular sobre los recubrimientos sintetizados, se utilizó el reactivo de viabilidad celular alamarBlue™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Las células MC3T3 se cultivaron en placas NUNC™ de 48 pocillos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) con una densidad de 10000 células/mL. Tras un periodo de tiempo de 1, 3 y 7 días, se evaluó la proliferación celular siguiendo el protocolo del fabricante.

3.8.3. PCR

a) Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc

El ARN total se obtuvo a partir de ambas líneas celulares cultivadas en los discos de titanio recubiertos con sol-gel, usando TRIzol (tiocianato de guanidina 1 M, tiocianato de amonio 1 M, acetato de sodio 3 M, glicerol al 5 %, aquafenol al 38 %). La cantidad, integridad y calidad del ARN resultante se midieron utilizando un espectrofotómetro NanoVue® Plus (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido). Para cada muestra, se convirtió aproximadamente 1 µg de ARN total en ADNc utilizando el kit PrimeScript RT (Perfect Real Time) (TAKARA Bio Inc., Shiga, Japón). El ADNc resultante se diluyó en agua libre de ADNasas a una concentración adecuada para un adecuado análisis de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

b) PCR cuantitativa en tiempo real (ReTi-qPCR)

Antes de la ReTi-qPCR, se diseñaron los cebadores con secuencias de ADN específicas disponibles en NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>), empleando el software PRIMER3plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Los niveles de expresión se midieron usando cebadores de Thermo Fischer Scientific (Tabla 2.2). Se utilizó la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) para normalizar los datos obtenidos de la ReTi-qPCR y como control endógeno. Las reacciones ReTi-qPCR se llevaron a cabo utilizando SYBR PREMIX Ex Taq (Tli RNase H Plus) (TAKARA Bio Inc.), en un sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems StepOne Plus™ (Foster City, CA, USA). Los parámetros utilizados fueron los siguientes: una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, seguida de 40 ciclos de 5 s a 95 °C y de 34 s a 60 °C. La etapa final es de un ciclo de 15 s a 95 °C y de 60 s a 60 °C.

Tabla 2.2. Secuencias utilizadas para la realización de las PCR.

Línea celular	Gen	Secuencia
MC3T3-E1	ALP	F: CCAGCAGGTTTCTCTCTTGG R: CTGGGAGTCTCATCCTGAGC
Ambas	TGF- β	F: TTGCTTCAGCTCCACAGAGA R: TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC
RAW 264.7	TNF- α	F: AGCC CCCAGTCTGTATCCTT R: CTCCTTTGCAGAACTC

3.8.4. ELISA

Para evaluar la actividad de la ALP se analizó la conversión del p-nitrofenilfosfato (p-NPP) en p-nitrofenol. Para ello, se sembraron células MC3T3-E1 en las diferentes superficies en placas NUNC™ de 48 pocillos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) con una densidad de 17500 células/mL. Después de cultivarlas durante 7 y 14 días, las células se sumergieron en un tampón de lisis (Triton X-100 al 0.2 %, Tris-HCl 10 mM, pH 7.2) y se incubaron a 4 °C durante 10 min. Después de la centrifugación (7 min, 14000 rpm, 4 °C), se añadieron 100 μ L de p-NPP (1 mg/mL) en un tampón de sustrato (glicina 50 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 10.5) a 100 μ L del sobrenadante. Después de 2 h de incubación en oscuridad (37 °C, 5 % de CO₂), se midió la absorbancia a 405 nm utilizando un lector de microplacas. La actividad de la ALP se calculó usando una curva estándar de p-nitrofenol en hidróxido sódico 0.02 mM. Se usó un kit de ensayo Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) para calcular el contenido de proteína total en la muestra y para normalizar los niveles de ALP.

Por otro lado, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) se cuantificó en los medios de cultivo celular de RAW 264.7 expuestos a los materiales. Después de 2 y 4 días de cultivo, el medio se recogió y se congeló hasta su posterior análisis. La concentración de TNF- α se determinó con un kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA; Thermo Fischer Scientific) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.9. Análisis estadístico

Los datos se sometieron a un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con una prueba *post-hoc* de comparaciones múltiples de Newman-Keuls. Las diferencias con $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**) y $p \leq 0.001$ (***) se consideraron estadísticamente significativas entre los materiales dopados y el recubrimiento base 7M:3T.

Referencias

1. Martínez-Ibáñez, M. *et al.* Biological characterization of a new silicon based coating developed for dental implants. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **27**, 80 (2016).
2. Juan-Díaz, M. J. *et al.* Study of the degradation of hybrid sol-gel coatings in aqueous medium. *Prog. Org. Coatings* **77**, 1799–1806 (2014).
3. Juan-Díaz, M. J. Desarrollo de recubrimientos híbridos bioactivos para implantes dentales. (UPV/EHU, 2013).
4. Araújo-Gomes, N. *et al.* Osseointegration mechanisms: a proteomic approach. *J. Biol. Inorg. Chem.* **23**, 459–470 (2018).
5. Pors Nielsen, S. The biological role of strontium. *Bone* **35**, 583–588 (2004).
6. Cacciotti, I. Bivalent cationic ions doped bioactive glasses: the influence of magnesium, zinc, strontium and copper on the physical and biological properties. *J. Mater. Sci.* **52**, 8812–8831 (2017).
7. Marie, P. Strontium Ranelate in Osteoporosis and Beyond: Identifying Molecular Targets in Bone Cell Biology. *Mol. Interv.* **10**, 305–312 (2010).
8. Dahl, S. G. *et al.* Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone* **28**, 446–453 (2001).
9. Neves, N., Linhares, D., Costa, G., Ribeiro, C. C. & Barbosa, M. A. In vivo and clinical application of strontium-enriched biomaterials for bone regeneration. *Bone Jt. Res.* **6**, 366–375 (2017).
10. Almeida, J. C. *et al.* A biocompatible hybrid material with simultaneous calcium and strontium release capability for bone tissue repair. *Mater. Sci. Eng. C* **62**, 429–438 (2016).
11. Omar, S. *et al.* Sol-gel hybrid coatings with strontium-doped 45S5 glass particles for enhancing the performance of stainless steel implants: Electrochemical, bioactive and in vivo response. *J. Non. Cryst. Solids* **425**, 1–10 (2015).
12. John, Ł., Podgórska, M., Nedelec, J. M., Cwynar-Zajac, Ł. & Dzięgiel, P. Strontium-doped organic-inorganic hybrids towards three-dimensional scaffolds for osteogenic cells. *Mater. Sci. Eng. C* **68**, 117–127 (2016).
13. Romero-gavilán, F., Araújo-gomes, N., García-arnáez, I., Martínez-ramos, C. & Elortza, F. The effect of strontium incorporation into sol-gel biomaterials on their protein adsorption and cell interactions. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **174**, 9–16 (2019).
14. Romero-Gavilán, F. *et al.* Proteomic analysis of calcium-enriched sol-gel biomaterials. *J. Biol. Inorg. Chem.* **24**, 563–574 (2019).
15. LeGeros, R. Z. Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphates. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **395**, 81–98 (2002).
16. Schmidt, H. & Mennig, M. *Wet Coating Technologies for Glass*. (INM, Institut für Neue Materialien, 2000).

17. Jitianu, A., Britchi, A., Deleanu, C., Badescu, V. & Zaharescu, M. Comparative study of the sol-gel processes starting with different substituted Si-alkoxides. *J. Non. Cryst. Solids* **319**, 263–279 (2003).
18. Lippmaa, E., Maegi, M., Samoson, A., Engelhardt, G. & Grimmer, A. R. Structural studies of silicates by solid-state high-resolution silicon-29 NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 4889–4893 (1980).
19. Smith, M. E. & Holland, D. Atomic-scale structure of gel materials by solid-state NMR. in *Handbook of Sol-Gel Science and Technology: Processing, Characterization and Applications* 1281–1322 (2018).
20. Kim, J. Systematic approach to characterize the dynamics of protein adsorption on the surface of biomaterials using proteomics. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **188**, 110756 (2020).
21. Gittens, R. A. *et al.* A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects. *Acta Biomater.* **10**, 2907–2918 (2014).
22. Wei, Q. *et al.* Protein interactions with polymer coatings and biomaterials. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **53**, 8004–8031 (2014).
23. Reiner, T., Kababya, S. & Gotman, I. Protein incorporation within Ti scaffold for bone ingrowth using Sol-gel SiO₂ as a slow release carrier. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **19**, 583–589 (2008).
24. Xynos, I. D. *et al.* Bioglass ®45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation in vitro: Implications and applications for bone tissue engineering. *Calcif. Tissue Int.* **67**, 321–329 (2000).
25. Gupta, R. & Kumar, A. Bioactive materials for biomedical applications using sol-gel technology. *Biomed. Mater.* **3**, 034005 (2008).
26. Ääritalo, V. *et al.* Development of a Low Temperature Sol-Gel-Derived Titania-Silica Implant Coating. *Mater. Sci. Appl.* **01**, 118–126 (2010).
27. Kaneko, H., Kamiie, J., Kawakami, H., Anada, T. & Honda, Y. Proteome analysis of rat serum proteins adsorbed onto synthetic octacalcium phosphate crystals. *Anal. Biochem.* **418**, 276–285 (2011).
28. Anitua, E. *et al.* High-throughput proteomic characterization of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret)-derived fibrin clot interactome. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **9**, E1-E (2015).

Capítulo 3.

Recubrimientos
dopados con Sr

1. Introducción

El papel del estroncio en el campo de la regeneración ósea ha alcanzado un gran reconocimiento en los últimos años tal y como se puede comprobar por el incremento anual del número de publicaciones sobre este tema (Figura 3.1).

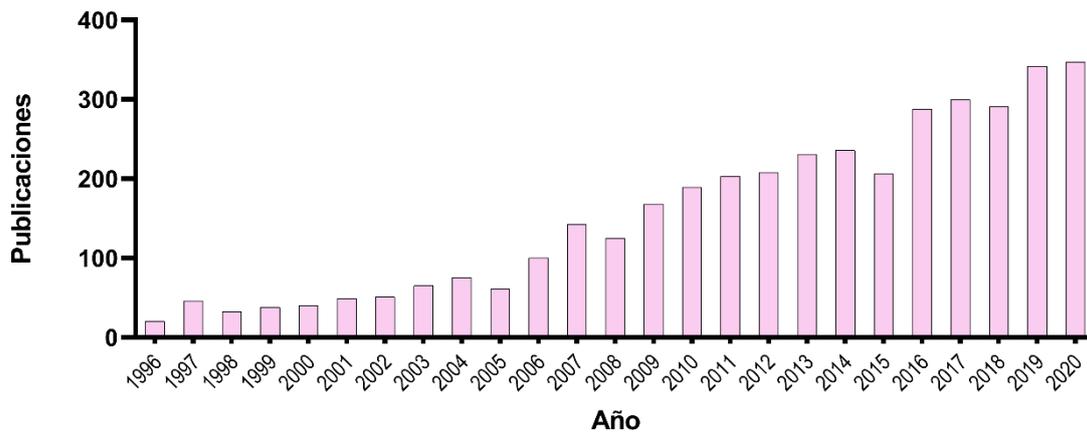


Figura 3.1. Evolución de las publicaciones sobre el estroncio y la regeneración ósea (Web of Science).

Tal y como se ha explicado en la introducción, se trata de un metal traza que se encuentra en el hueso en cantidades relativamente pequeñas (solo el 3.5 % del contenido de calcio)¹, pero cuyo efecto sobre el metabolismo óseo es indudable ya que actúa aumentando y manteniendo la formación ósea al impulsar la diferenciación y maduración de los osteoblastos², mientras inhibe la actividad de los osteoclastos responsables de la resorción ósea³. Además, pequeñas cantidades de este elemento pueden ayudar en la estabilización de la estructura ósea, y tiene un efecto positivo en la osteogénesis⁴.

El gran interés del efecto del Sr en la regeneración del tejido óseo se ha reflejado en el diseño y estudio de nuevos biomateriales que liberan Sr⁵. Las redes orgánico-inorgánicas obtenidas por el método sol-gel ya se han utilizado para desarrollar nuevos biomateriales que liberan estroncio, mostrando un comportamiento osteogénico prometedor. Así, Almeida *et al.* sintetizaron un material híbrido basado en el sistema PDMS-SiO₂ con capacidad para liberar Sr en un rango de concentración adecuado para la inducción de la reparación del tejido óseo⁶. Por otro lado, Omar *et al.* obtuvieron recubrimientos por el

método sol-gel que contenían nanopartículas de sílice funcionalizadas con Sr cuya respuesta *in vivo* era buena en cuanto a morfología y calidad óseas⁷. Igualmente, John *et al.* desarrollaron scaffolds o andamios híbridos con iones de Sr incorporados con prometedores resultados *in vitro*⁸. También nuestro equipo de investigación ha sintetizado un recubrimiento con Sr que muestra una mayor expresión génica de marcadores osteogénicos *in vitro*⁹.

Este elemento se utiliza, cada vez más, en tratamientos clínicos de regeneración ósea y en enfermedades de los huesos como la osteoporosis^{10,11}. Concretamente, el ranelato de estroncio y el cloruro de estroncio se han utilizado en la osteoporosis con el fin de disminuir el riesgo de fracturas óseas¹². En aplicaciones dentales en particular, el Sr se considera un elemento que mejora y acorta la recuperación después de la implantación. Así, Zhang *et al.* fabricaron un implante de titanio con la superficie nanoporosa a la que incorporaron Sr, obteniendo unos resultados que sugerían que dicho implante lograba una rápida osteointegración mejorando tanto la angiogénesis como la osteogénesis¹³. Por otra parte, un estudio realizado anteriormente por nuestro grupo de investigación de la primera capa de proteínas adsorbida en las superficies que llevan este ion metálico, ha evidenciado que puede tener un papel clave en la regeneración ósea¹⁴. No obstante, en otro estudio posterior, tal y como se ha comentado en la introducción, y gracias a la caracterización de las proteínas adsorbidas y los cultivos *in vitro*, se evidenció la existencia de una reacción inflamatoria del propio recubrimiento base causada por el precursor GPTMS¹⁵. Estos procesos inflamatorios fueron desencadenados por la activación de la cascada del complemento, fundamentalmente por las vías clásica y de lectinas¹⁶.

Por otra parte, el efecto de la concentración podría ser crucial. Neves *et al.* expusieron que pequeñas cantidades de Sr serían suficientes para tener impacto en la formación y remodelación del hueso⁵. A su vez, Dagang *et al.* compararon distintos porcentajes de Sr, encontrando una respuesta mayor con concentraciones más altas de este elemento¹⁷. Igualmente, Schrooten *et al.* encontraron que el efecto del Sr en la formación y mineralización óseas era dependiente de la dosis¹⁸. Por tanto, para este estudio se han sintetizado recubrimientos híbridos cargados con 0.5, 1 y 1.5 % en peso de cloruro de estroncio (Tabla 2.1) con el fin de obtener recubrimientos con propiedades osteogénicas mejoradas.

2. Resultados

2.1. Caracterización morfológica

2.1.1. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Los recubrimientos obtenidos no presentan separación de fases ni precipitados de SrCl_2 como se puede observar en las micrografías de SEM (Figura 3.2).

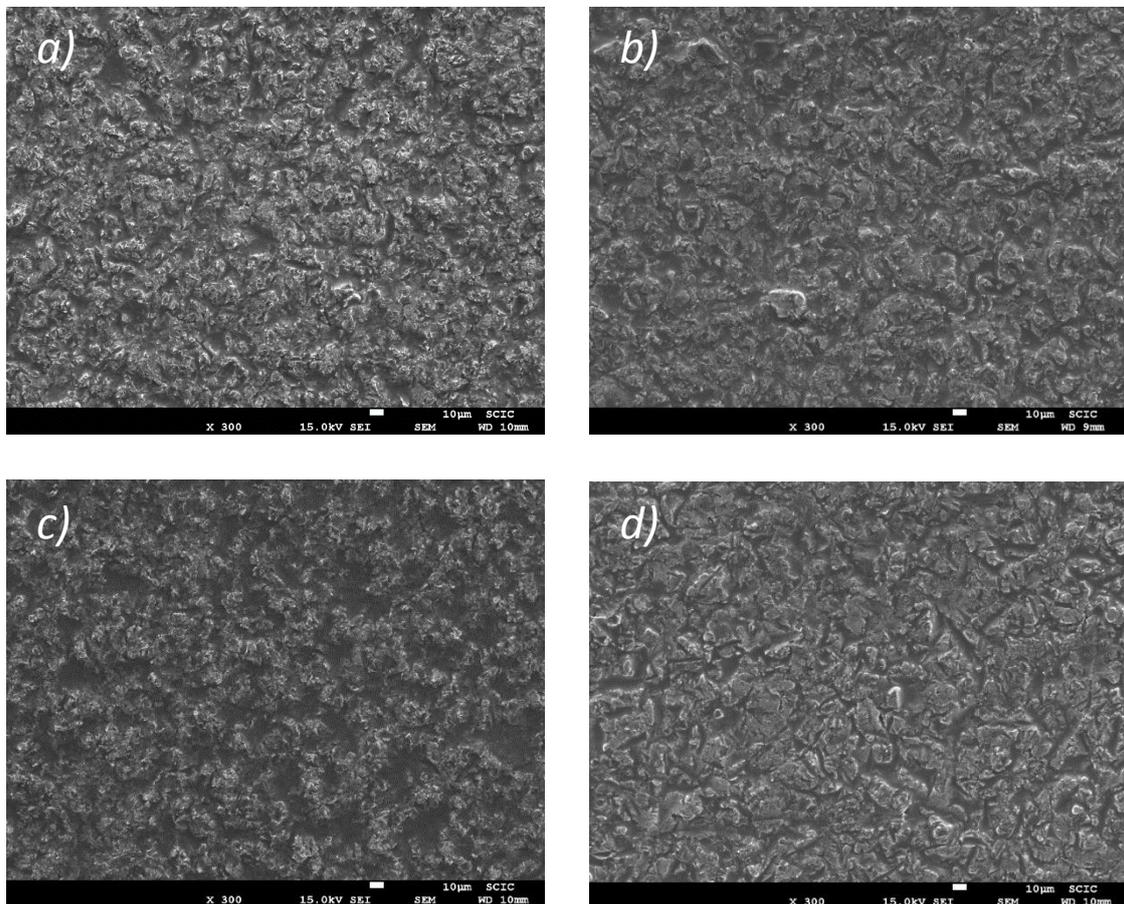


Figura 3.2. Micrografías por SEM de los recubrimientos (a) 7M:3T, (b) 7M:3T-0.5Sr, (c) 7M:3T-1Sr y (d) 7M:3T-1.5Sr.

Observando a grandes aumentos los recubrimientos con mayor porcentaje de sal, se pueden apreciar pequeñas porosidades de unos 100 nm (Figura 3.3). Estos poros presentes

pueden atribuirse a espacios vacíos que derivan de la evaporación de los compuestos volátiles que quedan atrapados dentro del recubrimiento¹⁹.

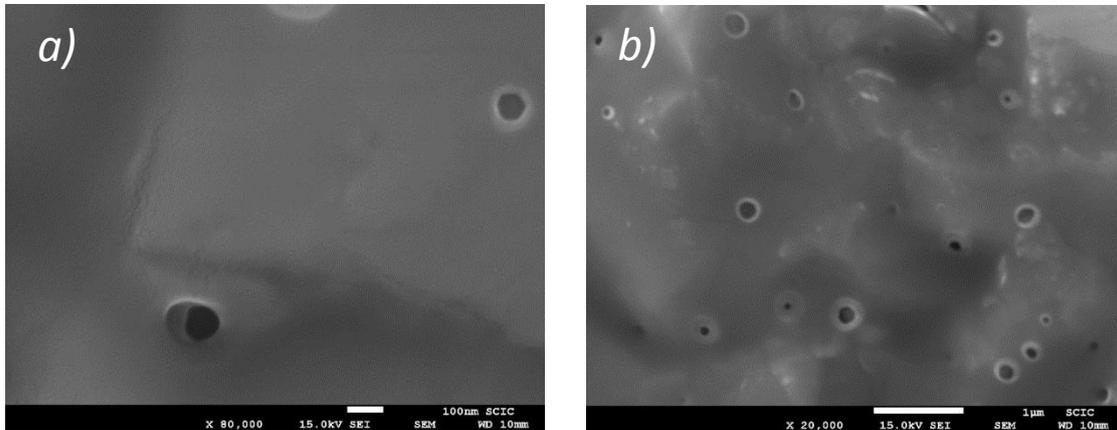


Figura 3.3. Detalle de las micrografías por SEM de los recubrimientos (a) 7M:3T-1Sr a 80000 aumentos y (b) 7M:3T-1.5Sr a 20000 aumentos.

2.1.2. Perfilometría óptica

Mediante esta técnica se obtienen los perfiles bidimensionales de los recubrimientos realizados con los distintos materiales. Gracias al software del equipo se obtiene el valor de Ra, un parámetro que cuantifica la rugosidad de la superficie.

La importancia de estos ensayos radica en que la rugosidad es un parámetro crítico en el proceso de adhesión celular, por lo que es clave para la osteointegración del implante²⁰.

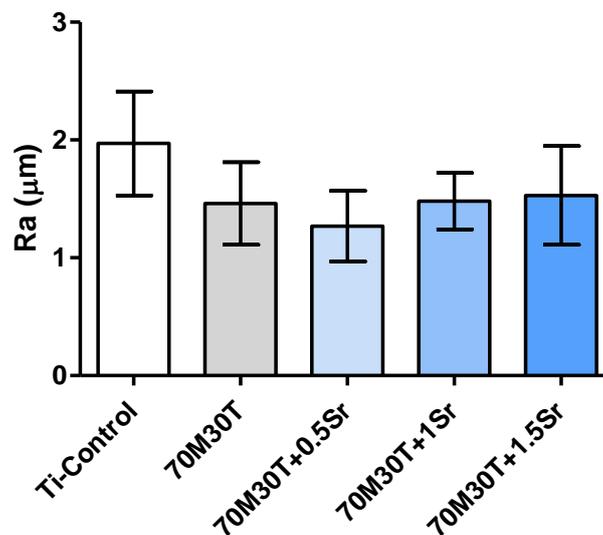


Figura 3.4. Representación gráfica de Ra para los diferentes sistemas dopados con SrCl₂.

A la vista de los resultados, se puede observar que los materiales sol-gel sintetizados cubren la rugosidad inicial de los discos de Ti, provocando una disminución en el parámetro Ra obtenido utilizando el perfilómetro óptico (Figura 3.4). Sin embargo, el valor de Ra aumenta ligeramente a medida que se incorporan mayores cantidades de Sr, aunque las diferencias no son significativas tras un test Newman-Keuls de comparaciones múltiples. Se confirma también que estos recubrimientos no presentan defectos notables, ni cráteres ni grandes poros.

2.2. Adherencia

Se caracteriza la adherencia del recubrimiento al metal por medio de la técnica de corte por enrejado. Para todas las formulaciones se obtienen recubrimientos adheridos al metal, sin desprendimiento del recubrimiento en ningún caso. Todos los recubrimientos presentan buenas propiedades superficiales, a saber, uniformidad, ausencia de grietas, transparencia y brillo.

Una vez realizados los cortes en cuadrícula y tras despegar la cinta de tira adhesiva de la superficie, se observa la misma con un microscopio óptico para comprobar la cantidad de material perdido y así determinar el grado de adherencia (Figura 3.5).

Todos los recubrimientos, tanto los base como los dopados con los distintos porcentajes, no presentan desprendimiento de material alguno, por lo que se pueden clasificar como “desprendimiento 0”. Por lo tanto, la adherencia del recubrimiento al sustrato es máxima en todos los casos.

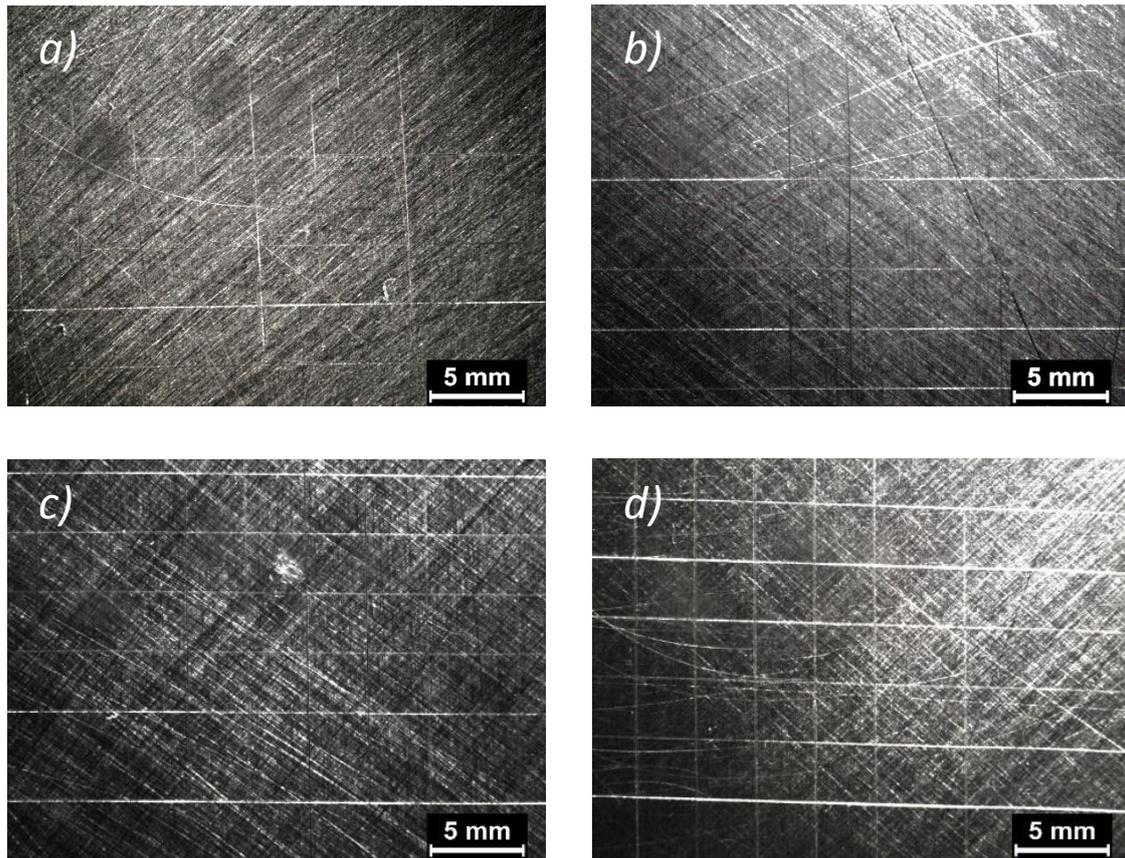


Figura 3.5. Ensayos de corte por enrejado para los sistemas (a) 7M:3T, (b) 7M:3T-0.5Sr, (c) 7M:3T-1Sr y (d) 7M:3T-1.5Sr, a un aumento de $\times 0.73$.

2.3. Caracterización química

2.3.1. FTIR/ATR

Esta técnica es una de las más utilizadas para identificar las reacciones tipo sol-gel, ya que permite caracterizar la estructura química de los materiales obtenidos. Con este ensayo se determina la red polisiloxánica, mediante la identificación de las bandas correspondientes a los enlaces Si-O-Si. Además, se puede evaluar si las distintas condiciones de síntesis aplicadas, al añadir las diferentes proporciones del agente dopante, han afectado a la formación de la mencionada red polisiloxánica.

En la Figura 3.6 se muestran los espectros IR obtenidos para los recubrimientos híbridos dopados con diferentes porcentajes de SrCl_2 .

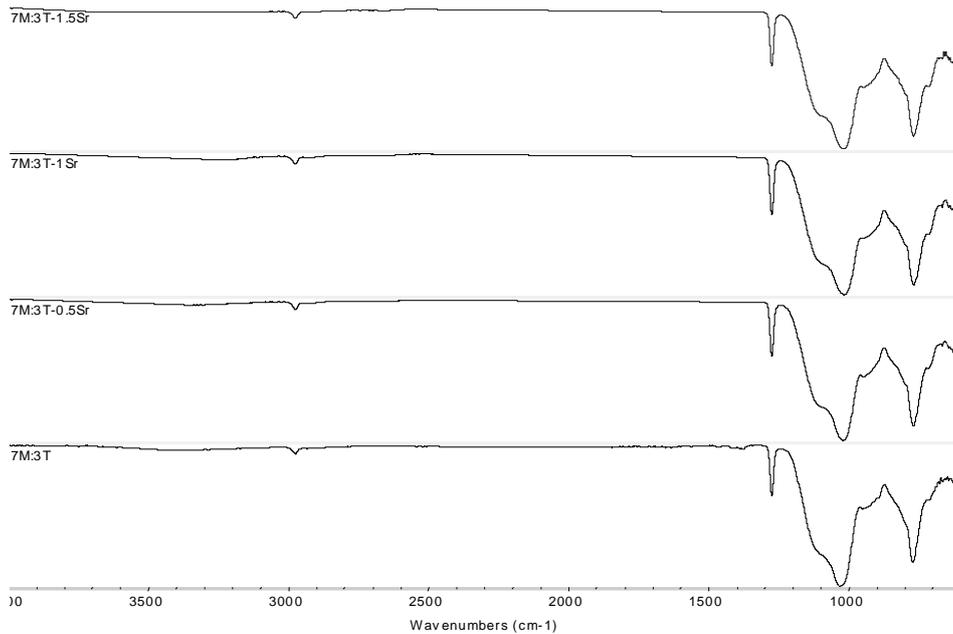


Figura 3.6. Espectros IR del sistema 7M:3T base y dopado con diferentes porcentajes de SrCl₂.

En todos los espectros se detecta una región asociada a los enlaces Si-O-Si de la red formada (entre 600 y 1200 cm⁻¹). Todos los espectros tienen en común dos bandas intensas alrededor de 1075 cm⁻¹ y de 1165 cm⁻¹, correspondientes a la vibración de tensión asimétrica del enlace Si-O-Si. Alrededor de 760 cm⁻¹ se observa la banda asociada a la vibración de tensión simétrica de este enlace. Todas estas bandas confirman que se han conseguido obtener, en todos los casos, redes polisiloxánicas²¹, demostrando que el dopado no afecta negativamente a la formación de estas.

También se observa la banda asociada a productos residuales de la reacción sol-gel. Así, a 940 cm⁻¹ aparece una banda asociada a la vibración de tensión de los grupos terminales Si-OH. La intensidad de esta en todos los espectros es baja, por lo que son pocos los grupos silanol que no han condensado. Esto quiere decir que la red que se ha formado es considerablemente densa.

Por otra parte, la presencia del grupo metilo (no hidrolizable) del MTMOS la confirman las bandas a 2975 cm⁻¹ y a 1275 cm⁻¹ debidas a la vibración de tensión asimétrica del grupo -CH₃ y a la vibración de deformación del grupo metilo del enlace Si-CH₃, respectivamente²².

2.3.2. ^{29}Si -RMN

La caracterización química de los materiales obtenidos se completa mediante la ^{29}Si -RMN. Este tipo de espectroscopia permite estudiar el entorno de los átomos de silicio de los sistemas, es decir, se puede obtener información acerca del grado de hidrólisis y condensación de los compuestos siloxánicos.

En las siguientes figuras (3.7 a 3.10), correspondientes a los espectros de ^{29}Si -RMN en estado líquido, se muestra la evolución en el tiempo, tanto de la hidrólisis como de la condensación, en los diferentes sistemas.

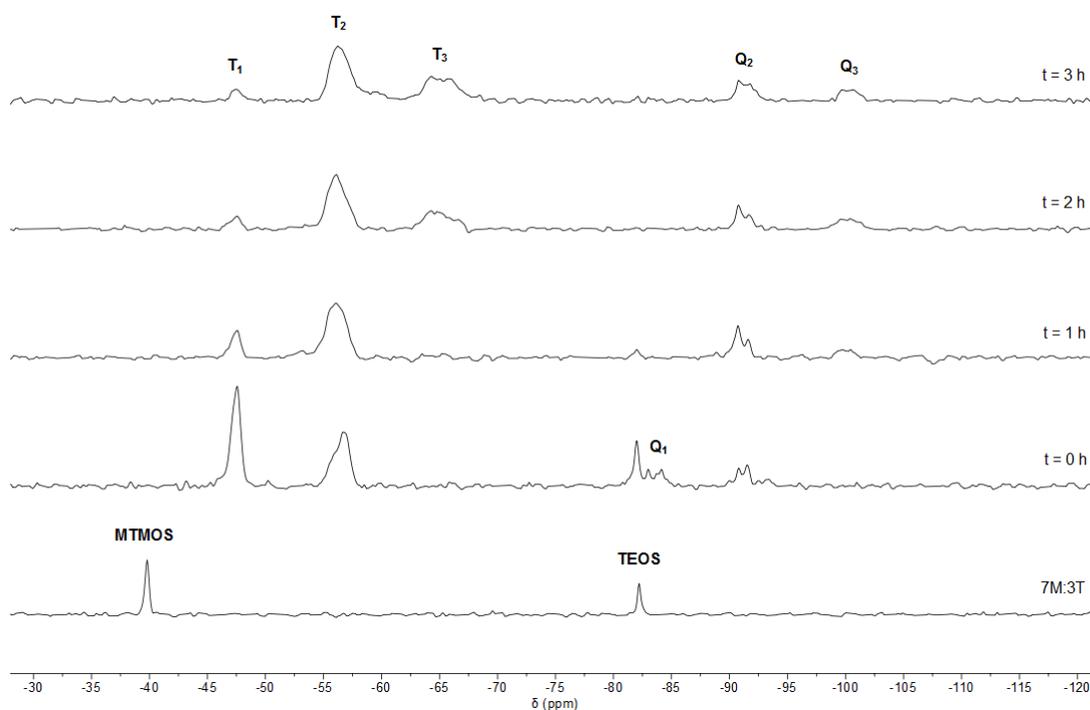


Figura 3.7. Espectro ^{29}Si -RMN líquido del sistema 7M:3T base.

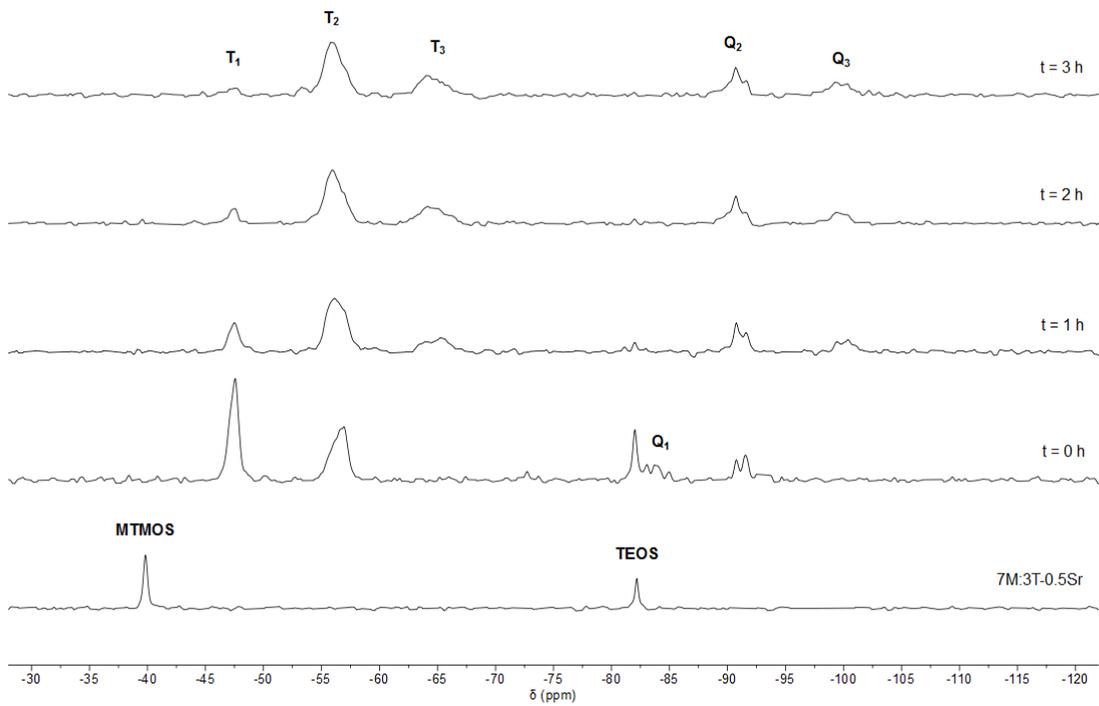


Figura 3.8. Espectro ^{29}Si -RMN líquido del sistema 7M:3T-0.5Sr.

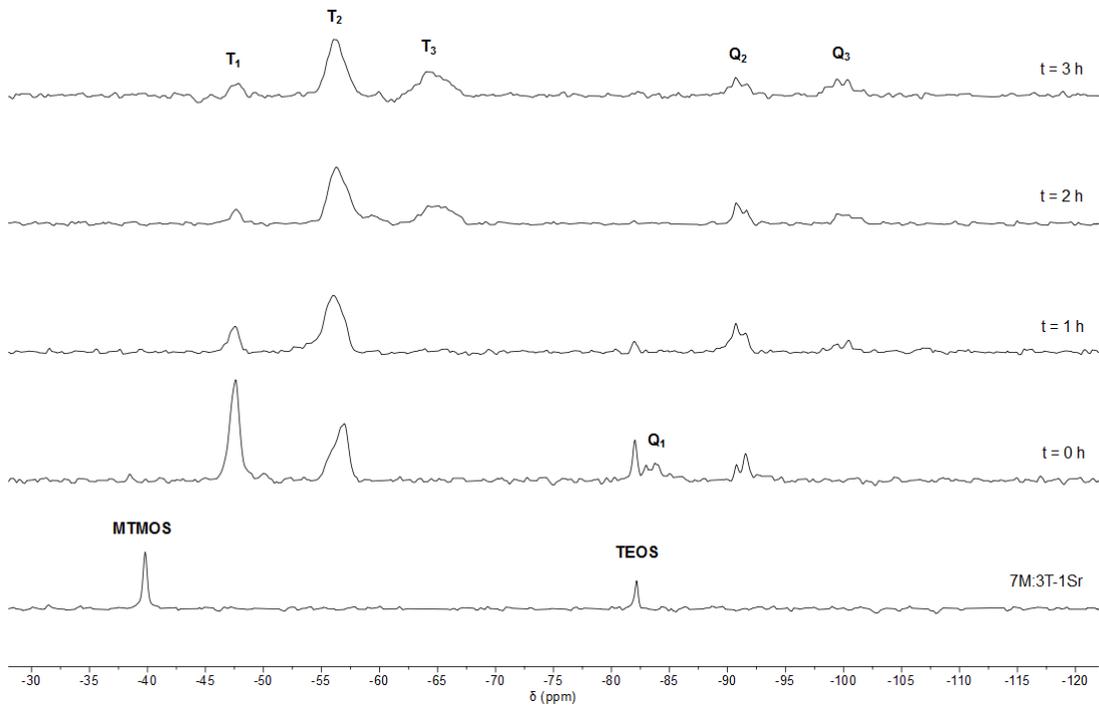


Figura 3.9. Espectro ^{29}Si -RMN líquido del sistema 7M:3T-1Sr.

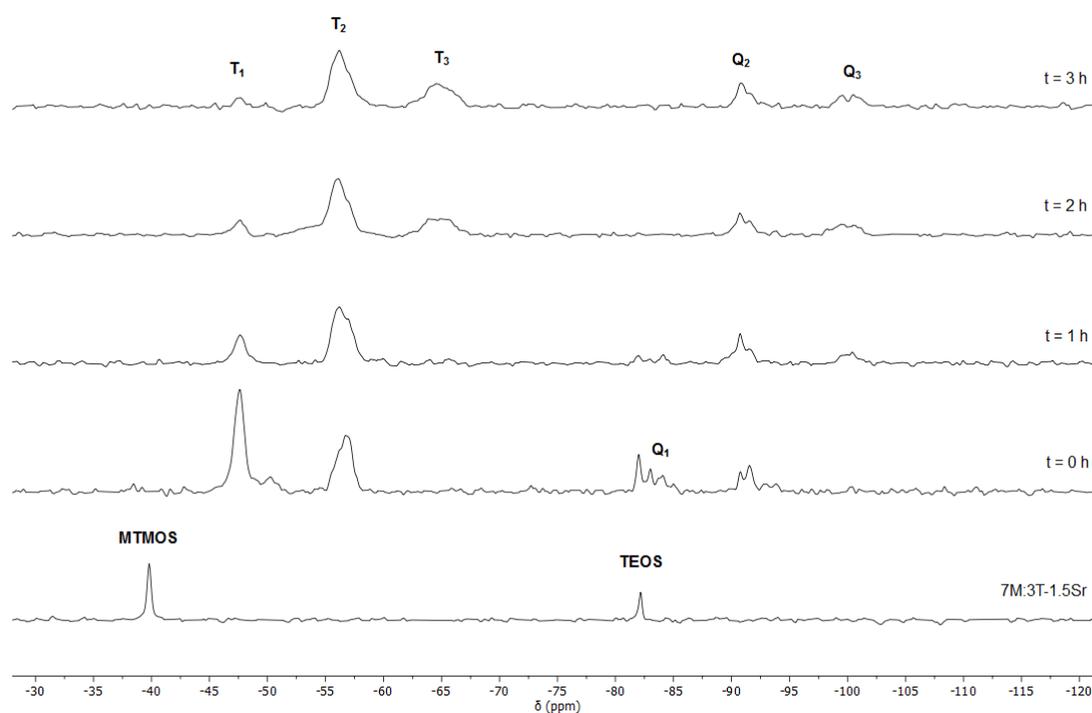


Figura 3.10. Espectro ^{29}Si -RMN líquido del sistema 7M:3T-1.5Sr.

Como se puede apreciar en todas las formulaciones, a tiempo cero predominan las especies con menor grado de condensación y, a medida que va transcurriendo el tiempo, va disminuyendo la intensidad de las mismas, mientras que la intensidad de las señales correspondientes a las especies de mayor grado de condensación va aumentando.

El precursor MTMOS presenta un desplazamiento químico alrededor de -40 ppm. Al añadir el agua acidificada esta señal desaparece completamente, lo que implica la muy rápida condensación de este precursor una vez hidrolizado, ya que tampoco se observa el pico correspondiente al precursor hidrolizado, y aparecen las señales asociadas a las especies condensadas T_1 y T_2 . A la primera hora de reacción, ya se observa una mayor intensidad de la señal correspondiente a la especie T_2 , y a las dos horas comienza a aparecer la banda correspondiente a T_3 . Cuanto más tiempo transcurre desde la adición del agua acidificada, las señales de las especies T_2 y T_3 aumentan considerablemente, en detrimento de la señal correspondiente a T_1 . La tendencia es similar en todos los sistemas, obteniéndose todas las especies condensadas posibles para el MTMOS: T_1 , T_2 (la más abundante) y T_3 .

En el caso del TEOS, el desplazamiento químico del precursor se encuentra a -82 ppm. En el instante en el que se añade el agua acidificada, esta señal permanece y aparecen

señales asociadas a las especies condensadas Q_1 y Q_2 . La señal correspondiente a la especie Q_1 se hace muy pequeña a la primera hora de reacción, siendo casi inapreciable. La señal asociada al precursor se mantiene hasta la primera hora de reacción, aunque su intensidad ya es muy baja, y desaparece totalmente a las 2 horas del ensayo. A su vez, a medida que transcurre el tiempo de reacción, aumenta la intensidad de las señales asociadas a las especies Q_2 y Q_3 , siendo siempre el pico correspondiente a Q_2 mayor que el de Q_3 . Los espectros son similares en todos los sistemas, lográndose todas las especies condensadas del TEOS, excepto la más condensada (Q_4).

Los desplazamientos químicos de cada especie se resumen en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Valores de desplazamiento químico de las señales de ^{29}Si -RMN líquido de los precursores.

Precursor	Especie	δ (ppm)
MTMOS	T_0	-40
	T_1	-47
	T_2	-57
	T_3	-65
TEOS	Q_0	-82
	Q_1	-83
	Q_2	-92
	Q_3	-101

A la vista de los resultados obtenidos queda patente que, transcurridas dos horas desde la adición del agua acidificada, en ningún caso las especies mayoritarias son las de mayor grado de condensación. Por ello, se recurre a un tratamiento térmico con el objetivo de conseguir una mayor condensación de las especies, y así una red polisiloxánica reticulada.

Para el estudio de la red final formada tras el curado (a una temperatura que no afecte negativamente a los compuestos), se utiliza la técnica de ^{29}Si -RMN de sólidos. Durante el tratamiento térmico se promueven las reacciones de condensación, donde los grupos silanoles contiguos que no han reaccionado anteriormente, lo hacen para dar grupos siloxano, produciéndose así un aumento del entrecruzamiento.

A continuación, en la Figura 3.11 se muestran los espectros de ^{29}Si -RMN de sólidos realizados para todos los sistemas.

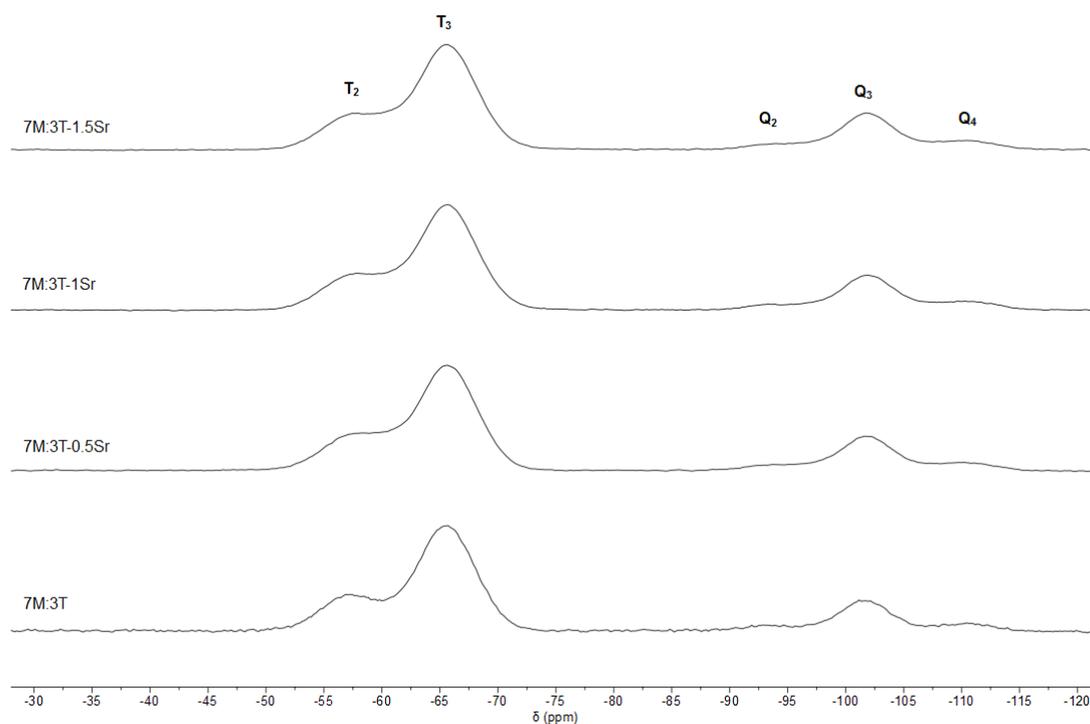


Figura 3.11. Espectro ^{29}Si -RMN sólido del sistema 7M:3T + % SrCl₂.

El espectro muestra las señales de las especies T₂ y T₃ del precursor MTMOS, y las asociadas a las especies Q₂, Q₃ y Q₄ del TEOS. Las ratios de las áreas de los picos T₃ y T₂ se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Ratio de las áreas de los picos T₃ y T₂ obtenidas por ^{29}Si -RMN.

Formulación	Ratio T ₃ /T ₂
7M:3T	3.35
7M:3T-0.5Sr	3.20
7M:3T-1Sr	3.16
7M:3T-1.5Sr	3.13

Como se puede observar en las ratios T₃/T₂, tras el tratamiento térmico, la reticulación de la red es ligeramente menor al aumentar el contenido de la sal de Sr. Ahora bien, las especies más condensadas aumentan en todos los casos. En el caso del MTMOS, la señal más intensa corresponde a la especie más condensada (T₃). En lo referente al TEOS, puede apreciarse la especie Q₄ (la más condensada) que no se veía en los espectros obtenidos en estado líquido, aunque es la especie Q₃ la más abundante.

Los resultados obtenidos demuestran que mediante el tratamiento térmico se promueven las reacciones de condensación. En otras palabras, aumenta la presencia de las especies condensadas consiguiéndose una red entrecruzada densa, no viéndose afectada en gran medida por la incorporación de la sal de Sr, en ninguna de las proporciones.

2.4. Determinación del grado de hidrofilia/hidrofobia

La hidrofilia de los recubrimientos influye en su afinidad por el agua, y por lo tanto podrá influir en su velocidad de degradación. Cuanto menor es el ángulo de contacto, más hidrófilo es el material, es decir, absorberá agua más fácilmente, estando favorecida así su degradación.

Con el fin de caracterizar el grado de hidrofilia/hidrofobia se realizan medidas del ángulo de contacto, que forma una gota de agua destilada, sobre los recubrimientos sintetizados.

Los valores obtenidos para cada recubrimiento se representan en la Figura 3.12.

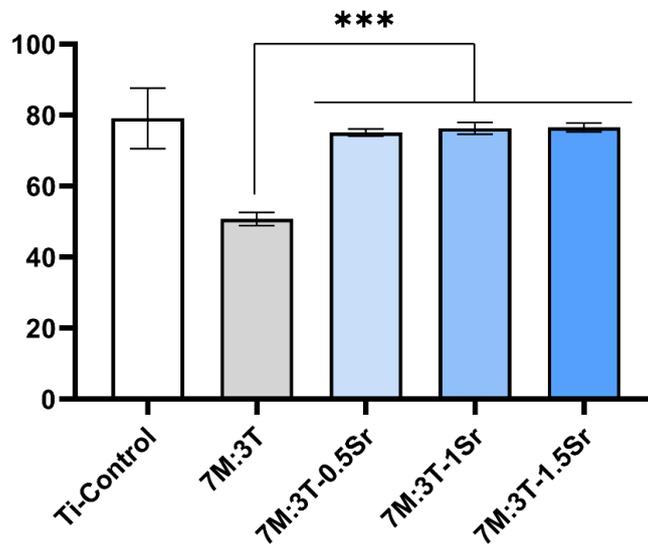


Figura 3.12. Valores de ángulo de contacto de los recubrimientos de los sistemas 7M:3T + % SrCl₂. (***) $p \leq 0.001$

Como se puede observar, el recubrimiento del material base 7M:3T convierte la superficie de titanio en una superficie mucho más hidrófila, presentando un ángulo de contacto de alrededor de 50°. La adición de SrCl₂ a este material provoca un incremento considerable del ángulo de contacto (con valores que rondan los 75°), resultando tener un carácter más

hidrófobo que el base, pero siendo todavía más hidrófilo que el disco de titanio sin recubrir, y sin mostrar diferencias con el porcentaje de sal incorporada al recubrimiento.

Con todo, para estos recubrimientos el ángulo de contacto ronda los 70°, siendo este resultado muy interesante, ya que es el valor que está descrito en bibliografía como el ángulo de contacto óptimo para la adhesión celular²³, proceso inicial importante para una buena respuesta tisular.

2.5. Ensayo de degradación hidrolítica

Los recubrimientos sol-gel, como se ha dicho anteriormente, pueden degradarse en contacto con agua, tanto por erosión como por hidrólisis de las películas. La degradación del recubrimiento está unida a la posible capacidad osteorregeneradora del mismo, ya que se liberan productos basados en silicio, que se reabsorben por el organismo.

Para evaluar la cinética de degradación por hidrólisis de los recubrimientos se mide la pérdida gradual de peso experimentada en el tiempo. Los resultados para los diferentes sistemas se muestran en la Figura 3.13.

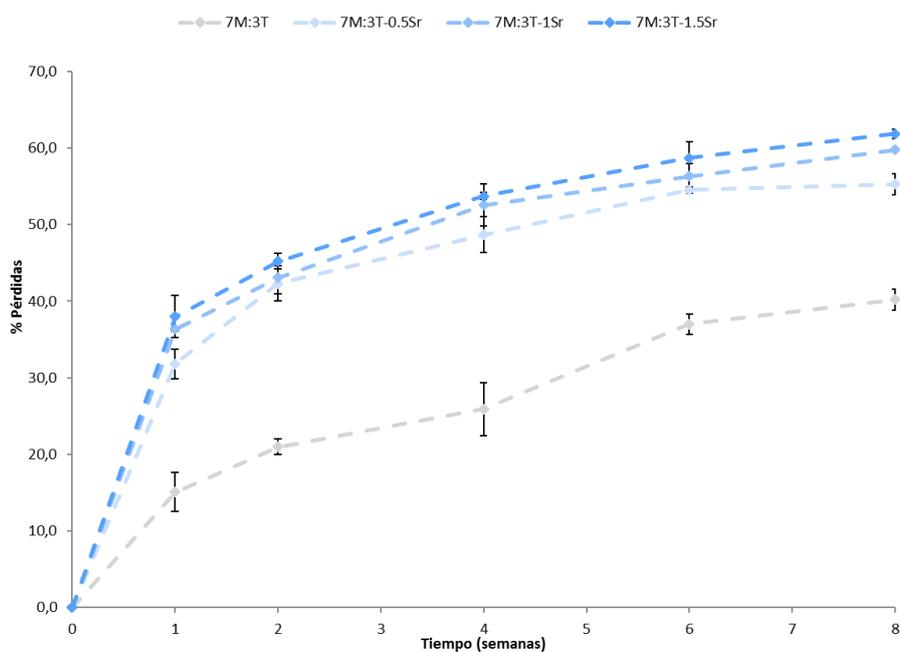


Figura 3.13. Degradación hidrolítica de los recubrimientos del sistema 7M:3T + % SrCl₂.

En los tres sistemas dopados se observa una pérdida considerable de material en los primeros siete días del ensayo, mientras que, a partir de ese tiempo, la pérdida se hace menos pronunciada, más gradual, hasta llegar a valores casi constantes. Del mismo modo, aunque en menor medida, el recubrimiento base presenta el mismo perfil. En lo referente a la adición del agente dopante, los sistemas con SrCl_2 muestran porcentajes de degradación mayores que el sistema base, siendo muy pequeña la diferencia entre los tres recubrimientos cargados con la sal de Sr en diferentes proporciones.

2.6. Ensayos de liberación

La degradación hidrolítica de estos recubrimientos provoca la liberación tanto de iones de Si como de Sr. Ambos elementos podrían tener un papel crucial en la regeneración del tejido óseo, por lo que ahí radica la importancia del estudio de la liberación de los mismos.

El silicio que se libera en los procesos hidrolíticos de degradación tiene una gran capacidad osteorregeneradora, esto es, promueve la creación de tejido óseo alrededor del implante²⁴. El Si desprendido en bajas concentraciones no solo no es tóxico, sino que afecta positivamente a la proliferación celular²⁵.

Esta liberación está condicionada por el grado de entrecruzamiento de la red formada que, en este caso, tal y como se ha visto por ^{29}Si -RMN de sólidos, es muy similar. También es un factor importante la hidrofilia de cada formulación, y como se ha observado, esta disminuye con la adición de Sr, aunque entre los recubrimientos con diferentes cantidades de sal no hay diferencias significativas.

En la Figura 3.14 se muestran los resultados obtenidos mediante ICP-AES de la liberación de Si para los diferentes sistemas.

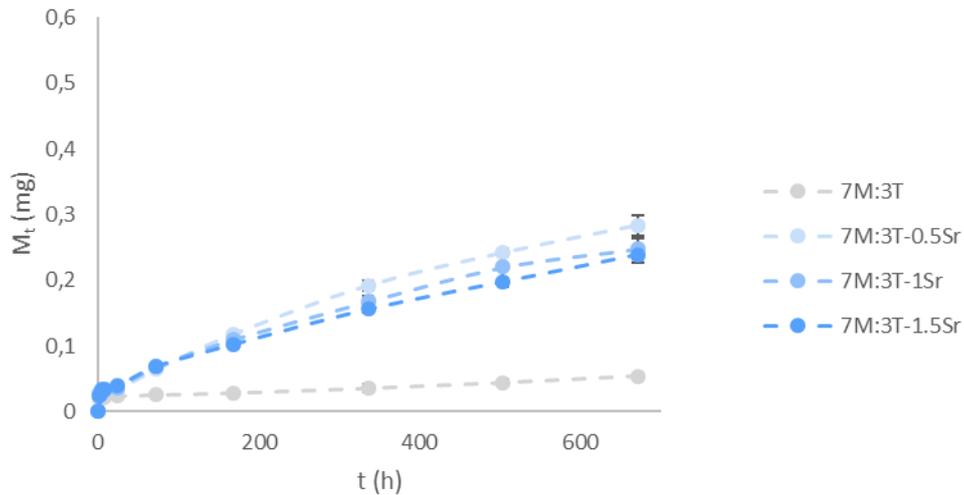


Figura 3.14. Liberación de silicio del sistema 7M:3T + % SrCl₂.

Como se puede observar, el ion silicio se libera de una forma continuada durante las cuatro semanas que dura el ensayo. Esto es muy positivo ya que es un elemento importante en la osteointegración, cuya etapa primera, la formación del hueso reticular, dura alrededor de 4 a 6 semanas.

El perfil de liberación de silicio de los recubrimientos es similar al de la degradación hidrolítica, habiendo una diferencia notable entre el sistema sin dopar y los tres dopados, donde, no hay grandes diferencias entre ellos.

Teniendo en cuenta que el recubrimiento actúa como medio para la liberación localizada de diferentes sustancias, gracias a los procesos de absorción de agua y posterior degradación hidrolítica del mismo, se estudió, también por ICP-AES, la liberación de los iones Sr al medio.

A continuación, se muestran las curvas de liberación de Sr que presentan los diferentes sistemas (Figura 3.15).

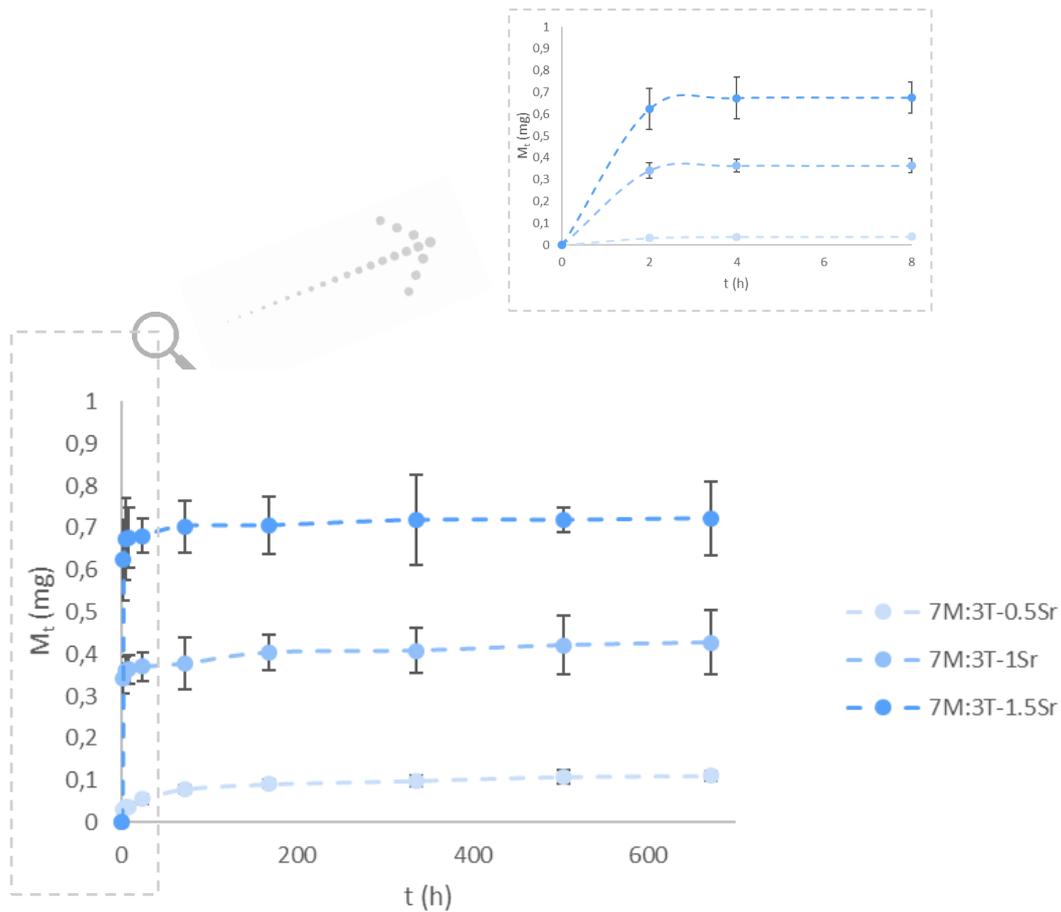


Figura 3.15. Liberación de Sr del sistema 7M:3T + % SrCl₂.

Como se puede observar en la figura los tres recubrimientos presentan unos perfiles de liberación idénticos, con una liberación muy rápida en las primeras horas del ensayo, seguido de una ralentización de la misma. Se observa además una mayor liberación cuanto mayor es el contenido de la sal en el recubrimiento.

2.7. Análisis proteómico de las proteínas adsorbidas en la superficie

El análisis LC-MS/MS identificó 111 proteínas distintas unidas a las superficies estudiadas (Anexo 1). La cuantificación relativa de proteínas entre los recubrimientos dopados con Sr y el material sol-gel base se llevó a cabo utilizando el software Progenesis QI. Además, se emplearon las bases de datos DAVID y PANTHER para clasificar las proteínas según sus funciones.

Los resultados del análisis comparativo de Progenesis QI se muestran en las Tablas 3.3 y 3.4, donde se pueden observar los cambios en los patrones de las proteínas adsorbidas cuando se comparan las muestras dopadas con Sr con la referencia del recubrimiento base. El análisis diferencial de Progenesis QI reveló 46 proteínas adsorbidas, de las cuales 6 están menos adheridas a la superficie del biomaterial cuando se añade SrCl₂ a la red sol-gel en comparación con la muestra de referencia (Tabla 3.3). Por el contrario, otras 40 proteínas tienden a aumentar su afinidad y se encuentran adsorbidas en las superficies de los materiales dopados con Sr en mayores proporciones (Tabla 3.4).

Tabla 3.3. Análisis diferencial Progenesis QI de proteínas menos adsorbidas en recubrimientos dopados con Sr (7M:3T-0.5Sr, 7M:3T-1Sr y 7M:3T-1.5Sr) respecto al material base. Las proteínas detectadas con ANOVA $p < 0.05$ (en amarillo) y una ratio inferior a 0.77 (en rojo) se consideraron significativamente diferentes (en negrita).

Código	Proteína	7M:3T-0.5Sr vs 7M:3T		7M:3T-1Sr vs 7M:3T		7M:3T-1.5Sr vs 7M:3T	
		<i>p</i>	Ratio	<i>p</i>	Ratio	<i>p</i>	Ratio
APOD	Apolipoprotein D	0.017	0.75	0.207	0.79	0.197	0.89
A1AG1	Alpha-1-acid glycoprotein 1	0.821	1.23	0.533	1.38	0.043	0.59
A1AG2	Alpha-1-acid glycoprotein 2	0.947	1.13	0.553	1.35	0.027	0.57
ZA2G	Zinc-alpha-2-glycoprotein	0.681	0.96	0.485	0.86	0.006	0.53
ANT3	Antithrombin-III	0.019	0.19	0.463	0.62	0.096	0.35
PROC	Vitamin K-dependent protein C	0.011	0.41	0.006	0.14	0.006	0.35

Tabla 3.4. Análisis diferencial Progenesis QI de proteínas más adsorbidas en recubrimientos dopados con Sr (7M:3T-0.5Sr, 7M:3T-1Sr y 7M:3T-1.5Sr) respecto al material base. Las proteínas detectadas con ANOVA $p < 0.05$ (en amarillo) y una ratio superior a 1.3 (en verde) se consideraron significativamente diferentes (en negrita).

Código	Proteína	7M:3T-0.5Sr vs 7M:3T		7M:3T-1Sr vs 7M:3T		7M:3T-1.5Sr vs 7M:3T	
		<i>p</i>	Ratio	<i>p</i>	Ratio	<i>p</i>	Ratio
HRG	Histidine-rich glycoprotein	0.415	1.39	0.010	9.51	0.020	11.23
FA11	Coagulation factor XI	0.192	1.60	0.000	9.09	0.055	6.85
CADH1	Cadherin-1	0.498	1.83	0.031	6.77	0.302	5.27
PCOC1	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	0.210	5.04	0.038	17.68	0.156	4.06
KV302	Ig kappa chain V-III region SIE	0.059	3.39	0.001	12.49	0.561	4.06
KNG1	Kininogen-1	0.021	1.95	0.005	4.19	0.148	3.21

LAC2	Ig lambda-2 chain C regions	0.238	2.09	0.006	7.23	0.402	2.92
APOC1	Apolipoprotein C-I	0.031	2.37	0.018	2.43	0.103	2.77
APOC4	Apolipoprotein C-IV	0.004	1.93	0.021	1.85	0.003	2.71
TETN	Tetranectin	0.036	2.16	0.006	3.59	0.221	2.53
CD5L	CD5 antigen-like	0.004	2.53	0.001	3.32	0.057	2.50
PROS	Vitamin K-dependent protein S	0.001	2.84	0.007	3.75	0.088	2.35
APOL1	Apolipoprotein L1	0.001	1.93	0.029	1.55	0.001	2.32
SEPP1	Selenoprotein P	0.055	1.47	0.015	1.87	0.010	2.28
C4BPA	C4b-binding protein alpha chain	0.002	2.59	0.002	2.89	0.031	2.23
HV320	Ig heavy chain V-III region GAL	0.002	2.66	0.000	3.08	0.460	2.20
GELS	Gelsolin	0.022	2.01	0.003	4.01	0.110	2.19
SAA4	Serum amyloid A-4 protein	0.387	1.12	0.693	1.09	0.001	2.14
CFAH	Complement factor H	0.087	1.46	0.006	3.22	0.033	2.08
IGLL5	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	0.259	1.77	0.008	4.14	0.274	2.07
AMBP	Protein AMBP	0.402	1.26	0.017	3.35	0.219	1.96
APOH	Beta-2-glycoprotein 1	0.107	2.79	0.040	6.15	0.917	1.88
HEMO	Hemopexin	0.144	1.82	0.019	4.00	0.434	1.83
FA5	Coagulation factor V	0.078	1.96	0.038	2.42	0.278	1.71
IGHG1	Ig gamma-1 chain C region	0.017	1.95	0.036	2.88	0.218	1.68
CO3	Complement C3	0.073	1.59	0.016	2.36	0.469	1.55
A1AT	Alpha-1-antitrypsin	0.066	1.85	0.005	3.69	0.307	1.54
PPIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	0.395	1.53	0.019	4.91	0.488	1.52
AACT	Alpha-1-antichymotrypsin	0.094	1.73	0.002	3.87	0.155	1.52
THRB	Prothrombin	0.411	1.13	0.097	1.36	0.036	1.52
IC1	Plasma protease C1 inhibitor	0.000	1.79	0.001	2.16	0.165	1.49
ITIH4	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	0.126	1.29	0.034	1.98	0.058	1.47
C1R	Complement C1r subcomponent	0.004	1.65	0.020	1.41	0.009	1.45
APOA2	Apolipoprotein A-II	0.023	1.45	0.682	1.07	0.050	1.32
KV105	Ig kappa chain V-I region DEE	0.166	1.29	0.038	1.97	0.444	1.25

HPT	Haptoglobin	0.127	2.08	0.011	3.63	0.775	1.20
ITIH1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	0.086	1.79	0.045	2.84	0.766	1.16
PON1	Serum paraoxonase / arylesterase 1	0.056	1.38	0.044	1.81	0.693	1.12
C1S	Complement C1s subcomponent	0.049	1.39	0.417	1.12	0.681	1.06
A2MG	Alpha-2-macroglobulin	0.458	1.43	0.039	2.32	0.999	1.00

Realizando el análisis de las proteínas adsorbidas de forma diferencial en las superficies mediante la herramienta DAVID se han identificado proteínas relacionadas con los procesos de inflamación, coagulación sanguínea, fibrinólisis y regeneración ósea.

Así, aquellas cuyo valor estadístico p es inferior a 0.05 están marcadas en amarillo. Por otro lado, las proteínas con una ratio menor a 0.77 o superior a 1.3 están coloreadas en rojo y en verde, respectivamente. Aquellas que cumplen la condición de $p < 0.05$ y alguno de los otros dos supuestos, se consideran significativamente diferentes y están destacadas en negrita.

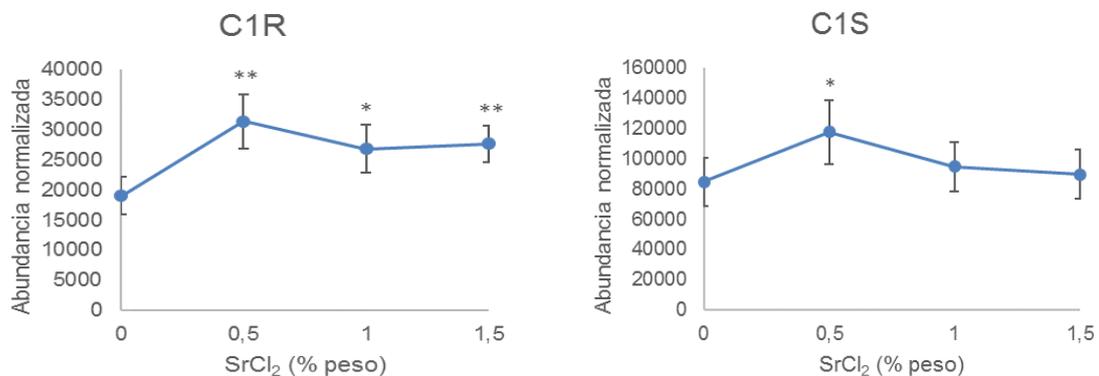
Tal y como se puede observar en la Tabla 3.3, las proteínas ANT3 (con un pronunciado descenso inicial) y PROC, relacionadas con los procesos de regulación de la coagulación y activación de la fibrinólisis, se encuentran en cantidades más pequeñas en los recubrimientos con Sr que en las superficies de los recubrimientos no suplementados. La apolipoproteína APOD, importante en el estrés oxidativo, y las glicoproteínas A1AG1 y A1AG2, relacionadas con la respuesta en la fase aguda, también muestran una unión preferencial a las superficies del material base. La proteína ZA2G, perteneciente al complejo principal de histocompatibilidad, muestra un comportamiento similar.

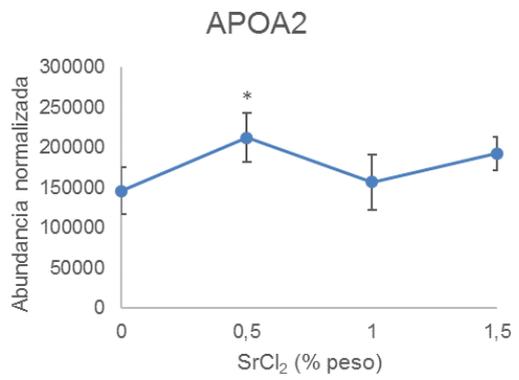
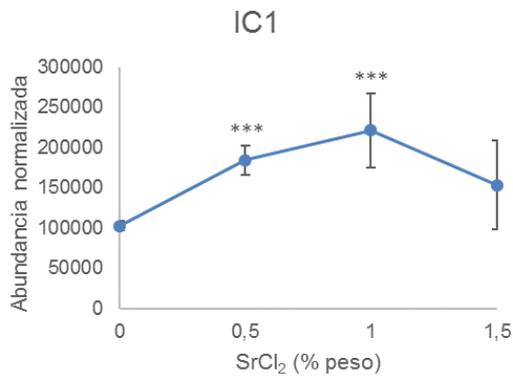
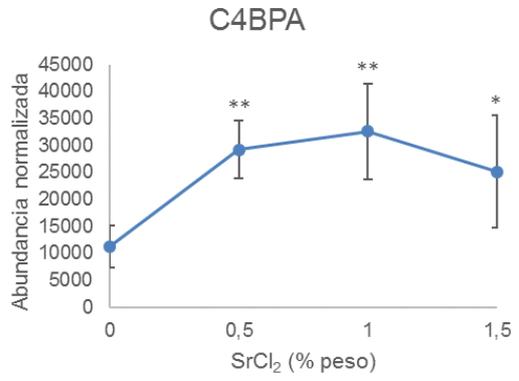
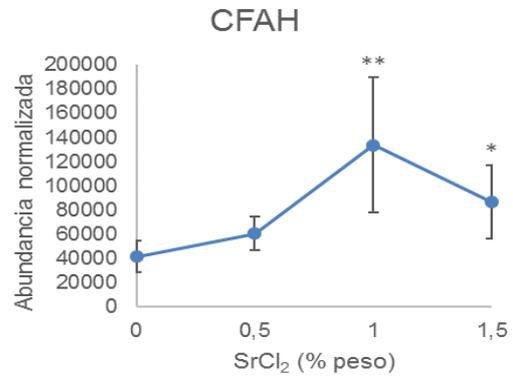
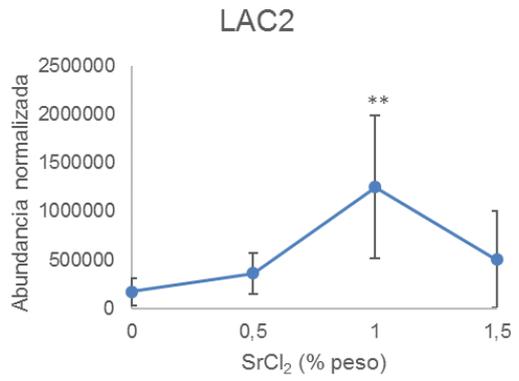
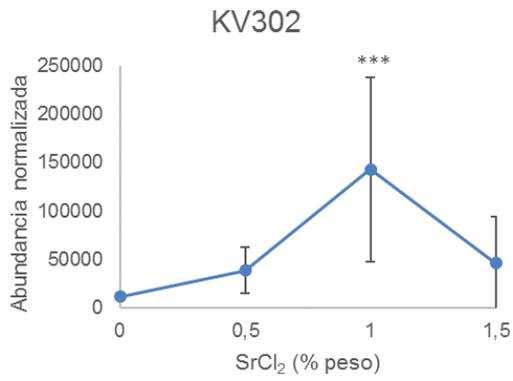
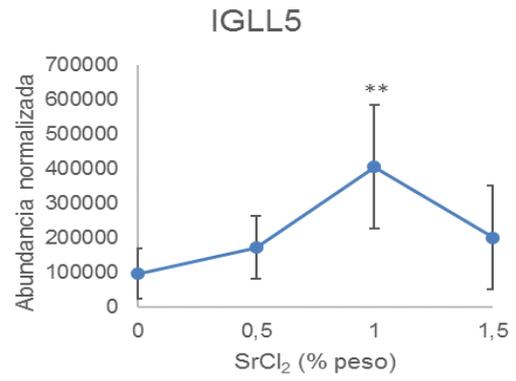
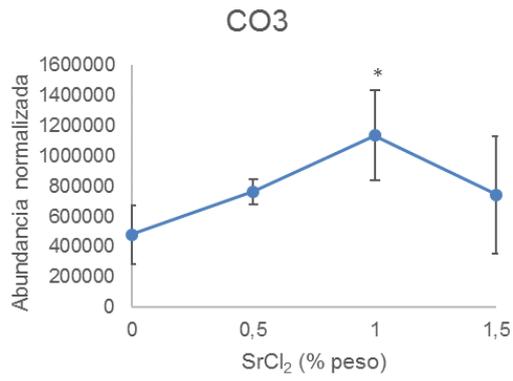
Entre las proteínas con mayor afinidad por las superficies de los recubrimientos dopados con Sr (Tabla 3.4) se ha detectado un grupo cuyas funciones están ligadas al sistema inmune (C1S, C1R, CO3, C4BPA, CFAH, IC1 y las inmunoglobulinas IGLL5, IGHG1, KV302 y LAC2). Además, se encuentra un grupo de apolipoproteínas como APOA2, APOC1, APOC4, APOH, APOL1 y SAA4. Estas apolipoproteínas tienen funciones relacionadas con los procesos metabólicos de las lipoproteínas y la unión de fosfolípidos. Por otro lado, se han identificado proteínas relacionadas con los procesos de coagulación sanguínea y fibrinólisis (A2MG, FA11, FA5, HRG, KNG1, PROS y THBR). De hecho,

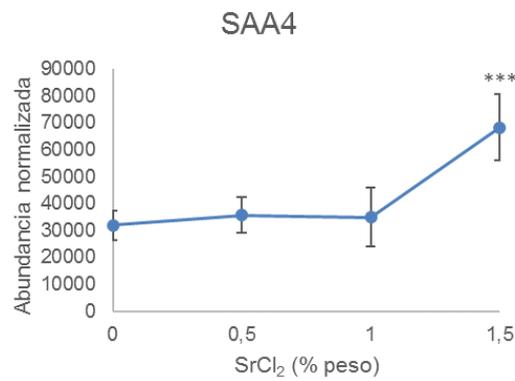
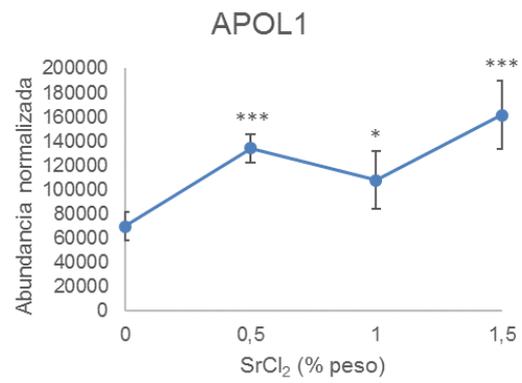
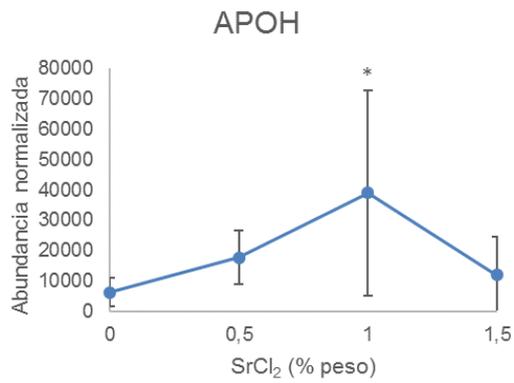
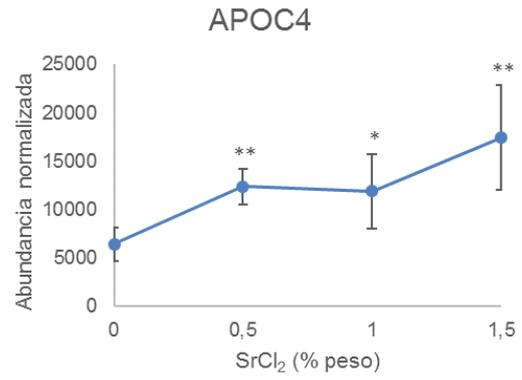
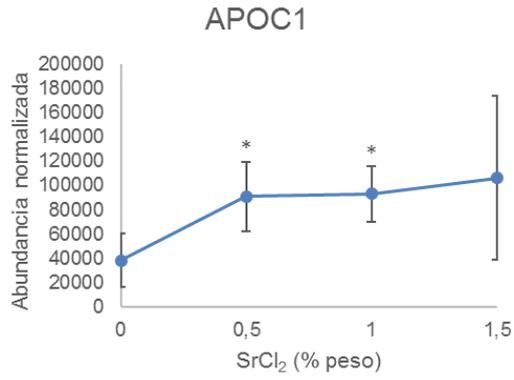
HRG se encuentra en lo más alto de la lista en la formulación que contiene un 1.5 % de Sr, donde se adsorbe 11.2 veces más respecto a la muestra de referencia. También se han encontrado las glicoproteínas ITIH4 y SEPP1 en estas superficies modificadas. Unidas preferentemente a los recubrimientos cargados con Sr se pudieron encontrar también proteínas intervinientes en la adhesión celular y la matriz extracelular, importantes para la integración del implante, como la TETN, que también está vinculada con la regeneración ósea. La técnica LC-MS/MS permitió, además, la detección de proteínas relacionadas, en cierto grado, con en el desarrollo de nuevo hueso como la PON1. También fueron identificados componentes celulares/citoplasmáticos de unión y adhesión celular como la GELS, relacionada igualmente con la regeneración ósea. Finalmente se detectaron otras proteínas como A1AT, AACT, HEMO, HPT o PPIB, relacionadas con diferentes procesos biológicos.

La Figura 3.16 muestra los cambios dependientes del contenido de Sr en la abundancia normalizada de las principales proteínas relacionadas con los procesos de inflamación (C1R, C1S, CO3, IGLL5, KV302 y LAC2 como activadoras; y CFAH, C4BPA, IC1 y el grupo de apolipoproteínas como reguladoras), coagulación (THRB, FA11 y FA5 como iniciadoras; y ANT3 y PROC como reguladoras), fibrinólisis (HRG) y regeneración ósea (GELS, PON1 y TETN).

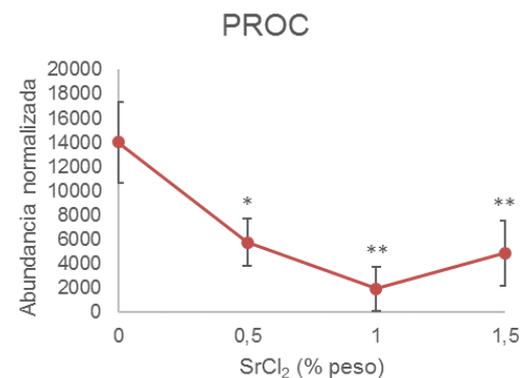
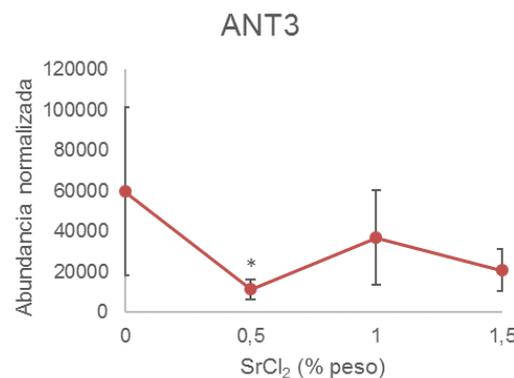
INFLAMACIÓN

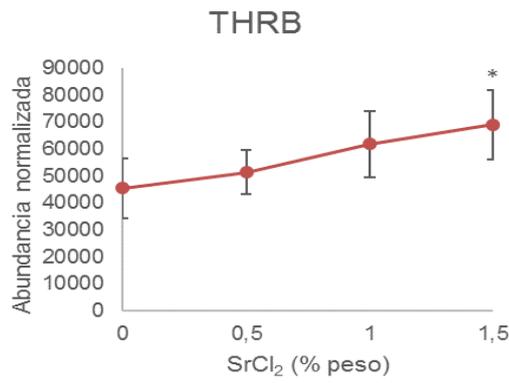
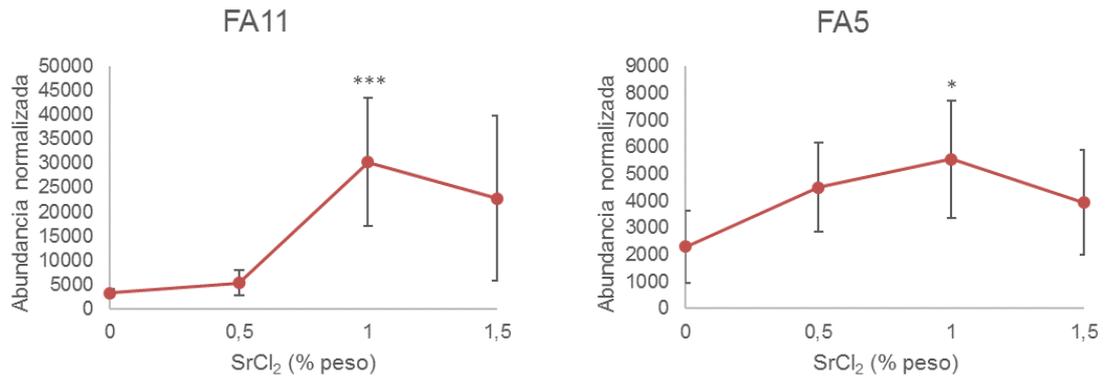




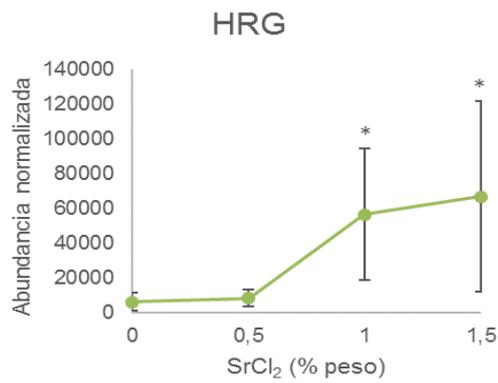


COAGULACIÓN





FIBRINÓLISIS



REGENERACIÓN ÓSEA

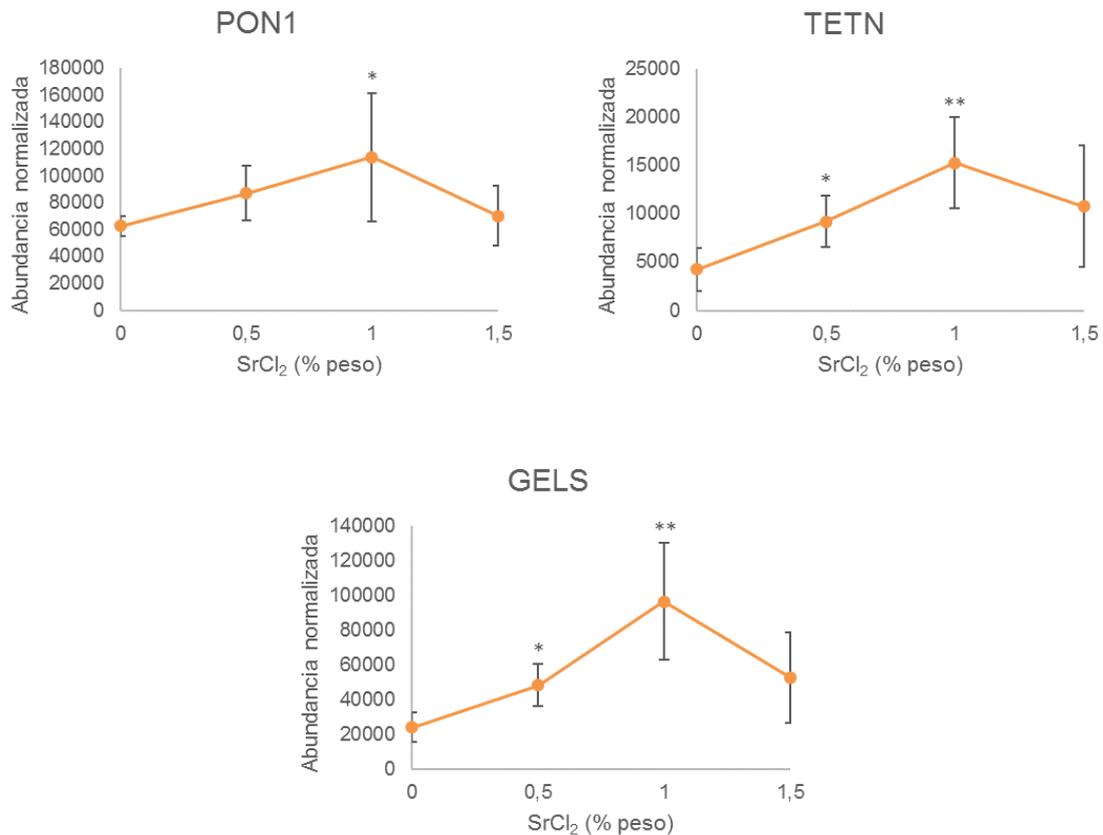


Figura 3.16. Abundancia normalizada en los recubrimientos enriquecidos con Sr del sistema 7M:3T.
(* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

El perfil en las gráficas correspondientes a las proteínas relacionadas con la activación de los procesos de inflamación tiene un pico máximo en la formulación con un 1 % de Sr, excepto para la C1R y la C1S donde el mayor valor es para el recubrimiento con 0.5 % de sal. En lo referente a las principales proteínas reguladoras de estos procesos inflamatorios, como la CFAH, la C4BPA y la IC1, muestran un perfil similar a las activadoras, con valores más altos en el recubrimiento con un 1 % de SrCl₂. El resto, las apolipoproteínas, en su mayoría, muestran un máximo en la formulación más dopada.

En cuanto a los procesos de coagulación, la incorporación del Sr lleva consigo el aumento de la THRB y la disminución de la ANT3, ambas pertenecientes a la vía común de la coagulación. Los dos factores de coagulación que no forman parte de esta cascada (FA11 y FA5), aumentan con el Sr y presentan un máximo en las formulaciones dopadas con un 1 %. La PROC está presente en la vía intrínseca y en la común ya que regula la

coagulación sanguínea inactivando los factores Va y VIIIa²⁶. La abundancia normalizada de la HRG, relacionada con la fibrinólisis, aumenta cuanto mayor es el porcentaje de sal añadido. Por último, el perfil de los gráficos en las proteínas relacionadas con la regeneración ósea es similar, aumentando con la presencia de Sr y dándose un máximo en la formulación 7M:3T-1Sr.

Las proteínas identificadas en el análisis de proteómica se han clasificado en base a sus funciones, utilizando el programa PANTHER. Los resultados de esta clasificación, respecto a las funciones de las proteínas en vías de señalización, se muestran en la Figura 3.17.

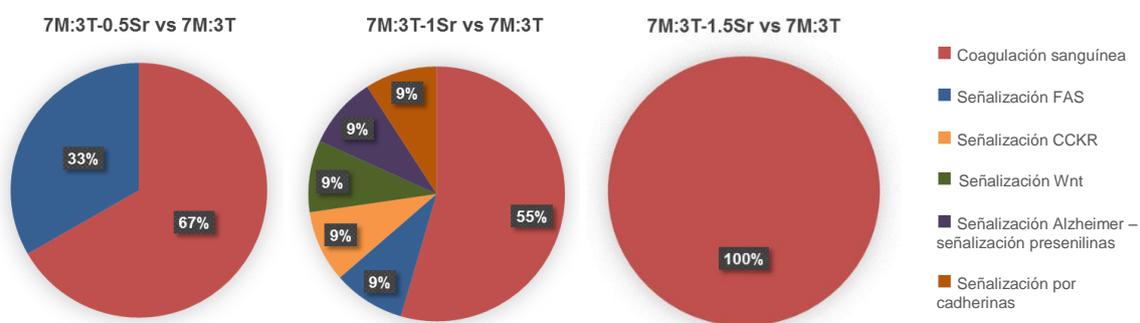


Figura 3.17. Análisis de funciones en vías de señalización mediante PANTHER.

En la formulación con un 0.5 % de Sr predomina la coagulación y aparece la vía de señalización FAS, relacionada con la apoptosis y la patogénesis de enfermedades del sistema inmunológico²⁷. Para los recubrimientos dopados con un 1 % se da un descenso de la actividad de estas dos vías y aparecen otras 4 señalizaciones: CCKR, Wnt, presenilinas y la señalización por cadherinas. Aunque aparecen en un porcentaje pequeño, estas vías pueden estar relacionadas con en el proceso de regeneración ósea^{28,29}. Por último, en la formulación con mayor porcentaje de SrCl₂ se da un importante aumento de la actividad de la coagulación, siendo la única que se observa. Por lo tanto, se puede decir que la coagulación sanguínea es la vía de señalización más importante que aparece con el Sr y su influencia es muy elevada en la formulación 7M:3T-1.5Sr.

2.8. Caracterización biológica *in vitro*

2.8.1. Citotoxicidad

Con el objetivo de estudiar los posibles efectos tóxicos de los recubrimientos sintetizados sobre las células, se realizó un ensayo de citotoxicidad. Se determinó la viabilidad celular de osteoblastos (MC3T3-E1) a través de los valores de densidad óptica obtenidos mediante ensayo “Titer Proliferation” descrito en el Capítulo 2.

En la Figura 3.18 se presentan los resultados de citotoxicidad para cada uno de los recubrimientos obtenidos.

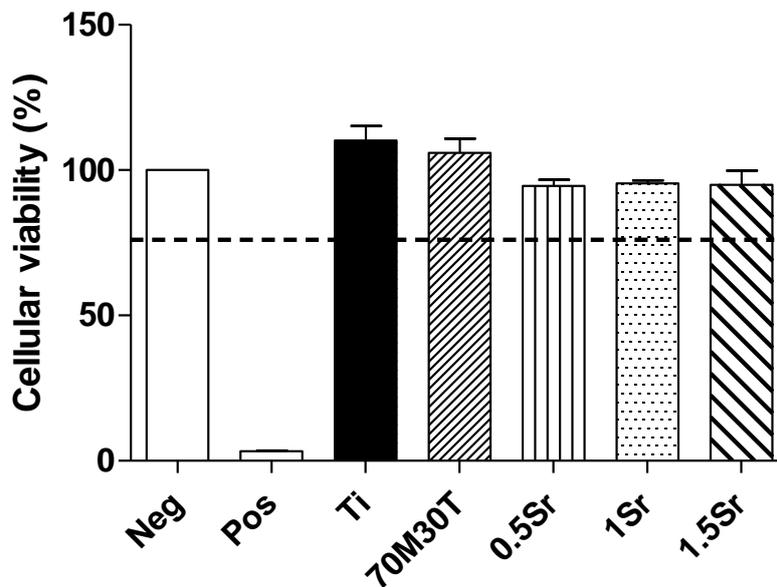


Figura 3.18. Estudio de la citotoxicidad del sistema 7M:3T + % SrCl₂.

Como se puede apreciar, todas las formulaciones ensayadas presentan una viabilidad superior al 70 % con respecto al control, por tanto, se puede decir que ninguna formulación es citotóxica.

2.8.2. Proliferación celular

Mediante el ensayo de alamarBlue™ se estudió la viabilidad celular de osteoblastos MC3T3 para periodos de incubación de 1, 3 y 7 días con el objetivo de estudiar los efectos de los recubrimientos sobre la proliferación celular.

En la Figura 3.19 se muestran los valores de proliferación celular obtenidos para las cuatro series de formulaciones sol-gel y el control (Ti).

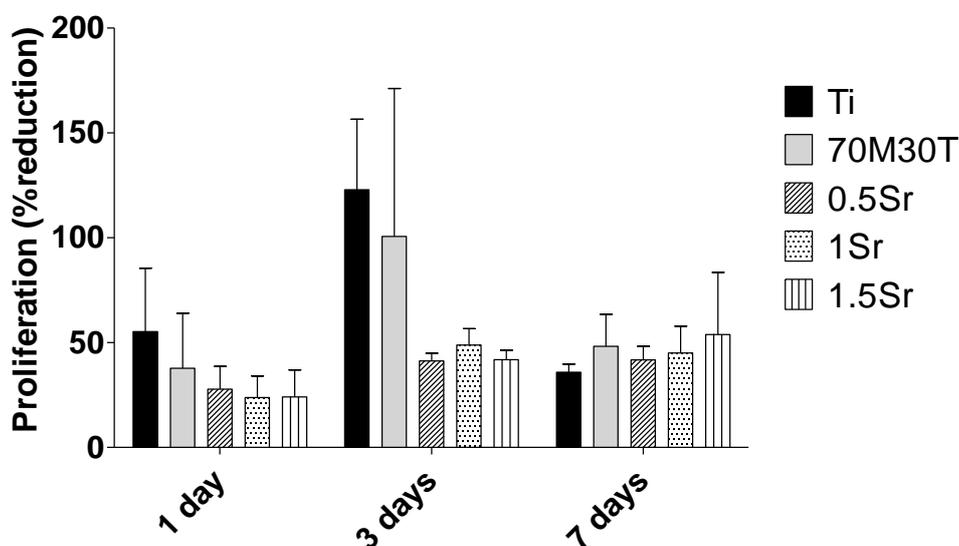


Figura 3.19. Valores de proliferación celular del sistema 7M:3T + % SrCl₂.

Como se puede comprobar, al primer y tercer día se obtienen valores de proliferación celular menores que para el control, principalmente para los recubrimientos que llevan Sr en su formulación, mientras que en el séptimo día el comportamiento es el contrario, siendo la proliferación superior a la del Ti en todos los sistemas. Esto puede deberse a dos factores, en primer lugar, que en los primeros días la rugosidad propia del disco de titanio granallado queda enmascarada, parcial o totalmente, por el recubrimiento, lo que dificulta la adherencia celular; y, en segundo lugar, a la elevada degradación hidrolítica que se produce al poner el recubrimiento en contacto con un medio acuoso. Por lo tanto, estas diferencias iniciales estarán probablemente más relacionadas con el cambio de la topografía final de los discos tras la deposición de los recubrimientos³⁰, tal y como se ha observado en estudios anteriores³¹.

2.8.3. PCR

En las siguientes figuras se muestran los resultados de las distintas PCR realizadas en las diferentes líneas celulares de osteoblastos (que proporcionan información sobre la mineralización y regeneración ósea) y de macrófagos (que dan una idea de la inflamación).

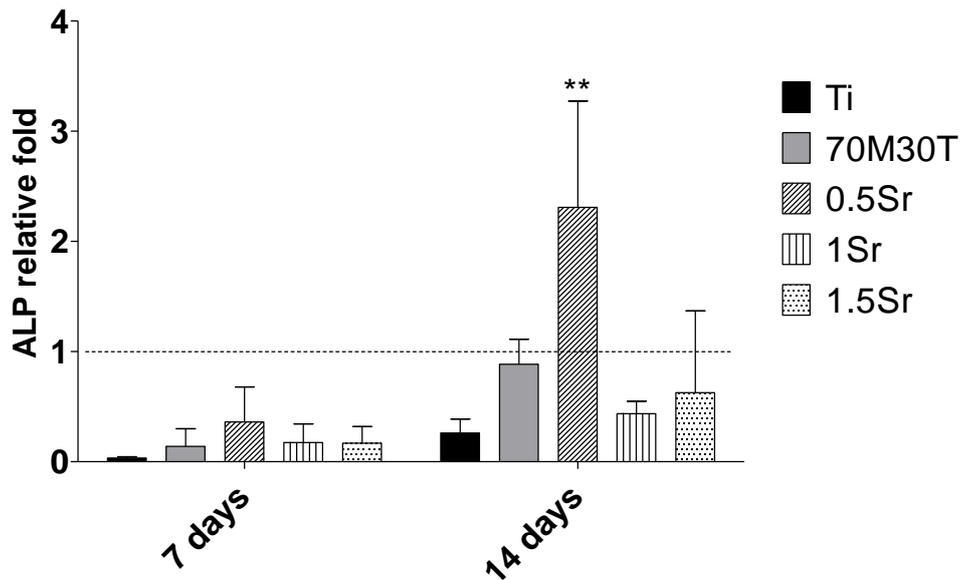


Figura 3.20. Expresión de genes de ALP para el sistema 7M:3T + % SrCl₂ (Osteoblastos: MC3T3). (** $p \leq 0.01$)

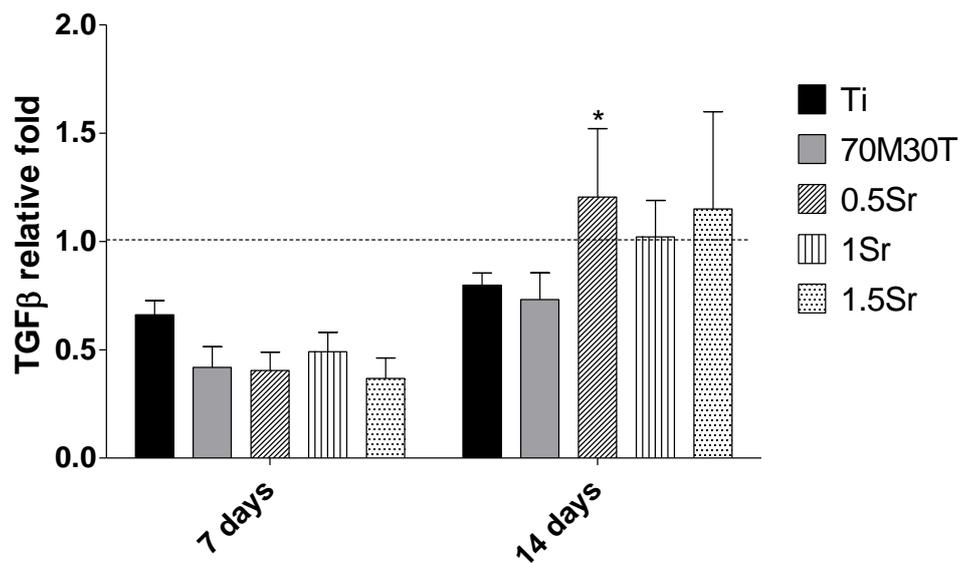


Figura 3.21. Expresión de genes de TGF-β para el sistema 7M:3T + % SrCl₂ (Osteoblastos: MC3T3). (* $p \leq 0.05$)

En la Figura 3.20 se puede observar que los recubrimientos, tanto el base como los dopados, muestran valores mayores de ALP que los del control, tanto a 7 como a 14 días, siendo este un comportamiento positivo, ya que se trata de un marcador osteogénico. Destaca el valor del recubrimiento 7M:3T-0.5Sr tras 14 días de ensayo.

Respecto a la expresión de genes de TGF- β con osteoblastos, en la Figura 3.21 existe una sobreexpresión de todos los recubrimientos dopados respecto al base. Se trata de un marcador osteogénico.

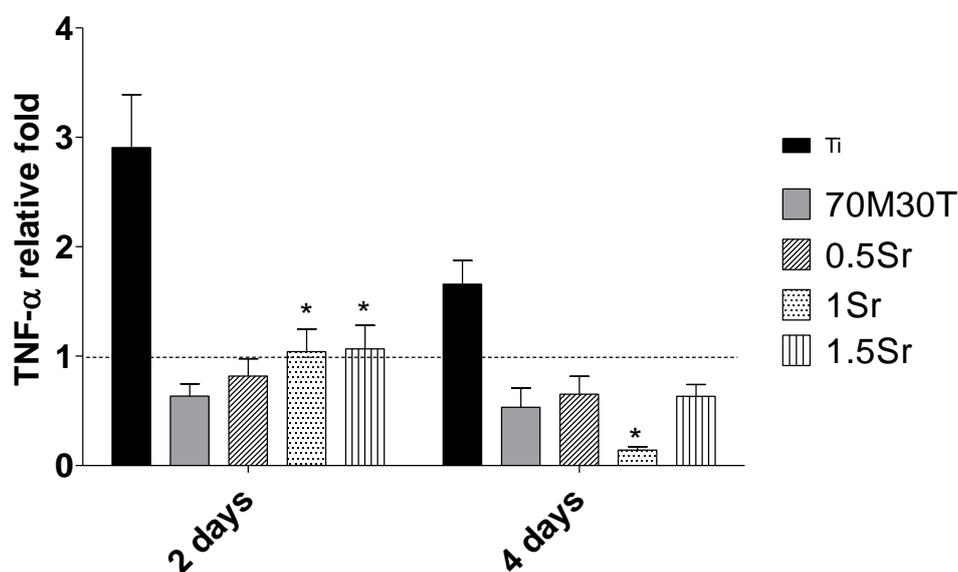


Figura 3.22. Expresión de genes de TNF- α para el sistema 7M:3T + % SrCl₂ (Macrófagos: RAW264.7). (* $p \leq 0.05$)

En los ensayos con macrófagos, en la Figura 3.22 se puede comprobar, teniendo en cuenta que TNF- α es un marcador de inflamación, que el Ti control, sin recubrimiento alguno, causa mucha más inflamación que todos los discos recubiertos, tanto a 2 como a 4 días de cultivo, ya que los valores de TNF- α del Ti son mayores que el resto.

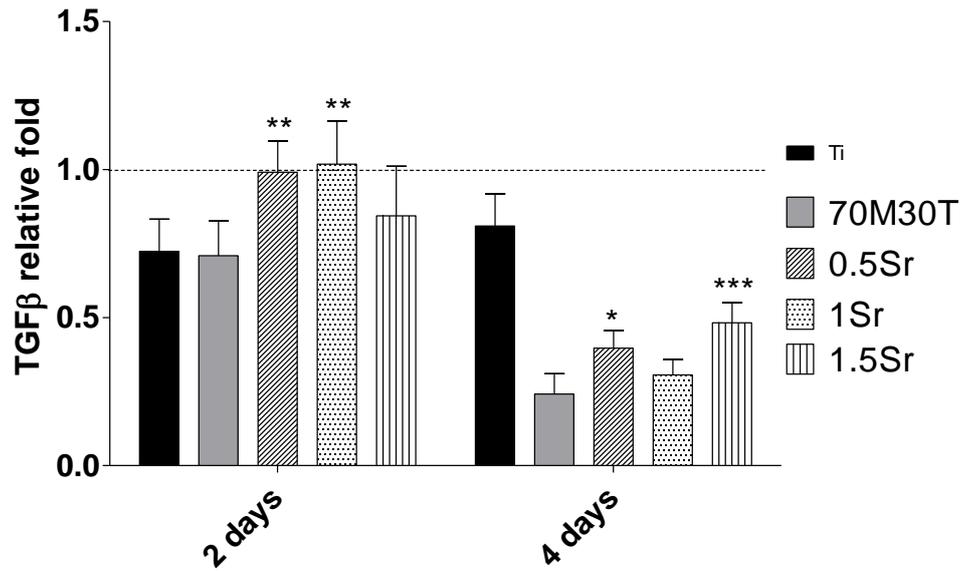


Figura 3.23. Expresión de genes de TGF- β para el sistema 7M:3T + % SrCl₂ (Macrófagos: RAW264.7). (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

En lo referente a la expresión de genes de TGF- β con macrófagos, la Figura 3.23 muestra una actividad antiinflamatoria con la incorporación del Sr, ya que, tanto a 2 como a 4 días, los valores de TGF- β son mayores para los recubrimientos que incorporan el Sr en su formulación que para el recubrimiento base.

En definitiva, a 2 días, a la vez que aumenta el porcentaje de Sr, la inflamación, representada por la presencia del marcador TNF- α , es mayor respecto al recubrimiento base. Lo mismo ocurre con el gen regulador TGF- β . A 4 días, sin embargo, la inflamación provocada por la presencia del Sr desaparece, aunque los datos de TGF- β siguen siendo más altos que los del recubrimiento base. Esto es muy destacable porque la inflamación no parece cronificarse.

2.8.4. ELISA

Así como la PCR es una prueba de diagnóstico que permite detectar un fragmento del material genético de las células, con el ensayo ELISA se obtienen resultados cuantitativos de las proteínas expresadas por parte de las células a su entorno.

La evaluación de la actividad de la ALP tras el cultivo de células MC3T3-E1 durante 7 y 14 días, da una idea del proceso de mineralización celular.

La Figura 3.24 muestra la cuantificación de ALP detectada, como indicador de mineralización inducida, por cada una de las distintas formulaciones de la serie de recubrimientos desarrollada.

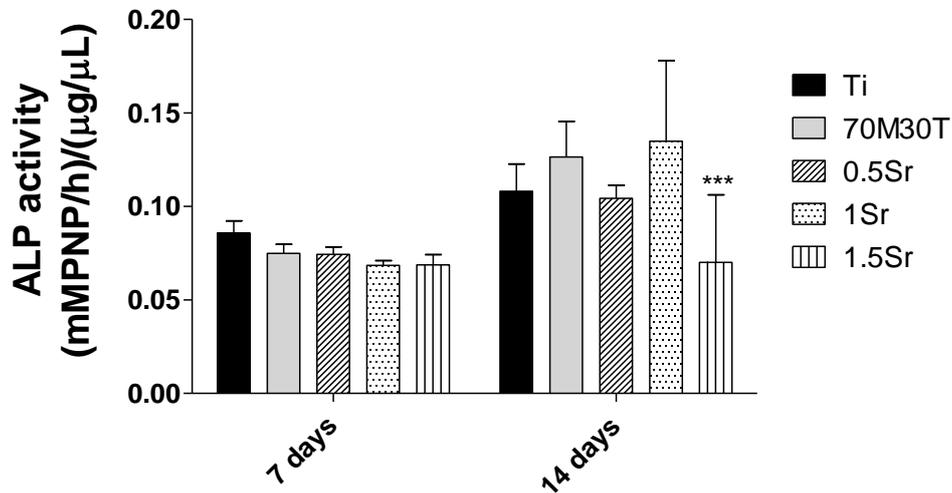


Figura 3.24. Actividad de la ALP del sistema 7M:3T + % SrCl₂ (Osteoblastos: MC3T3). (***) $p \leq 0.001$

Como se puede observar en la figura, todos los recubrimientos inducen una ligera menor mineralización que el Ti tras 7 días de cultivo, estadísticamente no diferenciable. Además, la actividad disminuye, también ligeramente, con el aumento de la concentración de agente dopante. A 14 días, por el contrario, el recubrimiento base y el dopado con 1 % de SrCl₂ presentaron valores mayores que el control, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. En cambio, la incorporación de un 1.5% de Sr supone un descenso significativo de la actividad de la fosfatasa alcalina. Eso sí, todos aumentaron en el intervalo de una a dos semanas de estudio, traduciéndose en efectos positivos para la diferenciación celular.

Por otro lado, la Figura 3.25 muestra la concentración de TNF- α determinada con un ensayo ELISA después de 2 y 4 días de cultivo de macrófagos RAW264.7.

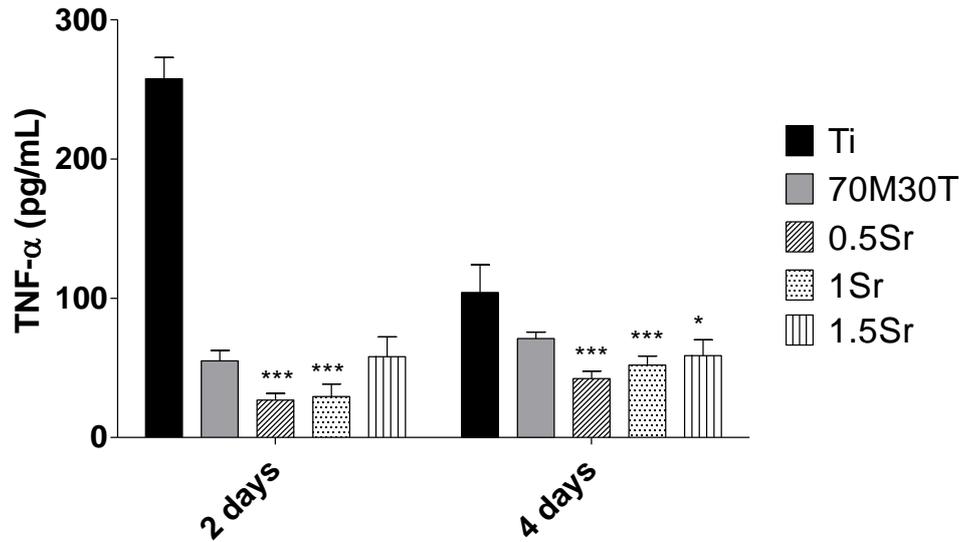


Figura 3.25. Resultados del ensayo ELISA para el sistema 7M:3T + % SrCl₂ (Macrófagos: RAW264.7).
(* $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$)

Corroborando los datos del apartado anterior se puede observar que el titanio sin recubrir causa mucha más inflamación que los discos recubiertos. Igualmente, aunque el valor de TNF- α disminuye al dopar el recubrimiento base, este aumenta, a su vez, a medida que se incorporan mayores cantidades de Sr, sin llegar a superar el del sistema base al finalizar el ensayo a 4 días.

3. Discusión

La adición de Sr a la red sol-gel presenta diferentes consecuencias en las características físico-químicas de la superficie del material base.

Los recubrimientos obtenidos presentan una buena apariencia, formando una película continua sobre los diferentes sustratos. Así, la presencia de Sr en la formulación no modifica la adherencia del recubrimiento ni provoca grietas ni grandes porosidades.

Por otro lado, el dopado del recubrimiento base ha provocado una modificación tanto de la humectabilidad como de la rugosidad de la superficie (Figuras 3.4 y 3.12). Cuanto mayor es el porcentaje de sal añadida los materiales tienen un carácter más hidrófobo y rugoso. Una mayor rugosidad ha sido asociada, en numerosas ocasiones en la bibliografía, a un mayor potencial osteointegrador³². Al comparar la regeneración ósea obtenida con

implantes sin tratar e implantes tratados superficialmente, se ha observado una mayor deposición de hueso en las primeras etapas y un mayor contacto implante/hueso en las superficies más rugosas³². Además, estos cambios pueden alterar la afinidad entre los materiales y las proteínas del suero, lo que afectaría a la deposición de proteínas, y definiría y condicionaría el comportamiento inicial de las células implicadas en los procesos de cicatrización ósea³³.

Asimismo, el aumento de la rugosidad de la superficie puede estar asociado con una mayor adsorción total de proteínas³⁴. Sin embargo, este efecto en los cambios de la rugosidad sobre la adsorción de proteínas específicas no es lineal y las afinidades de las diferentes proteínas pueden verse afectadas de manera desigual³⁵. Los cambios en la humectabilidad también pueden afectar a la adsorción de proteínas³⁶. No obstante, hasta ahora no se han podido correlacionar los efectos de las modificaciones de estas propiedades en la adsorción de proteínas específicas cuando se estudian sistemas complejos de múltiples proteínas, que es lo que se está realizando en esta tesis.

La incorporación de la sal de Sr no ha afectado a la formación de la red tridimensional tal y como se ha comprobado mediante las técnicas FTIR/ATR y ²⁹Si-RMN. La Figura 3.6 muestra que, en todas las formulaciones estudiadas, la red se ha formado con éxito, siendo las bandas de los enlaces siloxano las más intensas. Además, en la Figura 3.11 se ha confirmado la formación de la red, siendo los picos de mayor intensidad los correspondientes a las especies con alto grado de condensación (T₃ y Q₃).

En cuanto a la degradación hidrolítica (Figura 3.13), los sistemas con SrCl₂ muestran porcentajes de degradación mayores que el sistema base, y esta aumenta cuanto más porcentaje del agente dopante se incorpora en la red 7M:3T, siendo muy pequeña la diferencia. Esto concuerda con resultados previos realizados en el grupo³⁷. Se observan niveles de degradación superiores al 50 % después de 8 semanas de análisis. La degradación de los recubrimientos sol-gel es el resultado de un proceso de hidrólisis bien conocido³⁸, que permite la liberación de la sal incorporada. Esto puede ser debido a que las moléculas de la sal incorporada aumentan el volumen libre de la red, facilitando la entrada del agua y, por lo tanto, una mayor degradación, rompiéndose así la red siloxánica y provocando su liberación al medio acuoso, que está en contacto con el material. Además, una vez iniciado el proceso de hidrólisis la disolución de la sal en el medio

facilitará el contacto de la parte interna de la red con el agua, lo que a su vez afectará de alguna manera a la velocidad de hidrólisis. Por otra parte, hay que tener en cuenta que las pérdidas de peso incluyen las pérdidas debidas a la liberación del SrCl_2 al medio, lo que puede contribuir a aumentar la diferencia entre las pérdidas de peso del recubrimiento base y los recubrimientos dopados.

En cuanto a la liberación de silicio al medio (Figura 3.14), el perfil, lógicamente, es muy similar al de la degradación hidrolítica. En cuanto a las diferencias respecto a la tendencia en los primeros días y los posteriores en los valores obtenidos en los ensayos de liberación de Si y de degradación hidrolítica por pérdida de peso, podría deberse al efecto de la pérdida de peso correspondiente a la sal de Sr, que probablemente será mucho mayor al inicio del proceso, y es lo que justifica esa pendiente inicial tan acusada en las curvas de degradación hidrolítica por pérdida de peso, y que no se observa en las curvas de liberación de Si.

Por otra parte, se observa que, al igual que ocurría con las medidas de degradación hidrolítica por pérdida de peso, hay una gran diferencia en la liberación de Si entre el recubrimiento base y cualquiera de los recubrimientos dopados. Al analizar los datos de la degradación hidrolítica se indicaba que esto podía ser debido a que también contribuía a la pérdida de peso la posible liberación de la sal de Sr, pero esto no ocurre en este caso, en el que únicamente se mide la cantidad de Si que pasa al medio acuoso, luego se puede concluir que la incorporación de la sal al recubrimiento provoca un aumento de la degradación hidrolítica del mismo. La liberación de Si es similar para las tres formulaciones, llegando a liberarse unos 0.25 mg a los 28 días.

Del mismo modo, se ha liberado más Sr cuanto mayor era la concentración del mismo en la formulación del recubrimiento (Figura 3.15). Se ha producido una liberación rápida en las primeras horas del ensayo seguida de una progresiva estabilización hasta el final del mismo, llegando a valores de 0.7 mg en el material con mayor concentración de SrCl_2 (7M:3T-1.5Sr). Dado que la liberación de la sal se debe a procesos de degradación de la matriz que lo contiene, a mayores degradaciones hidrolíticas se darán mayores liberaciones. A la vista de los resultados anteriores de degradación por pérdida de peso y por liberación de Si, no existen grandes diferencias en cuanto al perfil de degradación de los tres sistemas. Por tanto, la diferencia que se observa en los valores de liberación de

Sr, será debida principalmente a la concentración de la sal en cada uno de los tres sistemas. A mayor concentración de sal de Sr (1.5 %), mayor es la cantidad liberada de este ion al medio.

Las curvas obtenidas tienen el perfil de liberación esperado, mostrando una primera liberación rápida proveniente del agente dopante que se encuentra en la zona más superficial, seguida de una liberación más lenta del resto de la sal debida a la degradación del recubrimiento por el agua que entra en el espesor del mismo. Este perfil es muy interesante ya que interesa que el agente actúe fuertemente durante los primeros días y, posteriormente, siga actuando hasta, al menos, los 28 días.

Así, mediante este estudio se confirma la capacidad de estos recubrimientos de liberar los agentes dopantes hacia el exterior para cumplir su función osteorregeneradora.

Las diferencias en las propiedades físico-químicas de las distintas formulaciones afectan en la abundancia y distribución de las proteínas depositadas. Por ende, es razonable pensar que el comportamiento celular también se verá afectado por dichos cambios. Los diversos ensayos *in vitro* permiten valorar el efecto de la adición de Sr sobre el comportamiento de los osteoblastos y los macrófagos.

Es importante señalar que ninguno de los materiales sintetizados es citotóxico. A nivel celular, el Sr^{2+} tiene un efecto estimulante sobre los osteoblastos favoreciendo, a tiempos largos de ensayo, su adhesión y posterior proliferación.

En los ensayos PCR, donde se detecta el material genético de las células, la expresión de genes de los marcadores osteogénicos ALP y TGF- β aumenta para todas las formulaciones dopadas en comparación al sistema base 7M:3T (Figuras 3.20 y 3.21). Es estadísticamente destacable, en este sentido, la formulación 7M:3T-0.5Sr a 14 días. En el ensayo ELISA (Figura 3.24) se observa que la expresión de genes de ALP aumenta en el intervalo de una a dos semanas de estudio. A 14 días, la incorporación de un 1.5 % de Sr supone un descenso estadísticamente significativo de la actividad de esta enzima, mientras que el recubrimiento base y el dopado con 1 % de SrCl_2 presentan valores mayores que el Ti.

Estos resultados están en línea con los encontrados en bibliografía. Así, Verberckmoes *et al.* también comprobaron que el Sr aumenta la expresión génica de la ALP¹¹. Choudhary *et al.* concluyeron que el ranelato de estroncio aumenta significativamente la actividad de la ALP, la diferenciación osteoblástica y la mineralización³⁹. Nardone *et al.* indicaron que el tratamiento con iones Sr²⁺ mejora la proliferación celular y la diferenciación osteogénica a través de la expresión de la ALP, aseverando que este elemento induce la regeneración ósea⁴⁰. Del mismo modo, como afirman Kong *et al.*⁴¹, el Sr también aumenta la expresión de TGF- β en osteoblastos a 14 días, lo que sugiere su papel activo en el metabolismo y la actividad de las células óseas.

El carácter osteogénico de los materiales dopados con Sr también se puede comprobar en estudios *in vivo*. De hecho, Neves *et al.* demostraron que este tipo de materiales son eficaces en la estimulación de la regeneración ósea en modelo animal⁵. Los resultados *in vivo* de Belluci *et al.* confirmaron que el Sr tiene efectos osteoestimulantes lo que indica posibles consecuencias beneficiosas sobre los procesos de formación ósea⁴². A su vez, los biomateriales basados en Sr analizados por Zhang *et al.* mostraron una mayor formación de hueso nuevo en el lugar de la implantación y mostraron una tendencia a acelerar el proceso de regeneración ósea en comparación con los respectivos análogos sin dopar⁴³. Los ensayos *in vivo* de Lin *et al.* revelaron que el Sr estimuló la regeneración ósea y la angiogénesis en un modelo animal osteoporótico⁴⁴. Igualmente, según los estudios disponibles hasta el momento, tal y como indican Shi *et al.*, se puede concluir que los implantes de titanio modificados con Sr podrían mejorar la osteointegración y la nueva formación ósea del área periimplantaria⁴⁵.

El estudio proteómico realizado ha permitido observar una mayor adsorción de las proteínas TETN, PON1 y GELS con la presencia de Sr en el recubrimiento. Estas tres proteínas, en cierta manera, están ligadas con el proceso de desarrollo óseo según algunas investigaciones. Wewer *et al.* estudiaron el papel de la TETN en la formación ósea en mamíferos, concluyendo que es muy importante en la mineralización durante la osteogénesis⁴⁶. Esta proteína tiene la capacidad de unirse al plasminógeno y de estimular la activación de este, contribuyendo así a la regulación de la formación del tejido óseo⁴⁷. Del mismo modo, la TETN se une al calcio y a la heparina y, por lo tanto, podría ser un componente integral de la matriz ósea⁴⁸. Iba *et al.* investigaron el papel de la TETN en la reparación de fracturas utilizando dos modelos de regeneración ósea en ratones sin esta

proteína, concluyendo que existe un retraso en la regeneración de dichas fracturas y proponiendo que la TETN podría ser un agente potencial para mejorar la regeneración de fracturas óseas⁴⁹. Por otra parte, Dowling *et al.* indicaron que los niveles elevados de PON1 en suero humano representan un mecanismo protector contra los efectos del estrés oxidativo en la formación ósea asociada con la resorción osteoclástica⁵⁰. A su vez, Thouverey *et al.* apuntaron que la GELS puede impulsar la liberación de las vesículas matriciales de los osteoblastos involucradas en el inicio de la mineralización ósea⁵¹.

La abundancia normalizada de estas 3 proteínas aumenta respecto al recubrimiento base y tienen un máximo en la formulación 7M:3T-1Sr. Estos resultados se alinean con los obtenidos en los ensayos biológicos donde la tendencia de la gráfica de ALP en el ensayo ELISA se corresponde con la evolución de la abundancia normalizada de estas proteínas relacionadas con la regeneración ósea, ya que, a 14 días, existe un máximo en la actividad de ALP para un 1 % de Sr. En la PCR con osteoblastos, sin embargo, el valor de ALP correspondiente a la formulación 7M:3T-0.5Sr, es mayor, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

La respuesta inflamatoria de los diferentes recubrimientos se puede estudiar analizando los marcadores inflamatorios expresados por los macrófagos en los distintos ensayos *in vitro*. En los ensayos PCR con cultivos celulares de macrófagos se aprecia una clara disminución en la expresión del gen proinflamatorio TNF- α en todos los recubrimientos respecto al Ti, tanto a 2 como a 4 días de cultivo (Figura 3.22). También se observa un efecto dependiente de la concentración de Sr utilizada en el dopado de los materiales. En este caso, al añadir la sal, la inflamación a 2 días va aumentando con el porcentaje de Sr respecto al recubrimiento base, pero a 4 días la incorporación de Sr no provoca un aumento significativo de la misma, por lo que la inflamación no se cronifica. Los valores mínimos de TNF- α se alcanzan en el recubrimiento base y en el dopado con 0.5 % a 2 días, mientras que a 4 días se da en la formulación con un 1 % de Sr. Así mismo, la expresión de genes del marcador regulador de la inflamación TGF- β aumenta para todas las formulaciones dopadas en comparación al sistema base 7M:3T (Figura 3.23). En el caso del ensayo ELISA con macrófagos también hay una clara disminución de los valores de TNF- α de la base y de las composiciones con Sr respecto al Ti control. Además, la adición de Sr al recubrimiento base provoca un descenso de la expresión de este gen de

inflamación, dándose el valor mínimo en la composición de 0.5 % de Sr, tanto a 2 como a 4 días (Figura 3.25).

Un importante clúster de proteínas relacionadas con el sistema del complemento ha sido identificado mediante el análisis proteómico. Así, se han detectado, proteínas como la C1S, C1R o CO3 que forman parte de la activación de esta cascada. Su adhesión a la superficie del biomaterial podría iniciar una reacción inmune/inflamatoria en la experimentación *in vivo*⁵². Entre el sistema inmune y el hueso existen interacciones complejas que podrían tener un papel importante en el proceso de regeneración ósea. Así, las citoquinas y factores de crecimiento generados por el sistema inmune pueden mediar en la regulación de las actividades de las células óseas (osteoblastos y osteoclastos)⁵³. Por lo tanto, esta actividad del sistema inmune, siempre que se mantenga dentro de unos límites, tendría un efecto positivo sobre la regeneración. En concreto, la proteína CO3, como ya se ha expuesto, estaría ligada a una respuesta inmune e inflamatoria a través de su papel en la activación de la cascada del complemento⁵⁴ (Figura 3.26). Sin embargo, también podría tener otras funciones relacionadas con el proceso de regeneración ósea. Los osteoclastos son macrófagos óseos derivados del linaje mieloide que requieren el complemento CO3 para una diferenciación óptima⁵⁵. Estas células son necesarias para la resorción ósea, de forma que un equilibrio óptimo entre osteoblastos y osteoclastos es fundamental para obtener una correcta regeneración del hueso.

Las proteínas que inician la cascada del complemento por la vía clásica, como son la C1R y la C1S, experimentan un crecimiento con la presencia de Sr. Estas proteínas están presentes desde el inicio (en el recubrimiento base), y experimentan un pequeño máximo con una concentración de 0.5 % de Sr. El CO3, siendo una de las proteínas que puede conducir a una activación muy rápida de la cascada del complemento, se incrementa respecto al 7M:3T hasta llegar a un pico con un 1 % de Sr.

Por otro lado, las proteínas C4BPA y CFAH, con un máximo en la formulación con 1 % de Sr, pueden inhibir la activación de la cascada del complemento^{52,56}. La C4BPA lo hace restringiendo la activación de esta vía, regulando su intensidad⁵⁷, modulando así la respuesta inmunitaria/inflamatoria para lograr una correcta regeneración tisular⁵⁸. Con todo, si no se regula, podría darse una inflamación crónica debida a una reacción inmune desproporcionada, derivando en el fallo del implante⁵⁹.

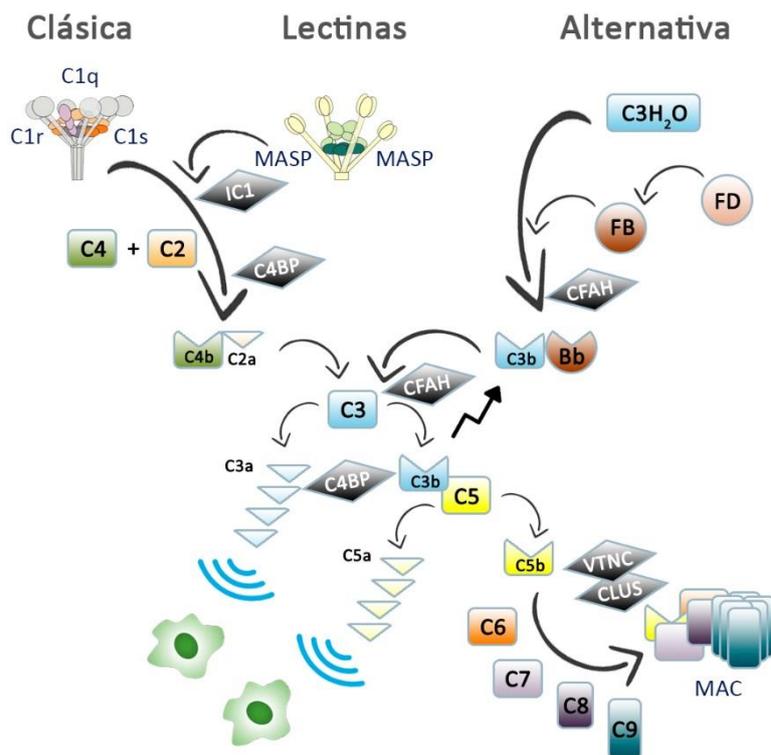


Figura 3.26. Vías de activación del sistema del complemento. Los rombos simbolizan las proteínas inhibitoras y sus posibles sitios de acción.

Del mismo modo, es destacable la gran afinidad de las superficies dopadas por las proteínas de la familia de las apolipoproteínas (APOA2, APOC1, APOC4, APOH, APOL1 y SAA4), las cuales también podrían jugar un papel antiinflamatorio. A pesar de sus conocidas funciones en el metabolismo de los lípidos, esta familia de proteínas también podría tener un papel en la prevención de la activación de la respuesta inmune innata⁶⁰. En esta línea, se encontró que la unión preferencial de las lipoproteínas séricas a nanopartículas de sílice condujo a mayores fracciones de lípidos en la corona proteica, protegiendo las partículas de la activación del complemento⁶¹. La mayoría de estas proteínas tienen un máximo de abundancia normalizada en el sistema 7M:3T-1.5Sr.

Entre las proteínas con menos afinidad por las superficies de los recubrimientos base también se encuentran las inmunoglobulinas LAC2, KV302, IGHG1 e IGLL5, con un máximo en los recubrimientos con 1 % de sal de Sr. La adhesión de IGLL5 a la superficie de un biomaterial podría iniciar una reacción inmune/inflamatoria, que podría afectar al desarrollo del proceso de regeneración ósea⁶².

Así, en las gráficas de las proteínas adsorbidas de inflamación, tanto de las activadoras como de las reguladoras, la abundancia de todas ellas se incrementa al introducir la sal alcanzando, en su mayoría, un máximo en el 1 % de concentración y, en todos los casos, incrementándose respecto del sistema base. Comparando con la evolución en los ensayos PCR, se podría concluir que la presencia de Sr aumenta la inflamación respecto a la base al comienzo, pero después se elimina dicha inflamación no llegando a ser crónica, pudiendo tener mayor protagonismo las proteínas reguladoras que las iniciadoras. En el ensayo ELISA la inflamación aumenta con el contenido de Sr, nunca superando al valor de la base. Estas proteínas presentan una disminución de la abundancia para el recubrimiento con 1.5 % de Sr, que no se observa de forma tan clara en este ensayo. Esto puede ser debido a que la línea de macrófagos elegida (RAW264.7) es una línea de ratón, que no es tan sensible como la línea de macrófagos humana, lo que puede llevar a resultados algo diferentes.

La coagulación es un proceso importante y su desarrollo es clave para la regeneración ósea. Son numerosas las proteínas identificadas relacionadas con este proceso: A2MG, ANT3, FA11, FA5, KNG1, PROC, PROS y THBR. Dentro de la cascada de coagulación (Figura 3.27) destacan THRB, FA5 y ANT3 que son comunes para las dos vías y que están al final de la cascada, a diferencia de FA11 que está al inicio y que sólo afecta a la vía intrínseca.

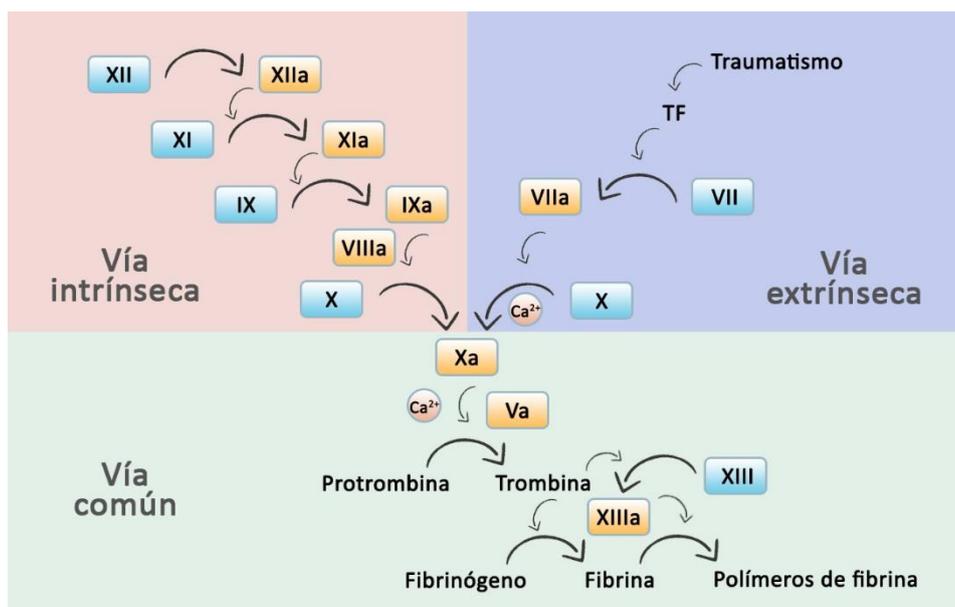


Figura 3.27. Esquema de la cascada de coagulación.

La FA11 y la THRB participan en la iniciación de esta vía de señalización. Esta última, también conocida como factor de coagulación II, puede desencadenar la coagulación de la sangre a través de su conversión en la proteasa trombina, activando la formación de plaquetas⁶³. La FA5 tiene una función reguladora en las vías procoagulantes y anticoagulantes⁶⁴. La A2MG podría tener un papel en la inhibición de las serina proteasas en el plasma, al inhibir la trombina, la calicreína y la plasmina. Bilotft *et al.* propusieron que los niveles de A2MG, en superficies artificiales, podrían ser un marcador global de compatibilidad sanguínea de los biomateriales⁶⁵. Sin embargo, Cvirn *et al.* informaron de que esta proteína podría mostrar funciones procoagulantes o anticoagulantes en función de los niveles de antitrombina⁶⁶. Por otro lado, la KNG1 participa en la regulación de la vía de señalización de la coagulación⁶⁷. Esta proteína está implicada en el metabolismo de los huesos y la regeneración ósea^{68,69}. A su vez, es parte del sistema calicreína-cinina responsable del inicio de la coagulación desde superficies artificiales⁷⁰. Las proteínas PROC y PROS están involucradas en la regulación de la vía de coagulación, inactivando los factores Va y VIIIa y, después, controlando la generación de trombina⁷¹. Sin embargo, la PROC se encuentra en menores cantidades en los recubrimientos dopados. Igualmente, la proteína ANT3, que puede regular la formación de trombina mediante la inhibición de FIIa y FXa⁷², está más presente en la superficie del material base. Al analizar las funciones mediante PANTHER (Figura 3.17), es en el recubrimiento con más porcentaje de Sr donde existe mayor presencia de proteínas relacionadas con la coagulación. Llama la atención también, en la formulación del 1 %, la existencia de un 45 % de proteínas relacionadas con otras funciones. Destacan entre ellas la señalización por Wnt y por cadherinas. Estas últimas intervienen, entre otros procesos, en la regulación de la β -catenina para participar en la señalización Wnt²⁸, que a su vez está relacionada con la regeneración tisular del hueso. Cui *et al.*²⁹ observaron que la presencia de Sr modulaba la actividad osteogénica de cementos óseos activando la señalización Wnt/ β -catenina.

La HRG está implicada en la regulación de la fibrinólisis⁷³. Esta proteína interacciona con el plasminógeno y el fibrinógeno⁷⁴ siendo moduladora de esta función relacionada con el sistema de coagulación. Tsuchida-Straeten *et al.* reportaron una mejora de la fibrinólisis en ratones que carecían de esta proteína⁷⁵. Como se observa en la Figura 3.16, esta proteína está aumentada en las formulaciones con un 1 % y un 1.5 % de Sr.

4. Resumen

A la vista de los resultados obtenidos, se ha conseguido incorporar satisfactoriamente el SrCl_2 en la red polisiloxánica. Todo ello presentando buenas propiedades y una gran adherencia al sustrato metálico.

También se ha comprobado que el recubrimiento actúa como una matriz, provocando la liberación de Sr, a medida que se va degradando. La cantidad de ion Sr liberada al medio es más elevada cuanto mayor es la concentración de su sal en la formulación del recubrimiento. A su vez, el perfil de la liberación se corresponde al de la degradación hidrolítica, observándose una gran pendiente al principio del ensayo, seguida de una estabilización hasta la conclusión de este.

La adición de Sr al recubrimiento híbrido sol-gel 7M:3T y su liberación al medio modifica alguna de sus propiedades físico-químicas, como la hidrofilia, aumentando significativamente el ángulo de contacto respecto al material base, o la rugosidad, con una tendencia creciente cuanto mayor es el porcentaje de sal añadida. Estos factores se consideran positivos para la adhesión celular y regeneración tisular.

Tanto la línea celular de osteoblastos como la de macrófagos muestran un comportamiento dependiente de la concentración de Sr incorporada. En lo referente a la regeneración ósea, se observa un aumento en la expresión génica de los marcadores osteogénicos ALP y TGF- β en la línea celular de osteoblastos en las PCR con el contenido de Sr, y en particular en la formulación con un 0.5 %. Igualmente, en el ensayo ELISA de ALP, en la misma línea celular, los valores aumentaron en el intervalo de una a dos semanas de estudio, dándose un máximo para el recubrimiento con un 1 % de Sr, coincidente con el pico máximo de las abundancias normalizadas relativas a las proteínas relacionadas con la regeneración ósea (TETN, GELS y PON1). Por otro lado, la inflamación disminuye respecto al Ti en todas las formulaciones. En las PCR se observa un aumento de la inflamación con el contenido de Sr. En el ensayo ELISA, los valores del marcador inflamatorio TNF- α aumentan igualmente cuanto mayor es el contenido del ion, pero los genes expresados son inferiores respecto al recubrimiento base.

El análisis mediante LC-MS/MS revela que el dopado modifica significativamente los perfiles de adhesión de las proteínas involucradas en diversos procesos como la inflamación, la coagulación, la regeneración ósea o la fibrinólisis. Concretamente, cuanto mayor es el contenido de Sr, aumentan las proteínas proinflamatorias como C1S, C1R o CO3, aunque también lo hacen las reguladoras de la inflamación, a saber, la C4BPA, la CFAH y las apolipoproteínas. Estas últimas parecen tener un mayor protagonismo que las iniciadoras, ya que la presencia de Sr aumenta la inflamación al comienzo, pero después se elimina dicha inflamación, no cronificándose. También en lo referente a la coagulación son varias las proteínas que aumentan con la presencia del Sr en el recubrimiento: FA11, FA5 y THRB. Sin embargo, otras como la ANT3 y la PROC disminuyen con la incorporación de este ion. Con todo, en el recubrimiento más dopado se encuentran más proteínas relacionadas con la función de la coagulación. Finalmente, la proteína HRG relacionada con la fibrinólisis también aparece en mayor proporción en las superficies más dopadas.

En resumen, los análisis proteómicos y de expresión génica muestran que la adición de Sr en los biomateriales podría mejorar su potencial osteogénico y antiinflamatorio, así como el sistema de coagulación.

Referencias

1. Pors Nielsen, S. The biological role of strontium. *Bone* **35**, 583–588 (2004).
2. Lymperi, S. *et al.* Strontium can increase some osteoblasts without increasing hematopoietic stem cells. *Blood, J. Am. Soc. Hematol.* **111**, 1173–1181 (2008).
3. Zhu, S. *et al.* Strontium inhibits titanium particle-induced osteoclast activation and chronic inflammation via suppression of NF- κ B pathway. *Sci. Rep.* **6**, 1–11 (2016).
4. Cacciotti, I. Bivalent cationic ions doped bioactive glasses: the influence of magnesium, zinc, strontium and copper on the physical and biological properties. *J. Mater. Sci.* **52**, 8812–8831 (2017).
5. Neves, N., Linhares, D., Costa, G., Ribeiro, C. C. & Barbosa, M. A. In vivo and clinical application of strontium-enriched biomaterials for bone regeneration. *Bone Jt. Res.* **6**, 366–375 (2017).
6. Almeida, J. C. *et al.* A biocompatible hybrid material with simultaneous calcium and strontium release capability for bone tissue repair. *Mater. Sci. Eng. C* **62**, 429–438 (2016).
7. Omar, S. *et al.* Sol-gel hybrid coatings with strontium-doped 45S5 glass particles for enhancing the performance of stainless steel implants: Electrochemical, bioactive and in vivo response. *J. Non. Cryst. Solids* **425**, 1–10 (2015).
8. John, Ł., Podgórska, M., Nedelec, J. M., Cwynar-Zajac, Ł. & Dzięgiel, P. Strontium-doped organic-inorganic hybrids towards three-dimensional scaffolds for osteogenic cells. *Mater. Sci. Eng. C* **68**, 117–127 (2016).
9. Romero-gavilán, F., Araújo-gomes, N., García-arnáez, I., Martínez-ramos, C. & Elortza, F. The effect of strontium incorporation into sol-gel biomaterials on their protein adsorption and cell interactions. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **174**, 9–16 (2019).
10. Marie, P. Strontium Ranelate in Osteoporosis and Beyond: Identifying Molecular Targets in Bone Cell Biology. *Mol. Interv.* **10**, 305–312 (2010).
11. Verberckmoes, S. C., De Broe, M. E. & D’Haese, P. C. Dose-dependent effects of strontium on osteoblast function and mineralization. *Kidney Int.* **64**, 534–543 (2003).
12. Dahl, S. G. *et al.* Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone* **28**, 446–453 (2001).
13. Zhang, W. *et al.* A strontium-incorporated nanoporous titanium implant surface for rapid osseointegration. *Nanoscale* **8**, 5291–5301 (2016).
14. Romero-Gavilan, F. *et al.* Proteomic analysis of silica hybrid sol-gel coatings: a potential tool for predicting the biocompatibility of implants in vivo. *Biofouling* **33**, 676–689 (2017).
15. Araújo-Gomes, N. *et al.* Complement proteins regulating macrophage polarisation on biomaterials. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **181**, 125–133 (2019).
16. Araújo-Gomes, N. Protein adsorption and macrophage polarization as biocompatibility markers for biomaterial design. (UJI, 2018).

17. Dagang, G., Kewei, X. & Yong, H. The influence of Sr doses on the in vitro biocompatibility and in vivo degradability of single-phase Sr-incorporated HAP cement. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **86**, 947–958 (2008).
18. Schrooten, I. *et al.* Dose-dependent effects of strontium on bone of chronic renal failure rats. *Kidney Int.* **63**, 927–935 (2003).
19. Phan, T. T., Bentiss, F. & Jama, C. Effects of sol–gel process parameters on the anticorrosive performance of phosphosilicate hybrid coatings for carbon steel: structural and electrochemical studies. *New J. Chem.* **42**, 13442–13452 (2018).
20. Sader, M. S. *et al.* In Vitro Cell Response to Protein Adhesion on Commercial β -TCP. in *Key Engineering Materials* vol. 631 367–372 (Trans Tech Publ, 2015).
21. Jitianu, A., Britchi, A., Deleanu, C., Badescu, V. & Zaharescu, M. Comparative study of the sol-gel processes starting with different substituted Si-alkoxides. *J. Non. Cryst. Solids* **319**, 263–279 (2003).
22. Yang, Y. Q., Liu, L., Hu, J. M., Zhang, J. Q. & Cao, C. N. Improved barrier performance of metal alkoxide-modified methyltrimethoxysilane films. *Thin Solid Films* **520**, 2052–2059 (2012).
23. Zolkov, C., Avnir, D. & Armon, R. Tissue-derived cell growth on hybrid sol-gel films. *J. Mater. Chem.* **14**, 2200–2205 (2004).
24. Shirotsaki, Y. *et al.* Effects of Si (IV) released from chitosan-silicate hybrids on proliferation and differentiation of MG63 osteoblast cells. *Bioceram. Dev. Appl.* **1**, (2011).
25. Reiner, T., Kababya, S. & Gotman, I. Protein incorporation within Ti scaffold for bone ingrowth using Sol-gel SiO₂ as a slow release carrier. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **19**, 583–589 (2008).
26. Ding, Q., Yang, L., Dinarvand, P., Wang, X. & Rezaie, A. R. Protein C Thr315Ala variant results in gain of function but manifests as type II deficiency in diagnostic assays. *Blood, J. Am. Soc. Hematol.* **125**, 2428–2434 (2015).
27. Wajant, H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science (80-)*. **296**, 1635–1636 (2002).
28. Klezovitch, O. & Vasioukhin, V. Cadherin signaling: keeping cells in touch. *FI000Research* **4**, (2015).
29. Cui, X. *et al.* Strontium modulates osteogenic activity of bone cement composed of bioactive borosilicate glass particles by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Bioact. Mater.* **5**, 334–347 (2020).
30. Deligianni, D. D., Katsala, N. D., Koutsoukos, P. G. & Missirlis, Y. F. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials* **22**, 87–96 (2000).
31. Juan-Díaz, M. J. *et al.* Development of hybrid sol–gel coatings for the improvement of metallic biomaterials performance. *Prog. Org. Coatings* **96**, 42–51 (2016).
32. Buser, D. *et al.* Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J. Biomed. Mater. Res.* **25**, 889–902 (1991).
33. Romero-Gavilán, F. *et al.* Proteome analysis of human serum proteins adsorbed onto different titanium surfaces used in dental implants. *Biofouling* **33**, 98–111 (2017).

34. Rechendorff, K., Hovgaard, M. B., Foss, M., Zhdanov, V. P. & Besenbacher, F. Enhancement of protein adsorption induced by surface roughness. *Langmuir* **22**, 10885–10888 (2006).
35. Deligianni, D. D. *et al.* Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti–6Al–4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials* **22**, 1241–1251 (2001).
36. Spriano, S. *et al.* How do wettability, zeta potential and hydroxylation degree affect the biological response of biomaterials? *Mater. Sci. Eng. C* **74**, 542–555 (2017).
37. García-Arnáez, I. *et al.* A single coating with antibacterial properties for prevention of medical device-associated infections. *Eur. Polym. J.* **113**, (2019).
38. Saravanapavan, P., Jones, J. R., Pryce, R. S. & Hench, L. L. Bioactivity of gel-glass powders in the CaO-SiO₂ system: A comparison with ternary (CaO-P₂O₅-SiO₂) and quaternary glasses (SiO₂-CaO-P₂O₅-Na₂O). *J. Biomed. Mater. Res. Part A An Off. J. Soc. Biomater. Japanese Soc. Biomater. Aust. Soc. Biomater. Korean Soc. Biomater.* **66**, 110–119 (2003).
39. Choudhary, S., Halbout, P., Alander, C., Raisz, L. & Pilbeam, C. Strontium ranelate promotes osteoblastic differentiation and mineralization of murine bone marrow stromal cells: involvement of prostaglandins. *J. Bone Miner. Res.* **22**, 1002–1010 (2007).
40. Nardone, V. *et al.* In vitro effects of strontium on proliferation and osteoinduction of human preadipocytes. *Stem Cells Int.* **2015**, 1–12 (2015).
41. Kong, Y., Guo, Y., Zhang, J., Zhao, B. & Wang, J. Strontium promotes transforming growth factors β 1 and β 2 expression in rat chondrocytes cultured in vitro. *Biol. Trace Elem. Res.* **184**, 450–455 (2018).
42. Bellucci, D. *et al.* Bone regeneration by novel bioactive glasses containing strontium and/or magnesium: a preliminary in-vivo study. *Materials (Basel)*. **11**, 2223 (2018).
43. Zhang, S. *et al.* Recent developments in strontium-based biocomposites for bone regeneration. *J. Artif. Organs* **23**, 191–202 (2020).
44. Lin, K. *et al.* Enhanced osteoporotic bone regeneration by strontium-substituted calcium silicate bioactive ceramics. *Biomaterials* **34**, 10028–10042 (2013).
45. Shi, J. *et al.* Effect of titanium implants with strontium incorporation on bone apposition in animal models: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **7**, 1–10 (2017).
46. Wewer, U. M. *et al.* A potential role for tetranectin in mineralization during osteogenesis. *J. Cell Biol.* **127**, 1767–1775 (1994).
47. CLEMMENSEN, I., PETERSEN, L. C. & KLUFT, C. Purification and characterization of a novel, oligomeric, plasminogen kringle 4 binding protein from human plasma: tetranectin. *Eur. J. Biochem.* **156**, 327–333 (1986).
48. Gehron Robey, P., Bianco, P. & Termine, J. D. The cellular biology and molecular biochemistry of bone formation. *Disord. Bone Miner. Metab.* 241–263 (1992).
49. Iba, K. *et al.* Delayed fracture healing in tetranectin-deficient mice. *J. Bone Miner. Metab.* **31**, 399–408 (2013).
50. Dowling, P. *et al.* Identification of proteins found to be significantly altered when comparing the serum proteome from Multiple Myeloma patients with varying degrees of bone disease. *BMC Genomics* **15**, 904 (2014).

51. Thouverey, C. *et al.* Proteomic characterization of biogenesis and functions of matrix vesicles released from mineralizing human osteoblast-like cells. *J. Proteomics* **74**, 1123–1134 (2011).
52. Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K. & Lambris, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* **11**, 785–797 (2010).
53. Lorenzo, J., Horowitz, M. & Choi, Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr. Rev.* **29**, 403–440 (2008).
54. Sahu, A. & Lambris, J. D. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol. Rev.* **180**, 35–48 (2001).
55. Tu, Z., Bu, H., Dennis, J. E. & Lin, F. Efficient osteoclast differentiation requires local complement activation. *Blood, J. Am. Soc. Hematol.* **116**, 4456–4463 (2010).
56. Kishore, U. & Sim, R. B. Factor H as a regulator of the classical pathway activation. *Immunobiology* **217**, 162–168 (2012).
57. Mollnes, T. E. & Kirschfink, M. Strategies of therapeutic complement inhibition. *Mol. Immunol.* **43**, 107–121 (2006).
58. Chen, Z. *et al.* Osteoimmunomodulation for the development of advanced bone biomaterials. *Mater. today* **19**, 304–321 (2016).
59. Vishwakarma, A. *et al.* Engineering immunomodulatory biomaterials to tune the inflammatory response. *Trends Biotechnol.* **34**, 470–482 (2016).
60. Cho, N. & Seong, S. Apolipoproteins inhibit the innate immunity activated by necrotic cells or bacterial endotoxin. *Immunology* **128**, e479–e486 (2009).
61. Meerasa, A., Huang, J. G. & Gu, F. X. Human serum lipoproteins influence protein deposition patterns on nanoparticle surfaces. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **5**, 489–493 (2013).
62. Araújo-Gomes, N. *et al.* Characterization of serum proteins attached to distinct sol–gel hybrid surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **106**, 1477–1485 (2018).
63. Pozzi, N. & Di Cera, E. Prothrombin structure: unanticipated features and opportunities. (2014).
64. Dahlbäck, B. Novel insights into the regulation of coagulation by factor V isoforms, tissue factor pathway inhibitor α , and protein S. *J. Thromb. Haemost.* **15**, 1241–1250 (2017).
65. Bilotft, D. *et al.* Fast form alpha-2-macroglobulin-A marker for protease activation in plasma exposed to artificial surfaces. *Clin. Biochem.* **50**, 1203–1208 (2017).
66. Cvirn, G. *et al.* Alpha 2-macroglobulin enhances prothrombin activation and thrombin potential by inhibiting the anticoagulant protein C/protein S system in cord and adult plasma. *Thromb. Res.* **105**, 433–439 (2002).
67. Josic, D., Hoffer, L. & Buchacher, A. Preparation of vitamin K-dependent proteins, such as clotting factors II, VII, IX and X and clotting inhibitor Protein C. *J. Chromatogr. B* **790**, 183–197 (2003).
68. Yamamura, J., Morita, Y., Takada, Y. & Kawakami, H. The fragments of bovine high molecular weight kininogen promote osteoblast proliferation in vitro. *J. Biochem.* **140**, 825–830 (2006).

69. Tsuruga, E., Rao, D. S., Baatz, J. E. & Reddy, S. V. Elevated serum kininogen in patients with paget's disease of bone: A role in marrow stromal/preosteoblast cell proliferation. *J. Cell. Biochem.* **98**, 1681–1688 (2006).
70. Schmaier, A. H. & McCrae, K. R. The plasma kallikrein–kinin system: its evolution from contact activation. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 2323–2329 (2007).
71. Suleiman, L., Négrier, C. & Boukerche, H. Protein S: A multifunctional anticoagulant vitamin K-dependent protein at the crossroads of coagulation, inflammation, angiogenesis, and cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **88**, 637–654 (2013).
72. Furie, B. & Furie, B. C. Mechanisms of thrombus formation. *N. Engl. J. Med.* **359**, 938–949 (2008).
73. Jones, A. L., Hulett, M. D. & Parish, C. R. Histidine-rich glycoprotein: A novel adaptor protein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation systems. *Immunol. Cell Biol.* **83**, 106–118 (2005).
74. Wakabayashi, S. & Koide, T. Histidine-rich glycoprotein: a possible modulator of coagulation and fibrinolysis. in *Seminars in thrombosis and hemostasis* vol. 37 389–394 (© Thieme Medical Publishers, 2011).
75. Tsuchida-Straeten, N. *et al.* Enhanced blood coagulation and fibrinolysis in mice lacking histidine-rich glycoprotein (HRG). *J. Thromb. Haemost.* **3**, 865–872 (2005).

Capítulo 4.

Recubrimientos
dopados con Ca

1. Introducción

El calcio es un elemento muy utilizado en el campo de la ingeniería de tejidos óseos para el desarrollo de biomateriales, debido a sus funciones relacionadas con el metabolismo óseo y el proceso de coagulación. La presencia de iones de Ca condiciona el microambiente en la intercara tejido/material, afectando al depósito de proteínas en el biomaterial y las consiguientes respuestas celulares¹.

El Ca es el elemento mineral más abundante del cuerpo humano, suponiendo alrededor del 2 % del peso corporal, y estando el 98 % del mismo en los huesos². Este es esencial en la contracción muscular, la activación ovocitaria, los impulsos nerviosos y la coagulación de la sangre, entre otros procesos del ser humano². La adición de iones calcio en cultivos celulares muestra un efecto sobre la diferenciación osteogénica de osteoblastos³ e incrementa la proliferación celular⁴. Se ha identificado que el Ca tiene varios efectos estimulantes sobre los osteoblastos en ensayos *in vitro*. Así, Adams *et al.* afirman que el aumento de la concentración de Ca^{2+} puede desencadenar diversas reacciones que se traducen en la modulación de la apoptosis de los osteoblastos⁵. Además, según Pierre Marie, el Ca extracelular induce una serie de vías de señalización intracelulares en las células óseas, derivando en la regulación de la actividad de los osteoclastos y los osteoblastos⁶. Del mismo modo, Yamaguchi *et al.* demostraron de manera concluyente que el Ca participa en la estimulación de la proliferación celular a través del receptor sensor de calcio (CaR), que está acoplado a la proteína G, y a los agonistas del CaR⁷. También el Ca es uno de los elementos estructurales en la fase mineral ósea, por lo que tiene un papel clave en el metabolismo óseo, estimulando la formación e inhibiendo la resorción óseas⁸. Esto hace que sea una opción interesante en el desarrollo de biomateriales⁹.

Los materiales basados en Ca, han sido ampliamente utilizados como sustitutos óseos y en el campo protésico, así como en la odontología. Estos biomateriales favorecen la formación de nuevo hueso ya que promueven la proliferación y expresión de células óseas¹⁰. Más concretamente, en el campo de la implantología, el Ca se ha utilizado en numerosas ocasiones para activar las superficies de los implantes y mejorar su

osteointegración. Así, Subirà-Pifarré *et al.* concluyeron que los implantes modificados con fosfato cálcico, crean una superficie osteoconductora que mejora la osteointegración, traduciéndose en una alta tasa de supervivencia y, por lo tanto, pueden considerarse una buena elección para la práctica clínica¹¹. Igualmente, de Lacerda *et al.* realizaron diferentes estudios, *in vitro* e *in vivo* en cóndilo femoral de conejo, que confirmaron la estabilización de los implantes dentales con cemento de fosfato cálcico reforzado con fibras de PVA, durante la osteointegración, sin comprometer su osteocompatibilidad¹². Además, Anitua *et al.* demostraron que ciertas superficies de implantes de titanio modificadas con CaCl_2 estimulan la adhesión y activación plaquetaria, mejorando la osteointegración *in vivo*¹³.

Por último, tal y como se ha explicado en el capítulo introductorio, los iones Ca^{2+} promueven y aceleran la coagulación sanguínea. El coágulo de sangre alrededor del implante sirve como un andamio inicial para la reparación del tejido, la mineralización ósea y la posterior remodelación^{14,15}. Estos iones actúan en varias etapas de las vías intrínseca y extrínseca de la cascada de coagulación, lo que lleva a la formación del complejo protrombinasa, que convierte la protrombina en trombina, siendo crucial para estimular la diferenciación de los osteoblastos y aumentar la osteogénesis¹⁶. Así, se ha comprobado que la modificación química de las superficies de implantes dentales con iones de calcio, muestra una enorme capacidad procoagulante que aporta una estabilidad instantánea. El análisis proteómico de esta superficie modificada muestra que se adsorbe preferentemente la proteína FA10, que tiene un papel relevante en la vía común de la cascada de coagulación. Del mismo modo, los ensayos *in vivo* han demostrado que estas superficies estimulan una mayor formación de hueso alrededor de los implantes que las superficies de implantes estándar utilizadas como control¹⁷.

Así, en el estudio que se describe en este cuarto capítulo se pretende conocer la incidencia que tiene la presencia de este elemento en el recubrimiento y cuáles son las interacciones del mismo con las proteínas y las células.

Para ello, se han realizado modificaciones del sistema base, dopando los recubrimientos con 0.5, 1 y 1.5 % en peso de cloruro de calcio (Tabla 2.1).

2. Resultados

2.1. Caracterización morfológica

2.1.1. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Los recubrimientos sintetizados no presentan separación de fases ni precipitados de la sal, como se puede observar en las siguientes micrografías (Figura 4.1).

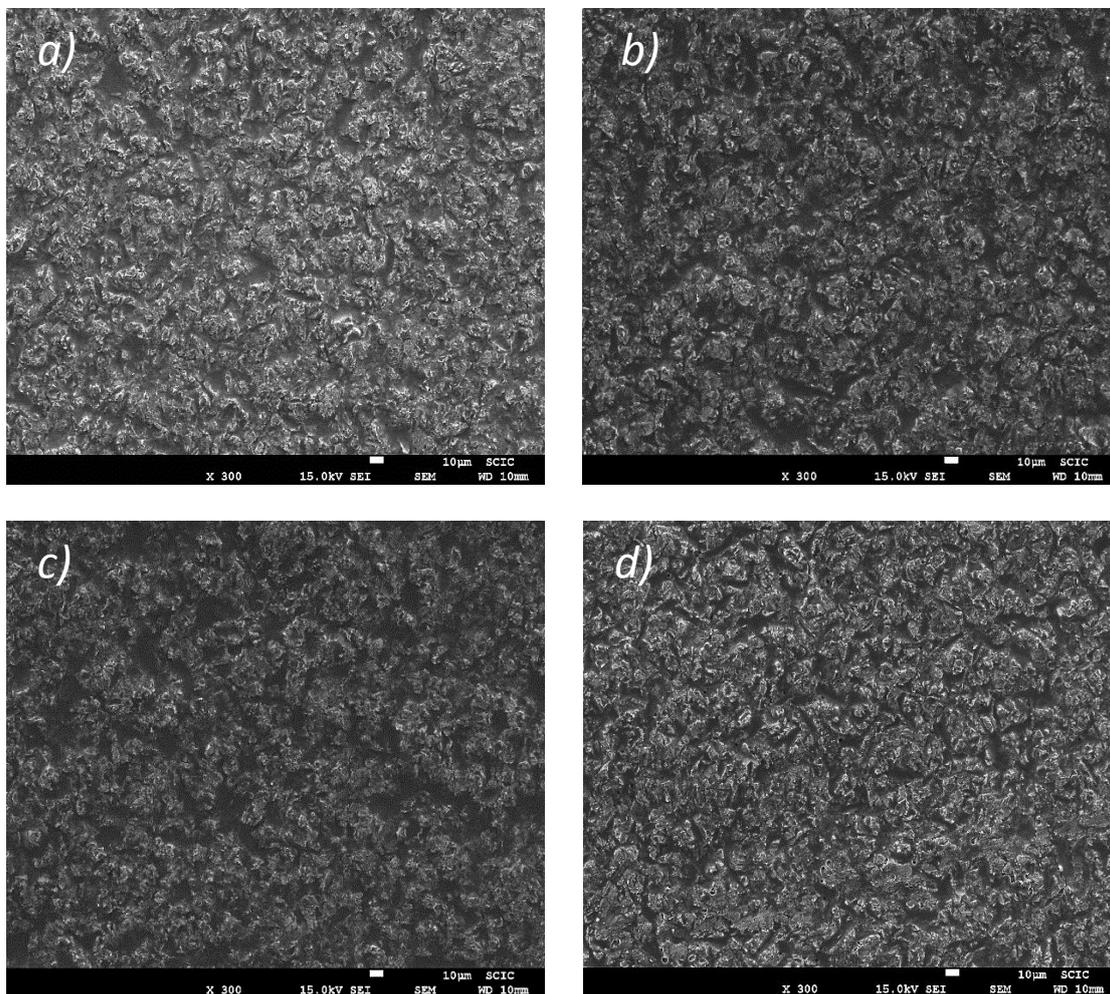


Figura 4.1. Micrografías por SEM de los recubrimientos (a) 7M:3T, (b) 7M:3T-0.5Ca, (c) 7M:3T-1Ca y (d) 7M:3T-1.5Ca.

Si se utiliza un gran número de aumentos, 10000 concretamente, se observa que la adición de la sal supone la aparición de pequeños poros en los recubrimientos (Figura 4.2).

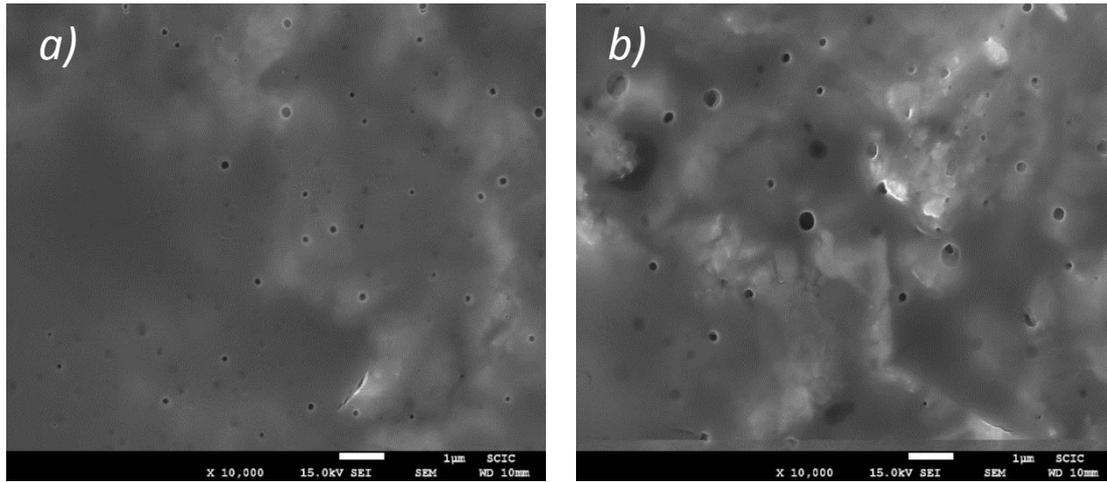


Figura 4.2. Detalle de las micrografías por SEM a 10000 aumentos de los recubrimientos (a) 7M:3T-1Ca y (b) 7M:3T-1.5Ca.

2.1.2. Perfilometría óptica

Como se ha comentado previamente, la rugosidad es uno de los parámetros clave en la adhesión celular, que a su vez es fundamental para el éxito del proceso de osteointegración.

En la Figura 4.3 se muestran los valores de Ra, proporcionados por el software del equipo, que cuantifican la rugosidad de la superficie.

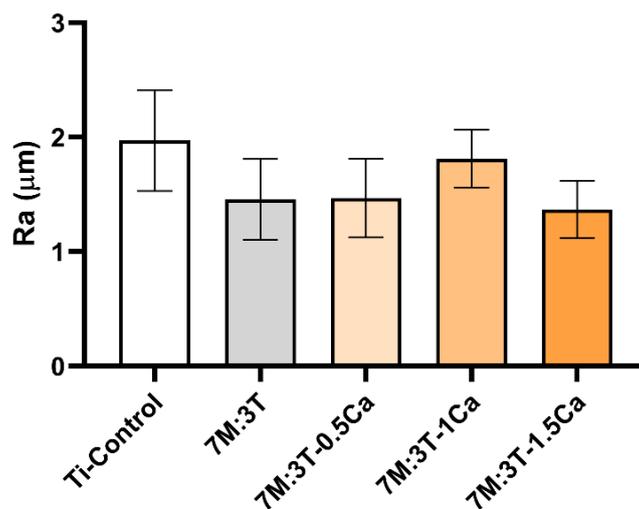


Figura 4.3. Representación gráfica de Ra para los diferentes sistemas dopados con CaCl₂.

Como se puede observar, los recubrimientos eliminan parte de la rugosidad inicial de los discos de Ti, provocando una disminución en el parámetro Ra. El valor de Ra de la formulación 7M:3T-1Ca es ligeramente superior a los otros dos recubrimientos, aunque tras realizar un test Newman-Keuls, de comparaciones múltiples, la diferencia no es estadísticamente significativa.

2.2. Adherencia

La adherencia de los recubrimientos sobre el sustrato se evalúa mediante el ensayo de corte por enrejado. Todos los recubrimientos se obtienen bien adheridos al metal, sin desprendimiento alguno. Superficialmente, todos ellos presentan uniformidad, ausencia de grietas, transparencia y brillo, signo de que no hay separación de fases.

Una vez realizados los cortes de forma perpendicular y tras retirar la cinta adhesiva, las placas metálicas se observan en un microscopio óptico, tal y como se ve en la Figura 4.4.

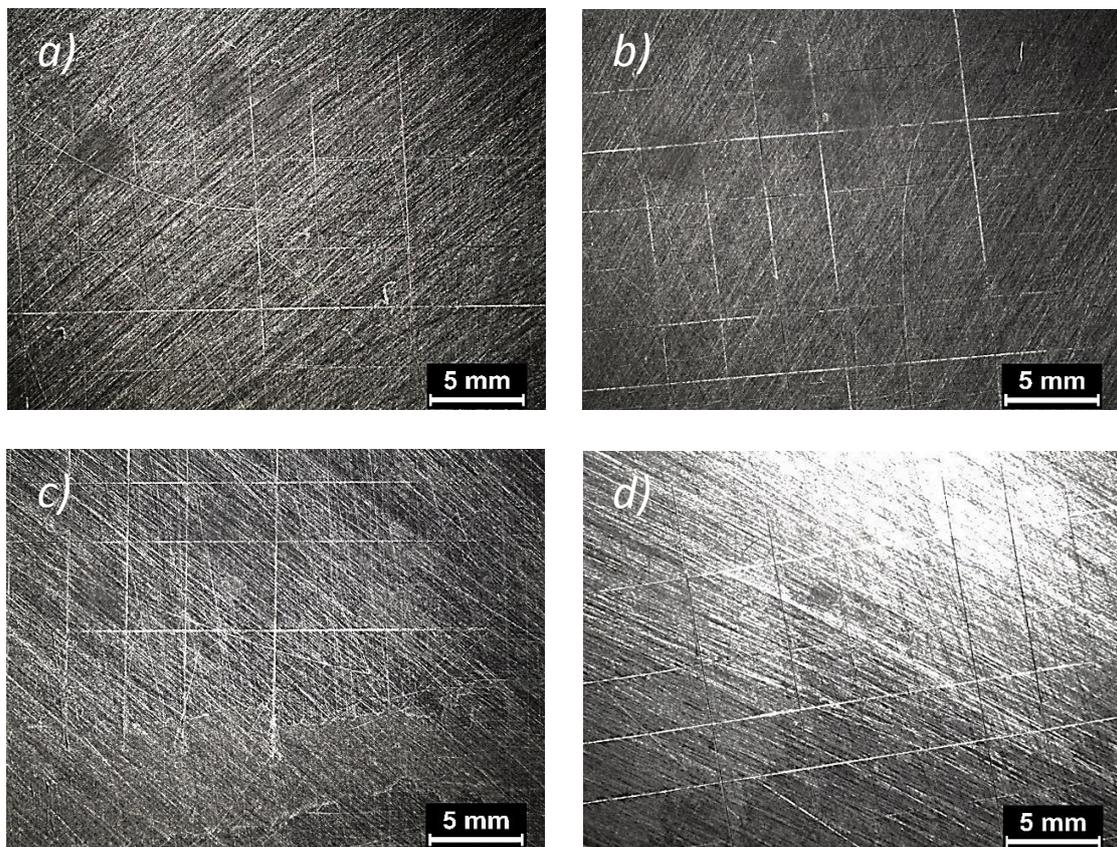


Figura 4.4. Ensayos de corte por enrejado para los sistemas (a) 7M:3T, (b) 7M:3T-0.5Ca, (c) 7M:3T-1Ca y (d) 7M:3T-1.5Ca, a un aumento de $\times 0.73$.

En todos los casos, comparando su aspecto con el esquema de la norma ISO 2409, el desprendimiento del material es 0. Esto quiere decir que en ningún caso se observa desprendimiento de los recubrimientos sintetizados, por lo que se obtiene una óptima adhesión sobre el sustrato metálico.

2.3. Caracterización química

En la caracterización de estos recubrimientos se han utilizado las técnicas de FTIR/ATR y ^{29}Si -RMN líquido y sólido.

2.3.1. FTIR/ATR

Para caracterizar químicamente los recubrimientos, se realizan los espectros infrarrojos de los mismos. Los espectros se registran en el intervalo de 4000 y 600 cm^{-1} . De este modo se podrá verificar la adecuada formación de la red polisiloxánica, tras el curado, y comprobar el carácter híbrido de los recubrimientos obtenidos.

En la Figura 4.5. se muestran los espectros IR de los recubrimientos cargados con diferentes porcentajes de CaCl_2 , junto con el del recubrimiento base.

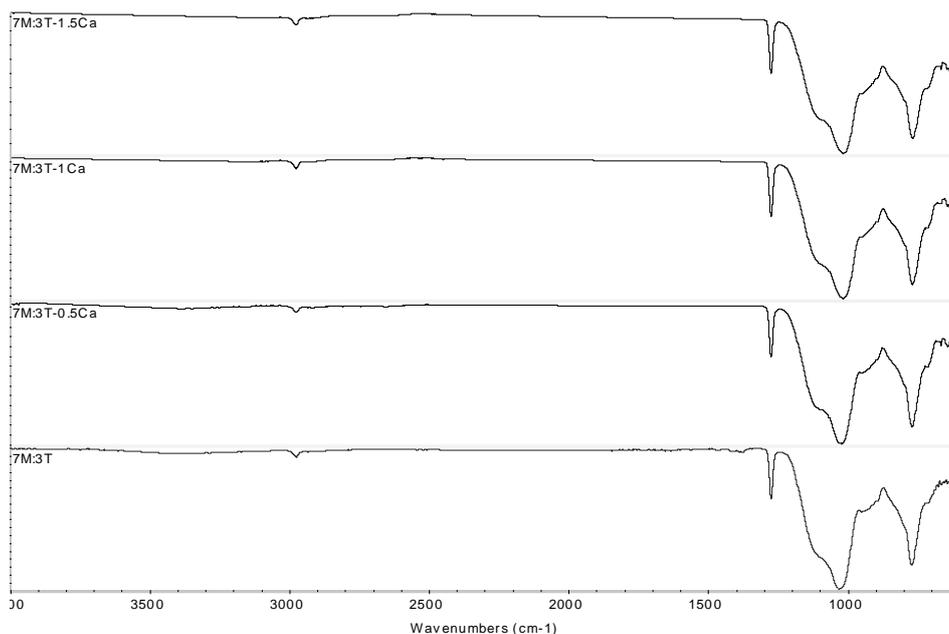


Figura 4.5. Espectros IR del sistema 7M:3T base y dopado con diferentes porcentajes de CaCl_2 .

En todos los espectros de estos sistemas se observan las bandas características de la red polisiloxánica. Estas bandas corresponden a las vibraciones asociadas al enlace siloxano a 1165 cm^{-1} , 1075 cm^{-1} y 760 cm^{-1} . Por lo que la adición de la sal de Ca, en principio, parece no afectar a la formación de la red.

Además de las bandas características de la red, se observan también las bandas asociadas al precursor MTMOS. La señal de vibración de tensión asimétrica del grupo metilo se sitúa en torno a 2975 cm^{-1} , mientras que a 1275 cm^{-1} se encuentra la banda correspondiente a la vibración de deformación del enlace Si-CH_3^{18} , confirmándose así el carácter híbrido de la red formada.

Por último, la banda de poca intensidad que se observa a 940 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de tensión de Si-OH , indica que la cantidad de grupos silanol libres es pequeña y, por lo tanto, que la red siloxánica es densa y altamente conectada.

2.3.2. ^{29}Si -RMN

Tras el análisis por FTIR/ATR, se realiza el estudio de las etapas de hidrólisis y condensación, que tienen lugar durante la síntesis de todas las formulaciones, mediante la técnica de RMN de ^{29}Si , en estado líquido.

En las Figuras 4.6, 4.7, 4.8 y 4.9 se muestran los espectros realizados, a diferentes tiempos, a partir de la adición del medio ácido, que inicia el proceso de hidrólisis.

En estos espectros se puede observar que el proceso de hidrólisis y condensación avanza análoga y favorablemente, en todos los casos. Así, para el precursor MTMOS se obtienen todas las especies condensadas T_1 , T_2 (la más abundante) y T_3 a partir de 1 h después de la adición del agua acidificada, aumentando la intensidad del pico correspondiente a T_3 con el tiempo. En el caso del TEOS, la consecución de las especies más condensadas es más lenta, siendo las señales menos intensas. Es más, no llega a lograrse la especie más condensada Q_4 . La diferencia del comportamiento de los dos precursores también se observa al inicio de la reacción donde la señal correspondiente al MTMOS desaparece inmediatamente, lo que indica que este se hidroliza y empieza a condensar rápidamente; mientras que el pico del TEOS tarda más en desaparecer.

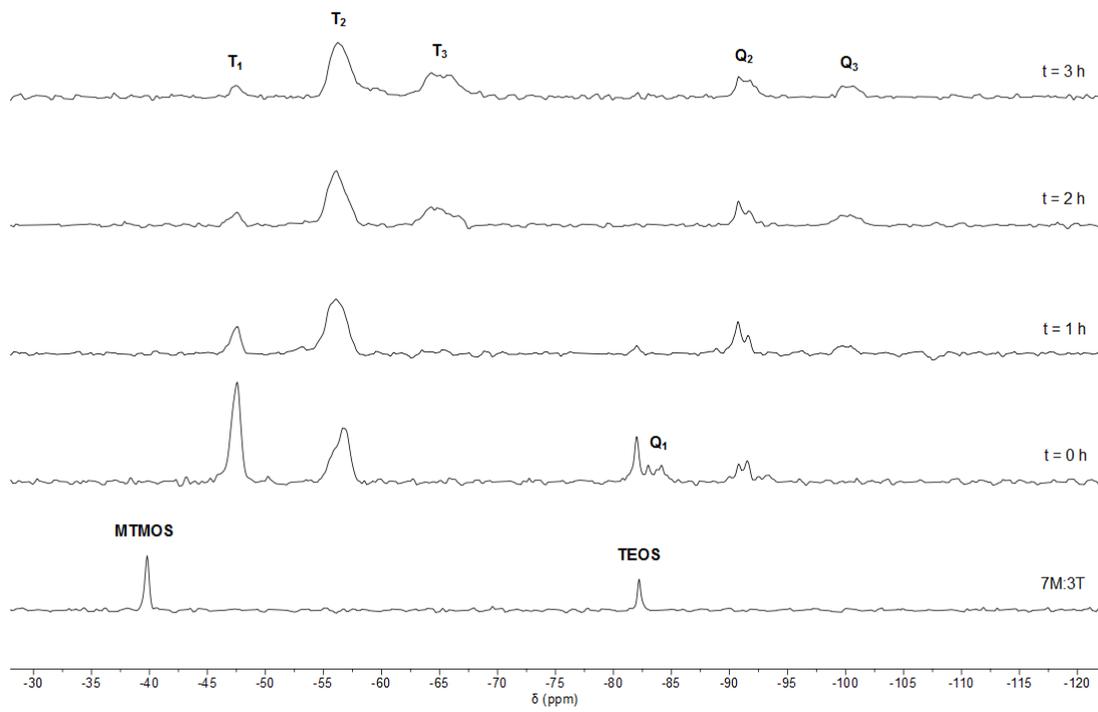


Figura 4.6. Espectro ^{29}Si -RMN líquido del sistema 7M:3T base.

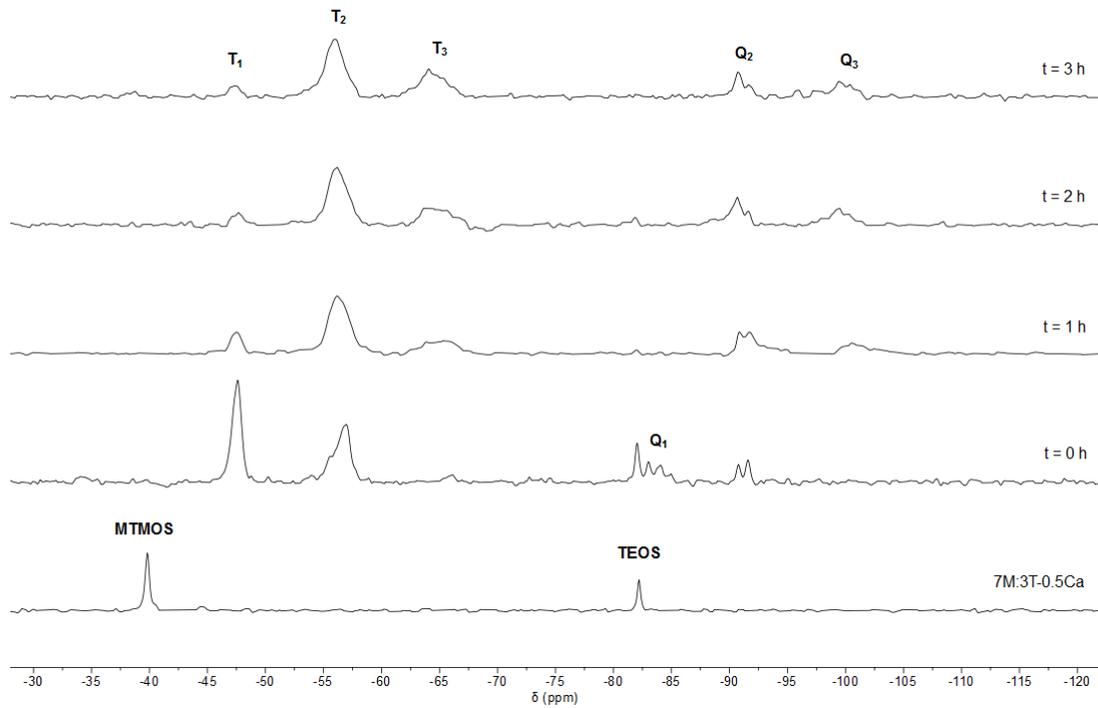


Figura 4.7. Espectro ^{29}Si -RMN líquido del sistema 7M:3T-0.5Ca.

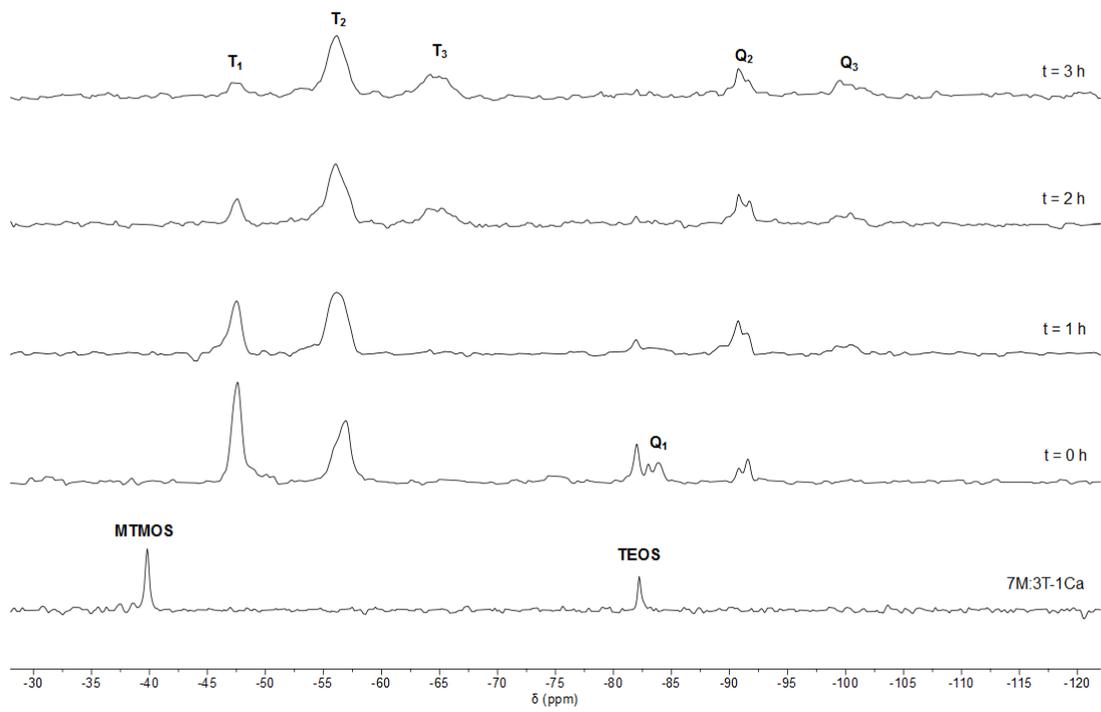


Figura 4.8. Espectro ^{29}Si -RMN líquido del sistema 7M:3T-1Ca.

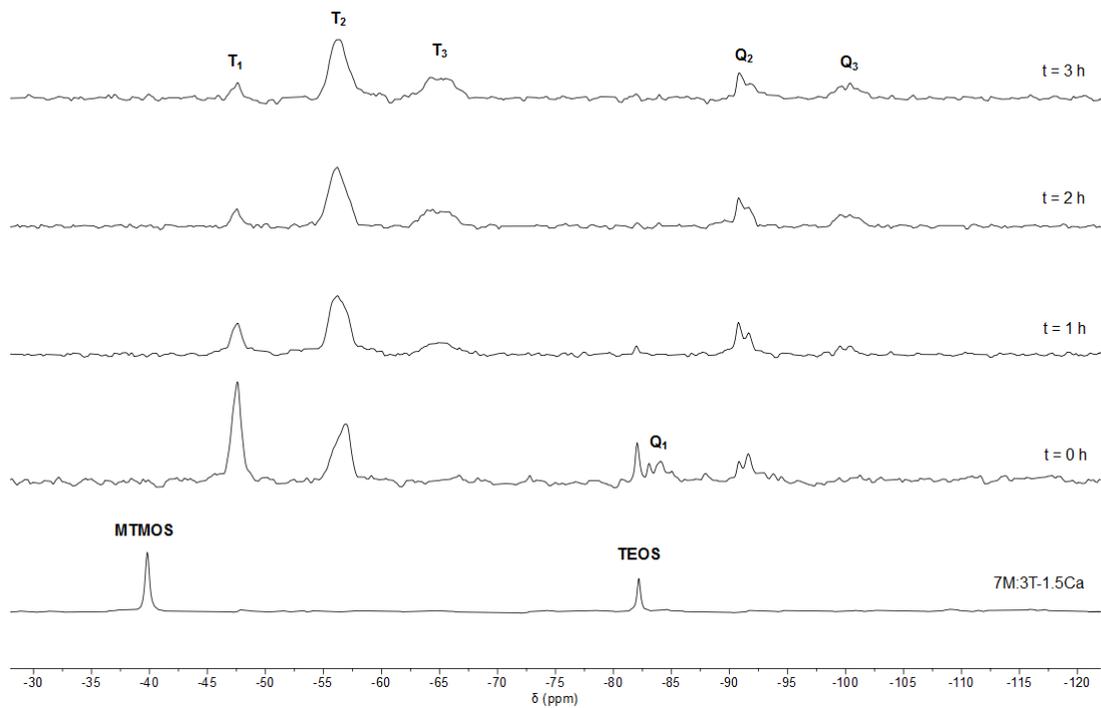


Figura 4.9. Espectro ^{29}Si -RMN líquido del sistema 7M:3T-1.5Ca.

Tal y como se observa, transcurridas dos horas desde la adición del agua acidificada, no se consigue que las especies mayoritarias sean las de mayor grado de condensación. Por lo tanto, se recurre a un tratamiento térmico para lograrlo.

Para el estudio de la red final formada tras el curado, se utiliza la técnica de ^{29}Si -RMN de sólidos. Durante el tratamiento térmico se promueven las reacciones de condensación, produciéndose así un aumento del entrecruzamiento de la red.

En la Figura 4.10. se muestran los espectros de ^{29}Si -RMN de sólidos realizados para todos los sistemas.

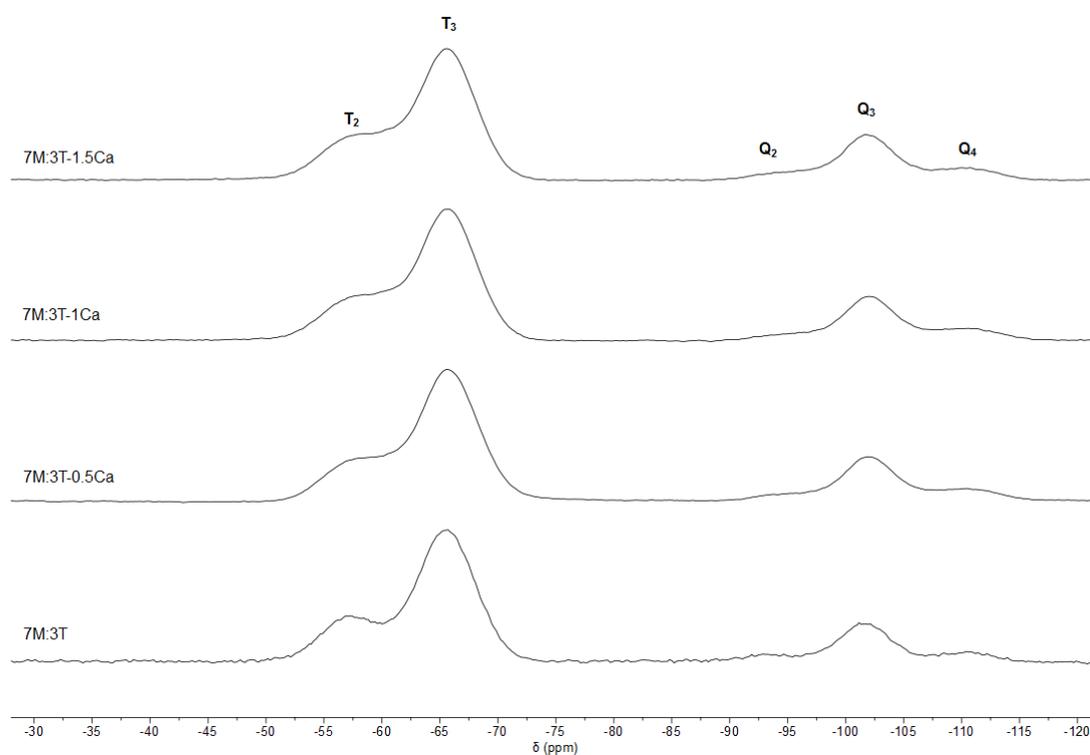


Figura 4.10. Espectro ^{29}Si -RMN sólido del sistema 7M:3T + % CaCl_2 .

El espectro muestra las señales asociadas a las especies T₂ y T₃ del precursor MTMOS, y las especies Q₂, Q₃ y Q₄ del TEOS. Las ratios de las áreas de los picos T₃ y T₂ se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Ratio de las áreas de los picos T_3 y T_2 obtenidas por ^{29}Si -RMN.

Formulación	Ratio T_3/T_2
7M:3T	3.35
7M:3T-0.5Ca	2.97
7M:3T-1Ca	2.76
7M:3T-1.5Ca	2.73

Como se puede observar, existen algunas diferencias en las ratios T_3/T_2 asociadas a un mayor contenido de sal en los recubrimientos, traduciéndose en que la red es algo menos reticulada. Como era de esperar, los picos asociados a las especies más condensadas son los que aparecen con mayor intensidad. Concretamente, en el caso del MTMOS se puede observar el pico de T_3 y en lo referente al TEOS puede apreciarse la señal de Q_4 , aunque la especie Q_3 es la más abundante. Las especies menos condensadas, T_1 y Q_2 , que aparecían en los espectros en fase líquida, ya han desaparecido.

Por lo tanto, la adición de las distintas proporciones de Ca en la formulación de los recubrimientos no afecta en gran manera a la correcta condensación promovida por el tratamiento térmico, ni a la formación de la red polisiloxánica, ya que las señales de las especies T_3 y Q_3 continúan siendo las más intensas y las ratios de los picos correspondientes al MTMOS siguen siendo elevadas.

2.4. Determinación del grado de hidrofilia/hidrofobia

La evaluación del carácter hidrófilo o hidrófobo de las superficies de los biomateriales sintetizados es clave ya que este influye en la adhesión celular¹⁹. Igualmente, esta propiedad determina la capacidad de adsorción de agua de los recubrimientos, pudiendo influir en la degradación del material.

Los resultados obtenidos para cada recubrimiento se representan en la Figura 4.11.

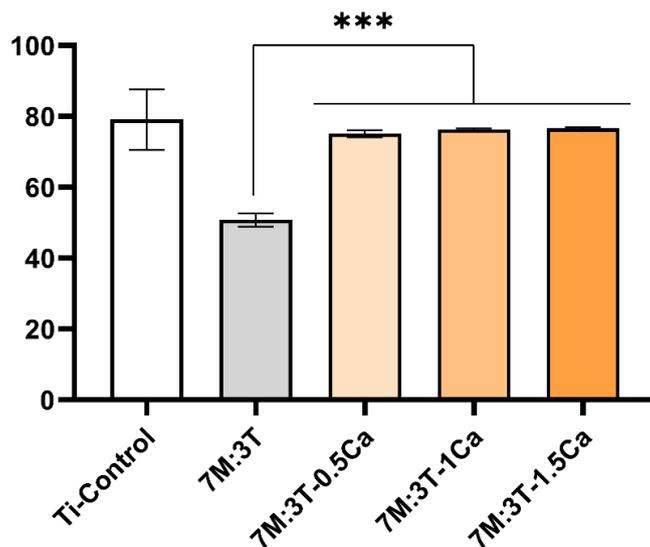


Figura 4.11. Valores de ángulo de contacto de los recubrimientos de los sistemas 7M:3T + % CaCl₂. (***) $p \leq 0.001$

El material base 7M:3T presenta un carácter más hidrófilo que el Ti, con un decrecimiento del ángulo de contacto de aproximadamente 30°. La adición de CaCl₂ a esta formulación base provoca un incremento importante de este parámetro, llegando a valores que rondan los 75°, más cercanos al del Ti control, siendo un valor de ángulo de contacto muy bueno para la adhesión celular²⁰, lo que es crucial para una buena osteointegración de los implantes.

2.5. Ensayo de degradación hidrolítica

La velocidad de degradación del recubrimiento es muy importante ya que influye en la liberación de los diferentes principios activos que en él se contienen. Los recubrimientos sintetizados son biodegradables en medio acuoso y se reabsorben en el organismo. Específicamente, los recubrimientos basados en sílice tienen propiedades osteogénicas, ya que estimulan la diferenciación osteoblástica, entre otras características²¹.

Los resultados de las medidas de degradación se expresan como la pérdida de peso (en tanto por ciento) frente al tiempo. En la Figura 4.12 se muestran los valores para los diferentes sistemas.

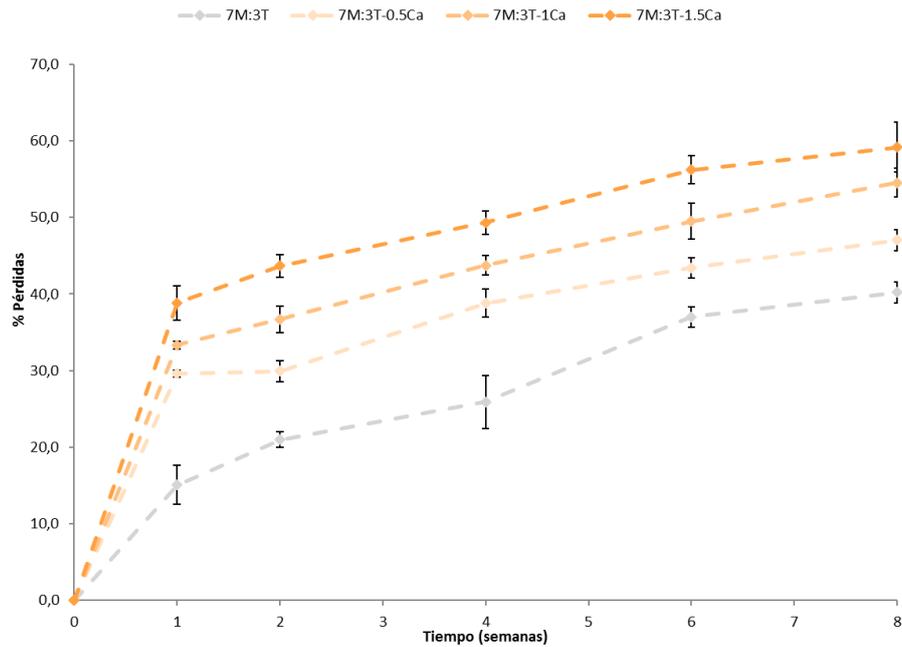


Figura 4.12. Degradación hidrolítica de los recubrimientos del sistema 7M:3T + % CaCl₂.

Tal y como se observa en la gráfica, todos los materiales presentan una rápida degradación inicial, durante la primera semana, dándose posteriormente una degradación más progresiva hasta el final del ensayo. Los sistemas con Ca muestran porcentajes de degradación mayores que el sistema base, siendo a su vez la degradación proporcional a la concentración de sal en la formulación.

2.6. Ensayos de liberación

La degradación hidrolítica del recubrimiento producirá por una parte la liberación del Si, que forma parte de la red siloxánica, y por otra la del Ca, que se ha incorporado en forma de sal a los recubrimientos. Este ensayo permitirá observar la cinética de liberación de ambos elementos, lo que influirá en la capacidad osteogénica de los recubrimientos obtenidos²².

En la Figura 4.13 se muestran los resultados obtenidos para el Si liberado, mediante la técnica ICP-AES, a partir de los diferentes sistemas sintetizados.

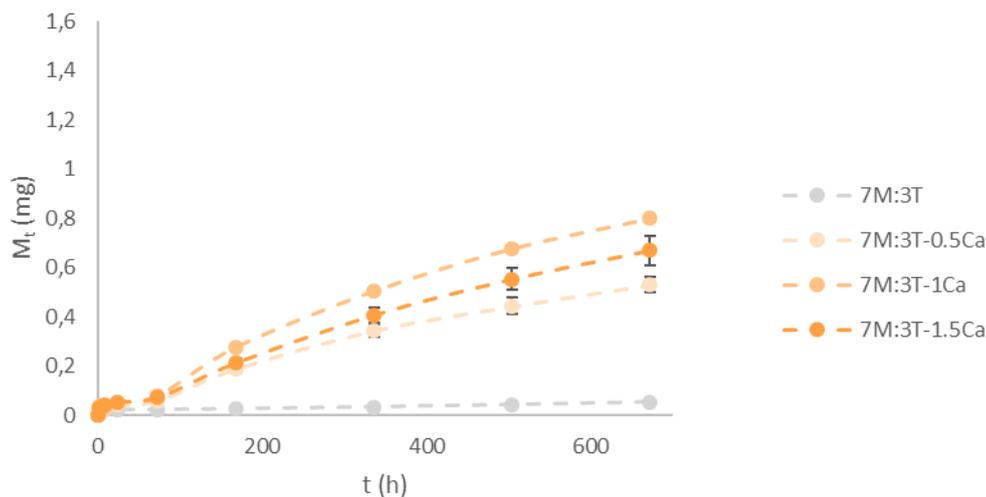


Figura 4.13. Liberación de silicio del sistema 7M:3T + % CaCl₂.

La incorporación de CaCl₂ a la formulación base 7M:3T afecta sobremanera a la liberación de Si, desde las primeras etapas de la hidrólisis, y por lo tanto a la degradación del recubrimiento. Se observa claramente en la gráfica cómo la adición de la sal aumenta considerablemente la liberación de Si, y por ende la degradación del recubrimiento. En cuanto a la influencia de la concentración de la sal en la formulación, esta es mucho menor, sobre todo a tiempos largos. Teniendo en cuenta, además, las desviaciones de las medidas, se puede afirmar que la variación de la concentración de la sal influye mucho menos que la incorporación de la sal, siendo las medidas muy similares en los tres recubrimientos que incorporan la sal de Ca.

Por otra parte, es importante conocer el perfil de la liberación de Ca a partir del recubrimiento, ya que constituye un factor clave para que este ion pueda ejercer su influencia en los procesos de coagulación y regeneración. Esta medida de la cinética de liberación del ion Ca se realizó también mediante ICP-AES, y los perfiles obtenidos se pueden observar en la Figura 4.14.

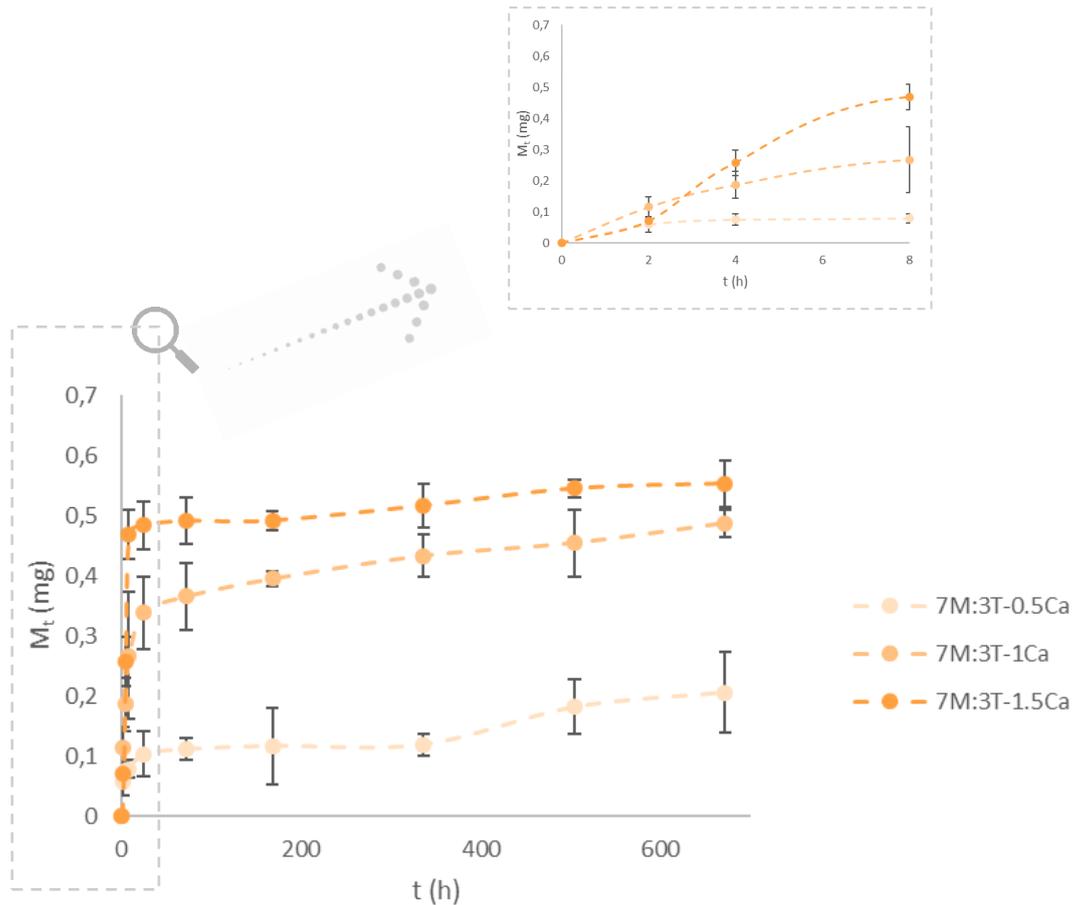


Figura 4.14. Liberación de Ca del sistema 7M:3T + % CaCl_2 .

Tal y como se puede apreciar en la ampliación, la cinética de liberación del ion Ca^{2+} presenta inicialmente una liberación muy rápida hasta un tiempo aproximado de 10 h para los dos sistemas con mayor concentración de sal y de 2 h para el menos dopado, y a partir de ese tiempo la liberación se hace más lenta y continuada en el tiempo. Además, se observa una mayor liberación cuanto mayor es el contenido CaCl_2 en el recubrimiento.

2.7. Análisis proteómico de las proteínas adsorbidas en la superficie

Las eluciones de las proteínas adsorbidas a los recubrimientos sol-gel se analizaron utilizando la técnica LC-MS/MS, lo que permitió la identificación de 107 proteínas distintas (Anexo 2). El software Progenesis QI permitió la comparación estadística de la cantidad relativa de las proteínas adheridas a los recubrimientos formulados con Ca respecto a las unidas al material sol-gel base de referencia (7M:3T). Por otro lado, se

utilizaron las bases de datos DAVID y PANTHER para la clasificación de dichas proteínas en cuanto a sus funciones.

Los resultados del análisis comparativo de Progenesis QI se muestran en la Tabla 4.2, donde es posible evaluar los cambios en los patrones de proteínas adsorbidas cuando se comparan las muestras que contienen Ca respecto a la referencia, el recubrimiento base. Progenesis QI reveló 24 proteínas adsorbidas en mayores proporciones cuando se añade CaCl₂ a la red sol-gel en comparación con la muestra de referencia, mientras que, a la inversa, el software no ha detectado proteínas que tengan mayor afinidad por el recubrimiento base 7M:3T.

Tabla 4.2. Análisis diferencial Progenesis QI de proteínas más adsorbidas en recubrimientos dopados con Ca (7M:3T-0.5Ca, 7M:3T-1Ca y 7M:3T-1.5Ca) respecto al material base. Las proteínas detectadas con ANOVA $p < 0.05$ (en amarillo) y una ratio superior a 1.3 (en verde) se consideraron significativamente diferentes (en negrita).

Código	Proteína	7M:3T-0.5Ca vs 7M:3T		7M:3T-1Ca vs 7M:3T		7M:3T-1.5Ca vs 7M:3T	
		<i>p</i>	Ratio	<i>p</i>	Ratio	<i>p</i>	Ratio
PLF4 PF4V	Platelet factor 4	0.046	4.82	0.023	9.10	0.231	40.12
APOC4	Apolipoprotein C-IV	0.015	3.58	0.001	3.75	0.002	4.30
HRG	Histidine-rich glycoprotein	0.004	2.41	0.004	2.53	0.000	3.50
CLUS	Clusterin	0.060	1.96	0.017	2.16	0.001	2.18
APOA	Apolipoprotein(a)	0.123	1.55	0.508	1.19	0.033	2.07
C4BPA	C4b-binding protein alpha chain	0.004	2.68	0.014	2.61	0.011	2.03
PROS	Vitamin K-dependent protein S	0.080	1.58	0.029	1.76	0.018	1.75
IGHG3	Ig gamma-3 chain C region	0.347	2.59	0.001	3.89	0.516	1.73
SAMP	Serum amyloid P-component	0.090	1.37	0.649	1.12	0.026	1.70
PLMN	Plasminogen	0.018	1.76	0.607	1.14	0.012	1.67
VTNC	Vitronectin	0.043	1.40	0.101	1.42	0.073	1.64
CFAB	Complement factor B	0.582	1.17	0.034	1.64	0.005	1.62
C1QC	Complement C1q subcomponent subunit C	0.494	1.54	0.031	1.42	0.040	1.53
IGHM	Ig mu chain C region	0.021	1.69	0.084	1.42	0.274	1.51
CD5L	CD5 antigen-like	0.554	1.24	0.167	1.32	0.011	1.51
CFAH	Complement factor H	0.039	1.71	0.102	1.50	0.121	1.44

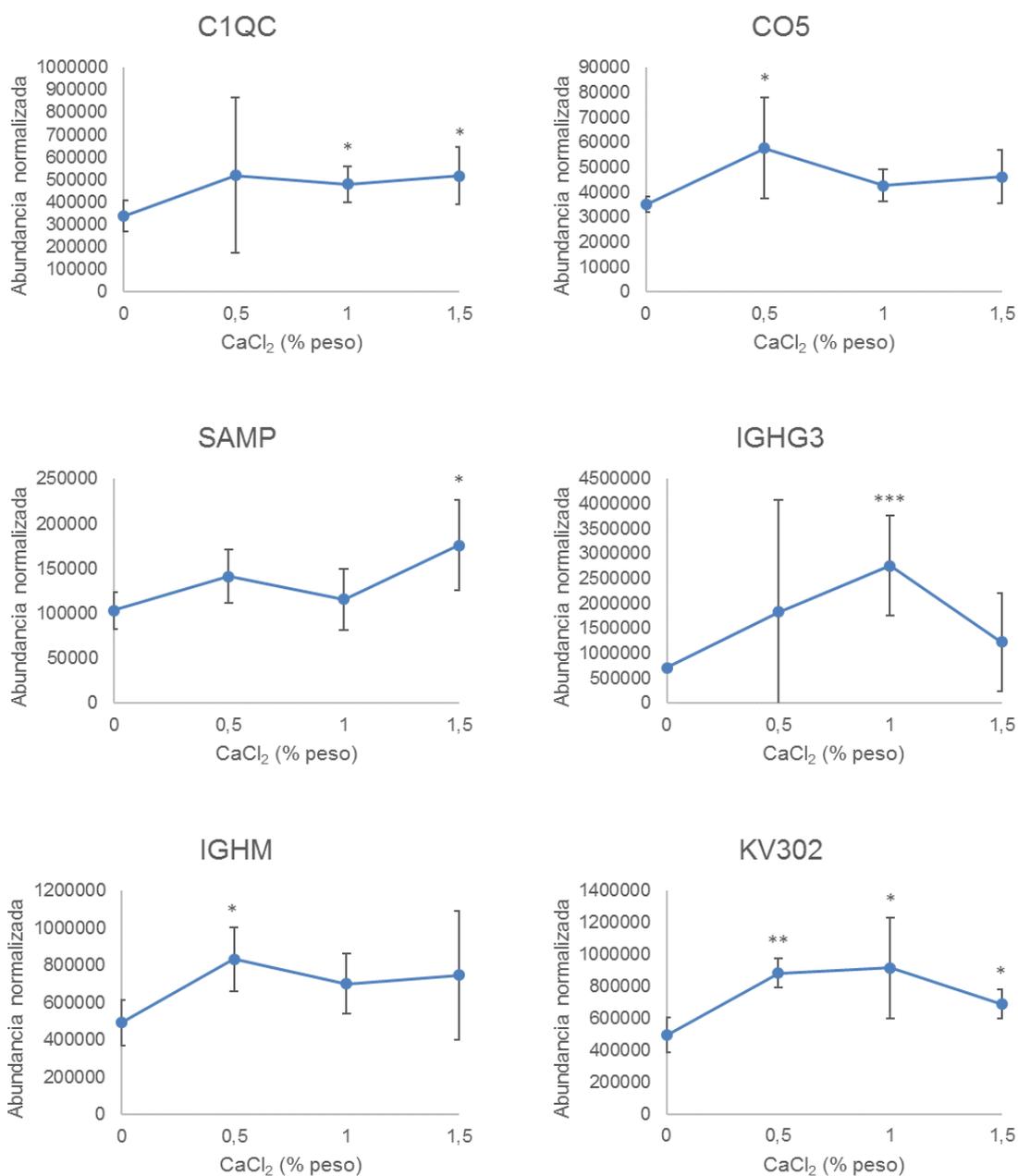
KV308	Ig kappa chain V-III region CLL	0.265	1.24	0.050	1.82	0.490	1.39
KV302	Ig kappa chain V-III region SIE	0.003	1.78	0.027	1.84	0.040	1.39
PEDF	Pigment epithelium-derived factor	0.024	1.71	0.171	1.30	0.374	1.38
IC1	Plasma protease C1 inhibitor	0.004	1.65	0.198	1.27	0.395	1.34
CO5	Complement C5	0.047	1.64	0.083	1.21	0.112	1.32
KV310 KV113	Ig kappa chain V-III region VH (Fragment)	0.067	1.36	0.024	1.49	0.127	1.32
SAA4	Serum amyloid A-4 protein	0.103	1.63	0.019	1.53	0.869	1.22
TETN	Tetranectin	0.037	1.48	0.097	1.60	0.423	1.14

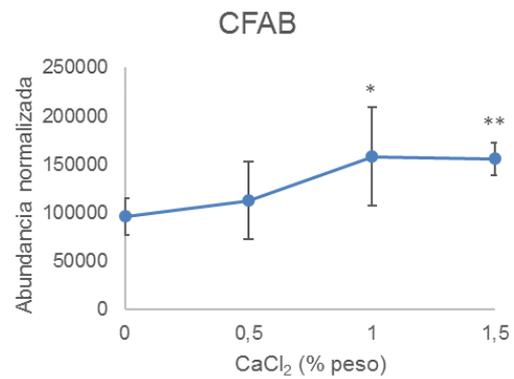
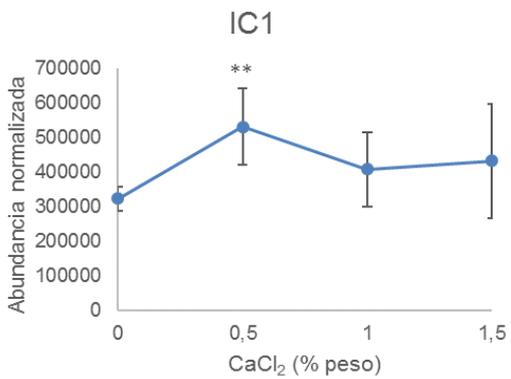
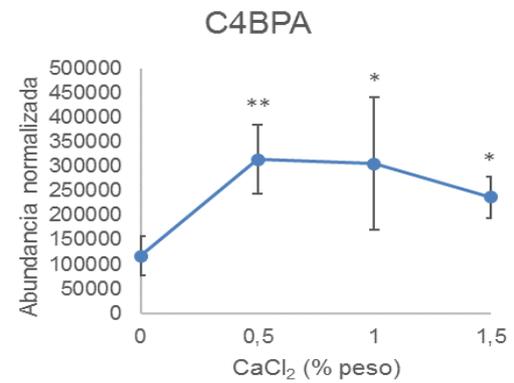
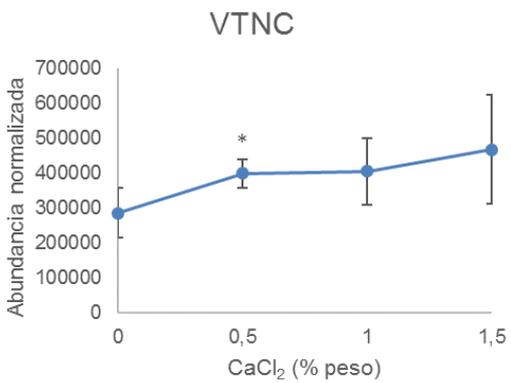
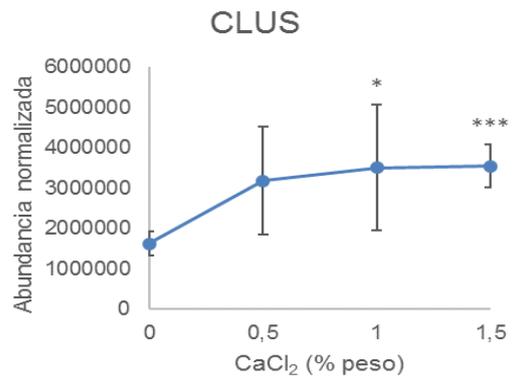
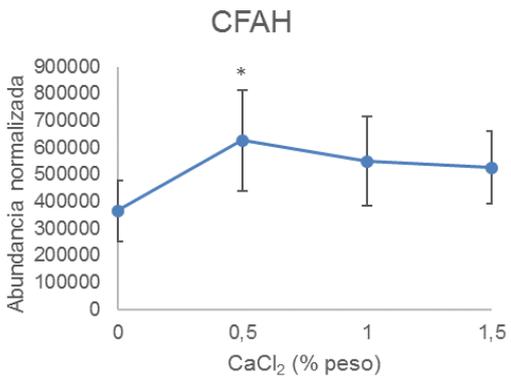
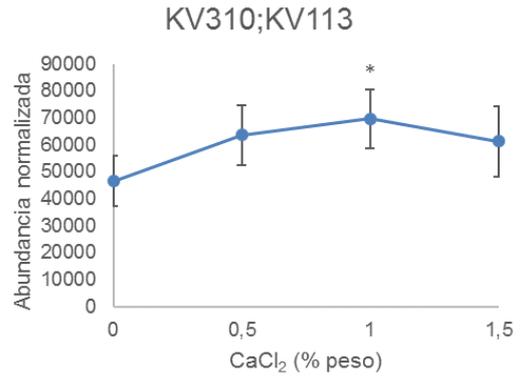
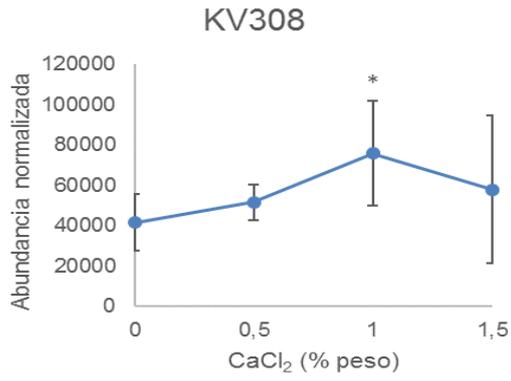
Realizando el análisis de las proteínas adsorbidas de forma diferencial en las superficies mediante la herramienta DAVID, se han identificado proteínas relacionadas con los procesos de inflamación, coagulación, fibrinólisis y regeneración ósea.

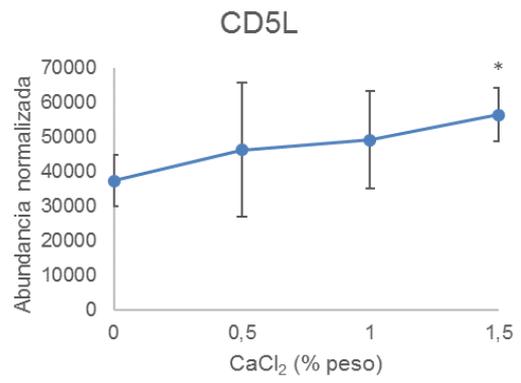
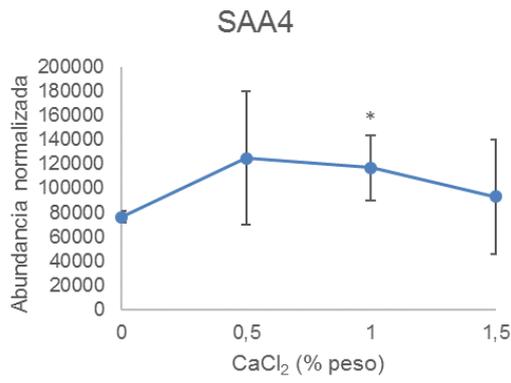
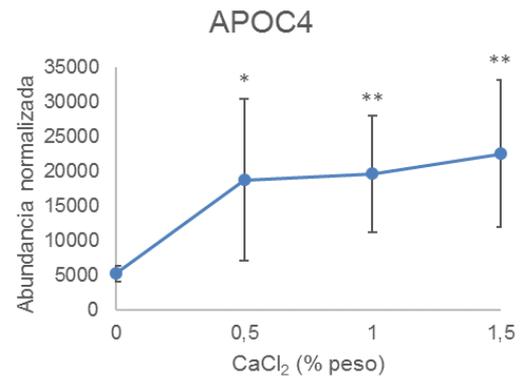
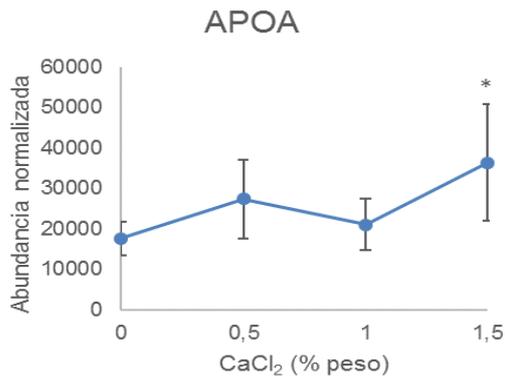
Entre las 24 proteínas adsorbidas que tienen mayor afinidad por los materiales que contienen Ca existe un grupo cuyas funciones estarían ligadas al sistema inmune: C4BPA, CFAB, C1QC, CD5L, CFAH, CO5, CLUS, IC1, SAMP, VTNC y las inmunoglobulinas IGHG3, IGHM, KV308, KV302, KV310 y KV113. Entre estas proteínas hay algunas que están relacionadas con el sistema del complemento, concretamente con su activación (C1QC) y su inhibición (CLUS y CFAH, además de IC1 y VTNC). Asimismo, se encuentran las apolipoproteínas APOA, APOC4 y SAA4 relacionadas con los procesos metabólicos de las lipoproteínas y la unión de fosfolípidos. Destacan entre ellas los valores de la APOC4, que es una de las proteínas más adsorbidas (3.5-4.3 veces más respecto al recubrimiento base) y que interviene positivamente en los procesos de regulación biológica, incluidos los procesos del sistema inmune. Por otra parte, las proteínas HRG, PROS y PLMN, están relacionadas con los procesos de coagulación sanguínea y fibrinólisis, y tienen más afinidad por las superficies que contienen Ca. Del mismo modo, se observa la presencia de las proteínas PLF4 y PF4V en estas superficies dopadas, estando relacionadas también con los procesos de coagulación. Por último, se detectan proteínas vinculadas, en cierto grado, al desarrollo de nuevo hueso como la PEDF y, en pequeña cantidad, la TETN, que interviene en procesos importantes para la integración del implante como son la adhesión celular, la matriz extracelular y la mineralización del hueso.

La Figura 4.15 permite observar los cambios, en función del contenido en Ca, de la abundancia normalizada de las proteínas ligadas con los diferentes procesos que se producen tras la implantación. Así, se representan las proteínas relacionadas con la inflamación (C1QC, CO5, SAMP y las inmunoglobulinas como activadoras; y CFAH, CFAB, CLUS, C4BPA, CD5L, VTNC, IC1 y el grupo de apolipoproteínas como reguladoras), la coagulación (PLF4, PF4V, PLMN y PROS), la fibrinólisis (HRG) y la regeneración ósea (TETN y PEDF).

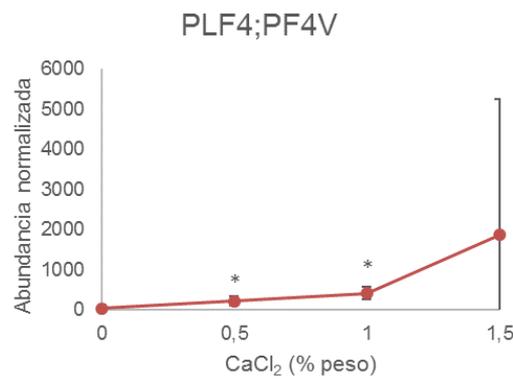
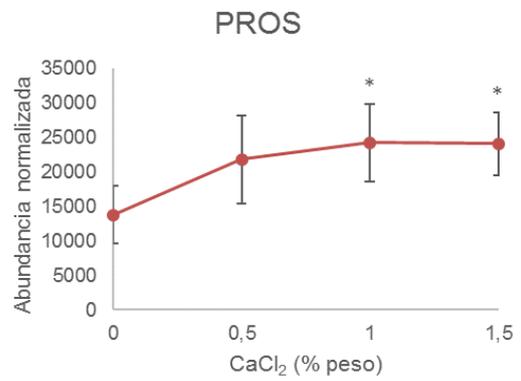
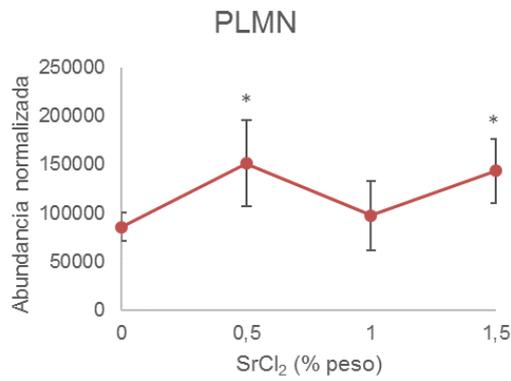
INFLAMACIÓN



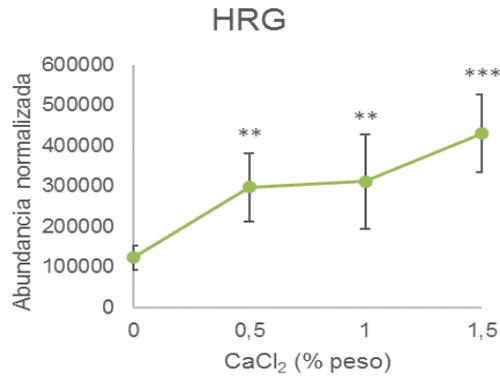




COAGULACIÓN



FIBRINÓLISIS



REGENERACIÓN ÓSEA

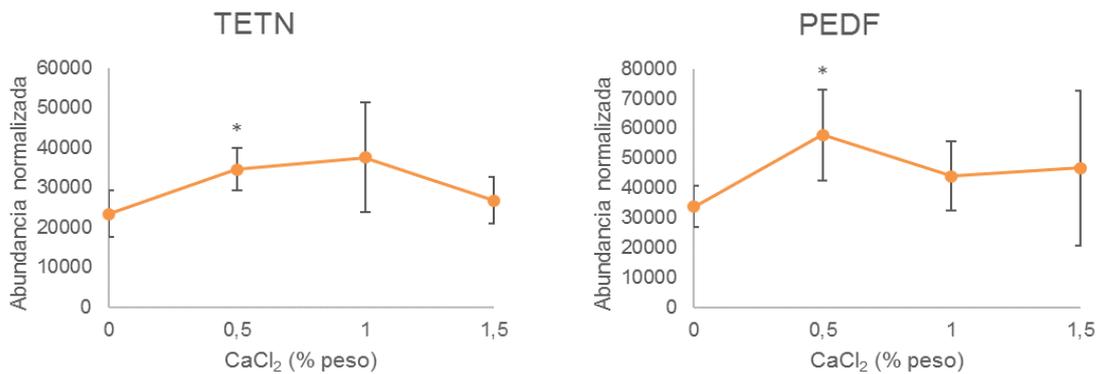


Figura 4.15. Abundancia normalizada en los recubrimientos enriquecidos con Ca del sistema 7M:3T.
(* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

Como se puede observar en los gráficos, la presencia de Ca incrementa las proteínas asociadas a los procesos inflamatorios, tanto las activadoras (la C1QC o las inmoglobulinas) como las reguladoras (CLUS y CFAH). Todas ellas tienen un máximo a diferentes concentraciones. En el siguiente grupo, la principal proteína de coagulación es la PROS, observándose un aumento de la misma con la concentración de calcio. En cuanto a la fibrinólisis, la abundancia normalizada de la HRG aumenta cuanto mayor es la concentración de Ca en el recubrimiento. En último lugar, los perfiles en las proteínas relacionadas con la regeneración ósea (TETN y PEDF) muestran un aumento con la incorporación del calcio al recubrimiento, aunque los perfiles que presentan son diferentes y con un máximo a diferentes concentraciones de Ca.

El programa PANTHER permite clasificar las proteínas anteriores identificadas, en función de las vías de señalización (Figura 4.16).

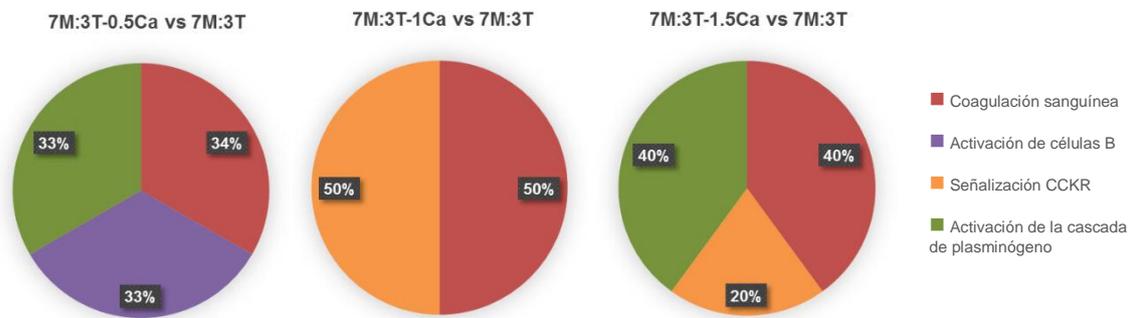


Figura 4.16. Análisis de funciones en vías de señalización mediante PANTHER.

En esta figura se observa que la coagulación es la función principal en todos los materiales dopados con CaCl_2 , aunque también se pueden observar otras, en diferentes proporciones, según el porcentaje de sal incorporado al recubrimiento. Así, la activación de células B, relacionada con el sistema del complemento²³, aparece en los recubrimientos con 0.5 % de Ca. La señalización CCKR, con efecto en la angiogénesis²⁴, se produce en los dopados con 1 y 1.5 % de Ca. Y, finalmente, la activación de la cascada de plasminógeno, que afecta a la fibrinólisis²⁵ y, por lo tanto, a la coagulación, se da en los recubrimientos con 0.5 y 1.5 % de sal.

2.8. Caracterización biológica *in vitro*

2.8.1. Citotoxicidad

Con este ensayo se pretende estudiar la citotoxicidad de cada uno de los recubrimientos sintetizados. Se ha determinado a través de la viabilidad celular de osteoblastos (MC3T3-E1). En la Figura 4.17. se presentan los resultados obtenidos.

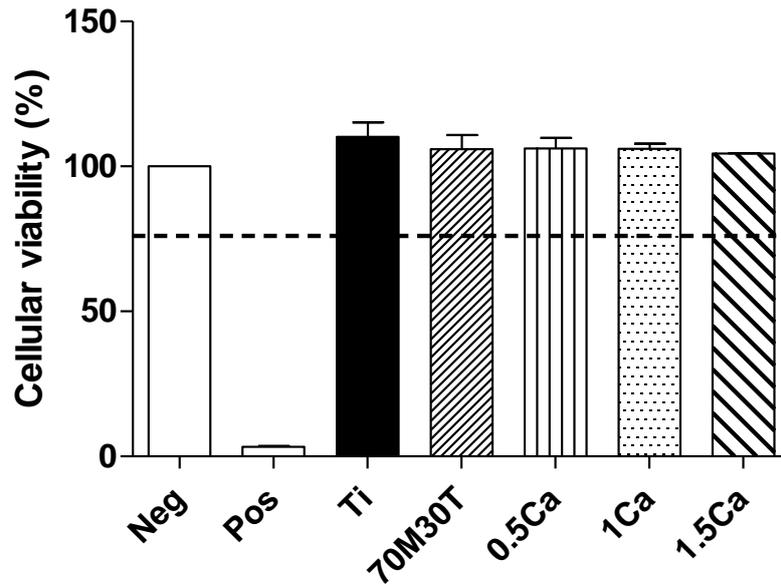


Figura 4.17. Estudio de la citotoxicidad del sistema 7M:3T + % CaCl₂.

Como se puede observar en la gráfica, todos los recubrimientos sintetizados presentan una viabilidad superior al 70 % con respecto al control. Esto quiere decir que ninguna formulación es citotóxica.

2.8.2. Proliferación celular

Los valores de proliferación celular obtenidos mediante la viabilidad celular de osteoblastos MC3T3 para los diferentes sistemas y para el control (Ti), se muestran en la Figura 4.18.

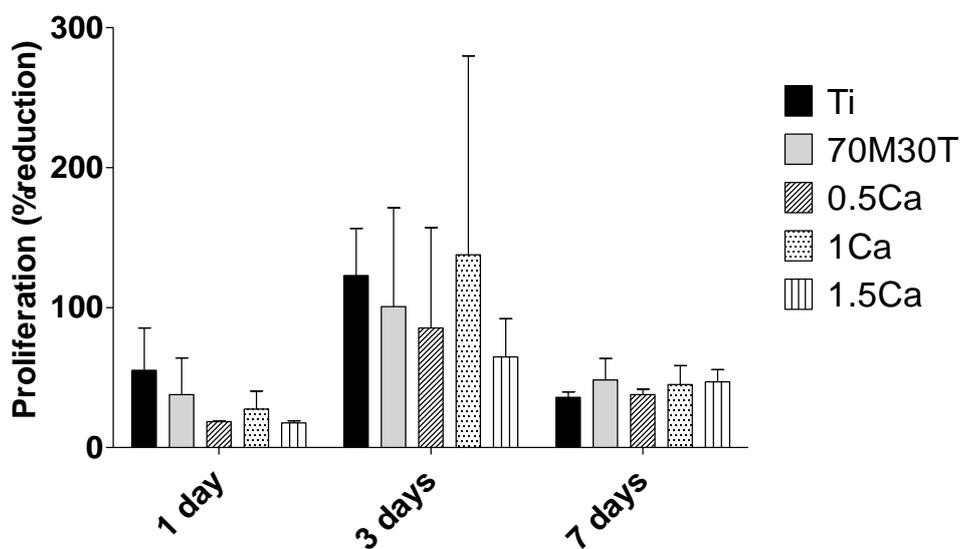


Figura 4.18. Valores de proliferación celular del sistema 7M:3T + % CaCl₂.

Como se puede apreciar en la figura, los resultados son muy similares en proliferación, sin que se aprecien diferencias significativas.

2.8.3. PCR

En las siguientes figuras se muestran los resultados de las PCR efectuadas para las distintas líneas celulares de osteoblastos y de macrófagos, con el fin de obtener información sobre la regeneración ósea y la inflamación, respectivamente.

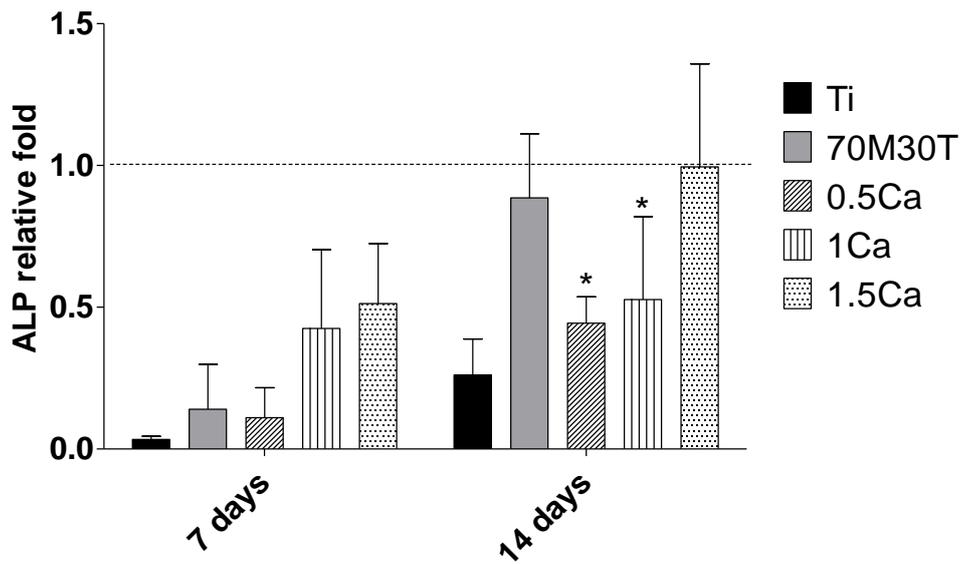


Figura 4.19. Expresión de genes de ALP para el sistema 7M:3T + % CaCl₂ (Osteoblastos: MC3T3). (* $p \leq 0.05$)

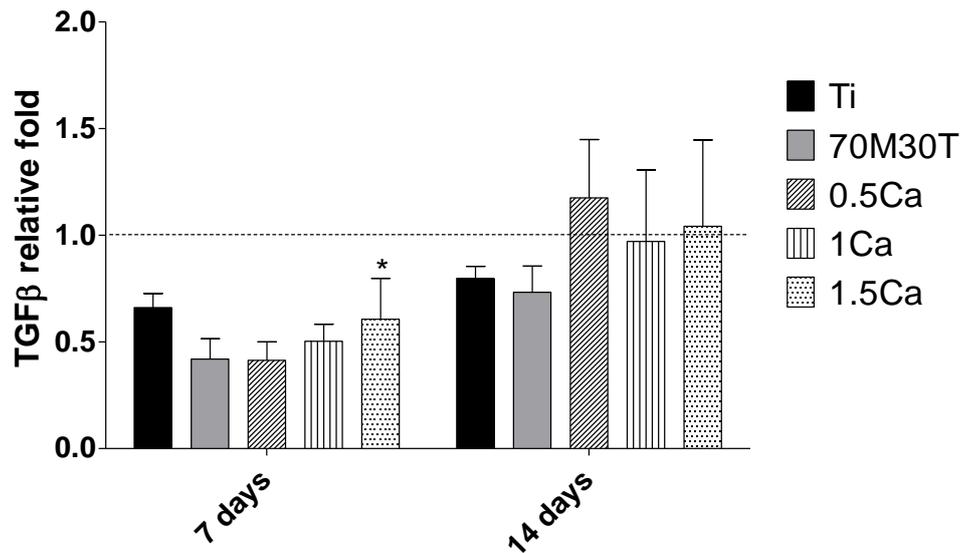


Figura 4.20. Expresión de genes de TGF-β para el sistema 7M:3T + % CaCl₂ (Osteoblastos: MC3T3). (* $p \leq 0.05$)

En la Figura 4.19 se aprecia que los recubrimientos dopados con 0.5 y 1 % de Ca, a 14 días, tienen valores de ALP menores que los del recubrimiento base. El resto de valores de los demás porcentajes, tanto a 7 como a 14 días, son superiores tanto al Ti control como a la base, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa.

En lo referente a la expresión de genes de TGF- β , con la línea celular de osteoblastos, se puede observar, en la Figura 4.20, una sobreexpresión en todos los recubrimientos dopados respecto al recubrimiento base 7M:3T, aunque únicamente el recubrimiento dopado con 1.5 % de Ca presenta una diferencia estadísticamente significativa, a los 7 días de la experimentación. Si se comparan estos valores con el Ti, la adición de Ca al recubrimiento provoca un aumento del gen TGF- β a 14 días. Es un comportamiento, en principio, muy interesante ya que, en el caso de los osteoblastos, se trata de un marcador osteogénico.

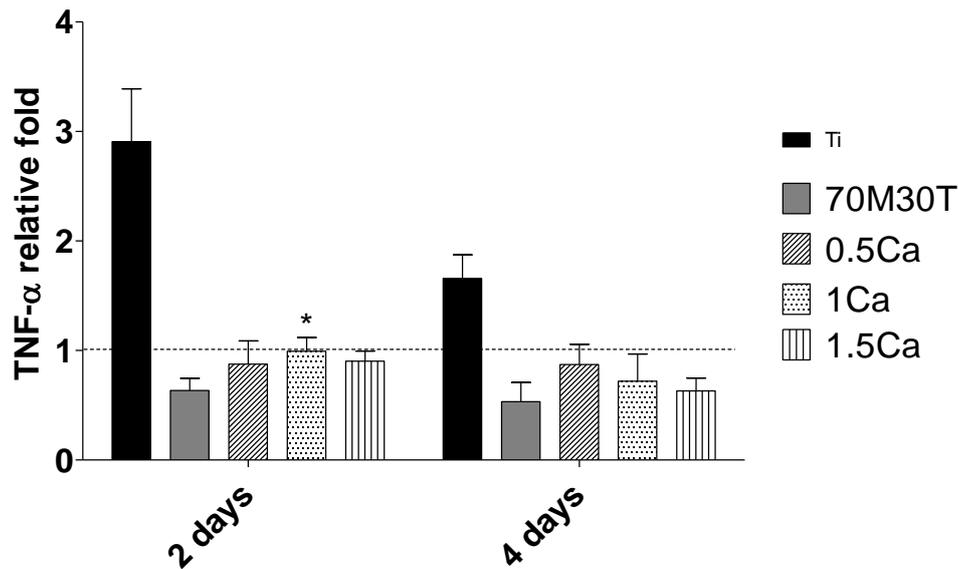


Figura 4.21. Expresión de genes de TNF- α para el sistema 7M:3T + % CaCl₂ (Macrófagos: RAW264.7). (* $p \leq 0.05$)

Con respecto a los ensayos realizados con macrófagos, en la Figura 4.21 se puede comprobar que los valores de la expresión de genes de TNF- α sobre el Ti control son mayores que los de todos los recubrimientos sintetizados. Esto quiere decir que los discos recubiertos causan menor inflamación a lo largo de todo el ensayo. En cuanto al efecto de la adición de la sal de Ca, se puede observar que solo el recubrimiento dopado con un 1 % de Ca, presenta un ligero aumento significativo respecto al recubrimiento base, únicamente a 2 días de experimentación.

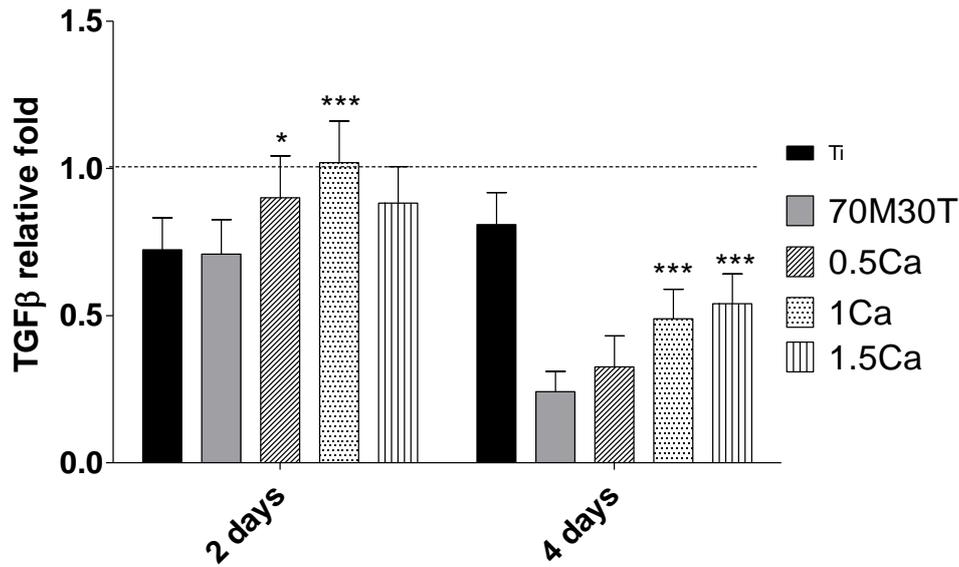


Figura 4.22. Expresión de genes de TGF- β para el sistema 7M:3T + % CaCl₂ (Macrófagos: RAW264.7). (* $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$)

Siguiendo con la línea de macrófagos, pero en referencia a la expresión de genes de TGF- β , en la Figura 4.22 también se aprecia una actividad antiinflamatoria con el dopado con Ca, ya que se observa, tanto a 2 como a 4 días, un aumento estadísticamente significativo de los recubrimientos dopados respecto al recubrimiento base.

Resumiendo, a 2 días del ensayo con la línea de macrófagos, los recubrimientos dopados muestran una concentración mayor del marcador proinflamatorio (significativo en la muestra con un 1 % de Ca) y mucho mayor del antiinflamatorio, respecto al material base, en función del contenido en Ca. A los 4 días del ensayo, el balance de ambos marcadores indica claramente una disminución de la inflamación, ya que disminuye el aumento del marcador proinflamatorio con el contenido en Ca, mientras que el marcador antiinflamatorio sigue siendo significativamente mayor en función del contenido en Ca. Este hecho, en principio, es positivo ya que significa que la inflamación inicial no se cronifica.

2.8.4. ELISA

La información sobre las proteínas expresadas por parte de las células al entorno, a través de los test ELISA, es fundamental para entender la influencia de la concentración de Ca en los procesos celulares.

En la Figura 4.23 se presentan los datos de la cuantificación de ALP detectada, que da una idea del proceso de mineralización celular, para cada uno de los recubrimientos sintetizados en esta serie con CaCl_2 .

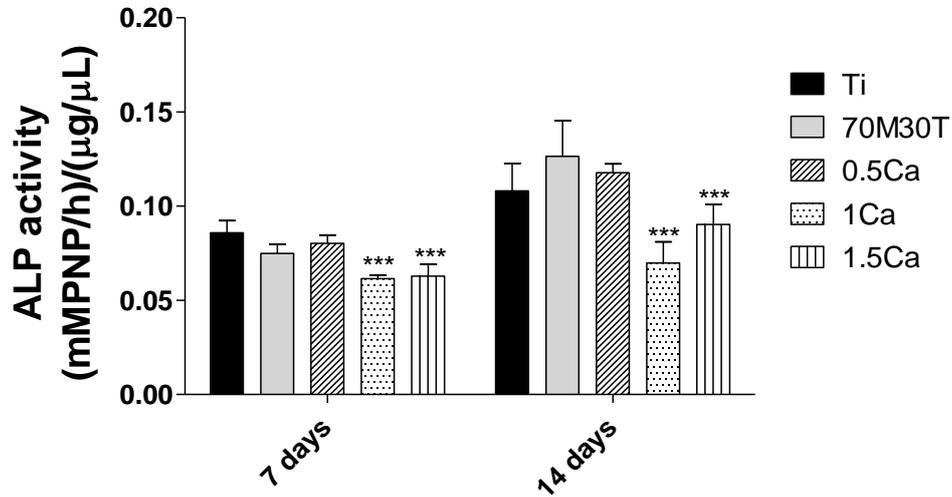


Figura 4.23. Actividad de la ALP del sistema 7M:3T + % CaCl_2 (Osteoblastos: MC3T3). (***) $p \leq 0.001$

Se observa que los recubrimientos dopados con 1 y 1.5 % de Ca indujeron una menor mineralización que el recubrimiento base, a los 7 días de la experimentación. A las 2 semanas, el dopado con 1 y 1.5 % de Ca supone, igualmente, un descenso significativo de la ALP.

Por otro lado, en la Figura 4.24 se puede observar la concentración de $\text{TNF-}\alpha$, en la línea de macrófagos, determinada con un ensayo ELISA.

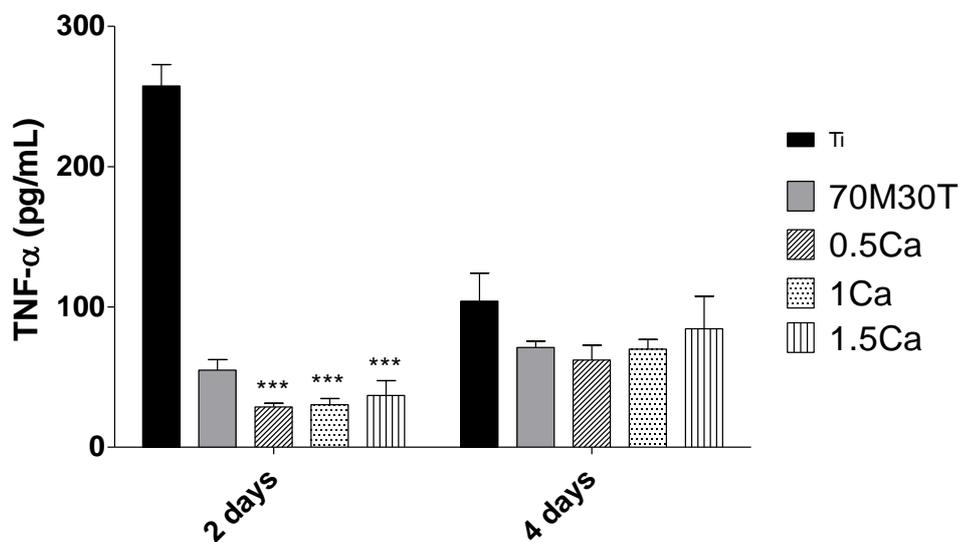


Figura 4.24. Resultados del ensayo ELISA para el sistema 7M:3T + % CaCl_2 (Macrófagos: RAW264.7). (***) $p \leq 0.001$

Este ensayo no hace más que ratificar lo observado en los ensayos PCR, observando que el valor más alto de TNF- α corresponde al Ti, lo que corrobora que los discos recubiertos causan menos inflamación que el Ti control. Además, los recubrimientos dopados con Ca presentan unos valores estadísticamente significativos más bajos que el correspondiente al recubrimiento base, a 2 días de ensayo, aunque los valores se igualan al finalizar la experimentación.

3. Discusión

Las funciones prorregenerativas del Ca han hecho que esté en el punto de mira de muchas investigaciones. Por ello, este elemento se ha utilizado considerablemente en el desarrollo de nuevos biomateriales para la regeneración ósea^{26,27}. Así mismo, la sal utilizada en el dopado se utiliza como coadyuvante en diversos tratamientos médicos^{28,29}.

En este capítulo se han evaluado los recubrimientos dopados con diferentes porcentajes de CaCl₂ frente al sistema base 7M:3T.

Los recubrimientos sintetizados muestran buenas características superficiales, así como una gran adherencia al sustrato metálico. El dopado con la sal de Ca no provoca agrietamientos ni grandes porosidades.

La incorporación de la sal de Ca a la formulación del recubrimiento ha supuesto una modificación de algunas propiedades superficiales, como la rugosidad y la mojabilidad (Figuras 4.3 y 4.11). En este sentido, el ángulo de contacto ha aumentado significativamente, respecto al sistema base, cuando se ha incorporado la sal en la red sol-gel, alcanzando valores en torno a 75°, muy adecuados para la adhesión celular²⁰. En cuanto al parámetro de la rugosidad, se ha detectado un aumento de Ra en el sistema 7M:3T-1Ca, en comparación a todos los demás recubrimientos, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa. Estas diferencias, así como la propia presencia y liberación del ion Ca²⁺ podrán influir en la adsorción superficial de las proteínas, por un lado, y en el comportamiento celular, por otro, condicionando el entorno en el que se desarrolla el proceso de reparación tisular.

La adición de la sal no ha afectado a la correcta formación de la red como demuestran los espectros obtenidos mediante FTIR/ATR (Figura 4.5) y ^{29}Si -RMN (Figuras 4.6-4.10). Las bandas características de los recubrimientos sol-gel³⁰ que aparecen en la Figura 4.5, de los espectros FTIR, confirman que todas las formulaciones se han sintetizado satisfactoriamente. Asimismo, en la Figura 4.10 se puede observar, por ^{29}Si -RMN de sólidos, que la red siloxánica se ha formado tal y como se esperaba, siendo las especies predominantes aquellas que tienen un alto grado de condensación (T_3 y Q_3).

Respecto a la degradación hidrolítica, los recubrimientos híbridos de Si que contienen la sal de Ca, presentan una mayor pérdida de peso, respecto al recubrimiento base, a lo largo de todo el ensayo, hecho que coincide con resultados previos del grupo³¹. Además, a la vista de los perfiles presentados en la Figura 4.12 se puede afirmar que cuanto mayor es la cantidad de agente incorporado mayor es la degradación medida por pérdida de peso, llegando a niveles superiores al 50 % al final del ensayo. Hay que tener en cuenta que la liberación de la sal contribuye a la pérdida de peso, lo que podría explicar, en parte, ese aumento de pérdida de peso con el aumento de la concentración de la sal.

Este comportamiento queda corroborado por los perfiles que presenta el ensayo de la liberación de Si (Figura 4.13), medida por ICP-AES, que es una medida cuantitativamente más precisa. Se observa un considerable aumento de liberación de este ion al incorporar la sal de Ca al recubrimiento, en cualquiera de las proporciones, respecto al recubrimiento base. De la misma manera, la Figura 4.14 muestra que la formulación con mayor concentración de Ca libera una mayor cantidad de ion Ca^{2+} al medio, siendo la formulación 7M:3T-0.5Ca la que menos libera. El perfil es similar para todos los recubrimientos dopados, con una liberación inicial muy rápida de los iones en las primeras horas, para ir estabilizándose a lo largo del resto del ensayo, llegando a liberar más de 0.5 mg en el recubrimiento con mayor porcentaje de Ca. Este perfil es muy interesante ya que así este elemento puede actuar fuertemente durante las primeras horas, en las que se debe producir la coagulación en la herida producida durante la colocación del implante, y posteriormente puede seguir actuando en las siguientes etapas que constituyen la regeneración del tejido.

Estos datos últimos se corresponden con los obtenidos para la degradación hidrolítica por pérdida de peso. Cuanto mayor es esta, mayor es la liberación del agente dopante. Del

mismo modo, cuanta más sal se introduce en el recubrimiento, más Ca se detecta en las liberaciones. Sin embargo, hay una desproporción entre las cantidades liberadas por la formulación menos dopada y las otras dos con mayor contenido en sal. Esto puede ser debido, por una parte, a que el recubrimiento que tiene 0.5 % de Ca es el que menos afecta al grado de entrecruzamiento de la red sol-gel y, por otra, a que el hecho de que haya una menor cantidad de sal en el recubrimiento no promueve la creación de “vías” que faciliten la difusión del ion a través del recubrimiento. Asimismo, en el caso de la liberación del Si, la cinética de la formulación con 1.5 % de sal es algo más lenta que la de la formulación con un 1% de Ca, aunque las diferencias, teniendo en cuenta las barras de error, son pequeñas. Una posible explicación puede ser, también, la facilidad de los iones Ca^{2+} para formar complejos con los grupos Si, que podría distorsionar las medidas³².

Con todo, se confirma la capacidad de estos recubrimientos de liberar tanto Si como Ca hacia el medio circundante, lo que posibilitará el ejercicio de su función coagulante y osteorregeneradora.

En cuanto al efecto de la incorporación de la sal de Ca en el recubrimiento, a nivel celular, se puede decir que ninguno de los materiales sintetizados es citotóxico y que, a tiempos largos de ensayo, se favorece la adhesión y posterior proliferación celular.

El Ca presenta efectos positivos sobre el comportamiento osteoblástico a tiempos largos de ensayo, favoreciendo la proliferación y diferenciación celular. Al analizar mediante los ensayos PCR la expresión génica de los marcadores osteogénicos ALP y TGF- β , se observa que la ALP es mayor para todos los recubrimientos sintetizados respecto al Ti control, destacando la formulación 7M:3T-1.5Ca a 14 días (Figura 4.19), aunque si se compara el efecto respecto al recubrimiento base, se observa que a 2 semanas la ALP disminuye significativamente en los recubrimientos dopados con 0.5 y 1 % de Ca, manteniéndose en valores similares el dopado con un 1.5 % de Ca, respecto al 7M:3T. En cuanto a los valores de TGF- β aumenta para todas las formulaciones dopadas en comparación al sistema base, siendo únicamente este aumento significativo para el recubrimiento dopado con un 1.5 % de Ca y a dos días de experimentación (Figura 4.20). Del mismo modo, en el ensayo ELISA (Figura 4.23) la expresión de ALP detectada aumenta a medida que transcurre el ensayo. Sin embargo, la influencia del Ca en la osteogenia no es clara, ya que la incorporación de 1 y 1.5 % de Ca supone un descenso

estadísticamente significativo de la actividad de este marcador, tanto a 7 como a 14 días de ensayo.

Numerosos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado claramente el papel del Ca en todo el proceso de formación ósea. Koori *et al.* demostraron que el dopado con CaCl_2 puede aumentar la osteogénesis de las células madre³³. Otros estudios han revelado que la presencia de Ca produce una sobreexpresión de marcadores osteogénicos como la ALP³⁴, creando un efecto positivo en la remodelación ósea y en la proliferación osteoblástica³⁵. Le Thi *et al.* concluyeron que sus muestras de Ti con recubrimientos de carbonato cálcico lograban una mayor actividad de la fosfatasa alcalina con osteoblastos en comparación con el Ti control³⁶. En ensayos *in vivo* sobre implantes de Ti modificados con Ca, se vio un aumento de la adsorción y activación de plaquetas en la superficie de los implantes, lo que daba como resultado un mayor volumen de hueso, densidad ósea y contacto hueso/implante que en los materiales control no modificados³⁷. Nguyen *et al.* calcificaron una superficie nanotubular y comprobaron que mejoraba la diferenciación de los osteoblastos estimulando la formación temprana de hueso en comparación con los nanotubos simples³⁸. A su vez, Zhang *et al.* llevaron a cabo experimentos *in vitro* e *in vivo*, que mostraban que la adición de un recubrimiento de fitato de calcio promovía la formación de hueso nuevo y aceleraba la osteointegración³⁹. También, Li *et al.* concluyeron que la biosílice dopada con Ca tiene un papel importante en las funciones hemostáticas que afectan al proceso de regeneración del tejido óseo⁴⁰.

El estudio proteómico realizado ha permitido observar una mayor adsorción de 2 proteínas relacionadas claramente con la regeneración ósea, la PEDF y la TETN, en los recubrimientos dopados con Ca. Los hallazgos de Feng *et al.* demostraron que la PEDF desempeña dos funciones en la osteoblastogénesis: mejora la diferenciación osteoblástica y aumenta la mineralización de la matriz ósea⁴¹. Del mismo modo, algunos estudios como los de Cai *et al.*⁴² y Chung *et al.*⁴³ sugirieron que la PEDF tiene un papel importante en la regulación de la angiogénesis. Además, Quan *et al.* apuntaron que la PEDF puede desempeñar un papel regulador en los procesos de diferenciación osteoblástica, osificación endocondral y remodelación ósea durante el desarrollo de las extremidades posteriores de ratones⁴⁴. Otros estudios, como los de Venturi *et al.*, confirmaron que la falta de PEDF deriva en defectos óseos y fracturas frecuentes⁴⁵. Gattu *et al.*⁴⁶ y Li *et al.*⁴⁷ reportaron que la PEDF mejora la diferenciación osteoblástica de células madre

mesenquimales humanas y de ratón, y aumenta la mineralización osteoblástica *in vitro*. Sin embargo, se desconocen los mecanismos por los cuales esta proteína regula la mineralización. La TETN se ha relacionado con el correcto desarrollo del tejido óseo. En estudios realizados por Ru *et al.* con ratones TETN knock-out se ha visto que padecen cifosis y muestran los síntomas de la osteoporosis⁴⁸. Igualmente, la TETN interviene en la formación de tejido nuevo y remodelación de la matriz de los procesos de cicatrización de heridas cutáneas⁴⁹, que es similar al proceso de cicatrización de fracturas óseas⁵⁰. Además, un estudio *in vitro* de Wewer *et al.* mostró que la TETN se expresa durante la formación ósea⁵¹.

La abundancia normalizada de estas 2 proteínas aumenta respecto a la formulación base y tienen un valor estadísticamente significativo en la formulación con un 0.5 % de Ca, en ambos casos. Estos resultados tienen coherencia con los valores de los ensayos *in vitro*, donde se ve, en PCR, una mejora tanto del marcador ALP, a 7 días, con el contenido en Ca, como del marcador osteogénico TGF- β , con un valor máximo en el recubrimiento con 0.5 % de calcio.

Con respecto al papel de los recubrimientos en la respuesta inflamatoria, el conocimiento de la expresión de los marcadores TNF- α y TGF- β expresados por los macrófagos en los diferentes ensayos *in vitro* y el balance entre ellos es de gran valor. En lo referente a los ensayos PCR, la expresión del gen proinflamatorio TNF- α disminuye en todas las formulaciones respecto al Ti control a 2 y 4 días de ensayo (Figura 4.21). La adición de Ca también produce variaciones en los datos, tanto por el propio hecho del dopado como por la cantidad del mismo. La incorporación de la sal hace que la inflamación sea mayor que la del recubrimiento 7M:3T, en todos los casos, marcando un máximo a 2 días para la formulación con 1 % de Ca (siendo el valor significativo) y para la de 0.5 % a 4 días (no significativo). En el intervalo de 2 a 4 días, la concentración del marcador disminuye para todos los materiales sintetizados, por lo que se puede pensar que la inflamación no se cronifica. Es más, a mayores porcentajes de Ca, menor es la inflamación a 4 días. En lo referente a la expresión de genes de TGF- β , que es un marcador antiinflamatorio, se aprecia una sobreexpresión en todos los recubrimientos dopados respecto al recubrimiento base, siendo esto indicativo de una regulación de la inflamación (Figura 4.22). En el caso del ensayo ELISA con macrófagos, se observa también una disminución importante de los valores de TNF- α de la formulación base y de los materiales con Ca

respecto al Ti (Figura 4.24). Además, a 2 días, la adición de Ca provoca un descenso de la expresión de este gen inflamatorio, dándose el valor mínimo en la formulación 7M:3T-0.5Ca. A 4 días, sin embargo, no hay diferencias estadísticamente significativas en TNF- α entre el recubrimiento base y los dopados con Ca.

La caracterización mediante LC-MS/MS de la capa de proteínas adsorbida sobre los distintos recubrimientos enriquecidos con Ca ha permitido la detección de un buen número de proteínas relacionadas con los procesos asociados a la respuesta inflamatoria. Destacan entre ellas un grupo de proteínas que pertenecen al sistema del complemento⁵². Algunas como C1QC, CO5 o SAMP son conocidas por formar parte de la activación de esta cascada⁵³. La ruta clásica del sistema del complemento se inicia cuando C1QC se une a complejos antígeno-anticuerpo. Diferentes estudios afirman que el aumento del nivel de la C1QC está relacionado con la enfermedad de la tuberculosis humana^{54,55}. El CO5, además, también podría tener otras funciones relacionadas con la regeneración ósea. Los osteoclastos, necesarios para la resorción ósea, necesitan el complemento CO5 para que su diferenciación sea favorable⁵⁶. Por último, la pentraxina SAMP, se encuentra en mayor proporción en el recubrimiento más dopado. Esto es coherente ya que se trata de una glicoproteína pentamérica con cinco subunidades⁵⁷, donde cada una de ellas contiene dos sitios de unión a Ca²⁺. Además, Poulsen *et al.* afirman que la interacción entre SAMP y otras proteínas o moléculas depende de la concentración de este ion⁵⁸. El papel de esta pentraxina en el proceso de regeneración aún no está claro, pero como indican Bottazzi *et al.* se ha asociado con la inflamación, la remodelación tisular y la coagulación⁵⁹. Esta proteína, además de su función en el sistema inmunitario innato, podría tener otras diferentes⁵⁸. En este sentido, SAMP está implicada en la cicatrización de heridas y en la remodelación tisular, pudiendo prevenir la diferenciación de monocitos en fibrocitos⁵⁹.

Estas proteínas que inician la cascada del sistema del complemento experimentan un crecimiento con la presencia del Ca. Teniendo en cuenta que la vía clásica de la activación del complemento es dependiente del Ca en sus primeras etapas, es de esperar que la presencia de este ion en las formulaciones, active de alguna manera esta cascada⁶⁰. Dichas proteínas están presentes desde el principio, en el recubrimiento base, dándose un aumento de la abundancia con la incorporación del Ca, con los puntos máximos en diferentes concentraciones (0.5 % de Ca para CO5 y 1.5 % de Ca para SAMP).

En contraposición, las proteínas CLUS, C4BPA, VTNC, CFAH e IC1, que en su mayoría tienen un máximo en la formulación con 0.5 % de Ca, inhiben y regulan esta cascada en sus diferentes fases⁶¹. La proteína CFAH es reguladora de la vía alternativa del complemento y se relaciona con el mantenimiento de la arquitectura del hueso, teniendo en cuenta que la dinámica entre osteoblastos y osteoclastos puede resultar alterada en ausencia de CFAH y, por lo tanto, reducir la calidad de este tejido⁶². La CLUS previene una excesiva inflamación, mediante la regulación del complemento y la vía NF- κ B, y la reducción de la apoptosis y el estrés oxidativo^{63,64}. La IC1 tiene efectos antiinflamatorios resultantes de la regulación del sistema del complemento y la interacción con células y matrices extracelulares⁶⁵. La VTNC puede moderar la intensidad y duración de la respuesta inflamatoria⁶⁶. Esta última, según los estudios de Chen *et al.*, tiene un papel importante en la adhesión de la interleucina-4 en los biomateriales, lo que lleva a la polarización de los macrófagos a su fenotipo reparador M2⁶⁷.

Igualmente, se ha detectado un grupo de apolipoproteínas, que muestran una mayor afinidad por el biomaterial cuando se agrega CaCl₂, pudiendo prevenir la activación de la respuesta inmune innata y jugar un papel antiinflamatorio⁶⁸. Se trata de las proteínas APOC4, APOA y SAA4, siendo las dos primeras muy abundantes y destacando la APOC4 como una de las proteínas más adsorbidas a todas las concentraciones. Esto es muy destacable ya que el papel inmunomodulador de las apolipoproteínas podría estar asociado con la polarización de los macrófagos en su fenotipo antiinflamatorio^{69,70}. Así mismo, la adición de Ca ha aumentado la afinidad, aunque no tan marcada, por la adsorción de inmunoglobulinas como IGHG3, IGHM, KV302, KV308, KV310 y KV113, relacionadas con los procesos de respuesta inflamatoria aguda del sistema inmune⁷¹.

Así, en las gráficas de la abundancia normalizada de las proteínas adsorbidas relacionadas con la inflamación, los valores, tanto de las activadoras como de las reguladoras, son mayores al introducir la sal de Ca, esto es, los valores se incrementan respecto del sistema base. Analizando estos datos junto con los de los ensayos PCR, se podría decir que la presencia de Ca aumenta la inflamación al comienzo, pero después desciende por lo que esta no es crónica, por lo que el papel que juegan las proteínas reguladoras tendría más importancia que el de las activadoras. En cuanto al ensayo ELISA, a 2 días, la inflamación es significativamente menor que la del recubrimiento base, igualándose a 4 días.

Se han encontrado también proteínas pertenecientes a la coagulación, clave para la regeneración ósea⁷². PF4 (expresado como PLF4 o PF4V) PLMN y PROS pertenecen a este grupo de proteínas. La PF4 es una quimiocina plaquetaria que inhibe la angiogénesis y el crecimiento tumoral⁷³. Este factor plaquetario neutraliza el efecto anticoagulante de la heparina e inhibe la proliferación de células endoteliales⁷⁴. Struyf *et al.* confirmaron con estudios *in vitro* que la PF4 es un inhibidor de la angiogénesis⁷⁵. De todas maneras, comparando la abundancia normalizada de esta proteína con todas las demás, está claro que se adsorbe en cantidades mínimas en todos los recubrimientos, partiendo de un valor cercano a 0 en el recubrimiento base, y siendo su abundancia claramente dependiente de la concentración de Ca en el recubrimiento. Como es conocido, el Ca participa activamente en la formación del tapón plaquetario, es decir, en la agregación plaquetaria y en la polimerización de la fibrina que dan lugar a la coagulación⁷⁶. La presencia de este factor indica claramente una activación de las plaquetas y por tanto de la coagulación. El PLMN tiene un papel importante en la activación del sistema plasminógeno, el paso clave en el proceso de la fibrinólisis. Tras un trauma, el sistema de coagulación es uno de los principales iniciadores del desarrollo de coágulos sanguíneos. Después de esto, el sistema plasminógeno actúa durante la degradación de la matriz extracelular y la consecuente remodelación tisular y angiogénesis, lo que lleva a una correcta cicatrización del tejido⁷⁷. La proteína PROS participa en la regulación de la vía de coagulación sanguínea⁷⁸. Esta proteína plasmática ayuda a prevenir la coagulación y estimula la fibrinólisis. Por otro lado, la VTNC, además de su papel como inhibidora de la activación de la cascada del complemento, podría interactuar con la cascada de la coagulación, contribuyendo a la formación de trombos, la reparación de heridas, la homeostasis vascular y la regeneración de tejidos⁷⁹. Esta proteína también podría favorecer la diferenciación osteoblástica⁶⁶. Igualmente, las superficies que adsorben más VTNC aumentan la adhesión y proliferación de osteoblastos y, por lo tanto, mejoran la osteoconducción⁸⁰. Respecto a las funciones en vías de señalización mediante PANTHER, hay que destacar que la única función común a todos los recubrimientos suplementados con Ca es la coagulación (Figura 4.16).

Del mismo modo, la proteína HRG está involucrada en estas etapas de la regeneración⁸¹. Esta podría funcionar como modulador antifibrinolítico y anticoagulante, y también podría regular la función plaquetaria *in vivo*⁸².

4. Resumen

Los resultados muestran que el material se ha obtenido exitosamente, con el CaCl_2 bien incorporado en la red sol-gel, y con buenas propiedades superficiales y buena adhesión a sustratos metálicos.

Como era de esperar, a medida que se ha introducido mayor cantidad de agente dopante a la red polisiloxánica, la degradación ha sido mayor, permitiendo obtener una liberación adecuada de Ca hasta el final del ensayo. El perfil de liberación se corresponde al de la degradación hidrolítica, donde todos los materiales presentan una rápida degradación inicial, dándose después una degradación más progresiva hasta el final.

La suplementación del sistema base ha derivado en una variación significativa de la humectabilidad, aumentando significativamente la hidrofobia respecto al material base, y la rugosidad, dándose un valor mayor de Ra en el sistema 7M:3T-1Ca, en comparación a todos los demás recubrimientos, no siendo estadísticamente diferente.

Los recubrimientos modificados con Ca han adsorbido más proteínas relacionadas con la respuesta inflamatoria, la regeneración tisular, la fibrinólisis y la coagulación sanguínea.

Las dos líneas celulares estudiadas en los ensayos *in vitro*, la de osteoblastos y la de macrófagos, manifiestan un comportamiento que depende de la concentración de Ca añadida.

Respecto a la inflamación, esta es menor a la del Ti en todos los recubrimientos sintetizados. En las PCR se observa mayor inflamación que el recubrimiento base, en todos los casos, a todos los tiempos. No obstante, el aumento de la expresión génica TGF- β en los macrófagos indica que los materiales indujeron un fenotipo antiinflamatorio en los mismos. El dopado con esta sal hace que aumente la abundancia de las proteínas C1QC, CO5 y SAMP, activadoras de la cascada del complemento. A su vez, las proteínas reguladoras de la inflamación, a saber, C4BPA, CFAH, CLUS, IC1, VTNC y las apolipoproteínas, también aparecen más adsorbidas en los materiales con Ca. La presencia de estas últimas parece tener más importancia ya que la inflamación que aparece al principio no se cronifica.

En relación a la regeneración ósea, en las PCR con osteoblastos, existe un aumento en la expresión de los genes del marcador osteogénico ALP a 7 días, y del marcador TGF- β , respecto al recubrimiento base, a lo largo de todo el experimento, con un valor máximo a 14 días para el recubrimiento dopado con 0.5 % de calcio. En el ensayo ELISA, la adición de 1 y 1.5 % de Ca supone una disminución de la expresión de ALP. No así la adición de un 0.5 % de calcio. Las tendencias al alza de las gráficas de abundancia normalizada de TETN y PEDF, proteínas concernientes a la regeneración ósea, y el máximo en la formulación con un 0.5 % de Ca, pueden correlacionarse con los valores de los ensayos PCR.

Por otro lado, en lo referente a la coagulación, las proteínas PL4, PLMN y PROS aumentan su presencia en los recubrimientos suplementados. Esta función es la más destacada en todos los recubrimientos con Ca. Por último, la abundancia de la HRG, relacionada con la fibrinólisis, aumenta cuanto mayor es el porcentaje de CaCl₂ introducido.

Por lo tanto, los estudios proteómicos y de expresión génica muestran que la incorporación de Ca al recubrimiento no provoca inflamación cronicada, aumenta claramente la función de la coagulación y fibrinólisis, y mejora la capacidad osteogénica del recubrimiento base.

Referencias

1. Romero-Gavilán, F. *et al.* Proteomic analysis of calcium-enriched sol-gel biomaterials. *J. Biol. Inorg. Chem.* **24**, 563–574 (2019).
2. Pravina, P., Sayaji, D. & Avinash, M. Calcium and its role in human body. *Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci* **4**, 659–668 (2013).
3. Habibovic, P. & Barralet, J. E. Bioinorganics and biomaterials: bone repair. *Acta Biomater.* **7**, 3013–3026 (2011).
4. Dvorak, M. M. *et al.* Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 5140–5145 (2004).
5. Adams, C. S., Mansfield, K., Perlot, R. L. & Shapiro, I. M. Matrix regulation of skeletal cell apoptosis: role of calcium and phosphate ions. *J. Biol. Chem.* **276**, 20316–20322 (2001).
6. Marie, P. J. The calcium-sensing receptor in bone cells: A potential therapeutic target in osteoporosis. *Bone* **46**, 571–576 (2010).
7. Yamaguchi, T. *et al.* Mouse Osteoblastic Cell Line (MC3T3-E1) Expresses Extracellular Calcium (Ca²⁺)-Sensing Receptor and Its Agonists Stimulate Chemotaxis and Proliferation of MC3T3-E1 Cells. *J. Bone Miner. Res.* **13**, 1530–1538 (1998).
8. Dvorak, M. M. & Riccardi, D. Ca²⁺ as an extracellular signal in bone. *Cell Calcium* **35**, 249–255 (2004).
9. Qi, C., Lin, J., Fu, L.-H. & Huang, P. Calcium-based biomaterials for diagnosis, treatment, and theranostics. *Chem. Soc. Rev.* **47**, 357–403 (2018).
10. LeGeros, R. Z. Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphates. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **395**, 81–98 (2002).
11. Subirà-Pifarré, C., Masuet-Aumatell, C., Rodado Alonso, C., Medina Madrid, R. & Galletti, C. Assessment of Dental Implants with Modified Calcium-Phosphate Surface in a Multicenter, Prospective, Non-Interventional Study: Results up to 50 Months of Follow-Up. *J. Funct. Biomater.* **10**, 5 (2019).
12. de Lacerda Schickert, S., Jansen, J. A., Bronkhorst, E. M., van den Beucken, J. J. P. & Leeuwenburgh, S. C. G. Stabilizing dental implants with a fiber-reinforced calcium phosphate cement: an in vitro and in vivo study. *Acta Biomater.* (2020).
13. Anitua, E., Prado, R., Orive, G. & Tejero, R. Effects of calcium-modified titanium implant surfaces on platelet activation, clot formation, and osseointegration. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **103**, 969–980 (2015).
14. Hoppe, A., Güldal, N. S. & Boccaccini, A. R. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* **32**, 2757–2774 (2011).
15. Anitua, E., Piñas, L., Murias, A., Prado, R. & Tejero, R. Effects of calcium ions on titanium surfaces for bone regeneration. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **130**, 173–181 (2015).

16. Lorenzo, J., Horowitz, M. & Choi, Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr. Rev.* **29**, 403–440 (2008).
17. Anitua, E. *et al.* Proteomics and in vivo analysis of UnicCa® implant surfaces. *J. Dent. Res.* in press (2021).
18. Yang, Y. Q., Liu, L., Hu, J. M., Zhang, J. Q. & Cao, C. N. Improved barrier performance of metal alkoxide-modified methyltrimethoxysilane films. *Thin Solid Films* **520**, 2052–2059 (2012).
19. Gittens, R. A. *et al.* A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects. *Acta Biomater.* **10**, 2907–2918 (2014).
20. Zolkov, C., Avnir, D. & Armon, R. Tissue-derived cell growth on hybrid sol-gel films. *J. Mater. Chem.* **14**, 2200–2205 (2004).
21. Gupta, R. & Kumar, A. Bioactive materials for biomedical applications using sol-gel technology. *Biomed. Mater.* **3**, 034005 (2008).
22. Shirosaki, Y. *et al.* Effects of Si (IV) released from chitosan-silicate hybrids on proliferation and differentiation of MG63 osteoblast cells. *Bioceram. Dev. Appl.* **1**, (2011).
23. Carroll, M. C. The complement system in B cell regulation. *Mol. Immunol.* **41**, 141–146 (2004).
24. Tripathi, S. *et al.* The gastrin and cholecystokinin receptors mediated signaling network: a scaffold for data analysis and new hypotheses on regulatory mechanisms. *BMC Syst. Biol.* **9**, 40 (2015).
25. Medcalf, R. L. Fibrinolysis, inflammation, and regulation of the plasminogen activating system. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 132–142 (2007).
26. Diez-Escudero, A., Espanol, M. & Ginebra, M.-P. Synthetic bone graft substitutes: Calcium-based biomaterials. in *Dental Implants and Bone Grafts* 125–157 (Elsevier, 2020).
27. Yi, L.-J., Li, J.-F., Ma, M.-G. & Zhu, Y.-J. Nanostructured Calcium-based Biomaterials and their Application in Drug Delivery. *Curr. Med. Chem.* **27**, 5189–5212 (2020).
28. Patel, G. B., Zhou, H., Ponce, A. & Chen, W. Mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using archaeal lipid-adjuvanted vaccines. *Vaccine* **25**, 8622–8636 (2007).
29. Gould-Fogerite, S. *et al.* Targeting immune response induction with cochleate and liposome-based vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **32**, 273–287 (1998).
30. Juan-Díaz, M. J. *et al.* Development of hybrid sol-gel coatings for the improvement of metallic biomaterials performance. *Prog. Org. Coatings* **96**, 42–51 (2016).
31. García-Arnáez, I. *et al.* A single coating with antibacterial properties for prevention of medical device-associated infections. *Eur. Polym. J.* **113**, (2019).
32. Gauvin, R. M., Buch, F., Delevoye, L. & Harder, S. Well-Defined Silica-Supported Calcium Reagents: Control of Schlenk Equilibrium by Grafting. *Chem. Eur. J.* **15**, 4382–4393 (2009).
33. Koori, K. *et al.* The roles of calcium-sensing receptor and calcium channel in osteogenic differentiation of undifferentiated periodontal ligament cells. *Cell Tissue Res.* **357**, 707–718 (2014).
34. Dvorak, M. M. & Riccardi, D. Ca²⁺ as an extracellular signal in bone. *Cell Calcium* **35**, 249–255 (2004).

35. Habibovic, P. & Barralet, J. E. Bioinorganics and biomaterials: Bone repair. *Acta Biomater.* **7**, 3013–3026 (2011).
36. Le Thi, B. *et al.* Biological responses of MC3T3-E1 on calcium carbonate coatings fabricated by hydrothermal reaction on titanium. *Biomed. Mater.* **15**, 35004 (2020).
37. Pellegrini, G., Francetti, L., Barbaro, B. & Del Fabbro, M. Novel surfaces and osseointegration in implant dentistry. *J. Investig. Clin. Dent.* **9**, e12349 (2018).
38. Nguyen, T. T. *et al.* The effect of APH treatment on surface bonding and osseointegration of Ti-6Al-7Nb implants: An in vitro and in vivo study. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **103**, 641–648 (2015).
39. Zhang, H. *et al.* Micro/nanostructured calcium phytate coating on titanium fabricated by chemical conversion deposition for biomedical application. *Mater. Sci. Eng. C* **118**, 111402 (2021).
40. Li, J. *et al.* Biosynthetic calcium-doped biosilica with multiple hemostatic properties for hemorrhage control. *J. Mater. Chem. B* **6**, 7834–7841 (2018).
41. Li, F., Song, N., Tombran-Tink, J. & Niyibizi, C. Pigment epithelium derived factor suppresses expression of Sost/Sclerostin by osteocytes: implication for its role in bone matrix mineralization. *J. Cell. Physiol.* **230**, 1243 (2015).
42. Cai, J., Jiang, W. G., Grant, M. B. & Boulton, M. Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of vascular endothelial growth factor receptor 1. *J. Biol. Chem.* **281**, 3604–3613 (2006).
43. Chung, C. *et al.* Pigment epithelium-derived factor is an angiogenesis and lipid regulator that activates peroxisome proliferator-activated receptor α . in *Hormonal Carcinogenesis V* 591–597 (Springer, 2008).
44. Quan, G. M. Y. *et al.* Localization of pigment epithelium-derived factor in growing mouse bone. *Calcif. Tissue Int.* **76**, 146–153 (2005).
45. Venturi, G. *et al.* Lack of expression of SERPINF1, the gene coding for pigment epithelium-derived factor, causes progressively deforming osteogenesis imperfecta with normal type I collagen. *J. Bone Miner. Res.* **27**, 723–728 (2012).
46. Gattu, A. K. *et al.* Determination of mesenchymal stem cell fate by pigment epithelium-derived factor (PEDF) results in increased adiposity and reduced bone mineral content. *FASEB J.* **27**, 4384–4394 (2013).
47. Li, F., Song, N., Tombran-Tink, J. & Niyibizi, C. Pigment epithelium-derived factor enhances differentiation and mineral deposition of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **31**, 2714–2723 (2013).
48. Ru, D. W., Yan, Y. F. & Li, B. Tetranectin knock-out mice exhibit features of kyphosis and osteoporosis. *Fudan Univ J Med Sci* **43**, 159 (2016).
49. Martin, P., Hopkinson-Woolley, J. & McCluskey, J. Growth factors and cutaneous wound repair. *Prog. Growth Factor Res.* **4**, 25–44 (1992).
50. Einhorn, T. A. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **355**, S7–S21 (1998).
51. Wewer, U. M. *et al.* A potential role for tetranectin in mineralization during osteogenesis. *J. Cell Biol.* **127**, 1767–1775 (1994).

52. Janeway, C. J., Travers, P. & Walport, M. The complement system and innate immunity. in *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* 61–81 (Garland Science, 2001).
53. Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K. & Lambris, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* **11**, 785–797 (2010).
54. Cai, Y. *et al.* Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis. *PLoS One* **9**, e92340 (2014).
55. Kumar, A., Chawla, K., Madigubba, H., Thakur, R. & Bisht, D. Evaluation of Serum Complement Component 1Q Subcomponent C (C1qC) as a Marker for Tuberculosis. *J. Evol. Med. Dent. Sci.* **8**, 2624–2629 (2019).
56. Tu, Z., Bu, H., Dennis, J. E. & Lin, F. Efficient osteoclast differentiation requires local complement activation. *Blood, J. Am. Soc. Hematol.* **116**, 4456–4463 (2010).
57. Emsley, J. *et al.* Structure of pentameric human serum amyloid P component. *Nature* **367**, 338–345 (1994).
58. Poulsen, E. T., Pedersen, K. W., Marzeda, A. M. & Enghild, J. J. Serum amyloid P component (SAP) interactome in human plasma containing physiological calcium levels. *Biochemistry* **56**, 896–902 (2017).
59. Bottazzi, B. *et al.* The pentraxins PTX3 and SAP in innate immunity, regulation of inflammation and tissue remodelling. *J. Hepatol.* **64**, 1416–1427 (2016).
60. Carroll, M. V & Sim, R. B. Complement in health and disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 965–975 (2011).
61. Merle, N. S., Church, S. E., Fremeaux-Bacchi, V. & Roumenina, L. T. Complement system part I—molecular mechanisms of activation and regulation. *Front. Immunol.* **6**, 262 (2015).
62. Alexander, J. J. *et al.* Absence of complement factor H alters bone architecture and dynamics. *Immunobiology* **223**, 761–771 (2018).
63. Wu, Z.-C., Yu, J.-T., Li, Y. & Tan, L. Clusterin in Alzheimer’s disease. *Adv. Clin. Chem.* **56**, 155 (2012).
64. Falgarone, G. & Chiochia, G. Clusterin: A multifacet protein at the crossroad of inflammation and autoimmunity. *Adv. Cancer Res.* **104**, 139–170 (2009).
65. Davis III, A. E., Mejia, P. & Lu, F. Biological activities of C1 inhibitor. *Mol. Immunol.* **45**, 4057–4063 (2008).
66. Leavesley, D. I. *et al.* Vitronectin—Master controller or micromanager? *IUBMB Life* **65**, 807–818 (2013).
67. Chen, Z. *et al.* Osteoimmunomodulation for the development of advanced bone biomaterials. *Mater. today* **19**, 304–321 (2016).
68. Cho, N. & Seong, S. Apolipoproteins inhibit the innate immunity activated by necrotic cells or bacterial endotoxin. *Immunology* **128**, e479–e486 (2009).
69. Li, Q., Zhai, Z., Ma, W. & Qian, Z. Anti-inflammatory effects of apoprotein AI are mediated via modulating macrophage polarity. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* **42**, 132–135 (2014).
70. Baitsch, D. *et al.* Apolipoprotein E induces antiinflammatory phenotype in macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1160–1168 (2011).

71. Romero-Gavilan, F. *et al.* Proteomic analysis of silica hybrid sol-gel coatings: a potential tool for predicting the biocompatibility of implants in vivo. *Biofouling* **33**, 676–689 (2017).
72. Loi, F. *et al.* Inflammation, fracture and bone repair. *Bone* **86**, 119–130 (2016).
73. Vandercappellen, J., Van Damme, J. & Struyf, S. The role of the CXC chemokines platelet factor-4 (CXCL4/PF-4) and its variant (CXCL4L1/PF-4var) in inflammation, angiogenesis and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **22**, 1–18 (2011).
74. Gupta, S. K., Hassel, T. & Singh, J. P. A potent inhibitor of endothelial cell proliferation is generated by proteolytic cleavage of the chemokine platelet factor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 7799–7803 (1995).
75. Struyf, S., Burdick, M. D., Proost, P., Van Damme, J. & Strieter, R. M. Platelets release CXCL4L1, a nonallelic variant of the chemokine platelet factor-4/CXCL4 and potent inhibitor of angiogenesis. *Circ. Res.* **95**, 855–857 (2004).
76. Leavitt, A. D. What for platelet factor 4? *Blood* **110**, 1090 (2007).
77. Wehner, C., Janjić, K. & Agis, H. Relevance of the plasminogen system in physiology, pathology, and regeneration of oral tissues—From the perspective of dental specialties. *Arch. Oral Biol.* **74**, 136–145 (2017).
78. Chu, A. J. Blood coagulation as an intrinsic pathway for proinflammation: A mini review. *Inflamm. Allergy - Drug Targets* **9**, 32–44 (2010).
79. Salaszyk, R. M., Williams, W. A., Boskey, A., Batorsky, A. & Plopper, G. E. Adhesion to vitronectin and collagen I promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Biotechnol.* **2004**, (2004).
80. Rivera-Chacon, D. M. *et al.* Fibronectin and vitronectin promote human fetal osteoblast cell attachment and proliferation on nanoporous titanium surfaces. *J. Biomed. Nanotechnol.* **9**, 1092–1097 (2013).
81. Long, A. T., Kenne, E., Jung, R., Fuchs, T. A. & Renné, T. Contact system revisited: an interface between inflammation, coagulation, and innate immunity. *J. Thromb. Haemost.* **14**, 427–437 (2016).
82. Wakabayashi, S. & Koide, T. Histidine-rich glycoprotein: a possible modulator of coagulation and fibrinolysis. in *Seminars in thrombosis and hemostasis* vol. 37 389–394 (© Thieme Medical Publishers, 2011).

Capítulo 5.

Recubrimientos
dopados con Sr y Ca

1. Introducción

Como se ha visto en los capítulos anteriores, la adición de diferentes componentes bioactivos al recubrimiento base sol-gel puede ser una forma prometedora de mejorar la función del propio recubrimiento por sí solo.

En los últimos años, las modificaciones superficiales de los implantes de titanio que utilizan una combinación de iones incorporados simultáneamente, han tenido objetivos tales como mejorar la cicatrización inicial¹ o provocar efectos positivos en la osteointegración de dichos implantes^{2,3}. La forma más habitual para realizarlo ha sido utilizar recubrimientos de hidroxiapatita o de fosfato cálcico modificados con iones como Sr, Zn o Mg. Sin embargo, también hay que reseñar que las diferentes propuestas investigadas han tenido algunas limitaciones, por ejemplo, en términos de biocompatibilidad o potencial de osteointegración. Así, según una revisión realizada por López-Valverde *et al.* en base, principalmente, a estudios *in vivo* en modelo animal y algún ensayo clínico en humanos, concluyen que el efecto de las modificaciones bioactivas de las superficies de los implantes dentales no siempre es beneficioso para la osteointegración⁴; o bien, tal y como comenta Wheeler, los recubrimientos no llegan a tener las propiedades adecuadas para realizar su función, achacándolo principalmente a que se producen cristalizaciones⁵; o incluso pueden tener efectos citotóxicos, tal y como observan Qadir *et al.* para elementos como Sr, Ca, C o Ag, en una revisión realizada en base a recubrimientos de hidroxiapatita sustituida con diferentes iones⁶.

De cualquier forma, el codopado con iones metálicos proporciona una solución económica y factible para incorporar agentes bioactivos que mejoren la regeneración ósea⁷. Esto se debe a su capacidad para desempeñar un papel importante en diferentes sistemas, como puede ser el tejido óseo, y a la posibilidad de activar canales iónicos o señales secundarias, como es el caso del estroncio con el calcio⁸. Así, en la revisión bibliográfica realizada por Jiménez *et al.*⁹ se muestran diferentes materiales codopados para terapias regenerativas, tales como andamios de vidrio bioactivo con Sr y Li que aceleran la formación temprana de hueso; óxidos de titanio con Sr y Ca que mejoran la formación ósea *in vivo*; o andamios con Sr y Zn que modulan el comportamiento de los

macrófagos. Igualmente, en la revisión realizada por O'Neill *et al.*¹⁰, sobre el rol de los iones en la regeneración ósea, se exponen los efectos osteogénicos de andamios de vidrio bioactivo con Ca y B, y los efectos angiogénicos de biomateriales con Co y Mg, entre otros.

Igualmente, se ha demostrado que diferentes iones metálicos coimplantados tienen efectos sinérgicos en la mejora de la osteogénesis, la angiogénesis y la osteointegración¹¹. Mao *et al.* determinaron que el Si y el Sr liberados de ciertas biocerámicas tenían un efecto sinérgico, mejorando la osteogénesis y suprimiendo la osteoclastogénesis¹². Por otro lado, Chattopadhyay *et al.* confirmaron que el Sr y el Ca combinados tienen un efecto mayor sobre la producción de fosfato de inositol, relacionado con la diferenciación de osteoblastos, que la acción individual de cualquiera de los iones¹³. Del mismo modo, en la revisión realizada por Marx *et al.* sugieren que la acción dual de los iones Ca y Sr puede mejorar la regeneración ósea en la intercara implante/hueso¹⁴. Análogamente, Almeida *et al.* demostraron el efecto sinérgico producido por la liberación de Ca y Sr desde un compuesto híbrido sol-gel, que presentaba una respuesta celular osteoblástica mejorada¹⁵. Esta interesante idea tiene el potencial de convertirse en una gran estrategia para mejorar la tasa de supervivencia de los implantes dentales.

Tanto el Sr como el Ca forman cationes divalentes con similar radio iónico (1.13 Å para el Sr y 0.99 Å para el Ca) y, a menudo, actúan de manera análoga en el cuerpo humano, con propiedades beneficiosas para los huesos¹⁶⁻¹⁸. Como se ha explicado en el capítulo 3, el Sr estimula la función de los osteoblastos e inhibe la función de los osteoclastos *in vitro*. El mecanismo celular que dirige esta respuesta parece ser que incluye el receptor sensor de Ca, lo que liga a ambos iones en las funciones celulares de las células óseas¹⁴. Además, los resultados obtenidos hasta ahora permiten afirmar que, por una parte, la adición del Sr al recubrimiento base podría mejorar el potencial osteogénico y antiinflamatorio, así como el sistema de coagulación, y por otra, la adición del Ca aumenta claramente las funciones de coagulación y fibrinólisis, mejorando la capacidad osteogénica y sin que provoque la cronificación de la inflamación. Por todo ello, y con el objetivo de estudiar el efecto producido por la incorporación simultánea de ambos iones y comprobar si provoca, o no, un efecto sinérgico en el proceso de remodelación ósea alrededor del implante, en este capítulo se propone introducir diferentes mezclas de ambas sales.

Por lo tanto, teniendo en cuenta la importancia de la dosificación¹⁹ y la concentración²⁰ en el papel de estos iones metálicos, y viendo los resultados de los capítulos anteriores, donde la adición de un 0.5 % de Ca arroja buenos resultados relacionados con los marcadores osteogénicos y de coagulación, e intentando no contribuir demasiado al aumento inicial de la inflamación que puede provocar este ion, se decide dopar los recubrimientos con un porcentaje fijo de CaCl_2 del 0.5 % en peso, e ir variando la cantidad de SrCl_2 introducida, a saber, de 0.5, 1 y 1.5 % en peso. Por lo tanto, serán 3 nuevas formulaciones las que se sintetizen para realizar este estudio (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Formulaciones utilizadas y nomenclatura de las mismas.

Nomenclatura	% SrCl_2	% CaCl_2
7M:3T-0.5Sr-0.5Ca	0.5	0.5
7M:3T-1Sr-0.5Ca	1	0.5
7M:3T-1.5Sr-0.5Ca	1.5	0.5

2. Resultados

2.1. Caracterización morfológica

2.1.1. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Al observar los recubrimientos obtenidos a pocos aumentos, x300, todas las formulaciones tienen una apariencia homogénea (Figura 5.1). Sin embargo, estudiando las superficies a mayores aumentos se observa que cada uno de los recubrimientos presenta características diferentes, que se analizarán individualmente a continuación.

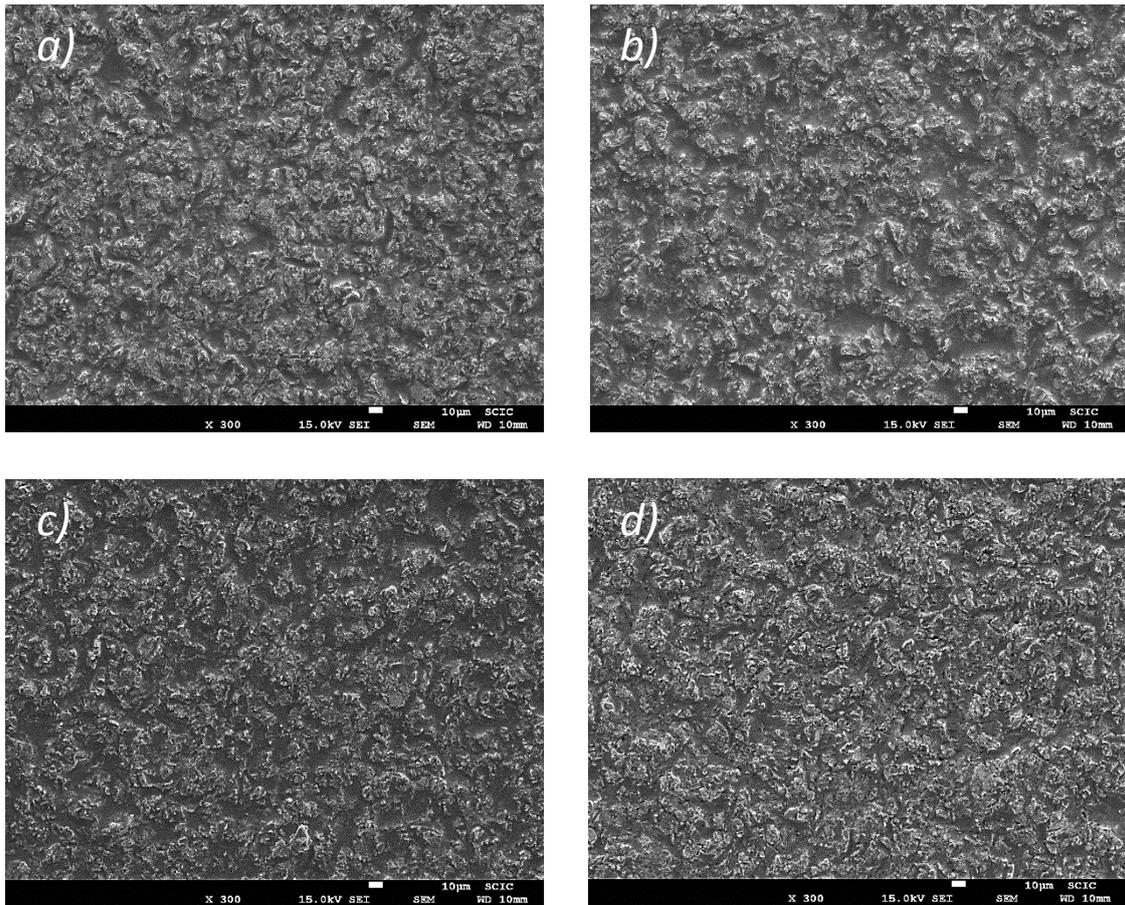


Figura 5.1. Micrografías por SEM de los recubrimientos (a) 7M:3T, (b) 7M:3T-0.5Sr-0.5Ca, (c) 7M:3T-1Sr-0.5Ca y (d) 7M:3T-1.5Sr-0.5Ca.

La composición que contiene un 0.5 % de CaCl_2 y un 0.5 % de SrCl_2 presenta precipitados distribuidos por toda la superficie del recubrimiento (Figura 5.2). Estas nanopartículas podrían ser núcleos de cristalización. Al realizar el análisis elemental de la superficie con espectroscopia por energía dispersiva de Rayos X (EDX) no se ha detectado ni Cl, ni Sr, ni Ca, debido, probablemente, a un problema de sensibilidad del equipo. El diminuto tamaño de las partículas, hace que la señal de estos elementos sea inapreciable. Sin embargo, el diferente brillo mostrado por estos precipitados indica que se trata de una fase distinta al sol-gel.

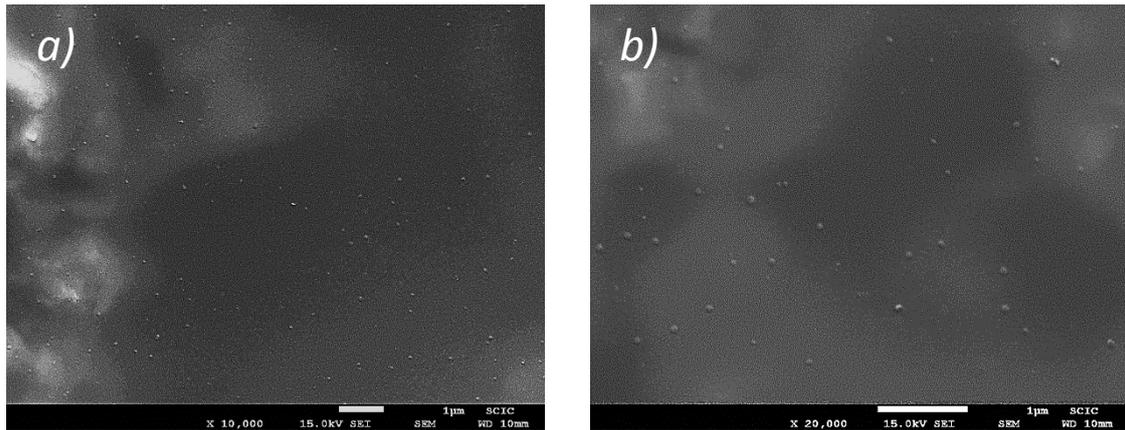


Figura 5.2. Detalle de las micrografías por SEM del recubrimiento 7M:3T-0.5Sr-0.5Ca a 10000x (a) y 20000x (b).

De modo similar a la composición anterior, en el recubrimiento que contiene un 1 % de SrCl_2 se observan precipitados distribuidos por toda la superficie del disco (Figura 5.3). En este caso, parece haber una mayor cantidad y los cristales parecen tener un mayor tamaño, observándose también alguna porosidad. Estos poros presentes pueden atribuirse a espacios vacíos que derivan de la evaporación de los compuestos volátiles que quedan atrapados dentro del recubrimiento²¹.

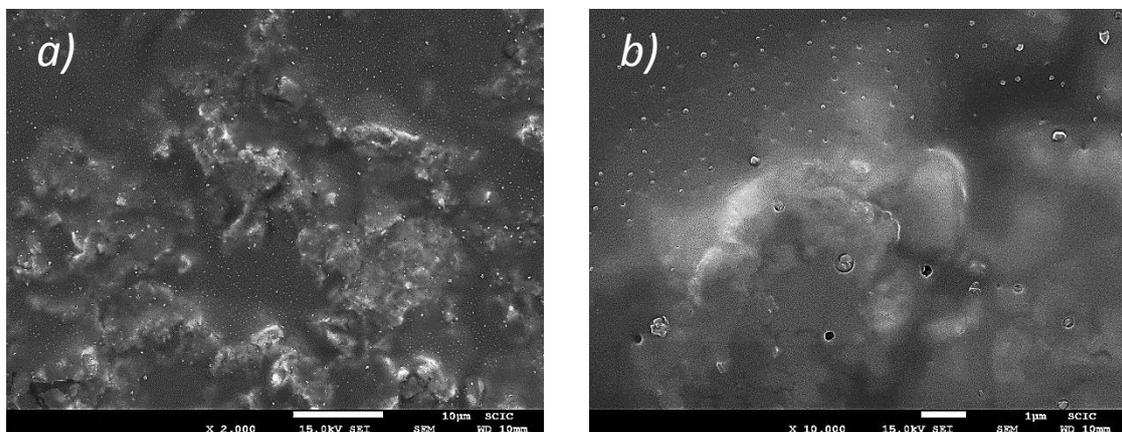


Figura 5.3. Detalle de las micrografías por SEM del recubrimiento 7M:3T-1Sr-0.5Ca a 2000x (a) y 10000x (b).

Al añadir un 1.5 % de SrCl_2 se pueden observar diferentes heterogeneidades asociadas al recubrimiento sol-gel (Figura 5.4). Por una parte, se distinguen precipitados similares a los de las composiciones anteriores, aunque de mayor tamaño, así como la aparición de más porosidad, y por otra, se observa la formación de una tercera fase donde el recubrimiento muestra unos cristales rectangulares de color oscuro distribuidos por la

superficie. Esta tercera fase parece estar totalmente integrada en la red sol-gel, pero su composición es diferente, mostrando una distinta intensidad.

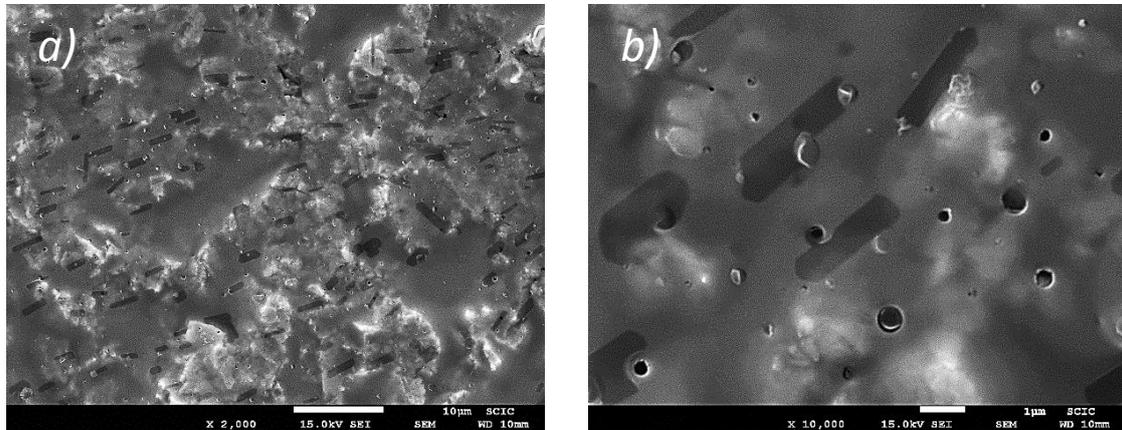


Figura 5.4. Detalle de las micrografías por SEM del recubrimiento 7M:3T-1.5Sr-0.5Ca a 2000x (a) y 10000x (b).

En este caso, al analizar el recubrimiento mediante EDX, tanto los precipitados como esta tercera fase detectada, dan lugar a un pico de Cl en el análisis de su composición (Figura 5.5). Este hecho indica que durante el proceso de obtención del recubrimiento sol-gel, se produce una cristalización de las sales de Ca y/o Sr.

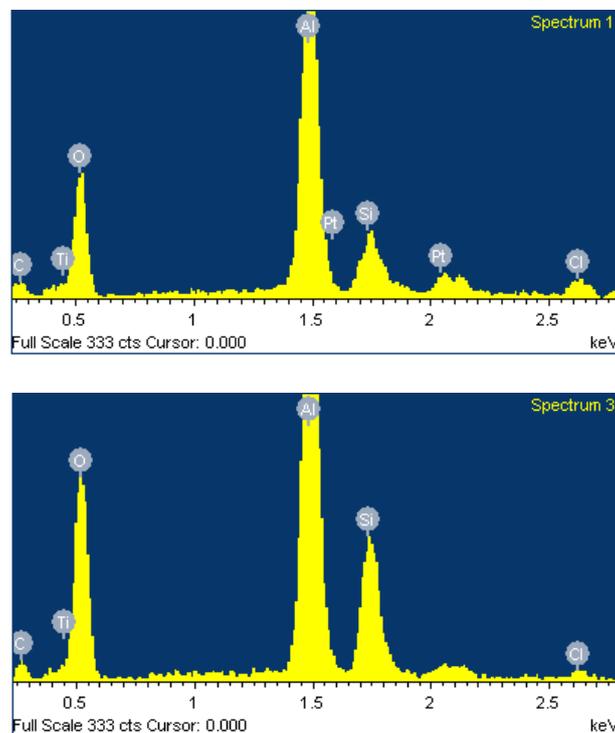


Figura 5.5. Análisis del recubrimiento 7M:3T-1.5Sr-0.5Ca mediante EDX de los precipitados (arriba) y de la tercera fase detectada (abajo).

2.1.2. Perfilometría óptica

La figura 5.6. muestra los valores de Ra proporcionados por el software del equipo.

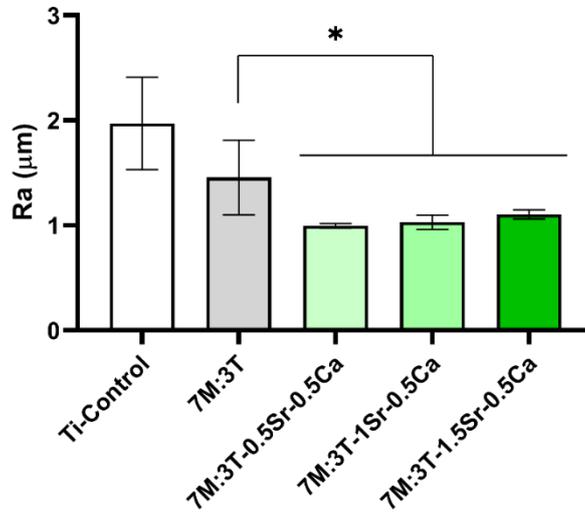


Figura 5.6. Representación gráfica de Ra para los diferentes sistemas dopados con CaCl_2 y SrCl_2 . (* $p \leq 0.05$)

Todos los recubrimientos, tanto el base como los dopados, cubren la rugosidad de los discos de Ti, haciendo que el parámetro Ra disminuya. La adición de las sales provoca una disminución significativa de la rugosidad respecto al recubrimiento base, hecho que no se ha observado en los recubrimientos formulados ni con SrCl_2 ni con CaCl_2 . El aumento de la cantidad de sal en el recubrimiento no provoca un cambio significativo en la rugosidad.

2.2. Adherencia

Se realiza el ensayo de adherencia mediante la técnica de “corte por enrejado” y se observa la superficie con un microscopio óptico (Figura 5.7). En todos los casos se obtienen recubrimientos transparentes con un acabado brillante. Del mismo modo, presentan otras buenas propiedades superficiales como la ausencia de grietas o la uniformidad.

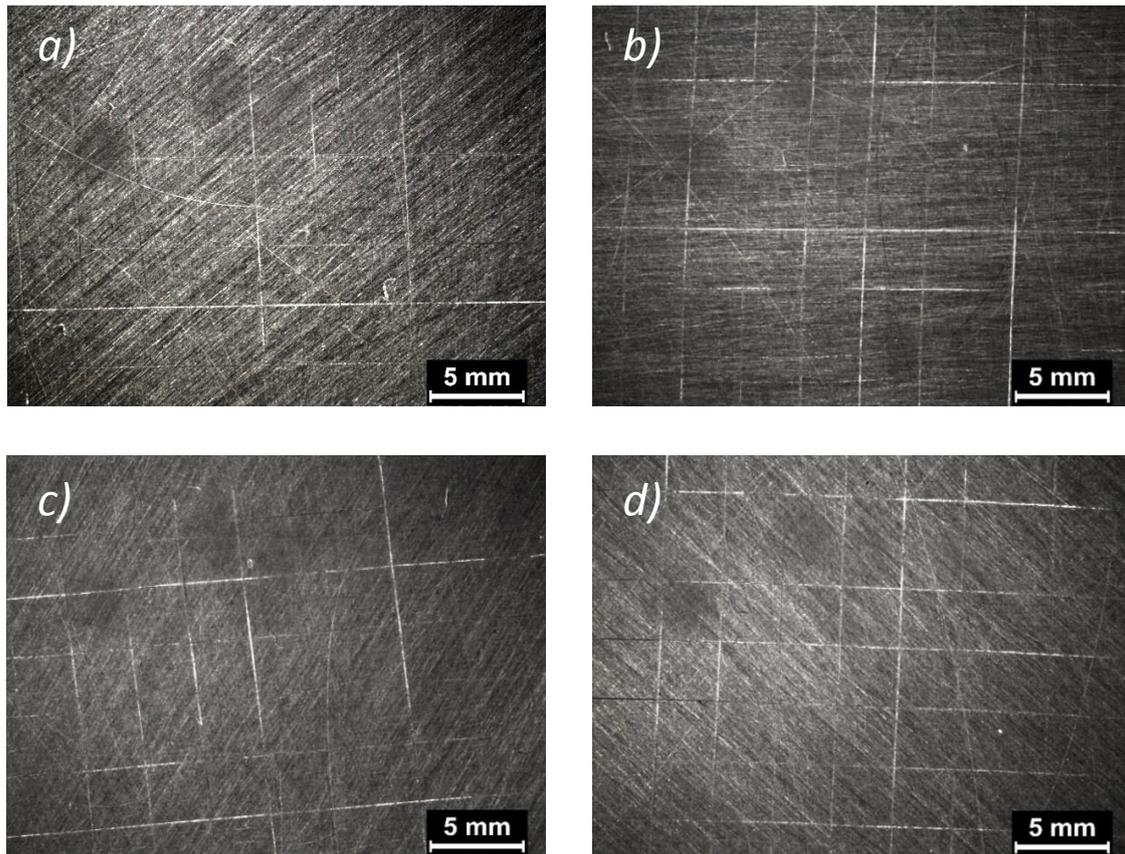


Figura 5.7. Ensayos de corte por enrejado para los sistemas (a) 7M:3T, (b) 7M:3T-0.5Sr-0.5Ca, (c) 7M:3T-1Sr-0.5Ca y (d) 7M:3T-1.5Sr-0.5Ca, a un aumento de $\times 0.73$.

Tras realizar los cortes en cuadrícula y despegar la cinta de tira adhesiva, en ninguno de los recubrimientos se observa que se desprenda algo de material. Por lo tanto, se clasifica como “desprendimiento 0”, es decir, la adherencia al sustrato de todos los materiales obtenidos es óptima, igual que en los recubrimientos formulados con CaCl_2 o con SrCl_2 .

2.3. Caracterización química

2.3.1. FTIR/ATR

Primeramente, con la espectroscopia infrarroja en el intervalo correspondiente a la región del infrarrojo medio, se estudia la red siloxánica formada en los recubrimientos base y en los dopados.

La Figura 5.8. muestra los espectros IR de los recubrimientos dopados con 0.5 % de CaCl_2 y los diferentes porcentajes de SrCl_2 .

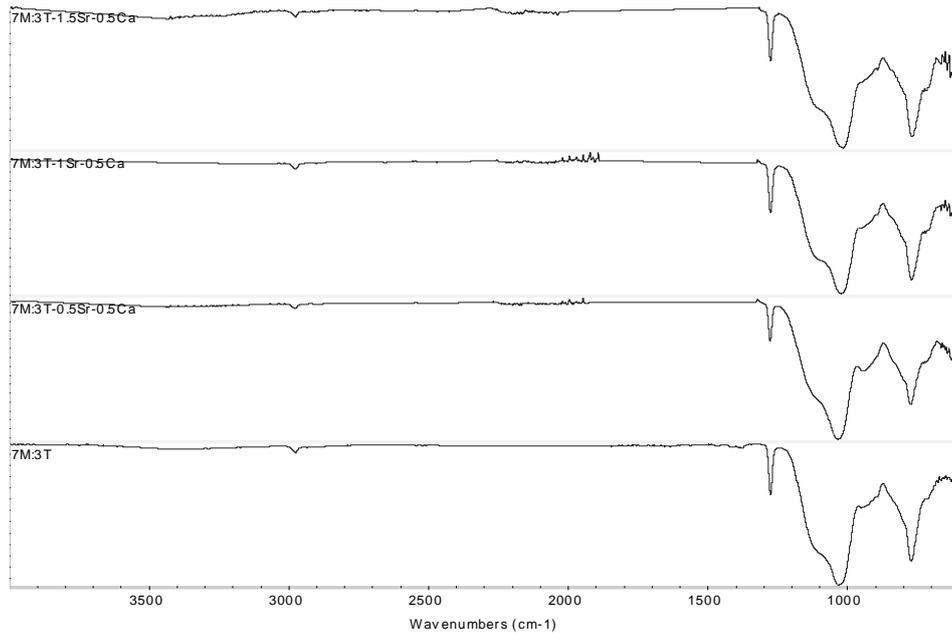


Figura 5.8. Espectros IR del sistema 7M:3T base y dopados con 0.5 % de CaCl_2 y diferentes porcentajes de SrCl_2 .

Los espectros de las distintas formulaciones muestran que la presencia de los dos cationes, incluso a la mayor concentración de un 2 % en peso, no impide la formación de la red.

Al igual que sucede con las formulaciones con un solo tipo de sal, es posible observar las bandas con mayor intensidad que corresponden a los enlaces Si-O-Si en torno a 760 y 1075 cm^{-1} . También se observa otra banda asociada a la vibración de tensión asimétrica de este enlace alrededor de 1165 cm^{-1} . Todas ellas confirman la formación satisfactoria de la red polisiloxánica²², del mismo modo que ocurría con los recubrimientos que incorporaban un único tipo de sal.

Igualmente, en todos los recubrimientos sintetizados el precursor MTMOS forma parte de la red de silicio. Esto se demuestra con la identificación, en todos los espectros analizados, de las bandas a 2975 y 1275 cm^{-1} , debidas a la vibración del grupo $-\text{CH}_3$ y Si-CH_3 ²³.

Por último, la banda que corresponde a la vibración de los $-\text{OH}$ de los grupos silanol se observa a 940 cm^{-1} . Esta es poco intensa en todos los espectros así que se puede concluir que la cantidad de grupos silanol sin condensar es pequeña. Por lo tanto, la red formada es densa.

2.3.2. ^{29}Si -RMN

La caracterización química se continúa con la técnica de ^{29}Si -RMN en estado líquido, que permite seguir la evolución de las reacciones de hidrólisis y condensación de todas las formulaciones.

En las siguientes figuras (5.9 a 5.12) se muestran los espectros correspondientes a la cinética de la reacción de los sistemas diseñados donde la concentración de Ca se mantiene constante y se varía la de Sr, junto con el espectro del recubrimiento base.

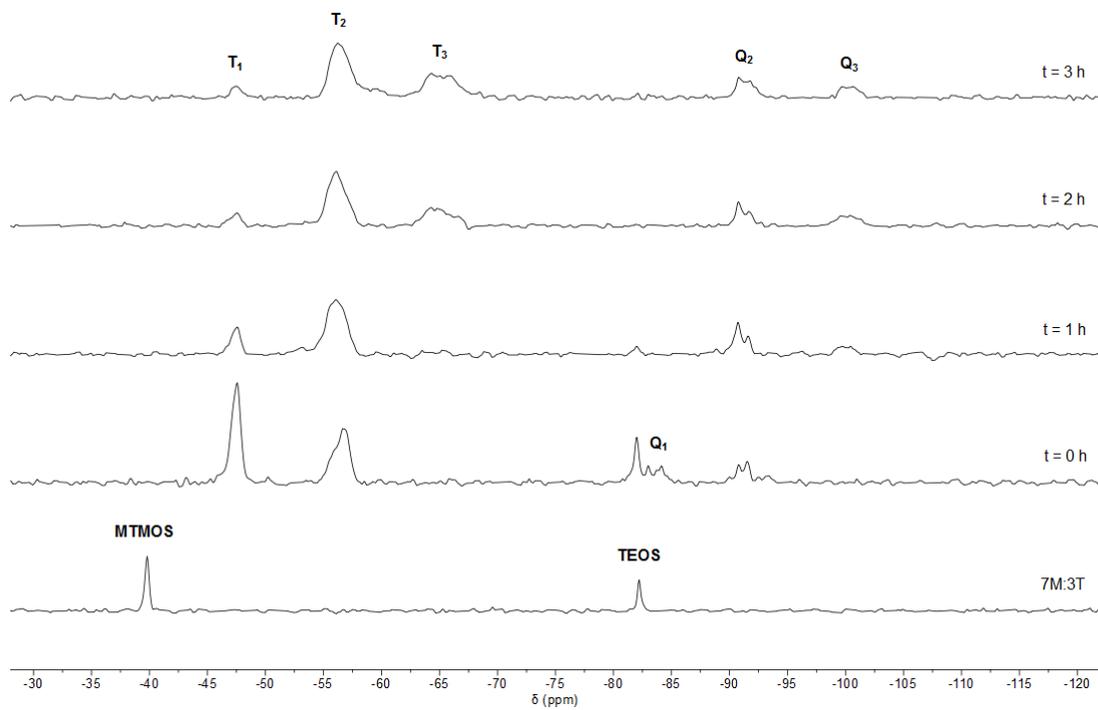


Figura 5.9. Espectro ^{29}Si -RMN líquido del sistema 7M:3T base.

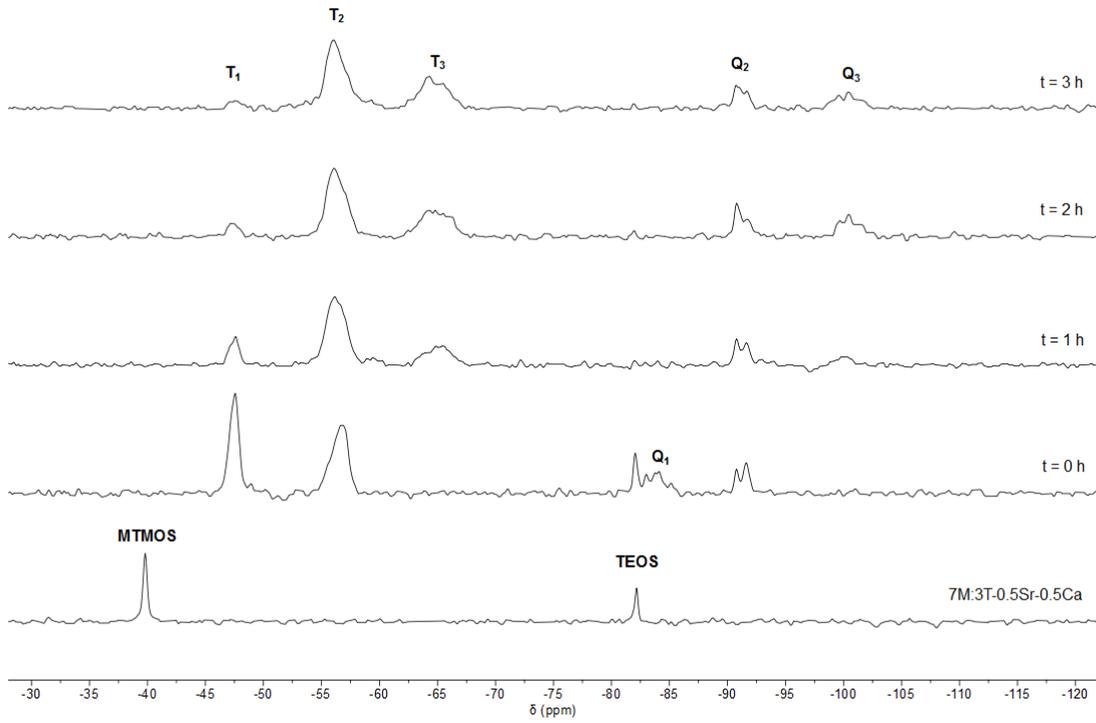


Figura 5.10. Espectro ^{29}Si -RMN líquido del sistema 7M:3T-0.5Sr-0.5Ca.

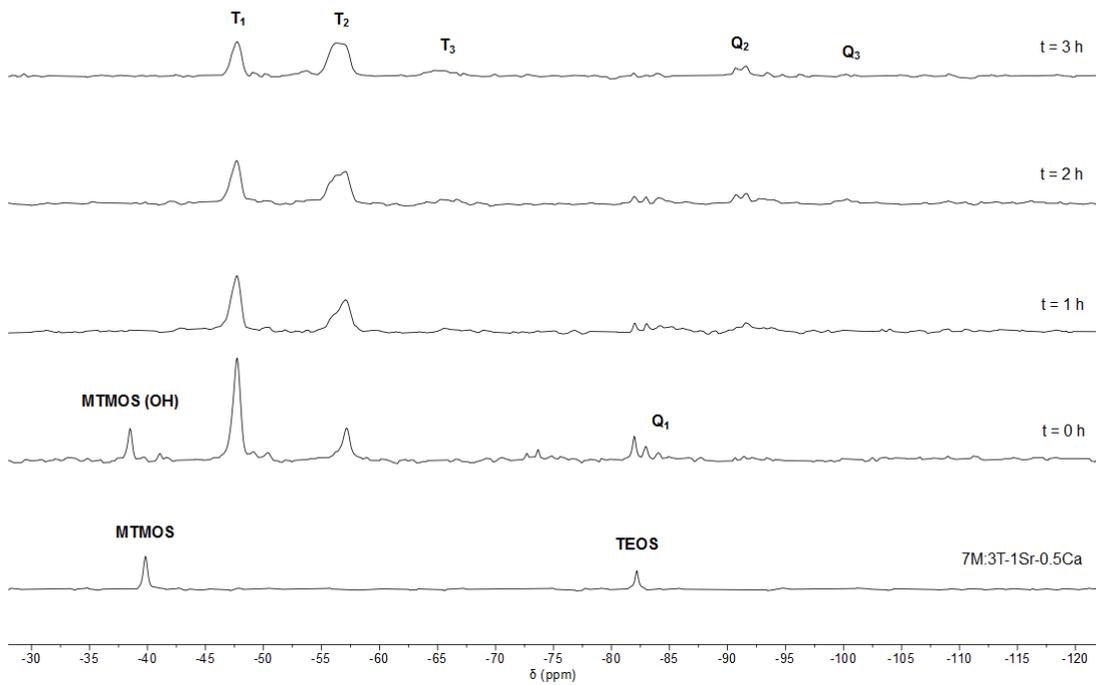


Figura 5.11. Espectro ^{29}Si -RMN líquido del sistema 7M:3T-1Sr-0.5Ca.

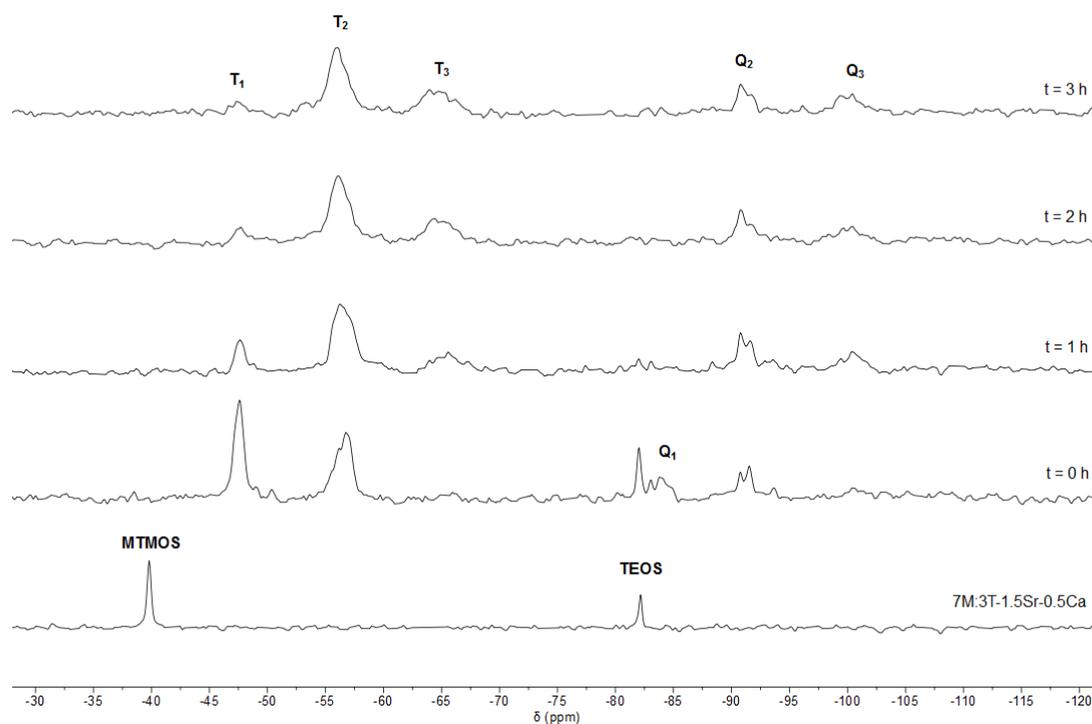


Figura 5.12. Espectro ^{29}Si -RMN líquido del sistema 7M:3T-1.5Sr-0.5Ca.

En los espectros se puede comprobar cómo evoluciona la red siloxánica durante este proceso. En todas las figuras se puede observar que los picos correspondientes a las especies menos condensadas (T_1 y Q_1) son los más destacados cuando comienza la reacción. En esta primera etapa, aparece un desdoblamiento de estos picos, mucho más notorio en el caso de Q_1 , que se puede atribuir a las interacciones entre los cationes y los silanoles²⁴, que desplazan ligeramente estos picos hacia valores más positivos. En la formulación 7M:3T-1Sr-0.5Ca, la reacción de condensación es más lenta y se pueden observar estos desdoblamientos en T_1 e, incluso, aparece la señal de las especies hidrolizadas del MTMOS. Sin embargo, a medida que avanza el tiempo, estas señales van perdiendo intensidad con el avance del tiempo de ensayo. Si se compara este proceso con el que se da con la formulación que lleva únicamente un 1 % de Sr (Figura 3.9), se observa, también, una ralentización de la condensación, sobre todo con el precursor MTMOS, ya que la especie MTMOS(OH) no desaparece inmediatamente y los picos correspondientes a T_3 , son prácticamente inapreciables, incluso a un tiempo de 2 horas. Este hecho, en cambio, no se aprecia con las formulaciones que llevan un 1.5 % de Sr, ya que la presencia del 0.5 % de Ca no se traduce en cambios apreciables en este proceso de hidrólisis-condensación. De la misma manera, los picos correspondientes a las especies

más condensadas (T_3 y Q_3) van aumentando su señal a medida que avanza la reacción. En ningún caso se logra la especie más condensada Q_4 .

Pasadas dos horas desde el inicio de la reacción, no hay evidencia de que las especies de mayor grado de condensación sean las mayoritarias, por lo que se realiza un tratamiento térmico para asegurar la formación de especies más condensadas que den lugar a la red polisiloxánica y a la solidificación.

Los espectros de ^{29}Si -RMN de sólidos realizados tras este tratamiento se muestran en la Figura 5.13.

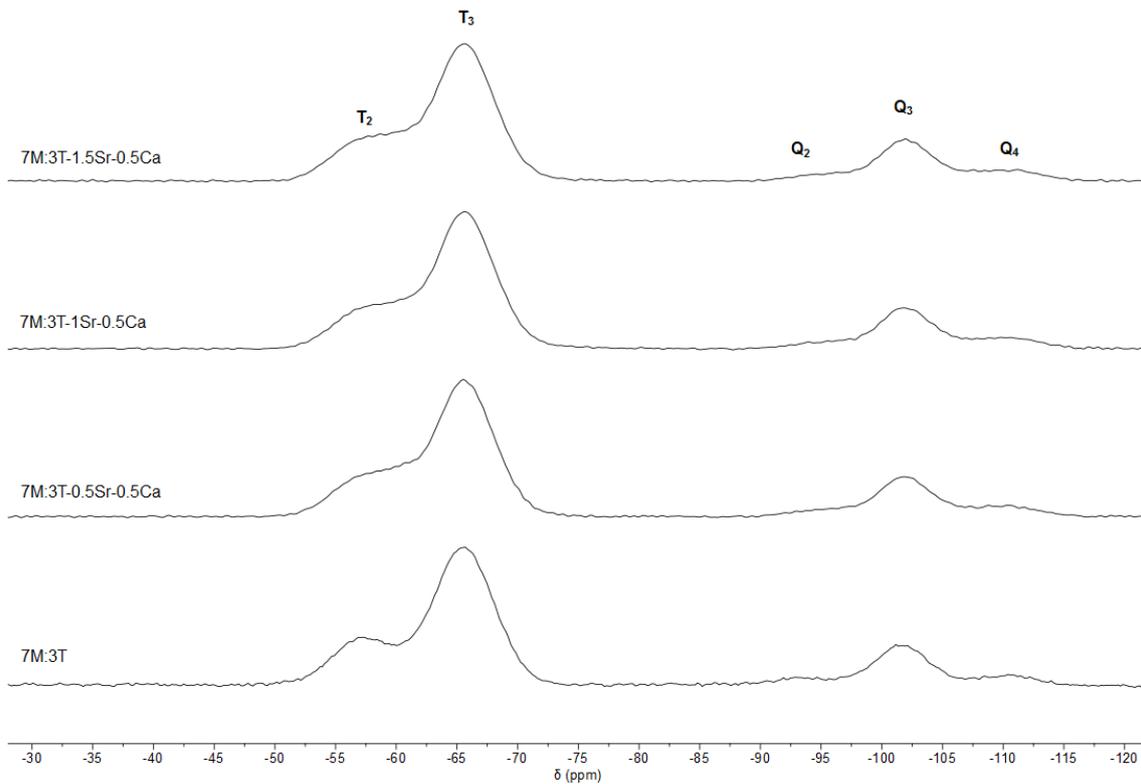


Figura 5.13. Espectro ^{29}Si -RMN sólido del sistema 7M:3T + 0.5 % CaCl_2 + % SrCl_2 .

El espectro muestra las señales de las especies T_2 y T_3 del precursor MTMOS, y las asociadas a las especies Q_2 , Q_3 y Q_4 del TEOS. Los ratios de las áreas de los picos T_3 y T_2 se muestran en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Ratio de las áreas de los picos T_3 y T_2 obtenidas por ^{29}Si -RMN.

Formulación	Ratio T_3/T_2
7M:3T	3.35
7M:3T-0.5Sr-0.5Ca	2.66
7M:3T-1Sr-0.5Ca	2.54
7M:3T-1.5Sr-0.5Ca	2.42

Observando los espectros se comprueba que se ha producido una mayor condensación de la red siloxánica, tal y como se esperaba, siendo los picos correspondientes a las especies de mayor condensación los que aparecen con mayor intensidad y desapareciendo las señales asociadas a los precursores. Así, en el caso del MTMOS se observan las señales T_2 y T_3 , siendo esta última la más abundante. En lo referente al TEOS, se observa que la especie con mayor presencia es la Q_3 , y las señales Q_2 y Q_4 son de baja intensidad.

Por lo tanto, la presencia conjunta de Ca y Sr en los recubrimientos no perjudica de manera importante a la formación de la red, ya que las señales de las especies T_3 y Q_3 continúan siendo las más intensas. Aun así, la condensación promovida por el tratamiento térmico aplicado es menor cuanto mayor es el porcentaje de sal añadido, ya que las ratios de los picos correspondientes al MTMOS disminuyen ligeramente, siendo los valores más bajos que el 2.97 correspondiente a la formulación 7M:3T-0.5Ca del tema anterior (Figura 4.10 y Tabla 4.1).

2.4. Determinación del grado de hidrofilia/hidrofobia

Es bien conocido que la hidrofilia de los recubrimientos puede influir en la velocidad de degradación de los mismo. Además, este factor es importante en la interacción celular de los biomateriales²⁵.

La medida del ángulo de contacto se ha llevado a cabo de la misma manera que en los casos anteriores y los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.14.

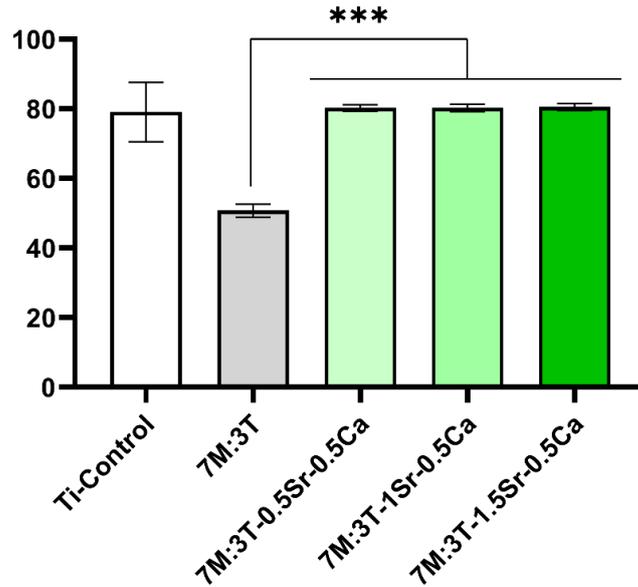


Figura 5.14. Valores de ángulo de contacto de los recubrimientos de los sistemas 7M:3T + 0.5 % CaCl₂ + % SrCl₂. (***) $p \leq 0.001$)

Como se puede comprobar, la adición de las dos sales aumenta el valor del ángulo de contacto a valores que rondan los 80°, superando ligeramente los 75° de los recubrimientos formulados con CaCl₂ o con SrCl₂. De cualquier forma, los valores de los nuevos recubrimientos se encuentran en el rango óptimo para la adhesión celular²⁶ y, por lo tanto, para una buena respuesta tisular.

2.5. Ensayo de degradación hidrolítica

Los recubrimientos obtenidos se degradan hidrolíticamente al sumergirlos en un medio acuoso. Los productos liberados en este proceso, basados en silicio, tienen propiedades osteorregeneradoras²⁷, por lo que ahí radica la importancia de este estudio.

Los resultados obtenidos, como tanto por ciento de pérdida de peso del recubrimiento, se presentan en la Figura 5.15.

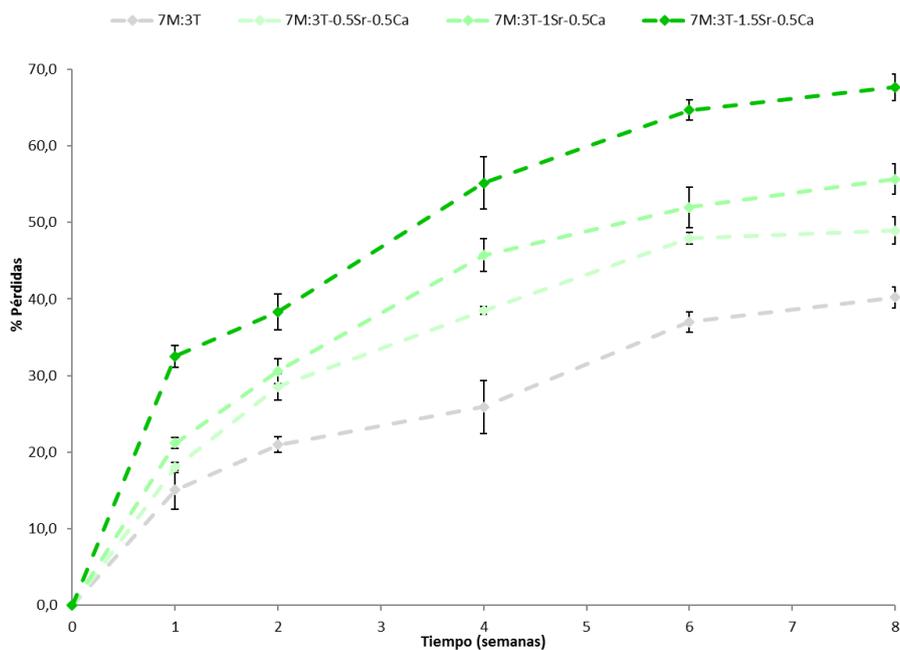


Figura 5.15. Degradación hidrolítica de los recubrimientos del sistema 7M:3T + 0.5 % CaCl₂ + % SrCl₂.

Todos los recubrimientos sintetizados se degradan con mayor celeridad en los primeros días. Después, hasta la conclusión del ensayo, la degradación es más gradual. La presencia de las sales, una vez más, favorece la mayor degradación respecto al recubrimiento base 7M:3T. Estos resultados son coherentes con las diferentes heterogeneidades asociadas al recubrimiento sol-gel observadas en el apartado 2.1.1, como los agregados y las porosidades. Por último, cuanto mayor es el porcentaje de agente dopante introducido en la formulación, más degradación sufre el recubrimiento, ya que, por un lado, la liberación de las sales contribuye a la pérdida de peso y, por otro, la menor condensación de la red favorece su hidrólisis. El comportamiento es similar al observado en los capítulos anteriores, donde un aumento de la concentración de la sal provoca un aumento de la degradación, por lo que la adición de las dos sales en las concentraciones 0.5 % de Ca y 1.5 % de Sr, provoca la mayor degradación del recubrimiento.

2.6. Ensayos de liberación

Una consecuencia de la degradación hidrolítica que sufren los recubrimientos desarrollados es la liberación de Si, Ca y Sr. Los 3 elementos pueden tener un papel muy importante en la regeneración ósea.

El Si liberado desde los recubrimientos sintetizados, así como el correspondiente al 7M:3T-0.5Ca, se muestra en la representación gráfica de la Figura 5.16.

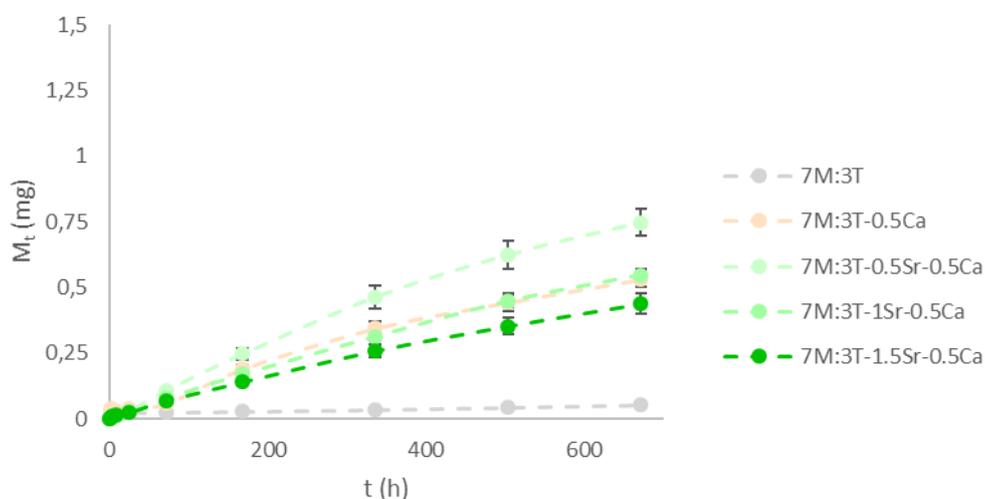


Figura 5.16. Liberación de silicio del sistema 7M:3T + 0.5 % CaCl₂ + % SrCl₂.

A la vista de los perfiles de liberación de Si se puede concluir que la liberación está muy favorecida frente al sistema base, con la adición de las sales de Sr y de Ca, observándose un aumento importante de la liberación de Si. Por otra parte, una vez más, la diferencia entre los sistemas dopados es bastante menor y los valores muy similares a los de la formulación con únicamente un 0.5 % de Ca. Este comportamiento es muy similar al que se daba tanto en los recubrimientos que incorporaban Sr como en los que incorporaban Ca.

Con este ensayo se puede, además, observar la cinética de liberación de los cationes que provienen de ambas sales.

Primeramente, en la Figura 5.17, se muestran las liberaciones de Sr que se dan a partir de los diferentes recubrimientos.

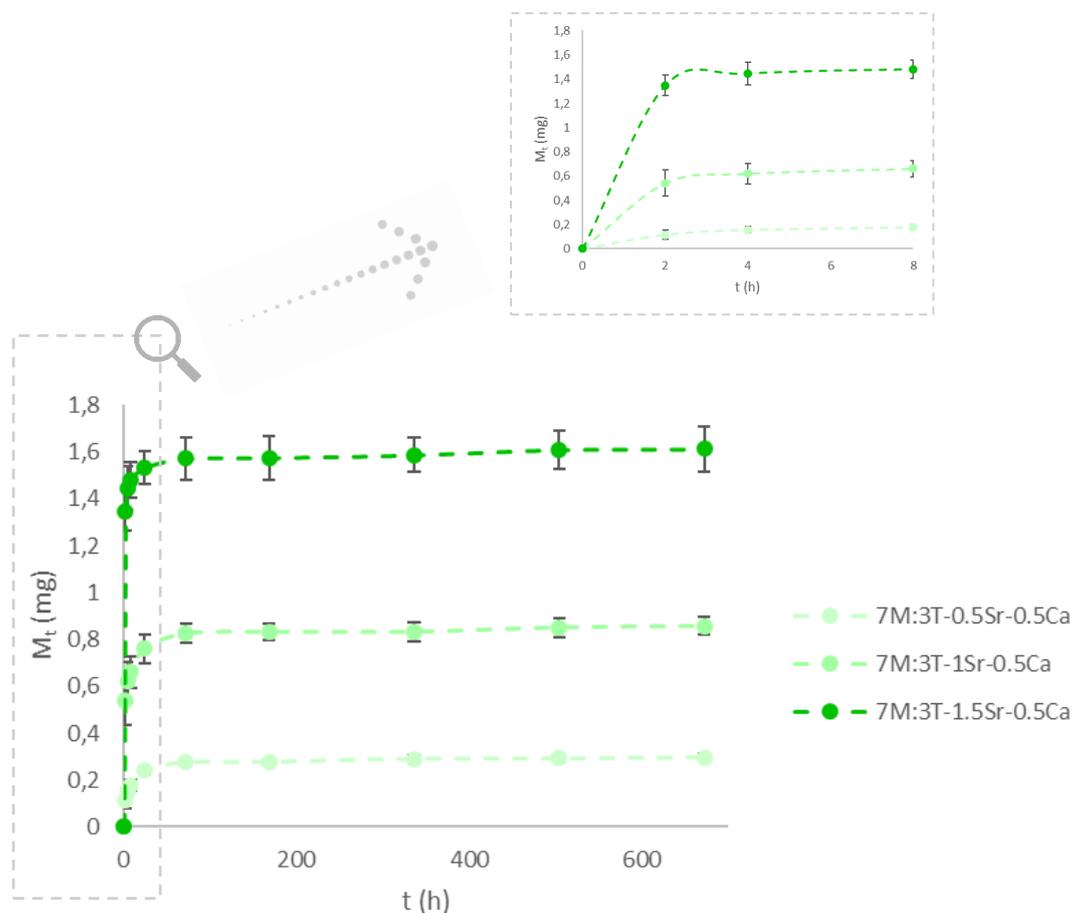


Figura 5.17. Liberación de Sr del sistema 7M:3T + 0.5 % $CaCl_2$ + % $SrCl_2$.

En todas las formulaciones, en las primeras horas se produce una rápida liberación de Sr y, después, se va ralentizando hasta las 3 o 4 horas, a partir de las cuales no se observa liberación. También se aprecia, lógicamente, que la formulación con mayor cantidad de Sr es la que presenta una mayor liberación, mientras que la que contiene un 0.5 % en peso es la que libera una cantidad proporcionalmente menor.

Por otro lado, en la Figura 5.18 se muestran los resultados del ensayo de liberación correspondiente al Ca.

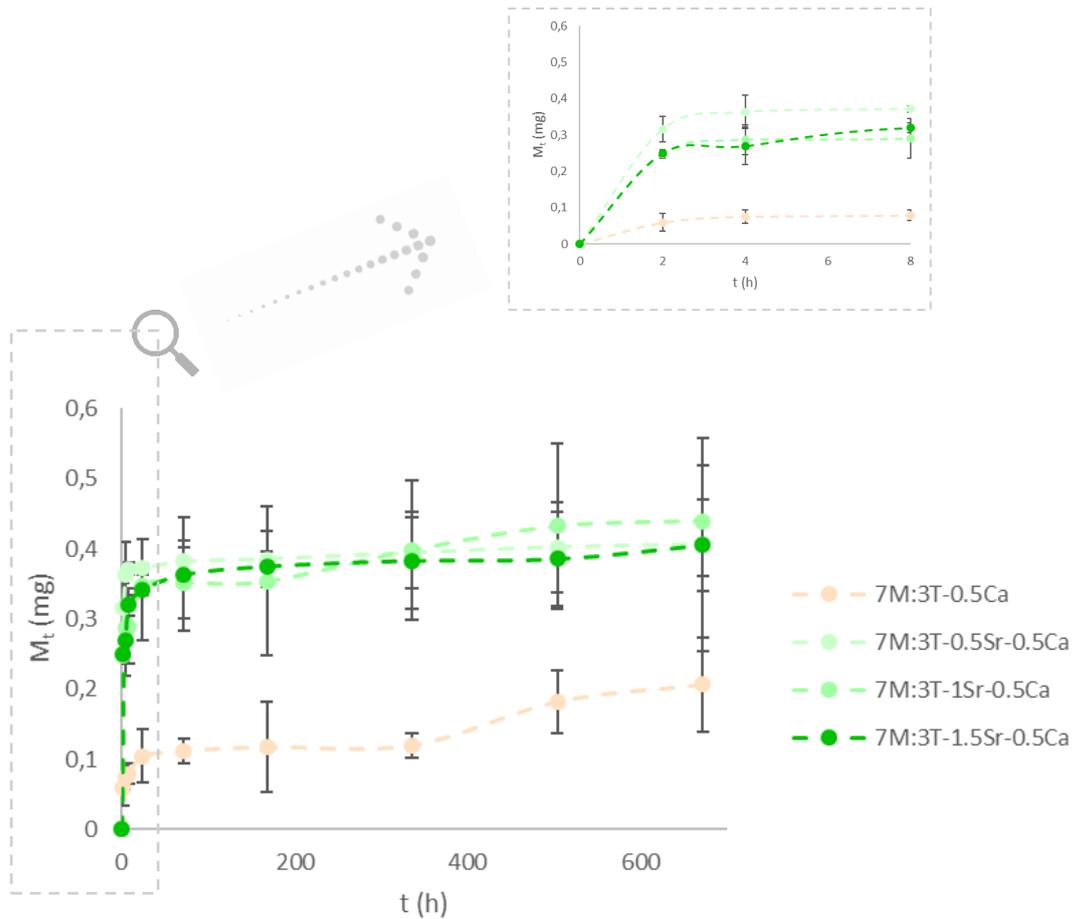


Figura 5.18. Liberación de Ca del sistema 7M:3T + 0.5 % CaCl_2 + % SrCl_2 .

En este caso también ocurre que la mayor parte del Ca liberado se produce en los primeros instantes del ensayo, y se mantiene constante durante todo el mes que dura el ensayo. Además, la cantidad liberada es similar en todas las formulaciones, siendo los perfiles de los diferentes materiales prácticamente iguales. Si se compara el Ca liberado en los recubrimientos que llevan la mezcla de sales con el recubrimiento que lleva únicamente 0.5 % de Ca (formulación 7M:3T-0.5Ca), la liberación de este ion es hasta 2-3 veces superior, debido, probablemente, a la mayor degradación y menor condensación de la red formada cuando se incorporan los dos iones.

2.7. Análisis proteómico de las proteínas adsorbidas en la superficie

Se han identificado un total de 183 proteínas distintas adsorbidas en los diferentes materiales desarrollados (Anexo 3). Se empleó el programa Progenesis QI para realizar el análisis diferencial de las proteínas identificadas entre las superficies dopadas y el recubrimiento base y las bases de datos PANTHER y DAVID para la clasificación de estas proteínas respecto a sus funciones.

El análisis comparativo utilizando Progenesis QI detectó 54 proteínas adsorbidas diferencialmente en los materiales enriquecidos con las sales, de las cuales 17 están menos adheridas a la superficie del recubrimiento cuando se dopan en comparación con la base (Tabla 5.3). En la tabla 5.4, en cambio, se muestran las 37 proteínas que presentan menor afinidad por el sistema base y se encuentran adsorbidas en las superficies dopadas en mayor proporción.

Tabla 5.3. Análisis diferencial Progenesis QI de proteínas menos adsorbidas en recubrimientos dopados con Sr y Ca respecto al material base. Las proteínas detectadas con ANOVA $p < 0.05$ (en amarillo) y una ratio inferior a 0.77 (en rojo) se consideraron significativamente diferentes (en negrita).

Código	Proteína	7M:3T-0.5Sr-0.5Ca vs 7M:3T		7M:3T-1Sr-0.5Ca vs 7M:3T		7M:3T-1.5Sr-0.5Ca vs 7M:3T	
		<i>p</i>	Ratio	<i>p</i>	Ratio	<i>p</i>	Ratio
IGKC	Immunoglobulin kappa constant	0.024	0.68	0.359	0.77	0.249	0.80
ACTB	Actin cytoplasmic 1	0.045	0.41	0.341	0.68	0.805	0.79
THRB	Prothrombin	0.020	0.56	0.234	0.65	0.312	0.77
PKP1	Plakophilin-1	0.005	0.42	0.030	0.22	0.180	0.75
IGLL5	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	0.022	0.41	0.108	0.51	0.057	0.61
IGLC6	Immunoglobulin lambda constant 6	0.014	0.51	0.107	0.60	0.022	0.57
G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrog.	0.016	0.33	0.296	0.30	0.205	0.46
KV106	Immunoglobulin kappa variable 1-6	0.011	0.36	0.118	0.35	0.020	0.38
SAA1	Serum amyloid A-1 protein	0.228	0.48	0.032	0.34	0.065	0.38
VTNC	Vitronectin	0.006	0.33	0.047	0.32	0.006	0.36
IBP4	Insulin-like growth factor-binding protein 4	0.002	0.18	0.048	0.48	0.013	0.35

ANT3	Antithrombin-III	0.000	0.23	0.004	0.27	0.001	0.31
FA9	Coagulation factor IX	0.258	0.28	0.062	0.19	0.032	0.17
S10A9	Protein S100-A9	0.016	0.03	0.019	0.03	0.261	0.10
PRG4	Proteoglycan 4	0.003	0.13	0.013	0.08	0.008	0.10
FA10	Coagulation factor X	0.004	0.08	0.001	0.04	0.003	0.09
PROC	Vitamin K-dependent protein C	0.002	0.01	0.004	0.02	0.000	0.02

Tabla 5.4. Análisis diferencial Progenesis Q1 de proteínas más adsorbidas en recubrimientos dopados con Sr y Ca respecto al material base. Las proteínas detectadas con ANOVA $p < 0.05$ (en amarillo) y una ratio superior a 1.3 (en verde) se consideraron significativamente diferentes (en negrita).

Código	Proteína	7M:3T-0.5Sr-0.5Ca vs 7M:3T		7M:3T-1Sr-0.5Ca vs 7M:3T		7M:3T-1.5Sr-0.5Ca vs 7M:3T	
		<i>p</i>	Ratio	<i>p</i>	Ratio	<i>p</i>	Ratio
HBA	Hemoglobin subunit alpha	0.008	14.09	0.091	10.82	0.011	13.48
APOF	Apolipoprotein F	0.001	10.44	0.002	12.54	0.000	11.01
APOL1	Apolipoprotein L1	0.034	5.46	0.028	8.82	0.013	10.02
ITIH3	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	0.334	1.82	0.157	3.50	0.008	7.53
CLUS	Clusterin	0.000	4.75	0.001	5.48	0.001	6.32
FINC	Fibronectin	0.130	2.86	0.287	2.97	0.022	5.47
APOA4	Apolipoprotein A-IV	0.000	5.62	0.019	4.52	0.001	5.26
CO4A	Complement C4-A	0.000	9.50	0.000	4.77	0.001	5.13
ZPI	Protein Z-dependent protease inhibitor	0.165	2.80	0.728	1.58	0.043	5.08
ITIH1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	0.179	1.57	0.113	1.94	0.003	4.46
RET4	Retinol-binding protein 4	0.089	1.84	0.058	2.23	0.044	3.94
IGLL1	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1	0.013	3.38	0.153	2.79	0.006	3.88
F13B	Coagulation factor XIII B chain	0.025	4.43	0.071	3.67	0.035	3.59
ITIH2	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	0.577	1.31	0.317	2.39	0.020	3.46
ANGT	Angiotensinogen	0.862	0.88	0.041	2.14	0.028	3.43
CD14	Monocyte differentiation antigen CD14	0.592	1.33	0.041	5.93	0.046	3.41
HEP2	Heparin cofactor 2	0.094	2.25	0.268	2.54	0.027	3.16

CO4B	Complement C4-B	0.004	4.13	0.020	3.51	0.016	2.86
ALS	Insulin-like growth factor-binding protein...	0.498	0.56	0.546	1.59	0.046	2.67
HRG	Histidine-rich glycoprotein	0.033	2.71	0.132	1.89	0.013	2.58
CO9	Complement component C9	0.013	1.90	0.087	2.13	0.001	2.55
FETUA	Alpha-2-HS-glycoprotein	0.049	2.87	0.277	2.34	0.054	2.42
APOA1	Apolipoprotein A-I	0.004	2.15	0.028	2.02	0.002	2.39
AACT	Alpha-1-antichymotrypsin	0.061	1.69	0.785	1.24	0.008	2.32
GPX3	Glutathione peroxidase 3	0.602	1.30	0.837	1.30	0.018	2.29
CO8A	Complement component C8 alpha chain	0.035	2.12	0.125	2.33	0.033	2.23
PON1	Serum paraoxonase / arylesterase 1	0.239	1.34	0.323	1.69	0.030	1.99
VTDB	Vitamin D-binding protein	0.030	2.33	0.184	2.71	0.046	1.97
CD5L	CD5 antigen-like	0.146	0.74	0.687	0.57	0.042	1.91
ITIH4	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	0.079	1.34	0.478	1.33	0.017	1.78
CO8G	Complement component C8 gamma chain	0.933	0.98	0.492	0.57	0.040	1.69
TFPI1	Tissue factor pathway inhibitor	0.043	2.08	0.415	1.37	0.326	1.55
A1AG2	Alpha-1-acid glycoprotein 2	0.115	1.81	0.046	2.28	0.200	1.50
IGHA1	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	0.214	1.16	0.977	1.02	0.034	1.35
ALBU	Serum albumin	0.037	1.61	0.066	1.72	0.231	1.31
CPN2	Carboxypeptidase N subunit 2	0.694	1.12	0.024	2.37	0.376	1.26
PHLD	Phosphatidylinositol-glycan-specific D	0.045	2.07	0.221	2.38	1.000	1.00

Realizando el análisis de las proteínas adsorbidas de forma diferencial en las superficies mediante la herramienta DAVID se han identificado proteínas relacionadas con los procesos de inflamación, coagulación sanguínea, fibrinólisis, adhesión celular y regeneración ósea.

Tal y como se puede observar en la tabla 5.3, las inmunoglobulinas IGKC, IGLL5, IGLC6 y KV106, junto con la SAA1, todas relacionadas con los procesos inflamatorios, muestran una unión preferencial a las superficies del material base. Por otro lado, son varias las proteínas relacionadas con los procesos de regulación de la coagulación que se encuentran también en cantidades más pequeñas en los recubrimientos dopados que en la superficie

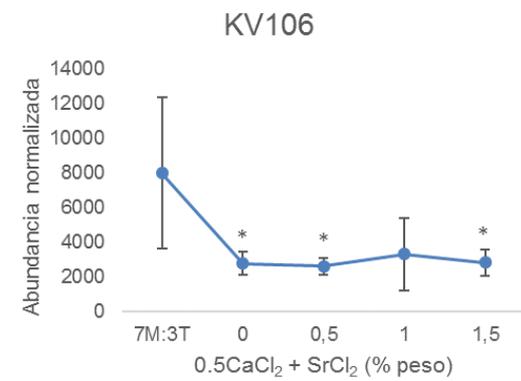
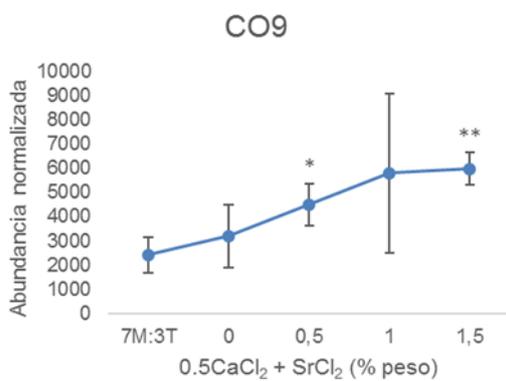
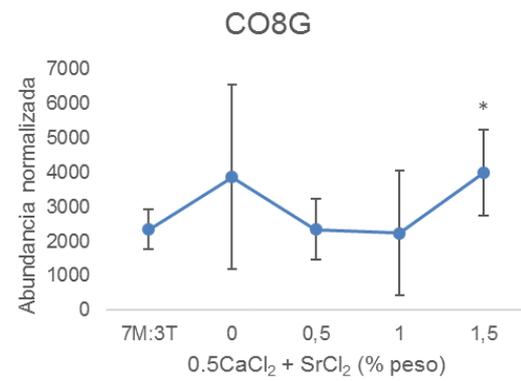
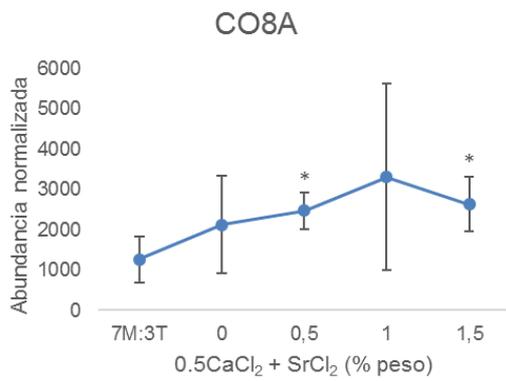
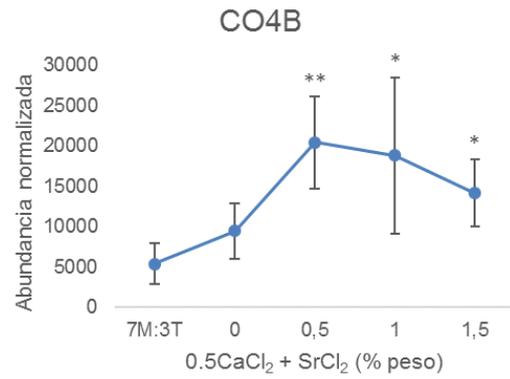
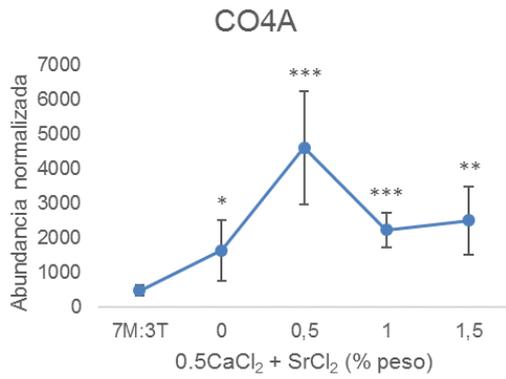
del recubrimiento base: ANT3 y PROC. Estas dos proteínas reguladoras del proceso de coagulación disminuyen de forma clara y significativa, con los iones, en todas las proporciones. También aparecen THRB, FA9 y FA10 que participan en la activación de esta vía de señalización. Del mismo modo, se relacionan con los procesos de regeneración la VTNC, la PRG4, la IBP4 y la S10A9 junto con la deshidrogenasa G3P. Se observa, igualmente, en los primeros puestos de la tabla, la ACTB y la PKP1, proteínas relacionadas con la adhesión celular y, por tanto, con la regeneración tisular. Es reseñable que existen proteínas con múltiples funciones, por lo que la VTNC, la ACTB y la PRG4 también se relacionan con la adhesión celular, y la PROC con la regeneración ósea. Todas estas proteínas se adhieren preferentemente a la superficie que lleva el recubrimiento base.

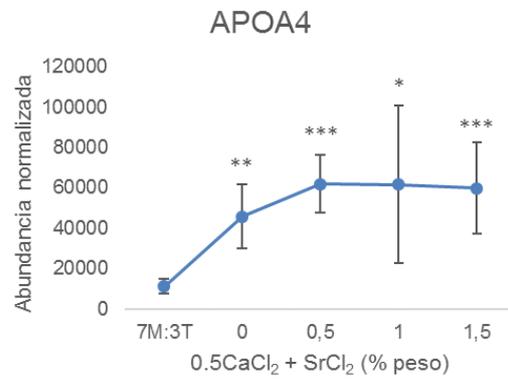
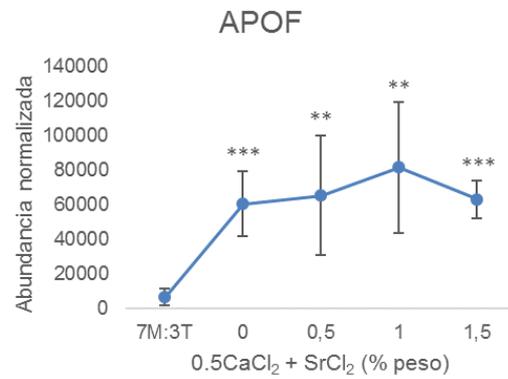
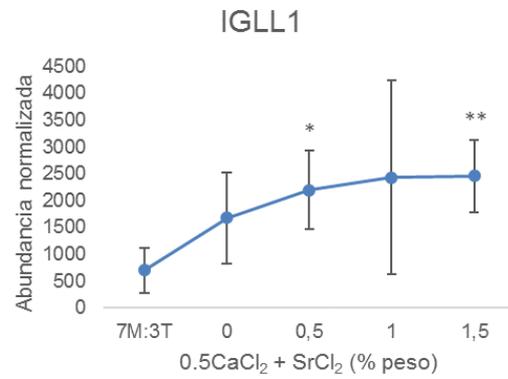
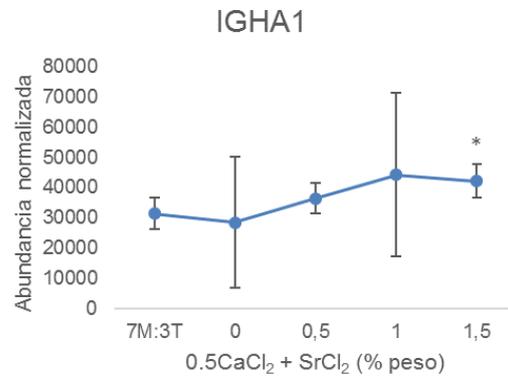
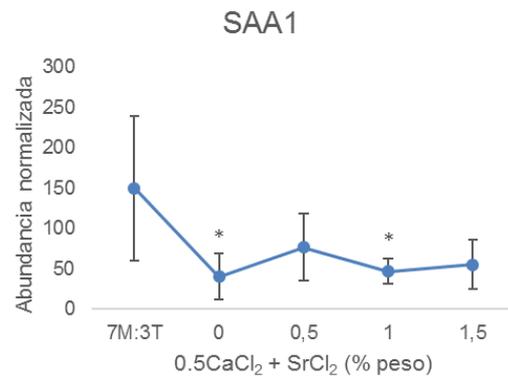
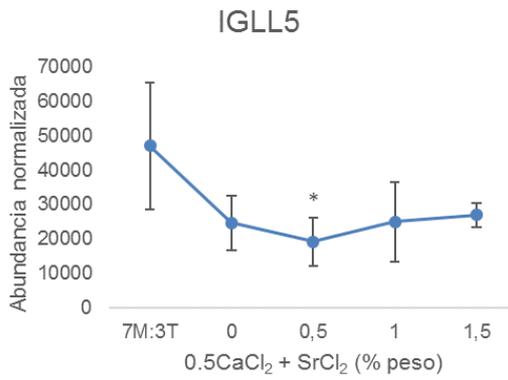
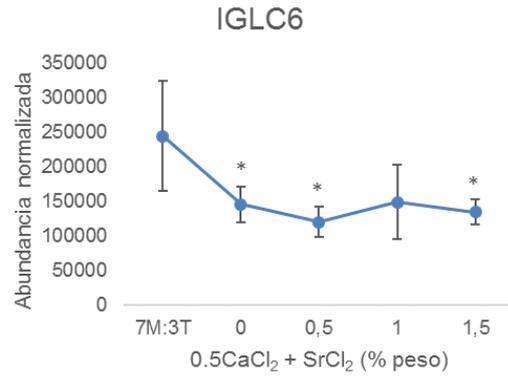
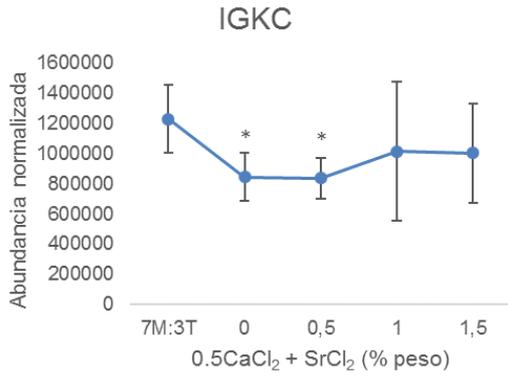
Entre las 37 proteínas con mayor afinidad por las superficies de los recubrimientos dopados con Sr y Ca (Tabla 5.4) se ha detectado un grupo cuyas funciones están ligadas al sistema inmune (CLUS, CO4A, CD14, CO4B, CO9, CO8A, CD5L, CO8G, ALBU y las inmunoglobulinas IGLL1 e IGHA1). Hay, además, otro conjunto de proteínas que tiene funciones relacionadas con los procesos metabólicos de las lipoproteínas y la unión de fosfolípidos, que son las apolipoproteínas APOF, APOL1, APOA4 y APOA1. Por otra parte, también se han identificado proteínas relacionadas con los procesos de coagulación sanguínea (F13B, HEP2 y TFPI1), adhesión celular (FINC) y fibrinólisis (HRG). La FINC, teniendo múltiples funciones, también pertenece a las proteínas involucradas en la fibrinólisis. La técnica permitió, además, la detección de proteínas relacionadas, en cierto grado, con el desarrollo de nuevo hueso como la FETUA, la PON1 y la VTDB. Finalmente, se han encontrado otras proteínas como las glicoproteínas (ITIH1, ITIH2, ITIH3, ITIH4, A1AG2), HBA, ZP1, RET4, ANGT, ALS, GPX3, AACT, la carboxipeptidasa CPN2 o la fosfolipasa PHLA, en estas superficies modificadas.

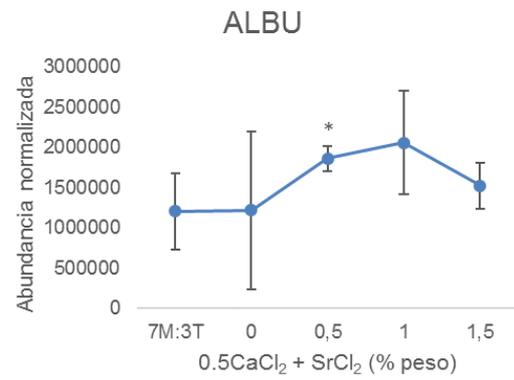
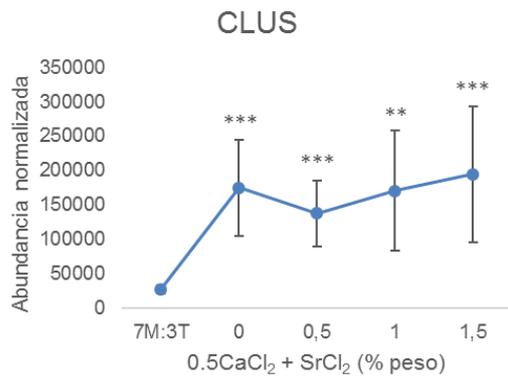
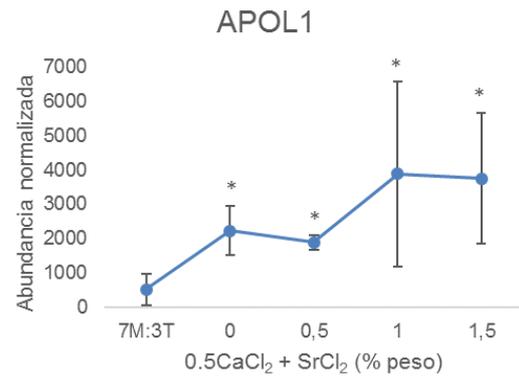
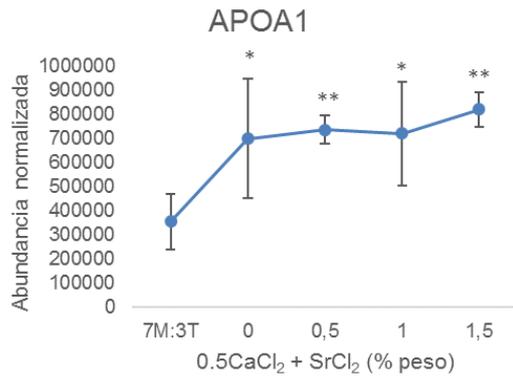
La Figura 5.19 muestra los cambios, en función del contenido de las sales, en la abundancia normalizada de las principales proteínas relacionadas con los procesos de inflamación (CO4A, CO4B, CO8A, CO8G y CO9 como activadoras; CLUS, ALBU y el grupo de apolipoproteínas como reguladoras; las inmunoglobulinas, pertenecientes al sistema inmune adaptativo, KV106, IGKC, IGLL5, IGLC6, IGHA1 e IGLL1; y la SAA1), coagulación (FA9, FA10, THRB y F13B como iniciadoras; y ANT3, HEP2 y

PROC como reguladoras), fibrinólisis (HRG), adhesión celular (FINC) y regeneración ósea (ACTB, PRG4, VTNC, PON1, FETUA y VTDB).

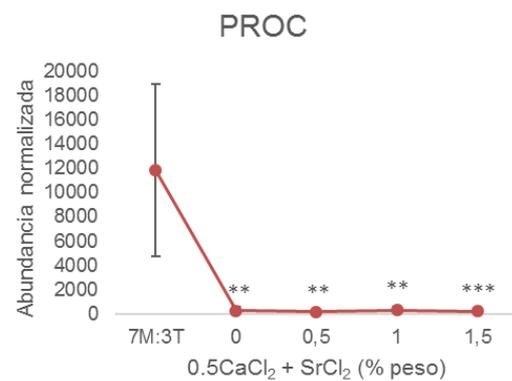
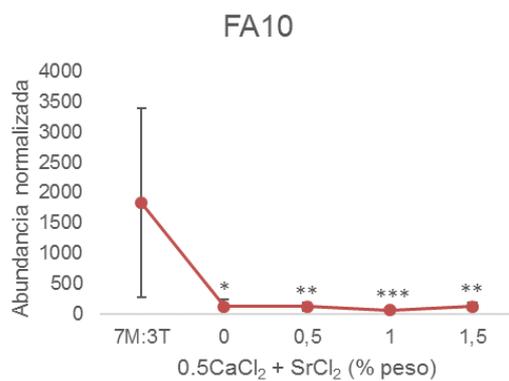
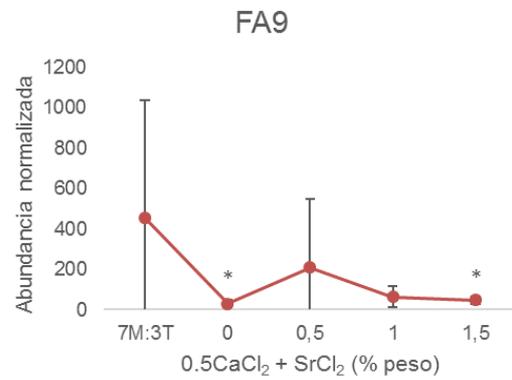
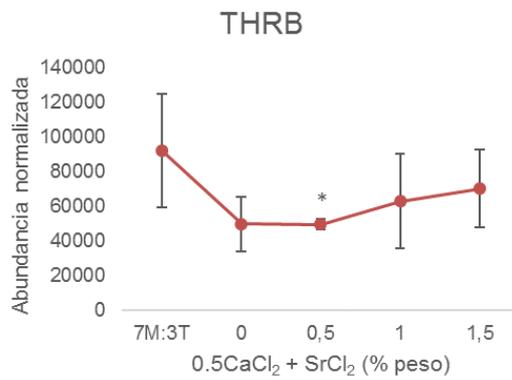
INFLAMACIÓN

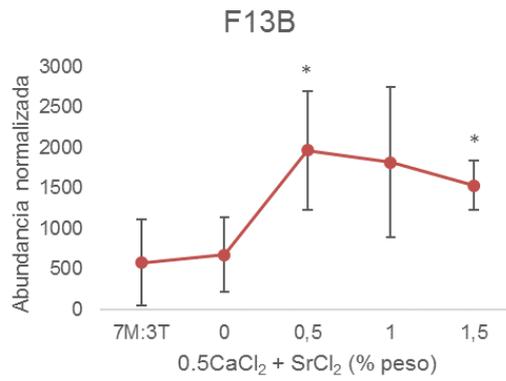
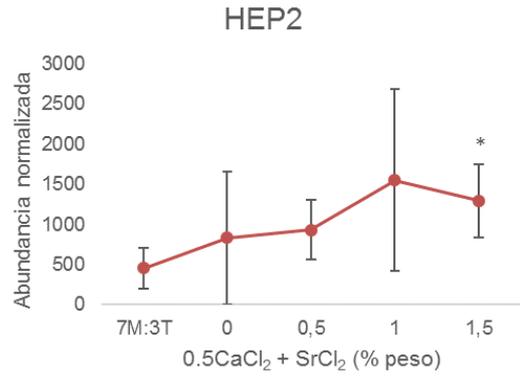
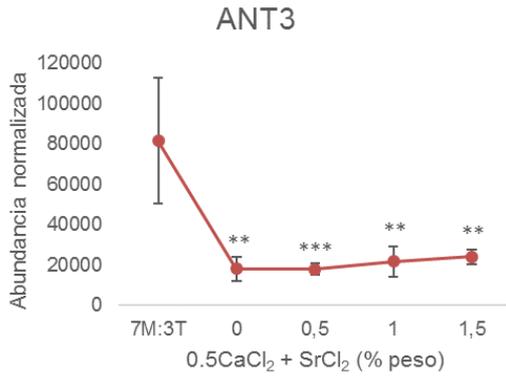




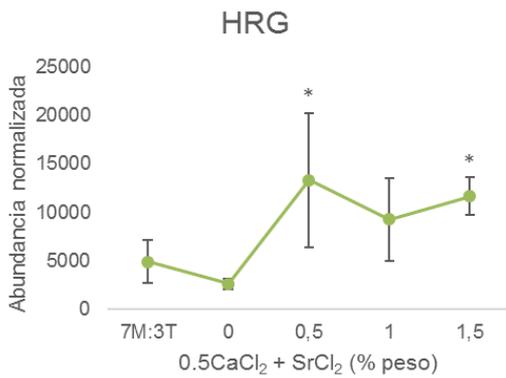


COAGULACIÓN

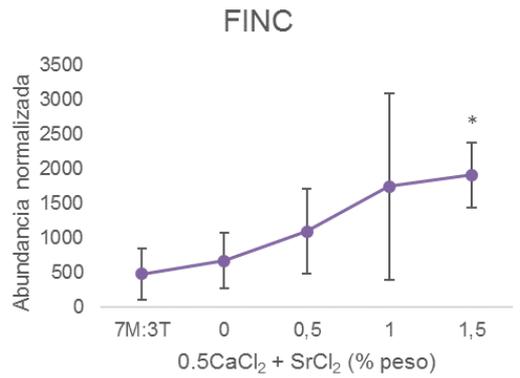




FIBRINÓLISIS



ADHESIÓN CELULAR



REGENERACIÓN ÓSEA

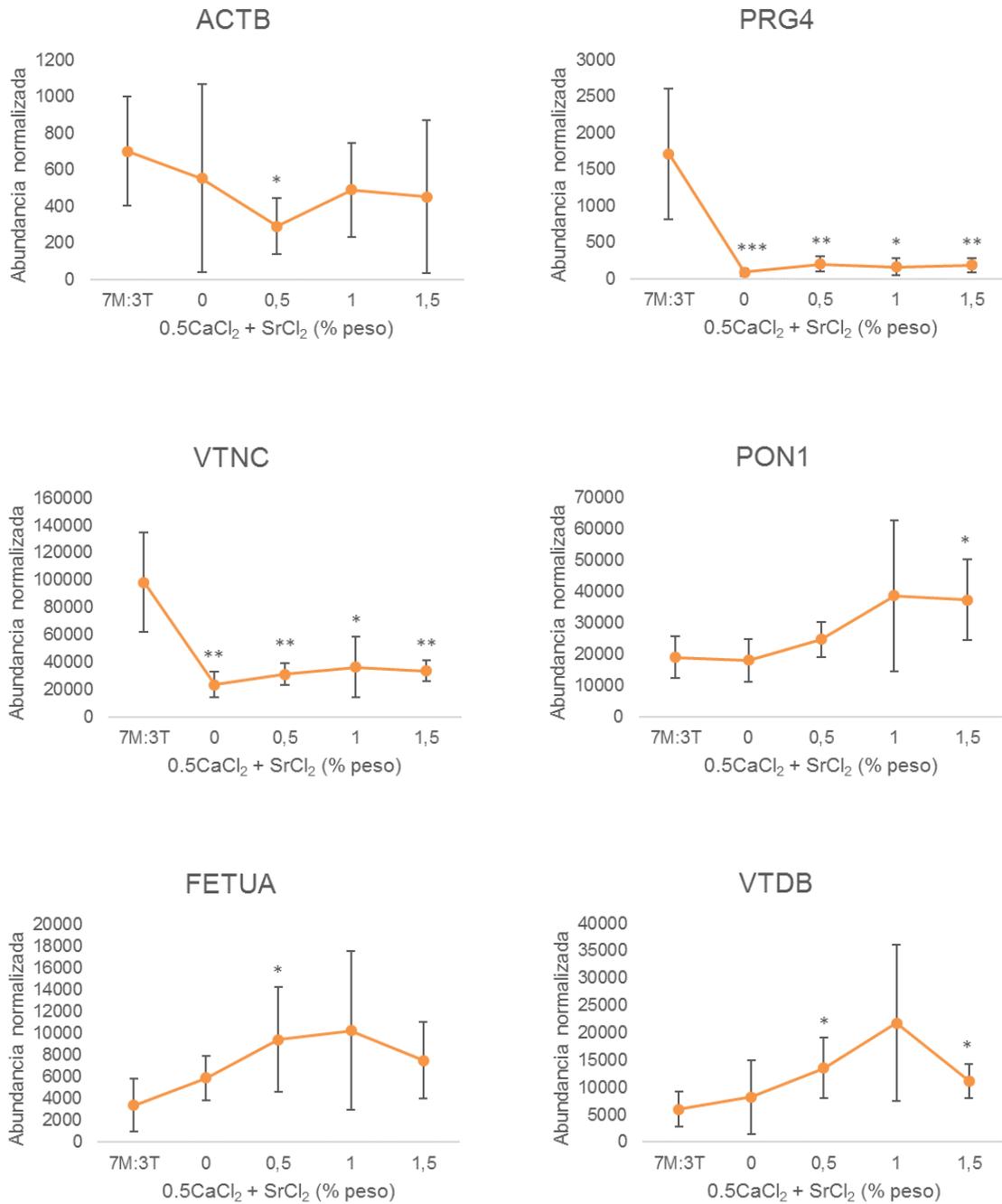


Figura 5.19. Abundancia normalizada en los recubrimientos enriquecidos con 0.5 % de Ca y % Sr del sistema 7M:3T. El valor en el eje de ordenadas corresponde al recubrimiento base. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

La tendencia de las gráficas correspondientes a las proteínas del sistema inmune innato relacionadas con la activación de los procesos de inflamación (CO4A, CO4B, CO8A, CO8G y CO9) no muestran un comportamiento idéntico, aunque todas ellas aumentan. La CO8A y la CO9 aumentan claramente con el contenido en sal, bien sea solo calcio o ambos, mientras que las proteínas CO4A y CO4B presentan un máximo para la concentración con 0.5 % de Ca y 0.5 % de Sr, y la CO8G no muestra una tendencia clara de aumento salvo a la concentración máxima de las sales.

En cuanto a las inmunoglobulinas, pertenecientes al sistema inmune adaptativo, en la mayor parte de ellas (KV106, IGKC, IGLL5 y IGLC6), la adición de las sales de Sr, en diferentes proporciones, no provoca un aumento de su presencia, por lo que se mantiene el descenso que provoca la adición del Ca al recubrimiento base. Igualmente, se observa la misma tendencia con la proteína SAA1. Por otra parte, en el caso de las inmunoglobulinas IGHA1 e IGLL1, la adición de la sal de Sr provoca un aumento de estas proteínas.

Respecto a las principales proteínas reguladoras de estos procesos inflamatorios, las apolipoproteínas APOF, APOA4, APOA1 y APOL1, y la CLUS, muestran un comportamiento similar. Todas ellas presentan una abundancia superior al recubrimiento base, y con escasa diferencia en función de la proporción de sal añadida. En cuanto a la proteína ALBU, la adición de la sal de Sr provoca un aumento de la misma, no solo respecto al recubrimiento base, sino que también respecto al que solo contiene la sal de Ca.

En lo referente a los procesos de coagulación, la adición de la sal de Sr no muestra mucho cambio respecto al recubrimiento que lleva un 0.5 % de Ca para las proteínas activadoras THRB, FA9 y FA10, y para las reguladoras PROC y ANT3, estando todas ellas, tanto activadoras como reguladoras, en menor cantidad que en el recubrimiento base 7M:3T, siendo, además, los descensos significativos para FA10, ANT3 y PROC. Es más, FA9 y FA10, junto con la PROC, desaparecen casi por completo al adicionar las sales. Respecto a las otras proteínas relacionadas con la coagulación, la HEP2 aumenta proporcionalmente a la cantidad de sal que tienen los recubrimientos dopados. Por último, la F13B, aumenta claramente con la adición de Sr.

La abundancia normalizada de la HRG, relacionada con la fibrinólisis, aumenta con el porcentaje de sal añadido.

Lo mismo ocurre con la abundancia normalizada de la FINC, perteneciente al grupo de proteínas de adhesión celular, donde los valores aumentan claramente con el dopado de las sales.

Por último, el perfil de los gráficos en las proteínas ACTB, PRG4 y VTNC, relacionadas con la regeneración ósea, es similar, disminuyendo con la presencia de las sales, siendo significativo en todas las proporciones de la PRG4 y la VTNC, y en la menos dopada de la ACTB. En otras como PON1, FETUA y VTDB, sin embargo, la abundancia normalizada aumenta al añadir la sal de Sr a la formulación, siendo este incremento dependiente del porcentaje de sal añadido, aunque en muy pocos puntos ese aumento es significativo (1.5 % Sr en PON1, 0.5 % Sr en FETUA, y 0.5 % y 1.5 % Sr en VTDB).

El programa PANTHER ha permitido clasificar las proteínas identificadas en el análisis de proteómica, en base a sus funciones en las vías de señalización (Figura 5.20).

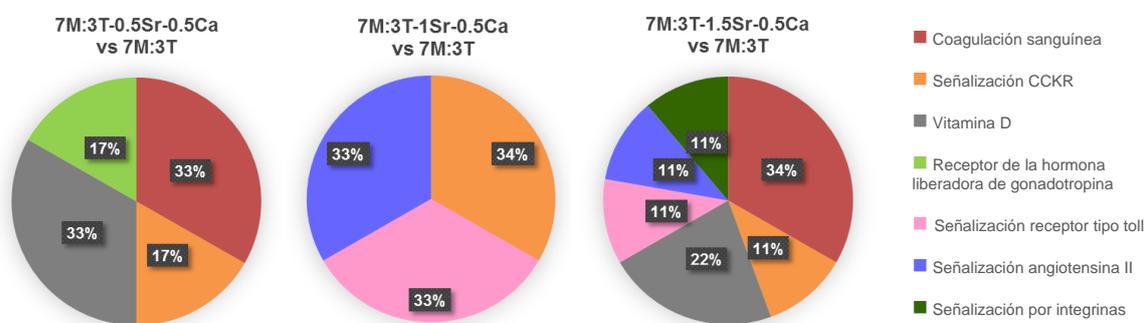


Figura 5.20. Análisis de funciones en vías de señalización mediante PANTHER.

Tal y como se puede observar en la figura 5.20, en la formulación con un 0.5 % de Sr y 0.5 % de Ca predominan la coagulación y la vía referida al metabolismo y la actividad de la vitamina D. Aparecen también, en un porcentaje menor, las vías de señalización CCKR y del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina. Para los recubrimientos dopados con un 1 % de Sr y 0.5 % de Ca desaparece la coagulación y se da un aumento de la actividad de señalización CCKR. Del mismo modo, aparecen otras 2 señalizaciones

con el mismo porcentaje: la del receptor tipo toll y la de la angiotensina II. Por último, en la formulación más dopada, vuelve a ser la coagulación la función prevalente (34 %).

Si se realiza el análisis de manera inversa, comparando el recubrimiento base con los sistemas dopados, se obtienen los siguientes resultados (Figura 5.21):

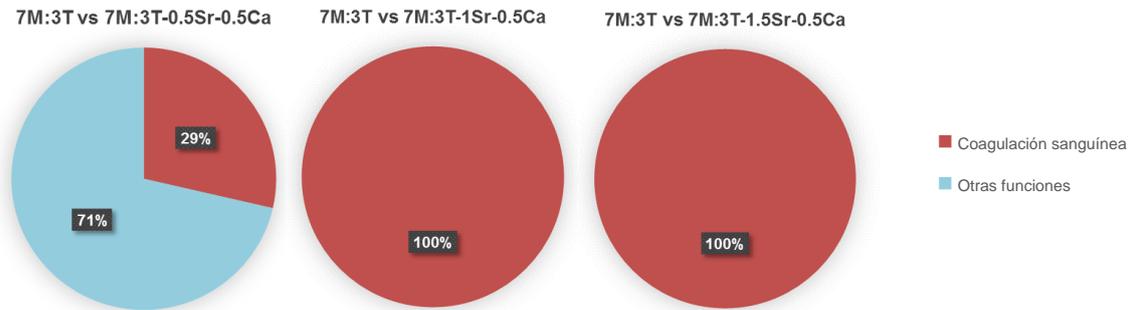


Figura 5.21. Análisis de funciones en vías de señalización mediante PANTHER.

Como se puede observar, la coagulación sanguínea es la única función que se expresa totalmente en el recubrimiento base respecto a los dos más dopados. Además, es la función mayoritaria (29 %) respecto a la formulación 7M:3T-0.5Sr-0.5Ca donde también aparecen las siguientes funciones: enfermedad de Huntington (14.3 %), señalización por cadherinas (7.1 %), señalización por integrinas (7.1 %), enfermedad Alzheimer - señalización presenilinas (7.1 %), inflamación mediada por quimiocinas y citocinas (7.1 %), señalización Wnt (7.1 %), glicólisis (7.1 %), regulación citoesquelética por Rho GTPasas (7.1 %) y señalización del receptor de acetilcolina de tipo nicotínico (7.1 %).

2.8. Caracterización biológica *in vitro*

2.8.1. Citotoxicidad

Dada la aplicación final de estos recubrimientos, se debe analizar si estos son citotóxicos. Para ello se han realizado ensayos de viabilidad celular con osteoblastos (MC3T3-E1) en contacto con los materiales desarrollados.

Los resultados de citotoxicidad para todos los recubrimientos sintetizados se muestran en la Figura 5.22.

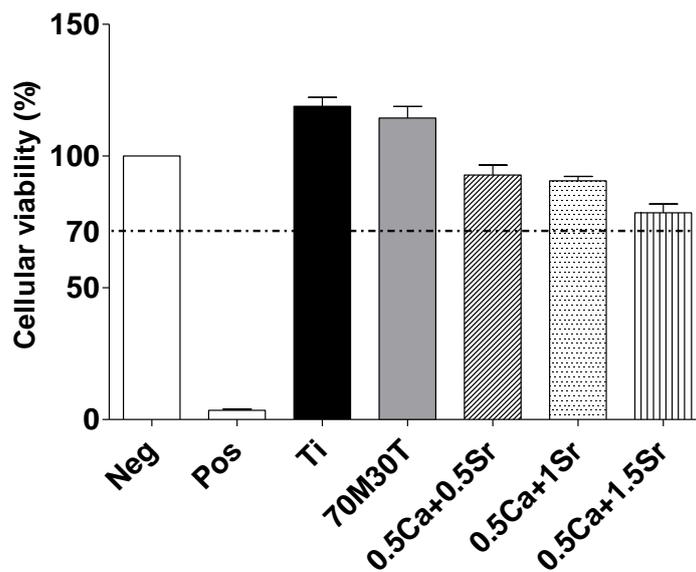


Figura 5.22. Estudio de la citotoxicidad del sistema 7M:3T + 0.5 % CaCl₂ + % SrCl₂.

En todas las formulaciones, tanto en la base como en las que incorporan las sales, se supera el valor del 70 % de viabilidad celular con respecto al control, por lo que se puede afirmar que ninguno de los materiales presenta citotoxicidad.

2.8.2. Proliferación celular

Los valores obtenidos para el ensayo de proliferación celular con osteoblastos MC3T3, para diferentes periodos de incubación, se muestran en la Figura 5.23.

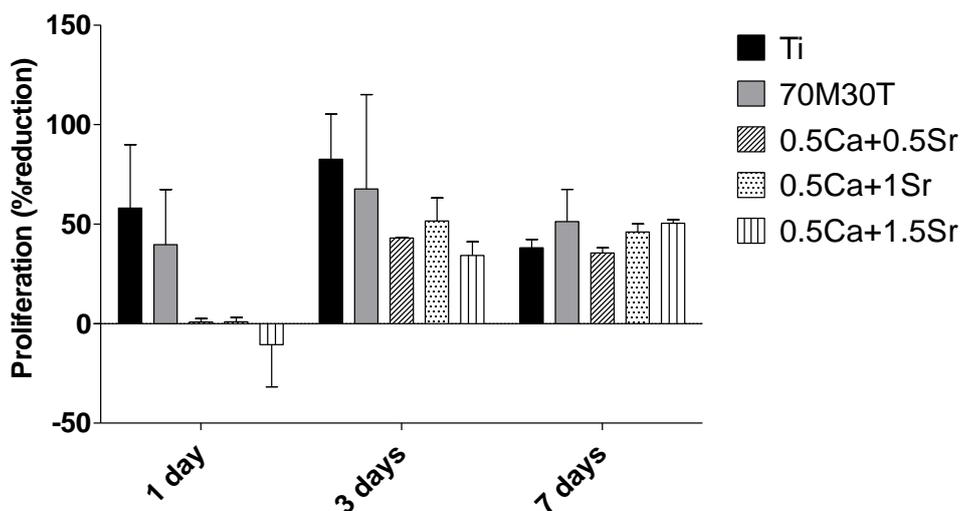


Figura 5.23. Valores de proliferación celular del sistema 7M:3T + 0.5 % CaCl₂ + % SrCl₂.

Como se puede observar en la figura 5.23, en el transcurso del ensayo se consiguen valores de proliferación muy similares, y sin diferencias significativas para todos ellos.

2.8.3. PCR

Las pruebas realizadas con PCR sobre las líneas celulares de osteoblastos y macrófagos, proporcionan información sobre la regeneración ósea y la inflamación, respectivamente. Las siguientes figuras muestran los resultados de dicha experimentación.

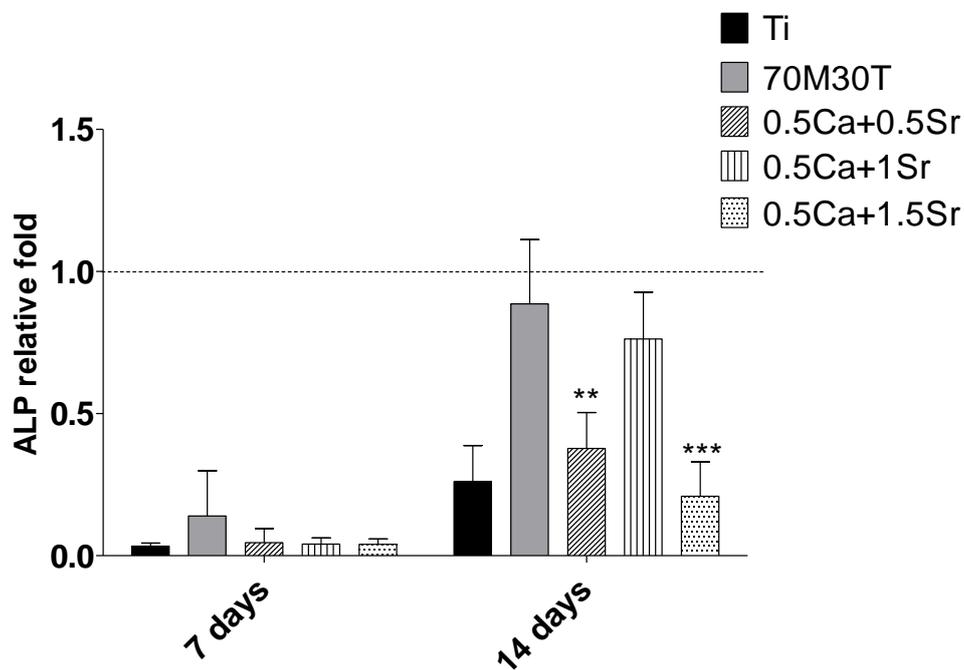


Figura 5.24. Expresión de genes de ALP para el sistema 7M:3T + 0.5 % CaCl₂ + % SrCl₂ (Osteoblastos: MC3T3).
(** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

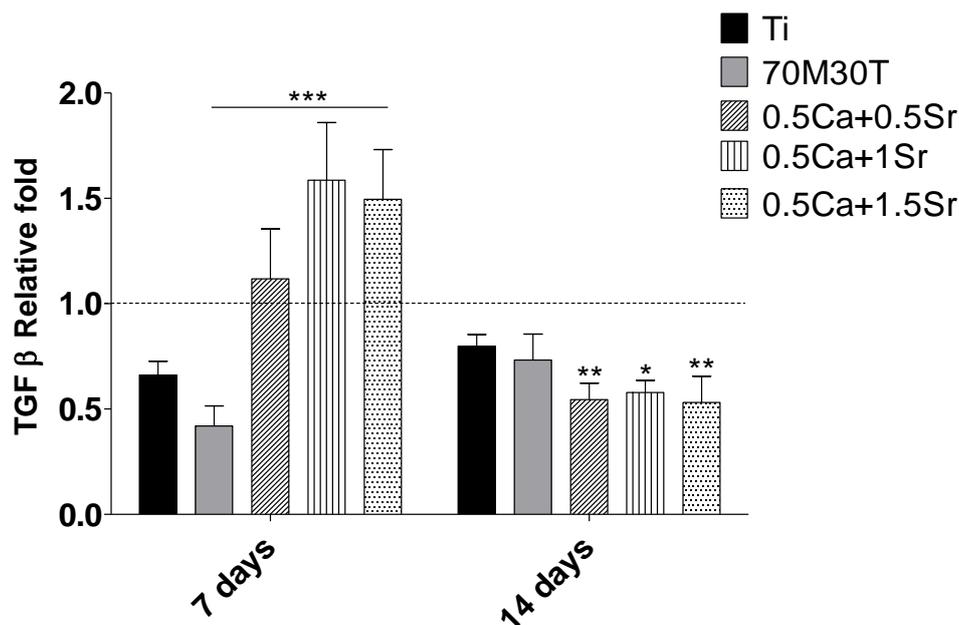


Figura 5.25. Expresión de genes de TGF- β para el sistema 7M:3T + 0.5 % CaCl₂ + % SrCl₂ (Osteoblastos: MC3T3). (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

Los valores observados en la Figura 5.24 muestran un carácter osteogénico para los recubrimientos base y dopados frente al Ti. Esto se comprueba, sobre todo, a dos semanas de ensayo donde los valores son mayores respecto al Ti control, excepto el sistema con mayor concentración de sales. En cambio, si se analiza el efecto de la mezcla de las sales en el recubrimiento base, se deduce que esta adición provoca una disminución del carácter osteogénico, con resultados estadísticamente significativos en los casos del 0.5 % y 1.5 % de Sr. Es el mismo comportamiento que tenía el recubrimiento con solo un 0.5 % de Ca (Figura 4.19).

En lo que a la expresión de genes de TGF- β con osteoblastos se refiere (Figura 5.25), hay una sobreexpresión de todos los recubrimientos dopados a 1 semana, tanto frente al base como al control. Sin embargo, a 14 días, esta tendencia se revierte y todos los recubrimientos modificados quedan por debajo de los valores del recubrimiento base. El recubrimiento 7M:3T-0.5Ca, por su parte, mostraba valores mayores que el base, a 7 y a 14 días (Figura 4.20).

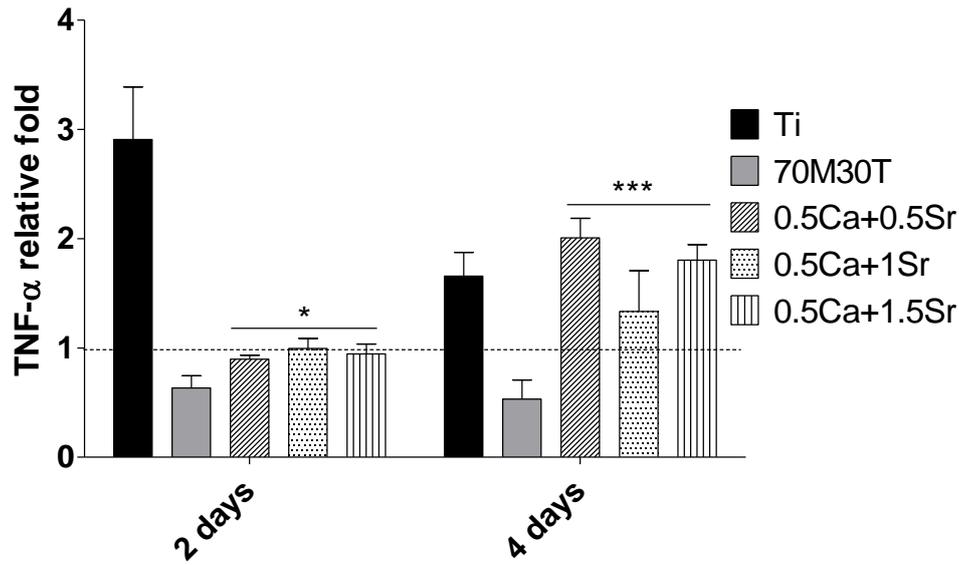


Figura 5.26. Expresión de genes de TNF- α para el sistema 7M:3T + 0.5 % CaCl₂ + % SrCl₂ (Macrófagos: RAW264.7). (* $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$)

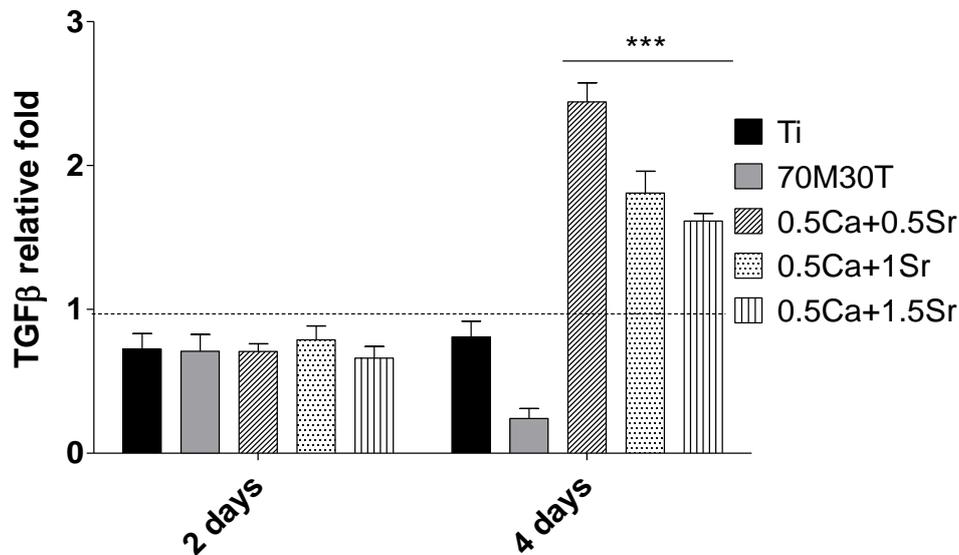


Figura 5.27. Expresión de genes de TGF- β para el sistema 7M:3T + 0.5 % CaCl₂ + % SrCl₂ (Macrófagos: RAW264.7). (***) $p \leq 0.001$)

Con respecto a los ensayos realizados con macrófagos, en la Figura 5.26 se puede comprobar que los valores de la expresión de genes de TNF- α sobre el Ti control son mayores que los de todos los recubrimientos sintetizados a dos días de ensayo. Esto quiere decir que los discos recubiertos causan una menor inflamación inicial. En cambio, a 4 días se observa que únicamente el recubrimiento base se mantiene en valores claramente

inferiores al Ti, siendo los valores de los recubrimientos dopados, cercanos a los del Ti y superiores de forma significativa al recubrimiento base. El recubrimiento con solo un 0.5 % de Ca (Figura 4.21) se comportaba de la misma manera.

Continuando con la línea de macrófagos, pero con la expresión de genes de TGF- β , en la Figura 5.27 se observa que claramente, a 4 días, un aumento estadísticamente significativo en todos los recubrimientos dopados, respecto al recubrimiento base y respecto al Ti. Esto se traduce en una mayor capacidad antiinflamatoria a menos de una semana. El recubrimiento 7M:3T-0.5Ca también mostraba valores mayores que el base, a 2 y a 4 días (Figura 4.22).

Por lo tanto, a 2 días de ensayo, a la vez que aumenta la concentración de sales, el marcador TNF- α , relacionado con la inflamación, es mayor respecto al recubrimiento base, pero no respecto al Ti control. En el gen TGF- β no se aprecian diferencias estadísticamente significativas. A 4 días, la inflamación aumenta respecto al recubrimiento base, pero no tanto respecto al Ti, y los valores de TGF- β de los recubrimientos dopados son bastantes más altos que los del 7M:3T y que los del Ti.

2.8.4. ELISA

Además de la información del material genético de las células proporcionada por las PCR, se han realizado diversos ensayos ELISA para obtener información de las proteínas expresadas por dichas células a su entorno.

La cuantificación de ALP detectada para cada uno de los materiales obtenidos tras doparlos con Ca y Sr se muestra en la Figura 5.28.

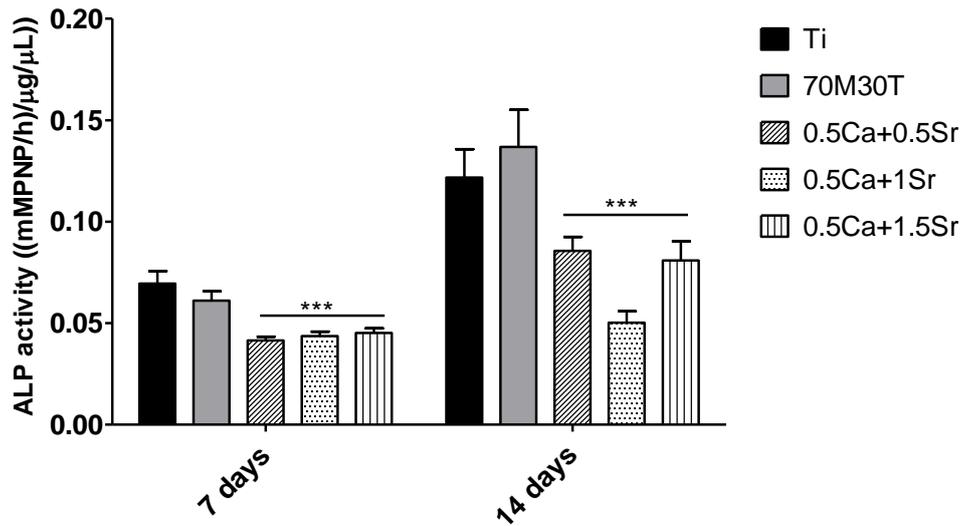


Figura 5.28. Actividad de la ALP del sistema 7M:3T + 0.5 % CaCl₂ + % SrCl₂. (***) $p \leq 0.001$

Todos los materiales han provocado una menor mineralización que el Ti y el recubrimiento 7M:3T tras 7 días de cultivo. A 14 días, todos los recubrimientos dopados muestran valores menores de ALP respecto al Ti control y al recubrimiento base.

Por otro lado, en la Figura 5.28 se puede observar la concentración de TNF- α determinada con un ensayo ELISA con macrófagos.

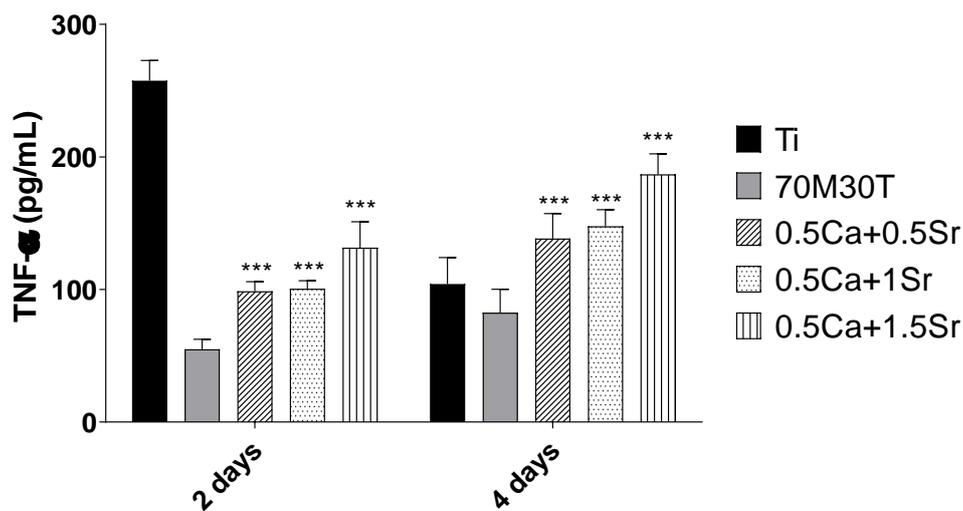


Figura 5.29. Resultados del ensayo ELISA para el sistema 7M:3T + 0.5 % CaCl₂ + % SrCl₂ (Macrófagos: RAW264.7). (***) $p \leq 0.001$

En la Figura 5.29 se observa que, a 2 días, todos los discos recubiertos causan menor inflamación que el Ti, aunque los recubrimientos dopados muestran valores mayores que los del 7M:3T. A 4 días de ensayo, el recubrimiento base continúa con valores algo más bajos que los del Ti control, pero en este caso la adición de la mezcla de sales provoca que los valores de TNF- α sean superiores a los del recubrimiento base y a los del Ti control. Además, cuanto mayor es la concentración de sal en el recubrimiento, mayor es la inflamación, a 2 y 4 días de ensayo. El recubrimiento 7M:3T-0.5Ca, por el contrario, mostraba valores menores que el base y el Ti, a 2 y a 4 días (Figura 4.24).

3. Discusión

El dopado de la red sol-gel con una mezcla de sales de Ca y Sr, hace que las características físico-químicas de la superficie del material presenten diversas variaciones frente al recubrimiento base y al dopado únicamente con 0.5% de Ca.

Se ha logrado sintetizar con éxito los nuevos materiales suplementados, obteniendo en todo el rango de composiciones, un film transparente, incoloro, brillante y homogéneo. Aun así, cuanto mayor es el porcentaje de sales introducido, se observan, a nivel microscópico, pequeñas grietas y porosidades. Además, van apareciendo precipitados producidos por la cristalización de las sales de Sr y/o Ca.

La incorporación de las sales ha provocado una alteración tanto de la humectabilidad como de la rugosidad de la superficie (Figuras 5.6 y 5.14). En este aspecto, el valor de Ra disminuye significativamente con la adición de la mezcla de sales, hecho que no ocurría al dopar solo con Ca. Además, este valor aumenta cuanto mayor es la cantidad de sal introducida, no llegando a superar el valor correspondiente al recubrimiento base. En cuanto al ángulo de contacto, los nuevos recubrimientos recuperan el carácter más hidrófobo del Ti, llegando a valores de 80°, superiores a los formulados con una única sal. Por lo tanto, estas modificaciones pueden afectar a las proteínas adheridas en la superficie y al comportamiento celular, esto es, al entorno en el que se desarrolla la reparación de los tejidos óseos.

Las técnicas FTIR/ATR y ^{29}Si -RMN han demostrado que el proceso de obtención de los recubrimientos es adecuado para todos los materiales, ya que la adición de las sales ha permitido la formación de la red tridimensional, para todas las concentraciones, al igual que sucede con las formulaciones con un solo tipo de sal. Así, los espectros IR de la Figura 5.8 muestran, por la identificación de los picos correspondientes, que se ha formado la red Si-O-Si, por lo tanto, las reacciones de condensación se han desarrollado correctamente. Igualmente, en los espectros de ^{29}Si -RMN de sólidos de la Figura 5.13 se observa la consecución de la red con una reticulación adecuada, donde las especies Q_3 y T_3 , de alto grado de condensación, son las que más destacan, aunque la compactación de la red es ligeramente menor a medida que aumenta el contenido en sales, tal y como se observa en la Tabla 5.1, siendo los valores más bajos que el correspondiente al recubrimiento 7M:3T-0.5Ca.

En cuanto a la degradación hidrolítica (Figura 5.15), los sistemas dopados muestran porcentajes de degradación mayores que el sistema base, y esta aumenta cuanto mayor es el porcentaje de sales incorporado al recubrimiento base, llegando a valores cercanos al 70 % a 56 días de ensayo, en la formulación más suplementada, mientras que en los capítulos anteriores los recubrimientos más dopados quedaban entre el 50 y 60 %. Este es el comportamiento esperado, habida cuenta del mayor peso del Sr y el mayor contenido en sal de la formulación más cargada de la mezcla (1.5 % de Sr + 0.5 % de Ca = 2 % de sal) que las de mayor contenido en una sola sal (1.5 % de sal). Este perfil es similar al de la liberación de Si que se ha medido por ICP-AES. Del mismo modo, la liberación de Sr es mayor cuanto mayor es la concentración de este en la formulación del recubrimiento (Figura 5.17). Se observa una liberación rápida en las 2 primeras horas del ensayo seguida de una estabilización hasta el final, alcanzando valores de 1.6 mg en el material más dopado. Este valor duplica al del recubrimiento únicamente dopado con Sr estudiado en el capítulo 3. En lo referente a la liberación del Ca, el perfil de esta vuelve a ser similar, con una rápida liberación inicial. La cantidad de este ion incorporada en todos los recubrimientos es la misma, 0.5 %, y se obtienen unos valores de liberación muy similares. En la Figura 5.18 se observa que la liberación del Ca ronda los 0.4 mg, valor que duplica el obtenido con el recubrimiento que incorpora únicamente 0.5 % de CaCl_2 , estudiado en el capítulo 4. La mayor liberación de iones, en ambos casos, se asocia a la menor reticulación de los recubrimientos dopados con las dos sales.

La cantidad de proteínas adheridas a la superficie de los recubrimientos está condicionada a las diferencias en las propiedades físico-químicas de los distintos materiales sintetizados. De la misma manera, gracias a los ensayos *in vitro* se pueden comprobar los cambios en el comportamiento de los osteoblastos y los macrófagos provocados por el dopado con estas dos sales de Ca y Sr.

La medida de viabilidad celular (Figura 5.22) muestra que el número de células viables sobre el material es superior al 70 % en todos los recubrimientos estudiados, por lo que ninguno de ellos es citotóxico. Igualmente, a una semana de ensayo (Figura 5.23), se favorece la adhesión y proliferación celular.

En los ensayos PCR, la expresión de genes de los marcadores osteogénicos ALP y TGF- β disminuye, al final del ensayo, para todas las formulaciones suplementadas respecto al sistema base 7M:3T (Figuras 5.24 y 5.25), mostrando una disminución del carácter osteogénico del recubrimiento. Solo son estadísticamente superiores los valores de TGF- β de los sistemas dopados a 1 semana. Esto no ocurría en las formulaciones con las sales por separado, donde los valores de TGF- β del recubrimiento con 0.5 % de Ca y los de todas las concentraciones de Sr, eran mayores que los del 7M:3T, incrementándose el carácter osteogénico. En el ensayo ELISA (Figura 5.28) se confirma esta tendencia en los recubrimientos que tienen las sales, donde la expresión de genes de ALP disminuye respecto al recubrimiento base. Del mismo modo, a 14 días, aunque la incorporación de Ca y Sr provoca un aumento de la actividad enzimática, los valores siguen siendo menores respecto al 7M:3T, agudizándose más la diferencia. En los ensayos ELISA con las sales por separado, la tendencia era similar.

Estos resultados parecen estar relacionados con los mecanismos celulares que desencadenan ambos cationes. Estos mecanismos están centrados, principalmente, alrededor del receptor sensor de Ca y su habilidad para mediar en las funciones celulares óseas y responder al Sr, a través de un mecanismo de actuación dual¹⁴. Se han encontrado diferentes efectos en la mineralización en cultivos con osteoblastos dependiendo de la concentración de Sr utilizada. Aunque en la mayoría de los casos la mineralización aumenta al añadir Sr²⁸, en otros no muestra efecto alguno²⁹ o incluso disminuye³⁰, como en este caso, donde la cantidad de Sr liberada ha ido aumentando mientras que la de Ca no varía. No hay que olvidar tampoco, que la relación Sr/Ca varía en las formulaciones,

lo que afecta a la concentración de iones disueltos en cada uno de los cultivos y, por tanto, a este mecanismo dual. Este comportamiento dependiente de las dosis de Sr y Ca también influye en la apoptosis celular. Tal y como dicen Marx *et al.*¹⁴, la combinación de Sr y Ca es capaz de estimular la apoptosis en mayor extensión que cada uno de los iones individualmente, lo que sugiere que actúan en diferentes cascadas celulares de señalización para potenciar la respuesta.

El estudio proteómico realizado es también testimonio de las diferentes respuestas provocadas por ambos cationes. Respecto a las proteínas relacionadas con la regeneración ósea, se ve una mayor adsorción de la PON1, FETUA y VTDB, y una menor afinidad de las proteínas ACTB, PRG4 y VTNC en los recubrimientos dopados. Las investigaciones realizadas señalan que un aumento de la ACTB, la PRG4, la VTNC y la VTDB sería un indicativo de incremento en la osteorregeneración. Así, Sen *et al.* mostraron que en las células madre mesenquimales, la ACTB regula la osteogénesis ya que induce la expresión de genes osteogénicos y de osteocalcina³¹. También añaden que la ACTB podría estar involucrada en el control de la osteogénesis a través de la regulación de la activación del RUNX2, un factor de transcripción clave asociado con la diferenciación de los osteoblastos. Del mismo modo, Novince *et al.* han demostrado en sus estudios *in vivo* con ratones, que la PRG4 tiene un papel importante en el desarrollo esquelético y la remodelación ósea³². Ruan *et al.* también han concluido que la PRG4 protege contra el desarrollo de la osteoartritis en modelos de ratón, tanto envejecidos como traumatizados³³. Igualmente, Leavesley, *et al.* proponen que la VTNC podría favorecer la diferenciación osteoblástica³⁴. Además, Rivera-Chacon *et al.* confirman que las superficies que adsorben más VTNC aumentan la adhesión y proliferación de osteoblastos y, por lo tanto, mejoran la osteoconducción³⁵. Asimismo, la VTDB está involucrada en el transporte y almacenamiento de vitamina D³⁶. Según Shah *et al.* la vitamina D promueve la mineralización ósea del esqueleto y de los dientes, y los mantiene adecuadamente³⁷. Los estudios *in vivo* de Kelly *et al.* han demostrado que la formación de hueso periimplantario es significativamente menor en ratas con deficiencia de vitamina D³⁸. Además, Dvorak *et al.* indicaron que la falta de vitamina D tiene un efecto indeseable sobre la formación ósea del hueso periimplantario cortical en ratas de laboratorio³⁹. Por el contrario, los hallazgos de Toptaş *et al.* sugieren un papel de la PON1 que confiere un mayor riesgo de osteoporosis, ya que reduce la densidad mineral ósea⁴⁰. De igual forma, Lee *et al.* afirman que la FETUA tiene un papel importante en la mineralización del

hueso⁴¹. Brylka *et al.* concluyeron en estudios *in vivo* con ratones que la FETUA regula la osificación mediante la inhibición de la mineralización⁴². Por lo tanto, este comportamiento en las proteínas adsorbidas indica una disminución de la osteogénesis.

La abundancia normalizada de las proteínas ACTB, PRG4 y VTNC disminuye respecto al recubrimiento base. Estos resultados se corresponden con la tendencia de las gráficas de ALP en los ensayos PCR y ELISA (Figuras 5.24 y 5.28), ya que tanto a 7 como a 14 días, existe un máximo en la actividad de ALP para el recubrimiento base, siendo menores los valores de los recubrimientos dopados. También en la expresión de genes de TGF- β con osteoblastos (Figura 5.25), a 14 días, los valores de los recubrimientos modificados son menores que los del recubrimiento 7M:3T. Además, la abundancia normalizada de la PON1 y de la FETUA aumenta, siendo estas negativas para la formación ósea. Por lo tanto, existe una disminución del carácter osteogénico y de la capacidad regeneradora del recubrimiento con la mezcla de sales respecto al 7M:3T. Para todas ellas, la tendencia en la abundancia normalizada se inicia con el 0.5 % de Ca, pero, sin duda alguna, la mezcla de las sales es la que determina que la osteogénesis disminuya.

Los distintos ensayos *in vitro* también dan una idea de la respuesta inflamatoria de los recubrimientos sintetizados a través de los marcadores inflamatorios expresados por los macrófagos. Existe una sobreexpresión del gen proinflamatorio TNF- α en todos los recubrimientos respecto al 7M:3T base, a 2 y 4 días de ensayo (Figura 5.26). Además, a 4 días la diferencia es todavía más significativa que a 2 días, por lo que la inflamación aumenta con el tiempo. No hay grandes variaciones entre los recubrimientos con diferentes grados de dopado. También es reseñable que los valores del gen TNF- α de las formulaciones 7M:3T-0.5Sr-0.5Ca y 7M:3T-1.5Sr-0.5Ca, a 4 días, son incluso mayores que los del Ti control. Por otro lado, la expresión de genes del TGF- β se mantiene igual, a 2 días, y aumenta, a 4 días, para todas las formulaciones dopadas en comparación al sistema base (Figura 5.27). Estos valores, al final del ensayo, van disminuyendo a medida que la concentración de sales aumenta. Esto no ocurre en los recubrimientos con una única sal, donde el balance de ambos marcadores indica una clara disminución de la inflamación, a 4 días respecto de la inflamación inicial. En el caso del ensayo ELISA con macrófagos también hay un aumento de los valores de TNF- α de las composiciones dopadas respecto a la base, tanto a 2 como a 4 días. Además, la adición de un mayor porcentaje de las sales provoca un aumento de la expresión inflamatoria, dándose un valor

máximo en la composición de 0.5 % de Ca y 1.5 % de Sr, a 4 días, incluso superando al valor correspondiente al Ti control (Figura 5.29). En el caso de los recubrimientos dopados con una sola sal, por el contrario, los valores de TNF- α son menores que los del sistema base al finalizar el ensayo, a 4 días, por lo que causan menor inflamación que el 7M:3T. Por lo tanto, es la mezcla de Ca y Sr la que establece este comportamiento, que no se daba ni en el recubrimiento con 0.5 % de Ca, ni en los dopados únicamente con Sr.

En el trabajo de Cardemil *et al.* observaron que los dos iones, el Sr y el Ca, tenían preferencias completamente diferentes para estimular citoquinas inflamatorias como TNF- α y la interleucina-6 (IL-6). Mientras que las partículas de Sr aumentaron significativamente la expresión de IL-6, las de Ca aumentaron, exclusivamente, la expresión de TNF- α ⁴³.

El análisis proteómico ha permitido detectar un grupo de proteínas relacionadas con el sistema del complemento. Algunas como CO4A, CO4B, CO8A, CO8G y CO9 forman parte de la activación de esta cascada de respuesta proinflamatoria⁴⁴. La CO4A y la CO4B son componentes no enzimáticos de las convertasas C3 y C5 y, por tanto, esenciales para la propagación de la vía clásica del complemento. Derivada de la degradación del complemento C4, la CO4A es mediadora del proceso inflamatorio local⁴⁵. La CO8A y la CO8G forman parte del MAC que juega un papel clave en la respuesta inmune innata⁴⁶. La CO8A se inserta en la membrana plasmática de las células diana, pero no forma poros por sí misma⁴⁷. La CO9 también es un componente del MAC siendo la subunidad formadora de poros⁴⁸.

Estas proteínas activadoras de la cascada del complemento experimentan un crecimiento de su abundancia normalizada con la presencia de las sales de Sr y Ca. Todas están presentes desde el inicio, en el recubrimiento base, y aumentan su abundancia normalizada en diferente medida.

Por otra parte, proteínas como la ALBU y la CLUS (que aumentan en su abundancia normalizada), pueden regular el proceso inflamatorio innato. Sin su regulación, una reacción inmune desproporcionada podría dar lugar a una inflamación crónica que supondría el fallo del implante⁴⁹. La presencia de proteínas adsorbidas como la ALBU puede modular la respuesta inflamatoria^{50,51}. La CLUS previene una excesiva

inflamación, mediante la regulación del complemento y la vía NF- κ B, y la reducción de la apoptosis y el estrés oxidativo^{52,53}.

También destaca la preferencia de la familia de las apolipoproteínas (APOF, APOA4, APOA1 y APOL1) por las superficies dopadas con las sales, aumentando, en todas, su abundancia normalizada. Estas proteínas podrían jugar, igualmente, un papel antiinflamatorio.

La adición de Ca y Sr también ha aumentado la afinidad en la adsorción de inmunoglobulinas como IGLL1 y IGHA1, aunque son más las que han disminuido: KV106, IGKC, IGLC6 e IGLL5. Todas ellas son activadoras del sistema inmune adaptativo.

Con todo, en general, la abundancia normalizada de las proteínas adsorbidas relacionadas con la activación de la inflamación se incrementa al introducir las sales a la formulación base. Del mismo modo, los valores correspondientes a las proteínas reguladoras decrecen con la suplementación. Comparando esta tendencia con los resultados obtenidos en los ensayos PCR, se puede concluir que el dopado de este material con Ca y Sr produce una inflamación que después aumenta con el tiempo. En el ensayo ELISA (Figura 5.29) la inflamación aumenta con el contenido de Ca y Sr, superando, en todo momento, al valor de la base y hasta el del Ti control, a 4 días. Por lo tanto, parece razonable afirmar que hay mayor respuesta inflamatoria.

La activación del complemento y su impacto en el biomaterial alcanza una alta complejidad como consecuencia de la interconexión existente entre este sistema y las cascadas tanto de coagulación como fibrinolítica⁵⁴, expuestas a continuación.

Son varias las proteínas identificadas relacionadas con el proceso de coagulación, importante para la regeneración ósea: THBR, FA9, FA10, PROC, ANT3, HEP2 y F13B. Dentro de la cascada de coagulación THRB, F13B, HEP2 y ANT3 pertenecen a la vía común y están al final de la cascada, PROC se encuentra en las vías común e intrínseca, FA10 se localiza al final de las vías intrínseca y extrínseca, y FA9 está al inicio y solo afecta a la vía intrínseca.

La THRB, también conocida como factor de coagulación II, puede desencadenar la coagulación de la sangre a través de su conversión en la proteasa trombina, activando la formación de plaquetas⁵⁵. La ANT3 regula la formación de trombina mediante la inhibición de FIIa y FXa⁵⁶. Igualmente, la PROC regula la vía de coagulación, inactivando los factores Va y VIIIa y, después, controlando la generación de trombina⁵⁷. FA10 desempeña un papel importante en esta vía ya que promueve la coagulación sanguínea⁵⁸. Este convierte la protrombina en trombina en presencia del factor Va, Ca²⁺ y fosfolípidos durante la coagulación de la sangre. FA9, por su parte, es una proteína plasmática, dependiente de la vitamina K, que participa convirtiendo el factor X en su forma activa, en presencia de iones Ca²⁺, fosfolípidos y el factor VIIIa⁵⁹. Todas estas proteínas están más presentes en la superficie del material base. Por otro lado, en cuanto a las que están en mayor cantidad en los recubrimientos dopados, la ALBU, además de su papel como inhibidora de la activación de la cascada del complemento, interactúa con la cascada de coagulación ya que se ha descrito como un inhibidor de la agregación plaquetaria y la trombosis⁶⁰. F13B es una subunidad del factor XIII que se encarga de reforzar las uniones de las cadenas de fibrina resultando en el incremento del reforzamiento de los coagulos⁶¹. La HEP2 regula la coagulación de la sangre inhibiendo la trombina⁶². Existe, por lo tanto, un efecto complejo donde la mezcla de iones activa la coagulación por la vía común haciendo decrecer significativamente las proteínas reguladoras ANT3 y PROC, mientras que aumenta significativamente la proteína F13B, activadora de la coagulación en la vía común, así como no altera el efecto provocado por la adición del 0.5 % de Ca, de disminución de la coagulación por las vías extrínseca e intrínseca (FA9 y FA10). Además, la THRB solo disminuye de forma estadísticamente significativa en una composición (7M:3T-0.5Sr-0.5Ca), mientras que la ANT3 decrece drásticamente en todas. Así pues, la coagulación parece aumentar por la vía común y disminuir por las vías intrínseca y extrínseca.

En lo referente a las proteínas relacionadas con la adhesión celular, la FINC es una proteína ampliamente descrita por estar involucrada en este proceso, así como en los procesos proliferativos^{63,64}. La FINC puede activar las integrinas $\alpha 5 \beta 1$ de las células a través del sitio de unión a integrinas RGD, un tripéptido formado por arginina, glicina y ácido aspártico⁶⁵. Igualmente, tal y como se ha comentado con anterioridad, algunas proteínas, además del papel descrito, pueden intervenir en otros procesos. Así, la VTNC, la PRG4 y la ACTB son biomarcadores de la adhesión celular. La VTNC se une a la

integrina $\alpha V\beta 3$, promoviendo la adhesión y la diseminación celular⁶⁶⁻⁶⁸. La PRG4 está relacionada con la adhesión celular y la matriz extracelular, importantes para la integración del implante³². Y la ACTB es un componente celular/citoplasmático de la adhesión y la unión celulares⁶⁹. Con todo, se podría decir que la adhesión celular aumenta ya que la abundancia de la FINC asciende claramente. La VTNC disminuye inicialmente con la adición del 0.5 % de Ca, aunque luego aumenta ligeramente con el Sr, siendo muy parecido a lo que pasa con la PRG4. En último lugar, la ACTB decrece.

Por otro lado, la HRG regula la fibrinólisis⁷⁰ interaccionando con el plasminógeno y el fibrinógeno⁷¹. Igualmente, la FINC interacciona con diversos componentes de la coagulación y fibrinólisis, ya que es capaz de unirse a colágeno, fibrinógeno, fibrina, heparina, factor XIII y plaquetas, entre otros, regulando procesos importantes como la adhesión y agregación plaquetarias, la remodelación de tejidos durante la cicatrización de una lesión, y la activación de la fibrinólisis mediada por los activadores del plasminógeno⁷². Por lo tanto, el aumento de las dos proteínas se traduce en una mejora de la fibrinólisis.

Por último, el análisis de funciones en vías de señalización mediante PANTHER, ofrece una visión general de la gran influencia de la presencia de sales en el recubrimiento que va a originar diversas respuestas celulares. Así, todas las proporciones tienen en común la vía de señalización CCKR que regula diferentes procesos celulares y promueve la angiogénesis⁷³. Las dos formulaciones más dopadas tienen también en común la señalización del receptor tipo toll, activador clave de la respuesta inmunológica⁷⁴, y la señalización por angiotensina II, que promueve la activación inflamatoria⁷⁵. Además, la vitamina D⁷⁶, cuya señalización celular está relacionada con el mantenimiento de la homeostasis de los iones Ca^{2+} , y la coagulación aparecen en las formulaciones con 0.5 % de Sr y con 1.5 % de Sr. Finalmente, la coagulación sanguínea es la función mayoritaria en el recubrimiento base respecto a los dopados.

4. Resumen

De lo expuesto anteriormente, se puede afirmar que las dos sales de SrCl₂ y CaCl₂ se han incorporado de manera satisfactoria en la red híbrida. Los recubrimientos desarrollados presentan buenas características superficiales y una buena adhesión al sustrato metálico.

Los recubrimientos presentan, igualmente, unas esperadas cinéticas de degradación hidrolítica y de liberación de Si, Ca y Sr, pudiendo ser moduladas mediante la incorporación de diferentes porcentajes de la sal de Sr y un porcentaje fijo de la sal de Ca. Igualmente, el perfil de degradación se corresponde al de liberación.

La incorporación de las dos sales al recubrimiento base ha modificado tanto la hidrofilia como la rugosidad de los materiales sintetizados. Por un lado, el dopado ha aumentado significativamente el valor del ángulo de contacto respecto al sistema base 7M:3T, llegando a valores superiores a los obtenidos con Ca únicamente. Por el otro, los valores de rugosidad de los recubrimientos dopados son significativamente menores que los del recubrimiento base, hecho que no ocurría al dopar solo con Ca, aumentando el valor de Ra cuanto mayor es la cantidad de Sr introducida.

Los estudios *in vitro* de osteoblastos y macrófagos de los sistemas que incorporan Ca y Sr, muestran un comportamiento que depende del porcentaje de sales añadido. En lo referente a la regeneración ósea, en las PCR con osteoblastos, los marcadores ALP y TGF-β, a 14 días, son menores para las formulaciones dopadas respecto al sistema base. En el ensayo ELISA de ALP se confirma esta tendencia donde la expresión de genes es menor respecto al recubrimiento base, en todas las mediciones. Estos resultados se corresponden con la tendencia de las gráficas de abundancia normalizada de las proteínas ACTB, PRG4 y VTNC, relacionadas con la regeneración ósea, ya que esta disminuye al dopar los recubrimientos. Así, podría decirse que la suplementación del sistema base con las sales reduce la capacidad regeneradora de los materiales. Esto es contrario a lo que ocurría en las formulaciones con las sales por separado, donde los ensayos *in vitro* y los estudios proteómicos mostraban que el carácter osteogénico se incrementaba.

Por otro lado, la inflamación aumenta respecto al sistema base en todos los recubrimientos dopados. En las PCR hay una sobreexpresión del gen TNF- α y un aumento en la expresión de genes del TGF- β , para todas las formulaciones dopadas en comparación al sistema base. En el ensayo ELISA, donde los valores del marcador inflamatorio TNF- α aumentan cuanto mayor es el contenido en sales, se confirma esta tendencia. La abundancia normalizada de las proteínas relacionadas con la activación de la inflamación, como CO4A, CO4B, CO8A, CO8G y CO9, se incrementa al introducir las sales de Ca y Sr. Esto hace que la presencia de las dos sales aumente la inflamación desde el principio, incrementándose con el tiempo. Este comportamiento no se observa al dopar los recubrimientos con las sales por separado.

En lo que a coagulación se refiere, las proteínas THBR, ANT3, FA9, FA10 y PROC, disminuyen con la incorporación de los iones, mientras que la HEP2 y la F13B aumentan. Podría decirse que la coagulación aumenta, debido a la disminución drástica de la ANT3 y al aumento de F13B, de la vía común, aunque es complejo de analizar porque disminuye la activación de esta función por las vías intrínseca y extrínseca. En los dos casos anteriores, el dopado exclusivamente con Ca o con Sr aumentaba claramente la función de la coagulación.

Respecto a las proteínas relacionadas con la adhesión celular, la FINC aumenta notoriamente con la adición de las sales. Los valores de la VTNC, la PRG4 y la ACTB, por el contrario, disminuyen significativamente. La mezcla de sales podría aumentar la adhesión celular por el incremento de la FINC, aunque no es significativo, y la adición del Sr al Ca también parece que aumenta ligeramente los valores de la VTNC y la PRG4. Solo en los recubrimientos con Ca aparece la VTNC, cuyos valores suben levemente.

En último lugar, la HRG, relacionada con la fibrinólisis, aparece en mayor cantidad en los materiales suplementados. Es el mismo patrón que se daba únicamente con Ca o con Sr.

Resumiendo, los resultados de proteómica y de expresión génica muestran que la adición simultánea de las dos sales de Sr y Ca, podría empeorar la osteogénesis, así como aumentar la coagulación y la inflamación. Los resultados de los cultivos celulares y la proteómica son coincidentes en cuanto a osteogénesis e inflamación se refiere. Con lo

cual, se puede decir que la adición de las sales no ha provocado un efecto sinérgico positivo respecto a la adición de las sales por separado.

Referencias

1. Tao, Z.-S. *et al.* A comparative study of zinc, magnesium, strontium-incorporated hydroxyapatite-coated titanium implants for osseointegration of osteopenic rats. *Mater. Sci. Eng. C* **62**, 226–232 (2016).
2. Li, Y. *et al.* The effect of strontium-substituted hydroxyapatite coating on implant fixation in ovariectomized rats. *Biomaterials* **31**, 9006–9014 (2010).
3. Yang, H.-W. *et al.* Osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells on strontium-substituted nano-hydroxyapatite coated roughened titanium surfaces. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 257–264 (2015).
4. López-Valverde, N. *et al.* Bioactive surfaces vs. conventional surfaces in titanium dental implants: a comparative systematic review. *J. Clin. Med.* **9**, 2047 (2020).
5. Wheeler, S. L. Eight-year clinical retrospective study of titanium plasma-sprayed and hydroxyapatite-coated cylinder implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **11**, (1996).
6. Qadir, M., Li, Y. & Wen, C. Ion-substituted calcium phosphate coatings by physical vapor deposition magnetron sputtering for biomedical applications: A review. *Acta Biomater.* **89**, 14–32 (2019).
7. Wang, W. & Yeung, K. W. K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact. Mater.* **2**, 224–247 (2017).
8. Habibovic, P. & Barralet, J. E. Bioinorganics and biomaterials: bone repair. *Acta Biomater.* **7**, 3013–3026 (2011).
9. Jiménez, M., Abradelo, C., San Román, J. & Rojo, L. Bibliographic review on the state of the art of strontium and zinc based regenerative therapies. Recent developments and clinical applications. *J. Mater. Chem. B* **7**, 1974–1985 (2019).
10. O'Neill, E., Awale, G., Daneshmandi, L., Umerah, O. & Lo, K. W.-H. The roles of ions on bone regeneration. *Drug Discov. Today* **23**, 879–890 (2018).
11. Yu, Y. *et al.* Multifunctions of dual Zn/Mg ion co-implanted titanium on osteogenesis, angiogenesis and bacteria inhibition for dental implants. *Acta Biomater.* **49**, 590–603 (2017).
12. Mao, L. *et al.* The synergistic effects of Sr and Si bioactive ions on osteogenesis, osteoclastogenesis and angiogenesis for osteoporotic bone regeneration. *Acta Biomater.* **61**, 217–232 (2017).
13. Chattopadhyay, N., Quinn, S. J., Kifor, O., Ye, C. & Brown, E. M. The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast proliferation. *Biochem. Pharmacol.* **74**, 438–447 (2007).
14. Marx, D., Yazdi, A. R., Papini, M. & Towler, M. A review of the latest insights into the mechanism of action of strontium in bone. *Bone reports* 100273 (2020).
15. Almeida, J. C. *et al.* A biocompatible hybrid material with simultaneous calcium and strontium release capability for bone tissue repair. *Mater. Sci. Eng. C* **62**, 429–438 (2016).
16. Li, Y. *et al.* Strontium ranelate treatment enhances hydroxyapatite-coated titanium screws fixation in osteoporotic rats. *J. Orthop. Res.* **28**, 578–582 (2010).

17. Ammann, P., Badoud, I., Barraud, S., Dayer, R. & Rizzoli, R. Strontium ranelate treatment improves trabecular and cortical intrinsic bone tissue quality, a determinant of bone strength. *J. Bone Miner. Res.* **22**, 1419–1425 (2007).
18. Marie, P. J. Strontium ranelate: a dual mode of action rebalancing bone turnover in favour of bone formation. *Curr. Opin. Rheumatol.* **18**, S11–S15 (2006).
19. Li, Y. *et al.* Effects of strontium on proliferation and differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **418**, 725–730 (2012).
20. Yuan, X. *et al.* Immunomodulatory effects of calcium and strontium co-doped titanium oxides on osteogenesis. *Front. Immunol.* **8**, 1196 (2017).
21. Phan, T. T., Bentiss, F. & Jama, C. Effects of sol–gel process parameters on the anticorrosive performance of phosphosilicate hybrid coatings for carbon steel: structural and electrochemical studies. *New J. Chem.* **42**, 13442–13452 (2018).
22. Zaharescu, M., Jitianu, A., Braileanu, A., Madarász, J. & Pokol, G. Ageing effect on the SiO₂-based inorganic-organic hybrid materials. *J. Therm. Anal. Calorim.* **64**, 689–696 (2001).
23. Yang, Y. Q., Liu, L., Hu, J. M., Zhang, J. Q. & Cao, C. N. Improved barrier performance of metal alkoxide-modified methyltrimethoxysilane films. *Thin Solid Films* **520**, 2052–2059 (2012).
24. Zheng, D., Cui, H., Tang, W., Sang, G. & Lo, T. Y. Influence and mechanisms of active silica in solid waste on hydration of tricalcium aluminate in the resulting composite cement. *Mater. Today Commun.* **27**, 102262 (2021).
25. Manso-Silvan, M. *et al.* Hybrid titania–aminosilane platforms evaluated with human mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. An Off. J. Soc. Biomater. Japanese Soc. Biomater. Aust. Soc. Biomater. Korean Soc. Biomater.* **83**, 232–239 (2007).
26. Zolkov, C., Avnir, D. & Armon, R. Tissue-derived cell growth on hybrid sol-gel films. *J. Mater. Chem.* **14**, 2200–2205 (2004).
27. Yan, S., Yin, J., Cui, L., Yang, Y. & Chen, X. Apatite-forming ability of bioactive poly (l-lactic acid)/grafted silica nanocomposites in simulated body fluid. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **86**, 218–224 (2011).
28. Rybchyn, M. S., Slater, M., Conigrave, A. D. & Mason, R. S. An Akt-dependent increase in canonical Wnt signaling and a decrease in sclerostin protein levels are involved in strontium ranelate-induced osteogenic effects in human osteoblasts. *J. Biol. Chem.* **286**, 23771–23779 (2011).
29. Barbara, A., Delannoy, P., Denis, B. G. & Marie, P. J. Normal matrix mineralization induced by strontium ranelate in MC3T3-E1 osteogenic cells. *Metabolism* **53**, 532–537 (2004).
30. Wornham, D. P., Hajjawi, M. O., Orriss, I. R. & Arnett, T. R. Strontium potently inhibits mineralisation in bone-forming primary rat osteoblast cultures and reduces numbers of osteoclasts in mouse marrow cultures. *Osteoporos. Int.* **25**, 2477–2484 (2014).
31. Sen, B. *et al.* Intranuclear actin regulates osteogenesis. *Stem Cells* **33**, 3065–3076 (2015).
32. Novince, C. M. *et al.* Proteoglycan 4: a dynamic regulator of skeletogenesis and parathyroid hormone skeletal anabolism. *J. Bone Miner. Res.* **27**, 11–25 (2012).

33. Ruan, M. Z. C. *et al.* Proteoglycan 4 expression protects against the development of osteoarthritis. *Sci. Transl. Med.* **5**, 176ra34-176ra34 (2013).
34. Leavesley, D. I. *et al.* Vitronectin—Master controller or micromanager? *IUBMB Life* **65**, 807–818 (2013).
35. Rivera-Chacon, D. M. *et al.* Fibronectin and vitronectin promote human fetal osteoblast cell attachment and proliferation on nanoporous titanium surfaces. *J. Biomed. Nanotechnol.* **9**, 1092–1097 (2013).
36. Nagasawa, H. *et al.* Gc protein (vitamin D-binding protein): Gc genotyping and GcMAF precursor activity. *Anticancer Res.* **25**, 3689–3695 (2005).
37. Shah, K., Mestry, J., Rangnekar, S. & Gupta, S. The Role and Importance of Lipoproteins, Vitamin D3, Vitamin K and Magnesium in the Osseointegration of Titanium Dental Implants. *IOSR J. Dent. Med. Sci.* **20**, 11–16 (2021).
38. Kelly, J., Lin, A., Wang, C. J., Park, S. & Nishimura, I. Vitamin D and bone physiology: demonstration of vitamin D deficiency in an implant osseointegration rat model. *J. Prosthodont. Implant. Esthet. Reconstr. Dent.* **18**, 473–478 (2009).
39. Dvorak, G. *et al.* Impact of dietary vitamin D on osseointegration in the ovariectomized rat. *Clin. Oral Implants Res.* **23**, 1308–1313 (2012).
40. Toptaş, B. *et al.* Investigation of the common paraoxonase 1 variants with paraoxonase activity on bone fragility in Turkish patients. *Mol. Biol. Rep.* **40**, 6519–6524 (2013).
41. Lee, C.-C., Bowman, B. H. & Yang, F. M. Human alpha 2-HS-glycoprotein: the A and B chains with a connecting sequence are encoded by a single mRNA transcript. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 4403–4407 (1987).
42. Brylka, L. & Jahnen-Dechent, W. The role of fetuin-A in physiological and pathological mineralization. *Calcif. Tissue Int.* **93**, 355–364 (2013).
43. Cardemil, C. *et al.* Strontium-doped calcium phosphate and hydroxyapatite granules promote different inflammatory and bone remodelling responses in normal and ovariectomised rats. *PLoS One* **8**, e84932 (2013).
44. Araújo-Gomes, N. *et al.* Complement proteins regulating macrophage polarisation on biomaterials. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **181**, 125–133 (2019).
45. Gullstrand, B., Mårtensson, U., Sturfelt, G., Bengtsson, A. A. & Truedsson, L. Complement classical pathway components are all important in clearance of apoptotic and secondary necrotic cells. *Clin. Exp. Immunol.* **156**, 303–311 (2009).
46. Steckel, E. W., York, R. G., Monahan, J. B. & Sodetz, J. M. The eighth component of human complement. Purification and physicochemical characterization of its unusual subunit structure. *J. Biol. Chem.* **255**, 11997–12005 (1980).
47. Hadders, M. A., Beringer, D. X. & Gros, P. Structure of C8 α -MACPF reveals mechanism of membrane attack in complement immune defense. *Science (80-.)*. **317**, 1552–1554 (2007).
48. Spicer, B. A. *et al.* The first transmembrane region of complement component-9 acts as a brake on its self-assembly. *Nat. Commun.* **9**, 1–7 (2018).
49. Vishwakarma, A. *et al.* Engineering immunomodulatory biomaterials to tune the inflammatory response. *Trends Biotechnol.* **34**, 470–482 (2016).

50. Don, B. R. & Kaysen, G. Poor nutritional status and inflammation: serum albumin: relationship to inflammation and nutrition. in *Seminars in dialysis* vol. 17 432–437 (Wiley Online Library, 2004).
51. Ishida, S. *et al.* Serum albumin levels correlate with inflammation rather than nutrition supply in burns patients: a retrospective study. *J. Med. Investig.* **61**, 361–368 (2014).
52. Wu, Z.-C., Yu, J.-T., Li, Y. & Tan, L. Clusterin in Alzheimer's disease. *Adv. Clin. Chem.* **56**, 155 (2012).
53. Falgarone, G. & Chiocchia, G. Clusterin: A multifacet protein at the crossroad of inflammation and autoimmunity. *Adv. Cancer Res.* **104**, 139–170 (2009).
54. Oikonomopoulou, K., Ricklin, D., Ward, P. A. & Lambris, J. D. Interactions between coagulation and complement—their role in inflammation. in *Seminars in immunopathology* vol. 34 151–165 (Springer, 2012).
55. Pozzi, N. & Di Cera, E. Prothrombin structure: unanticipated features and opportunities. (2014).
56. Furie, B. & Furie, B. C. Mechanisms of thrombus formation. *N. Engl. J. Med.* **359**, 938–949 (2008).
57. Suleiman, L., Négrier, C. & Boukerche, H. Protein S: A multifunctional anticoagulant vitamin K-dependent protein at the crossroads of coagulation, inflammation, angiogenesis, and cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **88**, 637–654 (2013).
58. Araújo-Gomes, N. *et al.* Osseointegration mechanisms: a proteomic approach. *J. Biol. Inorg. Chem.* **23**, 459–470 (2018).
59. Wang, S. *et al.* Studies of benzothiophene template as potent factor IXa (FIXa) inhibitors in thrombosis. *J. Med. Chem.* **53**, 1465–1472 (2010).
60. Lam, F. W. *et al.* Histone induced platelet aggregation is inhibited by normal albumin. *Thromb. Res.* **132**, 69–76 (2013).
61. Muszbek, L., Bereczky, Z., Bagoly, Z., Komáromi, I. & Katona, É. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol. Rev.* **91**, 931–972 (2011).
62. Van Deerlin, V. M. & Tollefsen, D. M. The N-terminal acidic domain of heparin cofactor II mediates the inhibition of alpha-thrombin in the presence of glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* **266**, 20223–20231 (1991).
63. Sottile, J., Hocking, D. C. & Swiatek, P. J. Fibronectin matrix assembly enhances adhesion-dependent cell growth. *J. Cell Sci.* **111**, 2933–2943 (1998).
64. Ruoslahti, E. Fibronectin in cell adhesion and invasion. *Cancer metastasis Rev.* **3**, 43–51 (1984).
65. Barberi, J. & Spriano, S. Titanium and Protein Adsorption: An Overview of Mechanisms and Effects of Surface Features. *Materials (Basel)*. **14**, 1590 (2021).
66. Di Benedetto, A. *et al.* Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from dental bud: role of integrins and cadherins. *Stem Cell Res.* **15**, 618–628 (2015).
67. Kundu, A. K. & Putnam, A. J. Vitronectin and collagen I differentially regulate osteogenesis in mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **347**, 347–357 (2006).
68. Salaszyk, R. M., Williams, W. A., Boskey, A., Batorsky, A. & Plopper, G. E. Adhesion to vitronectin and collagen I promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Biotechnol.* **2004**, (2004).

69. Baranwal, S. *et al.* Nonredundant roles of cytoplasmic β - and γ -actin isoforms in regulation of epithelial apical junctions. *Mol. Biol. Cell* **23**, 3542–3553 (2012).
70. Jones, A. L., Hulett, M. D. & Parish, C. R. Histidine-rich glycoprotein: A novel adaptor protein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation systems. *Immunol. Cell Biol.* **83**, 106–118 (2005).
71. Wakabayashi, S. & Koide, T. Histidine-rich glycoprotein: a possible modulator of coagulation and fibrinolysis. in *Seminars in thrombosis and hemostasis* vol. 37 389–394 (© Thieme Medical Publishers, 2011).
72. Lucena, S., Piñango, C. L. A. & Guerrero, B. Fibronectin. Structure and functions associated to hemostasis. Review. *Invest. Clin.* **48**, 249–262 (2007).
73. Willard, M. D. *et al.* Somatic mutations in CCK2R alter receptor activity that promote oncogenic phenotypes. *Mol. Cancer Res.* **10**, 739–749 (2012).
74. Parham, P. The immune system. in 624 (Garland Science, 2014).
75. Forrester, S. J. *et al.* Angiotensin II signal transduction: an update on mechanisms of physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* **98**, 1627–1738 (2018).
76. Sirajudeen, S., Shah, I. & Al Menhali, A. A narrative role of vitamin D and its receptor: with current evidence on the gastric tissues. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 3832 (2019).

Capítulo 6.

Evaluación biológica

in vivo

1. Introducción

La última fase de este trabajo consiste en la evaluación *in vivo* de los recubrimientos sol-gel sintetizados. Si bien es cierto que la evaluación biológica *in vitro* brinda información sobre la interacción célula/biomaterial, esta no es suficiente para caracterizar un material que va a ser utilizado en un implante, ya que se trata de un modelo bidimensional en el que no existe una organización estructural, y con ello la mayoría de las interacciones celulares heterotípicas específicas y características de la histología del tejido, así como las funciones bioquímicas asociadas a esta. Los cultivos celulares también carecen de los componentes sistémicos responsables de la regulación homeostática del organismo *in vivo*, como son el sistema endocrino y nervioso. Sin este control, el metabolismo desarrollado *in vitro* será más constante que aquel desarrollado *in vivo*, pero no será totalmente representativo del tejido del cual deriva. Así, el estudio *in vivo* es clave para saber cómo se va a comportar el material en un medio más complejo que el entorno celular, y además más parecido a un organismo humano. Por lo tanto, la evaluación *in vivo* ha de realizarse para cualquier material que vaya a formar parte de un dispositivo implantable, tal y como contempla la norma ISO 10993-6.

Los modelos animales permiten la evaluación de los materiales en situación de carga y descarga durante tiempos prolongados, en estados de salud o enfermedad de los tejidos y a diferentes edades. Además, permiten no solo estudiar el efecto de los implantes en su periferia, sino también en las zonas más alejadas del mismo, así como en el estado de salud general del organismo. Aunque los modelos animales pueden simular la situación fisiológica y mecánica clínica en humanos, hay que recordar que es tan solo una aproximación, ya que cada modelo animal tiene unas ventajas y desventajas únicas¹.

En general, al elegir cualquier modelo animal, se debe considerar el tamaño y la naturaleza del implante, las diferencias fisiológicas y anatómicas en la cicatrización de heridas entre el modelo y el ser humano, la ética de la experimentación animal, así como ciertos aspectos pragmáticos, tales como costos y requisitos de la instalación². Los ensayos con implantes dentales utilizan un modelo reproducible donde las dimensiones del implante puedan compararse con las utilizadas en humanos. Igualmente, la elección

de la especie animal está condicionada por el número y tamaño de los implantes a ensayar³.

Los estándares internacionales establecidos con respecto a las especies animales para realizar la implantación de materiales en el hueso establecen que los perros, las ovejas, las cabras, los cerdos y los conejos son adecuados⁴. La especie animal no primate más similar en estructura ósea a los humanos es el perro. Sin embargo, hay cada vez más problemas éticos relacionados con el uso de estos en la investigación médica debido a su estatus como animales de compañía³. El conejo es uno de los modelos animales más utilizados para la investigación ósea⁵. Existen similitudes en la densidad y la tenacidad a la fractura ósea entre estos y los humanos⁶. Además, en comparación con otras especies, como los primates o algunos roedores, los conejos tienen una regeneración ósea más rápida⁷ y alcanzan la madurez ósea poco después de la madurez sexual, alrededor de los seis meses de edad¹. Además, los conejos son fáciles de conseguir, alojar y manipular⁸. Todas estas características hacen que los conejos sean la primera opción para los ensayos *in vivo* de materiales implantables, antes de ser testados en modelos animales superiores.

Los modelos de osteointegración en tibia⁹⁻¹² y en cóndilo femoral¹³⁻¹⁵ de conejo son modelos ampliamente empleados para la evaluación biológica de recubrimientos de implantes dentales. La tibia de conejo se usa como modelo de implantación en mandíbula porque contiene más hueso cortical, y el cóndilo femoral se utiliza como modelo de implantación en el maxilar por su mayor cantidad de hueso trabecular¹⁶.

Así, se seleccionó como animal de experimentación para la colocación quirúrgica de los implantes dentales a conejos blancos de Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*), con el fin de evaluar la biocompatibilidad *in vivo*, la capacidad de osteointegración de los recubrimientos seleccionados y la degradación *in vivo* de los nuevos recubrimientos sol-gel desarrollados. Esta raza es la más utilizada en investigación con fines científicos ya que es poco agresiva y tiene mejor salud comparada con otro tipo de conejos⁴. Los modelos animales utilizados fueron tibia y cóndilo, realizándose, por tanto, dos experimentaciones *in vivo*. Los estudios han cumplido con las condiciones éticas y legales de trabajo establecidas en el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia (BOE 8-2-2013). Esta

implantación la ha realizado el grupo liderado por Fernando Muñoz, en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela, campus de Lugo.

Así, el objetivo de este capítulo es mostrar los resultados de la implantación *in vivo*, para determinar el grado de biocompatibilidad y de osteointegración de cada uno de los recubrimientos desarrollados, en las dos experimentaciones realizadas (Figura 6.1):

- a) Implantación en tibia de conejo.
- b) Implantación en cóndilo femoral de conejo.

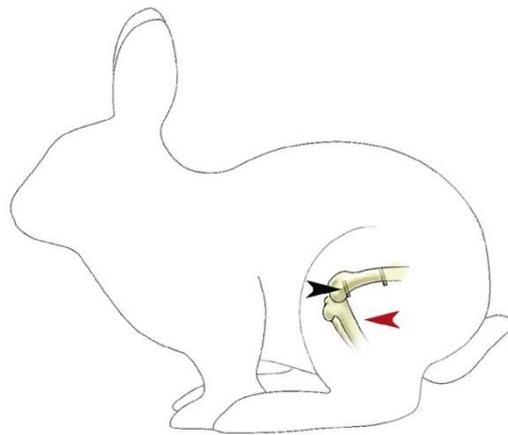


Figura 6.1. Dibujo esquemático que muestra la implantación en la tibia (flecha roja) y en el cóndilo (flecha negra). Adaptado de Cheng et al.¹⁷

2. Materiales y métodos

2.1. Implantación en tibia

En esta fase experimental fueron utilizados un total de 8 conejos blancos hembras de Nueva Zelanda con un peso aproximado de 4.5 kg. Al inicio del estudio tenían una edad de 16 semanas. Las fases posteriores fueron: castración (19 semanas), inicio de tratamiento con corticoides (21 semanas), colocación de implantes (25 semanas) y sacrificio (28 semanas).

Se realizó la ovariectomía por línea alba, con el fin de simular un modelo de hueso osteoporótico. Para ello, los animales se anestesiaron mediante administración

intramuscular (IM) de 1.25 mL de ketamina, 0.3 mL de medetomidina y 0.5 mL de buprenorfina. La monitorización anestésica se hizo mediante monitorización electrocardiográfica (ECG). Las ligaduras de ovarios se hicieron con poliglecaprona 2/0 y 3/0 para tejido celular subcutáneo y piel.

En el postoperatorio se observó incomodidad en los animales (se movían menos), por lo que se les administró por vía subcutánea (SC) 0.3 mL de meloxicam y enrofloxacino en agua de bebida (1 mL/L).

Para el tratamiento con corticoides se administró 1 mg/kg de metilprednisolona IM cada día durante 4 semanas, aunque en la última se decidió hacer una pauta de reducción de corticoides pasando a la administración de metilprednisolona cada 48 h. Se utilizó Urbason 250 mg/5mL y se administraron 0.09 mL por cada animal y día.

Para la cirugía de colocación de mini implantes los animales se sedaron con inyección IM de 1.25 mL de ketamina, 0.25 mL de medetomidina y 0.5 mL de buprenorfina. La anestesia se mantuvo por inhalación de isoflurano por mascarilla. Se implantaron dos prótesis radiculares por tibia, interviniéndose ambas patas (Figura 6.2). Se realizó una incisión, en la cara medial de la tibia, de 20 mm desde el extremo distal de la tuberosidad tibial. Se disecó el tejido subcutáneo, se seccionó la fascia muscular, se rebatió el músculo flexor largo común de los dedos, se expuso la zona de perforación y se desperiostizó. La perforación se realizó con varios kits quirúrgicos esterilizables y un micromotor de bajas revoluciones con irrigación continua automática de suero fisiológico. La secuencia de fresado comenzó con el marcaje de una pequeña señal hecha a mano con la fresa lanceolada. Después se procedió a la primera perforación con la misma fresa, seguida de una fresa piloto y tras ésta una fresa guía, que permite que la serie siguiente de fresas de diámetro creciente (de 2.8, 3.0 y 3.5 mm) entren perpendiculares a la cortical. Finalmente, la avellanadora permitió dar al defecto la forma necesaria para alojar el implante. Una vez creado el defecto, se insertaron las prótesis manualmente con la llave de carraca dinamométrica. Finalmente, se procedió al cierre de la herida suturando por planos.



Figura 6.2. Implantación en tibia de conejo.

Tras la intervención quirúrgica, se administró atipamezol (0.15 mL IM) y a partir del día siguiente se comenzó a administrar terapia antibiótica con enrofloxacino durante 3 semanas en el agua de bebida.

Trascurrido el periodo de ensayo, los animales fueron eutanasiados mediante 5 mL de pentobarbital por vía intravenosa, tras sedación con 1.5 mL de ketamina y 0.5 mL de medetomidina. Después de comprobar la ausencia de signos vitales, la región proximal de la tibia se limpió de tejidos blandos y se realizó una osteotomía de disección, con mini sierra circular, a una distancia de 5 mm a ambos lados del implante.

En la Tabla 6.1 se muestran las formulaciones con las que fueron recubiertos los mini implantes de titanio cpTi, grado IV, utilizados en este ensayo. Estos se fabricaron expresamente por GMI-Ilerimplant S.L. para este estudio, con unas medidas de 3 mm y 2 mm de diámetro en la cabeza y en el cuerpo, respectivamente, por 4 mm de longitud. Tal y como se ha explicado en el capítulo 2, se sometieron a un pretratamiento superficial que le otorga una rugosidad heterogénea al combinar un granallado de corindón blanco con un ataque ácido.

Tabla 6.1. Códigos de las muestras implantadas en tibia.

Material	Muestras
Ti control	T1RP, T2LP, T3RD, T4LD, T5RP, T6LP, T7RD, T8LD
7M:3T-0.5Sr	T1LP, T2RP, T3LD, T4RD, T5LP, T6RP, T7LD, T8RD
7M:3T-0.5Ca	T1RD, T2LD, T3LP, T4RP, T5RD, T6LD, T7LP, T8RP

Las muestras fueron codificadas con un número y tres letras. La primera letra (T) indica la implantación en tibia, el número se refiere al animal (de 1 a 8), la segunda letra expresa el lado de la tibia: derecho (R) o izquierdo (L), y la tercera letra si es el implante de la zona distal (D) o proximal (P).

2.2. Implantación en cóndilo femoral

Se utilizaron doce conejos blancos machos de Nueva Zelanda, de 23 semanas de edad y un peso aproximado de 4.5 kg, suministrados por una granja acreditada por AAALAC International (Granja cunícola San Bernardo SL, Tulebras, Navarra). Los animales fueron alojados en jaulas individuales, en el Animalario Experimental del Campus de Lugo, después de la aprobación por el comité ético y de la autorización administrativa (código de procedimiento: 06/18/LU-002). Los animales se mantuvieron bajo condiciones de temperatura (15-21 °C), humedad, renovación de aire y ciclos de luz controlados (ciclos de luz y oscuridad de 12 h alternas desde las 19 horas), de acuerdo con el anexo II de la directiva 86/609/EEC. Los animales fueron alimentados con pienso seco preparado en forma de pellets, esterilizado y especialmente fabricado para la alimentación de animales de laboratorio. Tanto el jefe de bienestar animal del centro, como el personal del establecimiento y los investigadores velaron por la salud de los animales durante todo el experimento.

Tras un período de cuarentena de tres semanas, los animales fueron medicados con ketamina 25 mg/kg/IM (Ketamidol 100 mg/mL), medetomidina 50 µg/kg/IM (Sedormin 1 mg/mL) y buprenorfina 0.03 mg/kg (Bupac 0.3 mg/mL). La anestesia se mantuvo por inhalación de una mezcla de O₂ y 2 % de isoflurano utilizando una máscara facial.

Después de la preparación aséptica de la piel, se realizó un abordaje lateral del fémur distal, afectando a la piel y al tejido subcutáneo para posteriormente disecar la musculatura y exponer la superficie lateral del cóndilo femoral lateral con un elevador periosteal. Se realizó un fresado, según indicaciones del fabricante, con un motor quirúrgico acoplado a una fresa quirúrgica (intrasurg 300Kavo, Biberach, Alemania). Tras realizar las perforaciones, se procedió a la colocación de los mini implantes mediante roscado manual en dirección lateromedial (Figura 6.3). La herida se suturó, utilizando

material reabsorbible (vicryl 4/0, Ethicon), en planos profundos y nylon 3/0 para la piel. Las diferentes superficies por ensayar se asignaron aleatoriamente al lado izquierdo o derecho, de acuerdo con una lista de aleatorización generada por ordenador hasta completar el mismo número en cada una de las posiciones (anterior y posterior, derecho e izquierdo).



Figura 6.3. Implantación en cóndilo femoral.

Después del cierre de la herida, la piel se desinfectó de nuevo con solución de povidona iodada. Tras la intervención quirúrgica, se administró atipamezol (0.15 mg/kg/IM; Esteve) para revertir los efectos de la medetomidina. Los animales fueron monitorizados en su recuperación y devueltos a su alojamiento, donde continuaron durante todo el período experimental.



Figura 6.4. Radiografía de los implantes en el cóndilo femoral.

Posteriormente, el dolor se controló con buprenorfina (0.01-0.03 mg/kg/IM, Buprex, RB Pharmaceuticals) durante 3 días y con meloxicam (0.2 mg/kg/SC, Metacam, Boehringer) durante 5 días. Como profilaxis antibiótica se utilizó enrofloxacin (5 mg/kg/12 horas, Syvaquinol 10 % oral) durante 3 semanas en el agua de bebida. Además, el estado de las heridas se evaluó dos veces por semana, así como cada vez que se limpiaron las jaulas.

Tras un periodo de implantación de 4 semanas los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital por vía intravenosa (Doletal, Vétoquinol, Francia) después de sedación con ketamina 25 mg/kg y medetomidina 50 µg/kg. Posteriormente, los fémures distales fueron disecados para observar los materiales implantados. Las muestras para histología se mantuvieron en el fémur para su fijación en solución tamponada de formaldehído al 10 %.

A continuación, se muestra la Tabla 6.2 con todas las muestras implantadas:

Tabla 6.2. Códigos de las muestras implantadas en cóndilo femoral.

Material	Muestras
Ti control	C1PL, C4AR, C5PR, C6AL, C7PL, C10AR, C11PR, C12AL
7M:3T-0.5Ca	C1AR, C2PR, C3AL, C4PL, C7AR, C8PR, C9AL, C10PL

Para la identificación se ha utilizado un código que consiste en un número y tres letras. La primera letra (C) indica que la implantación se ha realizado en cóndilo femoral, el número se refiere al animal (de 1 a 12), la segunda letra expresa si es el implante anterior (A) o posterior (P) y la tercera letra indica el lado del fémur: derecho (R) o izquierdo (L).

2.3. Estudio histológico

Para evaluar la biocompatibilidad, la osteointegración y la degradación de los recubrimientos se ha recurrido a la microscopía óptica. Para ello, las muestras obtenidas han de ser sometidas a un tratamiento que consta de cuatro pasos: fijación, inclusión en PMMA, corte y tinción de las muestras.

Así, una vez obtenidas las muestras, estas fueron inmediatamente fijadas, sumergiéndolas en etanol al 40 % (v/v) a 4 °C. Después se realizó el procesado histológico de inclusión

en PMMA según el protocolo descrito por Peris *et al.*¹⁸ de muestras óseas no descalcificadas. Este material presenta grandes ventajas frente a las diferentes alternativas. Por un lado, la versatilidad de la tinción y, por el otro, su capacidad de infiltración de muestras de gran tamaño previamente tratadas. Los bloques de PMMA obtenidos se cortaron mediante el sistema de corte de doble banda y micropulido EXAKT, obteniendo muestras con un espesor de 30 µm. Este grosor permite enfoques precisos de microscopía óptica de hasta 40 aumentos. Estos cortes se colocaron en diferentes portaobjetos, para proceder a su tinción por la técnica del Tricrómico de Gomori, según el protocolo descrito por García¹⁹. Con este método, el hueso adquiere diferentes tonalidades según su grado de madurez y calcificación. Así, el osteoide adquiere un tono rojizo y, a medida que madura, adquiere una tonalidad más azulada. Además, el tejido fibroso se tiñe de rojo, al igual que los citoplasmas celulares.

El estudio histológico de los cortes se realizó mediante observación con microscopio óptico vertical Eclipse 80i (Nikon), utilizando el campo claro.

2.4. Estudio de biocompatibilidad

Tras la observación de las muestras al microscopio, se evaluó semicuantitativamente la respuesta del organismo frente a un cuerpo extraño en cuanto a su biocompatibilidad. Para ello se ha desarrollado un sistema semicuantitativo, siguiendo las recomendaciones de la Norma ISO 10993-6:2017 y diversa bibliografía²⁰⁻²³, con el fin de evaluar los efectos locales, después de la implantación, de los diferentes materiales desarrollados, tanto en la superficie como en el hueso profundo. Los parámetros evaluados han sido: inflamación polimorfonuclear, linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, células gigantes, necrosis, fibrosis, neovascularización e infiltrado adiposo.

Los infiltrados de células inflamatorias y la necrosis se valoran utilizando el esquema de valoración de la Tabla 6.3. La neovascularización, fibrosis y el infiltrado adiposo se valoran con el esquema de la Tabla 6.4.

Tabla 6.3. Sistema de evaluación histológica – Tipo celular / respuesta.

Tipo celular / respuesta	Valoración				
	0	1	2	3	4
Inflamación polimorfonuclear	0	Vestigios, 1-5/phf *	5-10/phf	Infiltrado alto	Saturado
Linfocitos	0	Vestigios, 1-5/phf	5-10/phf	Infiltrado alto	Saturado
Células plasmáticas	0	Vestigios, 1-5/phf	5-10/phf	Infiltrado alto	Saturado
Macrófagos	0	Vestigios, 1-5/phf	5-10/phf	Infiltrado alto	Saturado
Células gigantes	0	Vestigios, 1-2/phf	3-5/phf	Infiltrado alto	Láminas
Necrosis	0	Mínima	Leve	Moderada	Severa

(*) phf = por campo de alto aumento (400x)

Tabla 6.4. Sistema de evaluación histológica – Respuesta del tejido.

Respuesta	Valoración				
	0	1	2	3	4
Inflamación polimorfonuclear	0	Proliferación capilar mínima, focal, 1-3 brotes	Grupos de 4-7 capilares con estructuras fibroblásticas de soporte	Banda ancha de capilares con estructuras de soporte	Banda extensa de capilares con estructuras fibroblásticas de soporte
Linfocitos	0	Banda estrecha	Banda moderadamente ancha	Banda gruesa	Banda extensa
Células plasmáticas	0	Cantidad mínima de grasa asociada con fibrosis	Varias capas de grasa y fibrosis	Acumulación alargada y ancha de células adiposas alrededor del sitio del implante	Grasa extensa que rodea completamente al implante

En este caso, debido a la mayor importancia de los infiltrados de células inflamatorias y necrosis, los parámetros de la Tabla 6.3 se multiplican por un factor de 2 para proporcionar un valor ponderado comparado con los parámetros de neovascularización, fibrosis e infiltrado adiposo de la Tabla 6.4.

Los valores se totalizan y luego se calcula una valoración promediada para cada una de las superficies estudiadas y para el control (Ti). El promedio de la valoración para el control se resta del valor promedio de cada una de las superficies, para así determinar el grado de reactividad.

La respuesta se valora según la siguiente puntuación: respuesta mínima o ausencia de reacción (puntuación de 0 a 3), reacción ligera (puntuación de 3 a 9), reacción moderada (puntuación de 9 a 15) o reacción severa (puntuación de 15 o mayor).

2.5. Estudio histomorfométrico

La histomorfometría es la rama cuantitativa de la histología que mide rasgos morfológicos. En los últimos años se ha convertido en una línea de trabajo recurrente²⁴.

Este estudio se ha realizado para evaluar la capacidad de osteointegración de los distintos recubrimientos desarrollados, prestando atención al hueso en contacto con el implante (en inglés Bone in Contact, BIC). Este parámetro queda determinado por la cantidad de hueso cortical y medular mineralizado en contacto íntimo con la superficie del implante, y expresada en milímetros.

Para realizar este estudio se tomaron imágenes de microscopía óptica, a 10 aumentos, del perímetro de cada uno de los implantes, obteniendo una imagen única de cada prótesis radicular, tras el montaje de las imágenes parciales, con el software Microsoft Imagen Composite Editor.

3. Resultados y discusión

3.1. Implantación en tibia de conejo

Las muestras obtenidas tras la implantación fueron procesadas para obtener los cortes histológicos y así poder observarlos al microscopio, para evaluar la biocompatibilidad y la capacidad de osteointegración de los diferentes recubrimientos desarrollados.

Se implantaron, en este caso, 8 implantes sin recubrimiento alguno (Ti control), 8 implantes con la formulación 7M:3T-0.5Sr y otros 8 con el sistema 7M:3T-0.5Ca.

En las siguientes figuras se muestran los cortes histológicos obtenidos tras 3 semanas de implantación de los implantes de Ti control como de los implantes recubiertos con las formulaciones seleccionadas de Sr y Ca, tintados por la técnica del Tricrómico de Gomori.

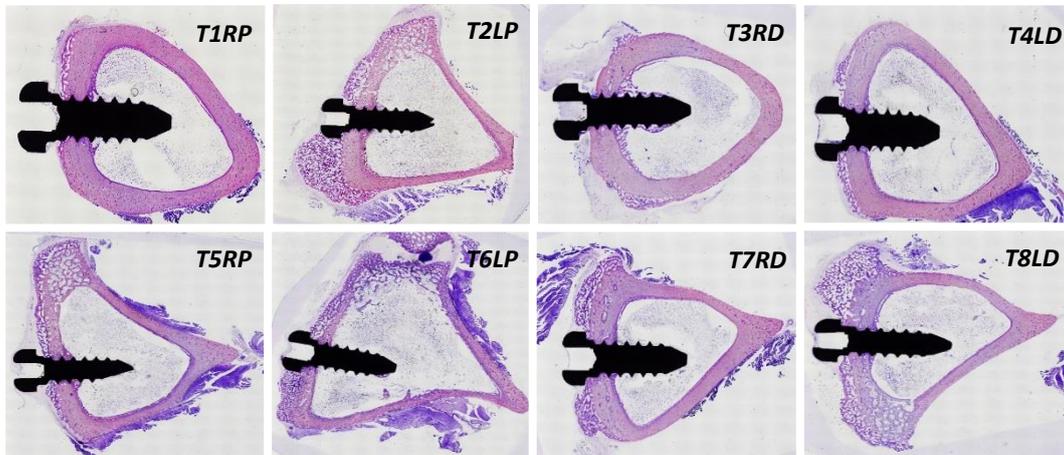


Figura 6.5. Cortes histológicos de las muestras Control (Ti) implantadas en tibia de conejo.

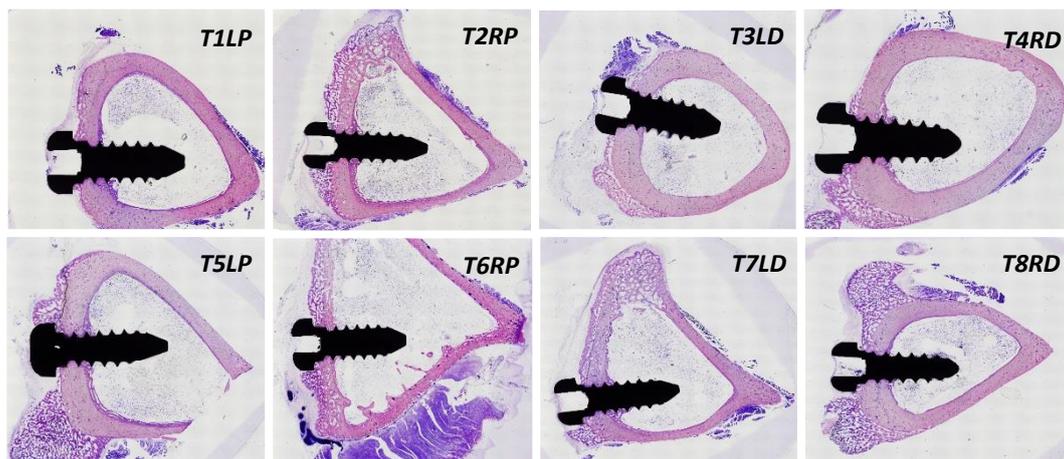


Figura 6.6. Cortes histológicos de las muestras 7M:3T-0.5Sr implantadas en tibia de conejo.

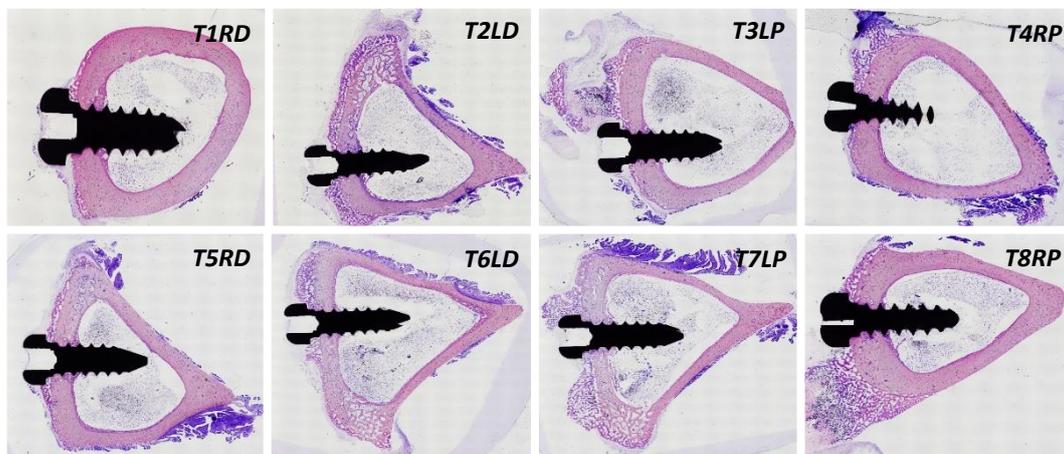


Figura 6.7. Cortes histológicos de las muestras 7M:3T-0.5Ca implantadas en tibia de conejo.

Para distinguir mejor el hueso neoformado se realizó una nueva tinción. Así, una vez pulidas las muestras para eliminar la parte más superficial que estaba teñida, se tiñeron nuevamente, siguiendo el protocolo de tinción con azul de Stevenel y picrofucsina de Van Gieson, descrito por Maniatopoulos *et al*²⁵. En las siguientes figuras se muestran, como ejemplo, algunos de los cortes histológicos nuevamente teñidos.

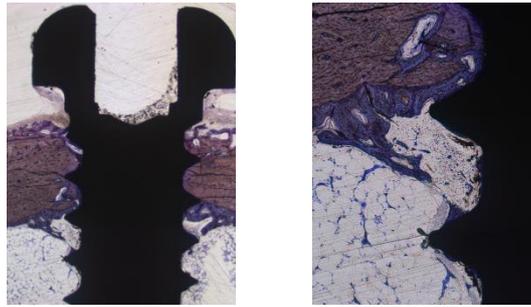


Figura 6.8. Muestra T1RP de Ti control implantada en tibia de conejo nuevamente teñida.

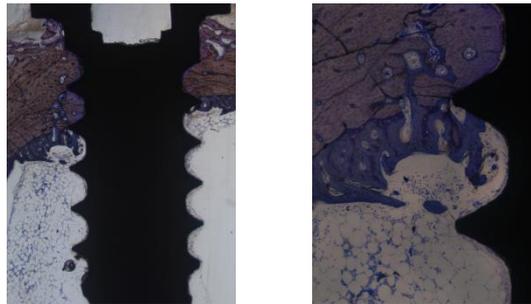


Figura 6.9. Muestra T1LP de Sr implantada en tibia de conejo nuevamente teñida.

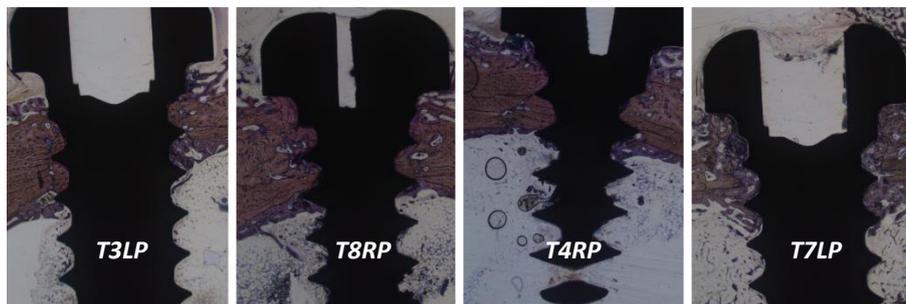


Figura 6.10. Muestras con Ca implantadas en tibia de conejo nuevamente teñidas.

A la vista de las imágenes histológicas se puede observar que debido al tamaño del implante (4 mm de longitud y 3 y 2 mm de diámetro en la cabeza y en el cuerpo, respectivamente) en ningún caso parece haber contacto de la superficie externa del

implante con el endostio, salvo en la zona cortical de entrada del implante, pero en ningún caso en la cavidad medular. El vástago del implante queda inmerso en la médula ósea, sin ningún tipo de fijación, y por tanto con una estabilidad únicamente causada por el apriete realizado en la zona cortical. Por este motivo, este modelo animal presenta tasas de estabilidad muy pequeñas para el tiempo de estudio realizado (3 semanas). Tal vez este sea el motivo por el que la regeneración ósea en estas muestras es muy limitada.

Observando las Figuras 6.8, 6.9 y 6.10 podría concluirse que no hay grandes diferencias histológicas entre las muestras del control y las recubiertas. Tampoco se observan diferencias notables entre las muestras en lo referente al tejido óseo neoformado (apenas nada en todas ellas). Se observan diferencias en cuanto a las características de la capa del recubrimiento que queda (grosor, alteración del tejido óseo cercano), así como en cuanto a las células multinucleadas que aparecen y al tejido conjuntivo próximo al implante.

En las muestras de Ca (Figura 6.10), aunque apenas hay tejido óseo neoformado, sí se considera el hueso neoformado, a partir de lenguas de la cortical y, ocasionalmente, en algún surco del implante más interno. En estas muestras, igualmente, hay cierta capa de tejido conjuntivo, pero sin tener gran entidad. Igualmente, en todas las muestras hay células multinucleadas, abundantes y alargadas. Además, en las muestras T3LP y T8RP hay tejido cartilaginoso en formación por fuera del hueso, próximo al sitio donde se ha insertado el implante. En algunas muestras parece que hay algo de inflamación en la zona subcortical del implante. La muestra T4RP es la que tiene peor aspecto y parece que en algunas zonas cercanas al implante el tejido óseo se está degradando. Esto último parece que ocurre en la muestra T7LP, pero en el hueso cortical próximo a la cabeza del implante.

Por otro lado, mediante la observación con microscopio óptico de los cortes histológicos de los ítems relacionados con la reacción de los tejidos a las diferentes superficies de los implantes, y su puntuación dentro de una escala de 0 a 3, se ha evaluado de forma semicuantitativa la biocompatibilidad de las nuevas formulaciones.

En las siguientes tablas se indican las puntuaciones para cada uno de los ítems y para cada tipo de implante.

Tabla 6.5. Puntuación de ítems para la evaluación semicuantitativa de la respuesta de reacción al implante de Ti.

Ti	PROFUNDO								SUPERFICIAL							
	T1RP	T2LP	T3RD	T4LD	T5RP	T6LP	T7RD	T8LD	T1RP	T2LP	T3RD	T4LD	T5RP	T6LP	T7RD	T8LD
Muestra																
Inflamación polimorfonuclear	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
Linfocitos	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	1	1	0	0
Células plasmáticas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
Macrófagos	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2
Células gigantes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SUB-TOTAL (x2)	2	2	2	2	2	2	2	2	4	2	16	2	6	6	2	4
Neovascularización	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibrosis	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	0	2	2	2	2	2
Infiltrado adiposo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SUB-TOTAL	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	0	2	2	2	2	2
TOTAL	4	4	3	3	3	3	3	4	6	4	16	4	8	8	4	6
TOTAL GRUPO	27/8 = 3.375								56/8 = 7							

Tabla 6.6. Puntuación de ítems para la evaluación semicuantitativa de la respuesta de reacción al implante recubierto con 7M:3T-0.5Sr.

7M:3T-0.5Sr	PROFUNDO								SUPERFICIAL								
	Muestra	T1LP	T2RP	T3LD	T4RD	T5LP	T6RP	T7LD	T8RD	T1LP	T2RP	T3LD	T4RD	T5LP	T6RP	T7LD	T8RD
Inflamación polimorfonuclear	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Linfocitos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Células plasmáticas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Macrófagos	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
Células gigantes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SUB-TOTAL (x2)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4	2	2	2	2	2	2
Neovascularización	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibrosis	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	2	1	2
Infiltrado adiposo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SUB-TOTAL	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	1	2
TOTAL	3	4	4	4	3	3	4	4	4	4	4	5	3	3	4	3	4
TOTAL GRUPO	29/8 = 3.625								30/8 = 3.75								

Tabla 6.7. Puntuación de ítems para la evaluación semicuantitativa de la respuesta de reacción al implante recubierto con 7M:3T-0.5Ca.

7M:3T-0.5Ca	PROFUNDO								SUPERFICIAL								
	Muestra	T1RD	T2LD	T3LP	T4RP	T5RD	T6LD	T7LP	T8RP	T1RD	T2LD	T3LP	T4RP	T5RD	T6LD	T7LP	T8RP
Inflamación polimorfonuclear	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Linfocitos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Células plasmáticas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Macrófagos	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
Células gigantes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SUB-TOTAL (x2)	2	2	2	2	4	2	2	2	2	2	6	2	2	2	0	2	2
Neovascularización	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibrosis	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1
Infiltrado adiposo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SUB-TOTAL	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1							
TOTAL	3	3	3	3	5	3	3	3	2	3	7	3	3	3	1	3	3
TOTAL GRUPO	25/8 = 3.125								26/8 = 3.25								

Con todas las puntuaciones, se realiza un promedio para determinar la valoración de la irritabilidad, donde un valor negativo se registra como cero.

Tabla 6.8. Promedios de la evaluación semicuantitativa de la respuesta de reacción a los implantes.

		Ti	7M:3T-0.5Sr	7M:3T-0.5Ca
PROFUNDO	TOTAL	3.375	3.625	3.125
	PROMEDIO (Ensayo - Control)	-	0.25	-0.25
SUPERFICIAL	TOTAL	7	3.75	3.25
	PROMEDIO (Ensayo - Control)	-	-3.25	-3.75

Como se puede observar, todas las formulaciones presentan una reacción irritante ligera. El mayor valor corresponde al Ti en la zona superficial. Sin embargo, los valores promedio de todos los implantes recubiertos no muestran irritabilidad alguna.

Finalmente, dentro de la experimentación en tibia de conejo, se realizó una histomorfometría detallada, en la que se ha estudiado la variable histomorfométrica BIC. Este estudio resulta determinante para cuantificar la capacidad de osteointegración de los recubrimientos en comparación con el Ti. Los resultados se muestran en la Figura 6.11.

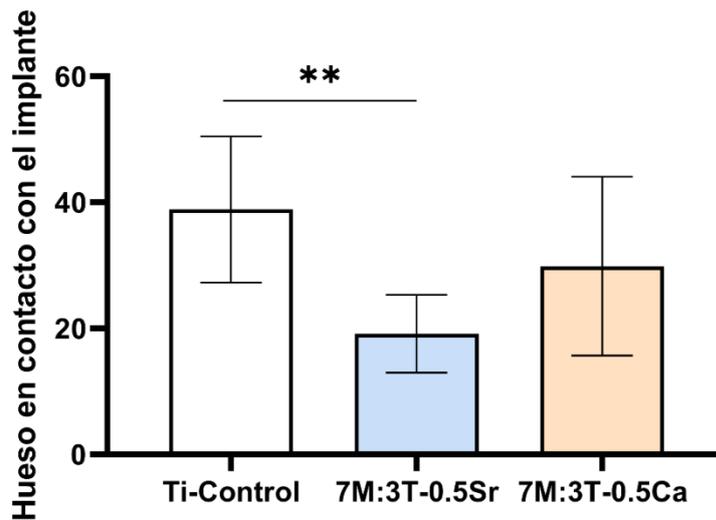


Figura 6.11. Valores de la variable histomorfométrica BIC para los diferentes implantes en tibia. (** $p \leq 0.01$).

A la vista de estos datos, se podría entender que los implantes dopados con Sr inducen menor osteointegración que el Ti control.

Así, en cuanto a la implantación en tibia de conejo, se puede concluir que:

- El único contacto del miniimplante con el tejido óseo se realiza por la zona de cabeza, y principalmente en la zona cortical. El vástago del implante queda inmerso en la médula ósea, sin contacto alguno con el endostio que la envuelve.
- No existe apenas tejido óseo neoformado, salvo en las muestras con Ca.
- No existen apenas diferencias entre las células, en cuanto a células multinucleadas (presentes en todas las muestras).
- Los implantes recubiertos con Ca y Sr no aumentan la irritabilidad respecto al implante de Ti (ligeramente irritante).
- Los implantes dopados con Sr inducen una menor osteointegración que el Ti control, mientras que la osteointegración de los implantes con Ca no tiene diferencias estadísticamente significativas frente al Ti.

3.2. Implantación en cóndilo femoral de conejo

A la vista de que la implantación en tibia de conejo no ha sido concluyente, probablemente debido a la baja estabilidad de los implantes, y teniendo en cuenta que en el grupo se iba a realizar una nueva experimentación *in vivo*, destinada a un ensayo de proteómica *in vivo*, se pensó en cambiar el modelo animal y aprovechar dicha implantación como prueba de concepto. En este modelo animal, debido a la limitación económica, se utilizaron únicamente 8 implantes de Ti sin recubrir como control y otros 8 recubiertos con la formulación 7M:3T-0.5Ca, donde solo 2 muestras de cada tipo se utilizaron para el estudio histológico (C4AR, C7PL, C2PR y C8PR).

A continuación, se muestran los cortes histológicos obtenidos, tras 4 semanas de implantación, de los 2 tipos de implantes (Figura 6.12).

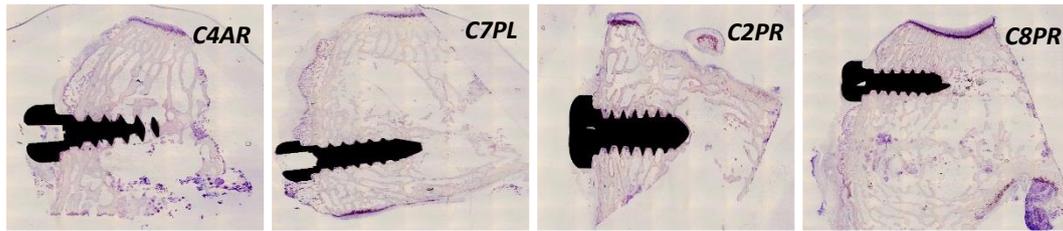


Figura 6.12. Cortes histológicos de las muestras Ti control (C4AR y C7PL) y 7M:3T-0.5Ca (C2PR y C8PR) implantadas en el cóndilo femoral de conejo.

Observando estas imágenes, y teniendo en cuenta el limitado número de muestras, se puede dar la información sobre diferentes ítems, que está recogida en la siguiente tabla:

Tabla 6.9. Valoración de las imágenes correspondientes a la implantación en cóndilo femoral de conejo.

Muestra	Ti control		7M:3T-0.5Ca	
	C4AR	C7PL	C2PR	C8PR
Proximidad cartílago articular	Sí	Sí	No	Sí
Cortical	Fina, trabecular	Fina, trabecular	Fina en un lado	Normal, trabecular
Trabéculas	Bastante abundantes	Abundantes, también en el lado del implante alejado de la pared lateral	Abundantes	Abundantes, también en el lado del implante alejado de la pared lateral
Abundancia trabéculas	++	+++	+++	+++
Recubrimiento	No	No	Sí	Sí, grueso
Características del recubrimiento	-	-	-	Parece que contacta hueso nuevo desde trabéculas, pero también hueso nuevo directamente sobre el recubrimiento
Hueso nuevo	Sí, desde trabéculas viejas	Sí, desde trabéculas viejas	Sí, muy abundante, desde trabéculas	Sí, desde trabéculas
Cantidad hueso nuevo	En varios surcos rellenando huecos, pero también surcos sin hueso	Rellenando huecos. Duda de si alguno puede ser tejido óseo en descomposición	Gran cantidad, rellenando surcos	Rellenando huecos. Duda de si alguno puede ser tejido óseo en descomposición
Valoración global	Buen comportamiento	Buen comportamiento	Buen comportamiento	Buen comportamiento

A la vista de los resultados, se puede decir que los 4 implantes estudiados muestran un buen comportamiento. Prestando atención a las imágenes del recubrimiento dopado con Ca podría decirse que es una formulación prometedora ya que no presenta irritabilidad y, cualitativamente, presenta mayor cantidad de nuevo hueso formado.

En lo referente a la variable histomorfométrica BIC, estos son los resultados obtenidos (Figura 6.13).

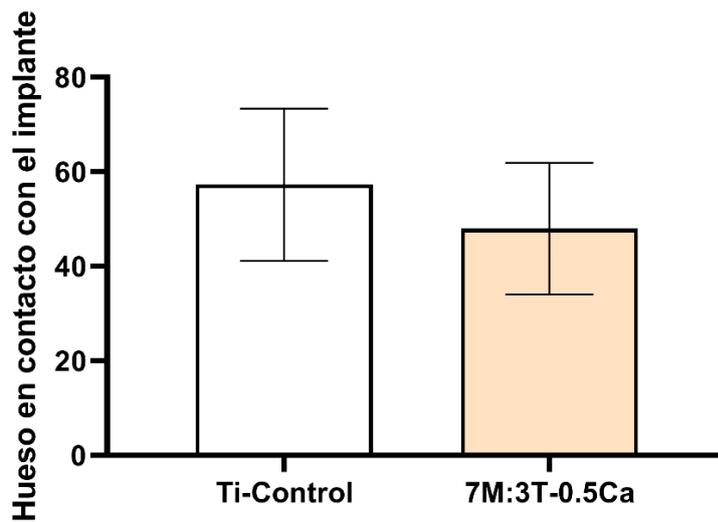


Figura 6.13. Valores de la variable histomorfométrica BIC para los diferentes implantes en cóndilo femoral.

La valoración histomorfométrica realizada entre los implantes de Ti (control) y los recubiertos con Ca no muestran diferencias estadísticamente significativas en cuanto al parámetro BIC.

En cuanto a las conclusiones que se pueden obtener de esta experimentación en cóndilo femoral:

- La experimentación ha sido diseñada para obtener resultados en ensayos de proteómica *in vivo*, y las muestras dedicadas a histología han sido únicamente 2, con lo que las conclusiones solo pueden ser cualitativas.
- El comportamiento, tanto de los implantes de Ti como de los que llevan el recubrimiento con Ca, es bueno y bastante similar entre ellos, mostrando una buena osteointegración.

- A nivel cualitativo, parece que las mayores diferencias aparecen en el hueso nuevo formado. El nuevo hueso, en las muestras de Ti, aparece desde trabéculas que ya estaban formadas. Sin embargo, con el recubrimiento con Ca, el nuevo hueso aparece como nuevas trabéculas, y no a partir de las ya existentes previamente.

- La cantidad de hueso nuevo parece ser mayor en las muestras con el recubrimiento con Ca, si bien no se observan diferencias significativas en el BIC, entre las muestras de Ti y las recubiertas.

Referencias

1. Lara-Sáez, I. Evaluación bioógica de nuevos recubrimientos osteoinductores sintetizados vía sol-gel para aplicación en implantología dental. (UPV, 2015).
2. Tataru, A. M., Shah, S. R., Livingston, C. E. & Mikos, A. G. Infected animal models for tissue engineering. *Methods* **84**, 17–24 (2015).
3. Pearce, A. I., Richards, R. G., Milz, S., Schneider, E. & Pearce, S. G. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* **13**, 1–10 (2007).
4. Mapara, M., Thomas, B. S. & Bhat, K. M. Rabbit as an animal model for experimental research. *Dent. Res. J. (Isfahan)*. **9**, 111 (2012).
5. Neyt, J. G., Buckwalter, J. A. & Carroll, N. C. Use of animal models in musculoskeletal research. *Iowa Orthop. J.* **18**, 118 (1998).
6. Wang, X., Mabrey, J. D. & Agrawal, C. An interspecies comparison of bone fracture properties. *Biomed. Mater. Eng.* **8**, 1–9 (1998).
7. Castaneda, S. *et al.* Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. *Skeletal Radiol.* **35**, 34–41 (2006).
8. Li, Y. *et al.* Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *J. Orthop. Transl.* **3**, 95–104 (2015).
9. Naito, Y. *et al.* The influence of 1 α . 25-dihydroxyvitamin D3 coating on implant osseointegration in the rabbit tibia. *J. Oral Maxillofac. Res.* **5**, (2014).
10. Breeding, K. *et al.* The effect of hydroxyapatite nanocrystals on osseointegration of titanium implants: an in vivo rabbit study. *Int. J. Dent.* **2014**, (2014).
11. Nalin, L. The rabbit as an animal model in dental implant research. (2013).
12. Seong, W., Grami, S., Jeong, S. C., Conrad, H. J. & Hodges, J. S. Comparison of push-in versus pull-out tests on bone-implant interfaces of rabbit tibia dental implant healing model. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* **15**, 460–469 (2013).
13. Chen, X. *et al.* In vivo osseointegration of dental implants with an antimicrobial peptide coating. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **28**, 76 (2017).
14. AlFarraj, A. A., Sukumaran, A., Al Amri, M. D., Van Oirschot, A. J. A. B. & Jansen, J. A. A comparative study of the bone contact to zirconium and titanium implants after 8 weeks of implantation in rabbit femoral condyles. *Odontology* **106**, 37–44 (2018).
15. Blanco, J., Alvarez, E., Muñoz, F., Liñares, A. & Cantalapiedra, A. Influence on early osseointegration of dental implants installed with two different drilling protocols: a histomorphometric study in rabbit. *Clin. Oral Implants Res.* **22**, 92–99 (2011).
16. Sennerby, L., Thomsen, P. & Ericson, L. E. A morphometric and biomechanic comparison of titanium implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **7**, (1992).

17. Cheng, P. *et al.* Site-dependent osseointegration of biodegradable high-purity magnesium for orthopedic implants in femoral shaft and femoral condyle of New Zealand rabbits. *J. Mater. Sci. Technol.* **32**, 883–888 (2016).
18. Peris, J. L. *et al.* Técnica histológica para la inclusión en metil-metacrilato de muestras óseas no descalcificadas. *Rev Esp Cir Osteoart* **28**, 231–238 (1993).
19. Garcia, L. S. *Diagnostic medical parasitology*. (American Society for Microbiology Press, 2006).
20. Shen, Y. *et al.* The biocompatibility of silk fibroin and acellular collagen scaffolds for tissue engineering in the ear. *Biomed. Mater.* **9**, 15015 (2014).
21. Li, D. *et al.* Thickness of fibrous capsule after implantation of hydroxyapatite in subcutaneous tissue in rats. *J. Biomed. Mater. Res. An Off. J. Soc. Biomater. Japanese Soc. Biomater. Aust. Soc. Biomater.* **45**, 322–326 (1999).
22. Ikarashi, Y. *et al.* Tissue reactions and sensitivity to iron-chromium alloys. *Mater. Trans.* **43**, 3065–3071 (2002).
23. MacNeill, S. R., Cobb, C. M., Rapley, J. W., Glaros, A. G. & Spencer, P. In vivo comparison of synthetic osseous graft materials: a preliminary study. *J. Clin. Periodontol.* **26**, 239–245 (1999).
24. Tiesler, V., Cucina, A. & Streeter, M. Manual de histomorfología en hueso no descalcificado. *Mérida Ser. manuales, Univ. Autónoma Yucatán* (2006).
25. Maniatopoulos, C., Rodriguez, A., Deporter, D. A. & Melcher, A. H. An improved method for preparing histological sections of metallic implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **1**, (1986).

Capítulo 7.

Conclusiones

generales

Teniendo en cuenta las **conclusiones parciales** de cada uno de los estudios realizados en esta tesis doctoral, y que están descritas al final de cada capítulo, se detallan a continuación las **conclusiones generales** que se pueden extraer del trabajo experimental realizado:

- La técnica sol-gel ha permitido obtener recubrimientos híbridos orgánico-inorgánicos, dopados con sales de Sr y Ca, con el fin de modificar superficialmente las propiedades de los implantes dentales de Ti y poder controlar la respuesta biológica. Estos recubrimientos actúan como matrices de liberación de los iones incorporados, además del Si, constituyente del propio recubrimiento. La incorporación de los iones y la variación en la cantidad introducida en la red siloxánica producen un cambio en las propiedades físico-químicas de las superficies, así como en la reticulación de la red. La cinética de liberación es función del grado de condensación de la red híbrida formada, además de la concentración del ion incorporado.

- La caracterización de la adsorción de proteínas séricas a la superficie de diferentes materiales utilizables en implantología dental, por proteómica, puede emplearse como una herramienta capaz de predecir las respuestas *in vivo* del biomaterial, pudiendo llegar a mejorar o completar los resultados obtenidos con los ensayos celulares *in vitro* tradicionales.

- Aunque la capacidad regenerativa de un biomaterial es un fenómeno muy complejo, en el que intervienen múltiples factores, los resultados de este estudio permiten afirmar que una significativa adsorción de proteínas correspondientes al sistema inmune, que den lugar a una inflamación bien regulada y, por lo tanto, no cronificada, puede indicar una importante bioactividad de la superficie e influir positivamente en su capacidad de regeneración ósea. Además, una afinidad de la superficie por la proteína TETN podría señalar una mayor capacidad de osteointegración.

- A falta de un nuevo estudio *in vivo*, que permita confirmarlo, el recubrimiento dopado con Ca resulta de gran interés para ser utilizado en implantes dentales, ya que tal y como se ha observado por proteómica la abundancia normalizada de las proteínas relacionadas con la regeneración ósea hasta cuadruplican a las correspondientes al Sr. Además, las proteínas encontradas denotan un aumento claro de la función de la coagulación y la fibrinólisis, que podría tener relación con el mayor potencial osteogénico

observado *in vitro*. Asimismo, en los ensayos celulares se comprueba que la adición de Ca no provoca inflamación cronicada en los recubrimientos sintetizados, hecho que se ha correlacionado con la detección de patrones de adsorción de proteínas afines a la regulación e inhibición de la respuesta inmune.

Tras los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, se proponen las siguientes líneas de investigación, que supondrían la continuación de la misma.

- Después de la síntesis y caracterización de los nuevos recubrimientos sol-gel dopados con SrCl₂ y CaCl₂, han de realizarse nuevos estudios *in vivo* para poder evaluar de manera satisfactoria la capacidad de osteointegración de los implantes dentales y realizar una discusión más profunda respecto a la caracterización proteómica.

- Del mismo modo, se evaluarán nuevas composiciones con el fin de obtener más información sobre las interacciones proteína/biomaterial. Se comprobarán las consecuencias provocadas por la adición de diferentes compuestos como MgCl₂, ZnCl₂, MnCl₂, CuCl₂, ZrCl₄, B o curcumina, entre otros. De esta manera se podrá seguir estudiando el efecto que tiene el dopado en los procesos de inflamación, osteogénesis, angiogénesis, adhesión celular y coagulación.

- Por otro lado, en los estudios realizados se ha utilizado un suero humano comercial. Sin embargo, el suero puede variar en función del metabolismo de cada persona. Por lo tanto, en una futura línea de investigación se realizarían estudios proteómicos comparativos utilizando sueros de diferentes grupos poblacionales asociados a patologías relacionadas con una menor capacidad de regeneración ósea, como diabéticos u osteoporóticos, respecto a un grupo de población sana, para un mismo biomaterial. De esta manera, se podría obtener una importante información para ser capaces de ofrecer una medicina personalizada a pacientes que tengan este tipo de factores de riesgo.

- Otra interesante línea de trabajo futuro consistiría en buscar la correlación entre los resultados de la caracterización proteómica de superficies, utilizando modelos más complejos, así como llevar a cabo los estudios de proteómica con células *in vitro* o incluso *in vivo*. De esta manera, se podría obtener una visión más global de los fenómenos asociados a la osteointegración y el papel de las proteínas durante el mismo.

- Por último, y teniendo en cuenta que el éxito de un implante dental no depende únicamente de una buena osteointegración, sino también de un buen sellado biológico, se abre un nuevo campo de desarrollo de nuevas superficies para los pilares del implante y su evaluación biológica con células correspondientes al tejido blando, así como su evaluación proteómica, para poder predecir un buen sellado biológico, y evitar así la periimplantitis.

Anexos

Anexo 1. Tabla de proteínas (Sr)

Tabla A.1. Análisis diferencial Progenesis Q1 de proteínas más y menos adsorbidas en recubrimientos dopados con Sr (7M:3T-0.5Sr, 7M:3T-1Sr y 7M:3T-1.5Sr) respecto al material base. Las proteínas detectadas con ANOVA $p < 0.05$ (en amarillo) y una ratio superior a 1.3 (en verde) o inferior a 0.77 (en rojo) se consideraron significativamente diferentes (en negrita).

Código	Proteína	7M:3T-0.5Sr vs 7M:3T		7M:3T-1Sr vs 7M:3T		7M:3T-1.5Sr vs 7M:3T	
		<i>p</i>	Ratio	<i>p</i>	Ratio	<i>p</i>	Ratio
HRG	Histidine-rich glycoprotein	0.415	1.39	0.010	9.51	0.020	11.23
FA11	Coagulation factor XI	0.192	1.60	0.000	9.09	0.055	6.85
CADH1	Cadherin-1	0.498	1.83	0.031	6.77	0.302	5.27
IBP4	Insulin-like growth factor-binding protein 4	0.351	1.90	0.055	7.16	0.147	4.44
APOF	Apolipoprotein F	0.220	4.42	0.124	5.12	0.216	4.25
PCOC1	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	0.210	5.04	0.038	17.68	0.156	4.06
KV302	Ig kappa chain V-III region SIE	0.059	3.39	0.001	12.49	0.561	4.06
KNG1	Kininogen-1	0.021	1.95	0.005	4.19	0.148	3.21
LAC2	Ig lambda-2 chain C regions	0.238	2.09	0.006	7.23	0.402	2.92
APOC1	Apolipoprotein C-I	0.031	2.37	0.018	2.43	0.103	2.77
APOC4	Apolipoprotein C-IV	0.004	1.93	0.021	1.85	0.003	2.71
TETN	Tetranectin	0.036	2.16	0.006	3.59	0.221	2.53
CD5L	CD5 antigen-like	0.004	2.53	0.001	3.32	0.057	2.50
PROS	Vitamin K-dependent protein S	0.001	2.84	0.007	3.75	0.088	2.35
APOL1	Apolipoprotein L1	0.001	1.93	0.029	1.55	0.001	2.32
SEPP1	Selenoprotein P	0.055	1.47	0.015	1.87	0.010	2.28
C4BPA	C4b-binding protein alpha chain	0.002	2.59	0.002	2.89	0.031	2.23
HV320	Ig heavy chain V-III region GAL	0.002	2.66	0.000	3.08	0.460	2.20
GELS	Gelsolin	0.022	2.01	0.003	4.01	0.110	2.19
S10A7	Protein S100-A7	0.326	2.80	0.058	4.21	0.687	2.17
SAA4	Serum amyloid A-4 protein	0.387	1.12	0.693	1.09	0.001	2.14
CFAH	Complement factor H	0.087	1.46	0.006	3.22	0.033	2.08

IGLL5	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	0.259	1.77	0.008	4.14	0.274	2.07
AMBP	Protein AMBP	0.402	1.26	0.017	3.35	0.219	1.96
FETUA	Alpha-2-HS-glycoprotein	0.106	1.50	0.059	1.88	0.208	1.95
APOH	Beta-2-glycoprotein 1	0.107	2.79	0.040	6.15	0.917	1.88
HEMO	Hemopexin	0.144	1.82	0.019	4.00	0.434	1.83
FA5	Coagulation factor V	0.078	1.96	0.038	2.42	0.278	1.71
CO7	Complement component C7	0.070	1.48	0.084	1.72	0.112	1.69
FHR1	Complement factor H-related protein 1	0.143	1.34	0.382	1.36	0.084	1.68
IGHG1	Ig gamma-1 chain C region	0.017	1.95	0.036	2.88	0.218	1.68
VTDB	Vitamin D-binding protein	0.435	1.39	0.095	1.99	0.197	1.64
FA12	Coagulation factor XII	0.227	1.73	0.089	3.45	0.658	1.57
CO3	Complement C3	0.073	1.59	0.016	2.36	0.469	1.55
A1AT	Alpha-1-antitrypsin	0.066	1.85	0.005	3.69	0.307	1.54
PPIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	0.395	1.53	0.019	4.91	0.488	1.52
AACT	Alpha-1-antichymotrypsin	0.094	1.73	0.002	3.87	0.155	1.52
THRB	Prothrombin	0.411	1.13	0.097	1.36	0.036	1.52
IC1	Plasma protease C1 inhibitor	0.000	1.79	0.001	2.16	0.165	1.49
ITIH4	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	0.126	1.29	0.034	1.98	0.058	1.47
FA9	Coagulation factor IX	0.811	1.19	0.161	1.62	0.718	1.47
APOE	Apolipoprotein E	0.043	1.26	0.235	1.33	0.259	1.45
C1R	Complement C1r subcomponent	0.004	1.65	0.020	1.41	0.009	1.45
TRFE	Serotransferrin	0.133	1.54	0.051	1.70	0.187	1.44
PGRP2	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	0.837	1.09	0.896	1.27	0.130	1.42
CO4B	Complement C4-B	0.062	1.50	0.191	1.37	0.074	1.40
K2C1B	Keratin, type II cytoskeletal 1b	0.328	1.41	0.049	2.94	0.450	1.39
VTNC	Vitronectin	0.390	1.36	0.082	3.23	0.622	1.39
IGHG2	Ig gamma-2 chain C region	0.322	1.47	0.054	9.27	0.809	1.32
APOA2	Apolipoprotein A-II	0.023	1.45	0.682	1.07	0.050	1.32
APOA5	Apolipoprotein A-V	0.245	1.33	0.464	1.21	0.278	1.30

HBB	Hemoglobin subunit beta	0.081	1.46	0.116	1.47	0.304	1.29
TTHY	Transthyretin	0.106	1.42	0.088	1.56	0.251	1.26
KV105	Ig kappa chain V-I region DEE	0.166	1.29	0.038	1.97	0.444	1.25
IGHM	Ig mu chain C region	0.079	1.26	0.783	1.05	0.105	1.24
HPT	Haptoglobin	0.127	2.08	0.011	3.63	0.775	1.20
PLMN	Plasminogen	0.451	1.09	0.184	1.30	0.225	1.20
CXCL7	Platelet basic protein	0.761	0.93	0.668	0.91	0.662	1.18
ITIH1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	0.086	1.79	0.045	2.84	0.766	1.16
HV305	Ig heavy chain V-III region BRO	0.443	1.33	0.052	3.69	0.806	1.16
IGKC	Ig kappa chain C region	0.776	0.95	0.224	1.60	0.318	1.14
PON1	Serum paraoxonase/arylesterase 1	0.056	1.38	0.044	1.81	0.693	1.12
K2C6A	Keratin, type II cytoskeletal 6A	0.470	0.63	0.685	0.72	0.789	1.11
APOB	Apolipoprotein B-100	0.951	1.03	0.055	1.81	0.937	1.11
ARG11	Arginase-1	0.997	0.91	0.282	0.64	0.695	1.09
APOA4	Apolipoprotein A-IV	0.344	1.13	0.345	0.82	0.547	1.08
C1S	Complement C1s subcomponent	0.049	1.39	0.417	1.12	0.681	1.06
APOC3	Apolipoprotein C-III	0.946	0.97	0.320	1.22	0.873	1.03
CLUS	Clusterin	0.989	1.02	0.123	0.75	0.976	1.03
CO9	Complement component C9	0.216	1.28	0.334	0.81	0.745	1.03
FA10	Coagulation factor X	0.394	1.26	0.514	1.10	0.798	1.02
K22E	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	0.637	0.85	0.992	1.05	0.840	1.01
A2MG	Alpha-2-macroglobulin	0.458	1.43	0.039	2.32	0.999	1.00
PEDF	Pigment epithelium-derived factor	0.697	0.86	0.543	1.18	0.856	1.00
TSP1	Thrombospondin-1	0.145	0.11	0.595	1.04	0.446	0.99
KCRM	Creatine kinase M-type	0.619	0.71	0.726	0.52	0.537	0.98
IGJ	Immunoglobulin J chain	0.492	1.07	0.663	1.08	0.846	0.97
HEP2	Heparin cofactor 2	0.331	1.25	0.185	1.30	0.975	0.96
CO5	Complement C5	0.116	1.30	0.537	1.07	0.637	0.91
APOD	Apolipoprotein D	0.017	0.75	0.207	0.79	0.197	0.89

K1C13	Keratin, type I cytoskeletal 13	0.301	0.58	0.103	0.40	0.800	0.88
K2C5	Keratin, type II cytoskeletal 5	0.970	0.96	0.758	0.82	0.911	0.87
CFAB	Complement factor B	0.594	1.08	0.700	1.06	0.604	0.87
K1C16	Keratin, type I cytoskeletal 16	0.345	0.70	0.276	0.64	0.655	0.84
ALBU	Serum albumin	0.501	1.27	0.073	1.67	0.357	0.80
C1QC	Complement C1q subcomponent subunit C	0.126	1.87	0.256	1.41	0.756	0.80
K2C78	Keratin, type II cytoskeletal 78	0.604	0.73	0.690	0.83	0.805	0.79
CERU	Ceruloplasmin	0.543	1.38	0.128	1.56	0.219	0.78
K2C1	Keratin, type II cytoskeletal 1	0.214	0.75	0.295	0.74	0.217	0.77
HBA	Hemoglobin subunit alpha	0.973	0.98	0.319	0.80	0.148	0.75
APOA1	Apolipoprotein A-I	0.935	0.99	0.207	0.64	0.329	0.72
K1C17	Keratin, type I cytoskeletal 17	0.018	0.54	0.071	0.54	0.192	0.72
IGHA1	Ig alpha-1 chain C region	0.530	1.16	0.447	1.23	0.308	0.71
K1C10	Keratin, type I cytoskeletal 10	0.191	0.71	0.328	0.76	0.181	0.71
ITIH2	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	0.813	1.07	0.266	1.51	0.116	0.71
CO8B	Complement component C8 beta chain	0.416	1.71	0.460	1.29	0.987	0.70
K1C9	Keratin, type I cytoskeletal 9	0.306	0.69	0.191	0.56	0.223	0.65
AFAM	Afamin	0.847	0.78	0.352	1.68	0.466	0.59
A1AG1	Alpha-1-acid glycoprotein 1	0.821	1.23	0.533	1.38	0.043	0.59
K1C14	Keratin, type I cytoskeletal 14	0.022	0.43	0.023	0.35	0.101	0.58
A1AG2	Alpha-1-acid glycoprotein 2	0.947	1.13	0.553	1.35	0.027	0.57
DSG1	Desmoglein-1	0.529	0.81	0.072	0.52	0.170	0.56
TLN1	Talin-1	0.301	1.47	0.423	1.23	0.993	0.55
ZA2G	Zinc-alpha-2-glycoprotein	0.681	0.96	0.485	0.86	0.006	0.53
APOC2	Apolipoprotein C-II	0.399	1.52	0.601	1.07	0.867	0.52
SAMP	Serum amyloid P-component	0.769	0.66	0.241	0.39	0.387	0.46
IBP5	Insulin-like growth factor-binding protein 5	0.422	0.65	0.624	0.91	0.137	0.42
ANT3	Antithrombin-III	0.019	0.19	0.463	0.62	0.096	0.35
PROC	Vitamin K-dependent protein C	0.011	0.41	0.006	0.14	0.006	0.35

KRT36	Keratin, type I cuticular Ha6	0.333	0.21	0.257	0.19	0.333	0.21
H4	Histone H4	0.474	0.60	0.647	0.18	0.989	0.06

Anexo 2. Tabla de proteínas (Ca)

Tabla A.2. Análisis diferencial Progenesis Q1 de proteínas más y menos adsorbidas en recubrimientos dopados con Ca (7M:3T-0.5Ca, 7M:3T-1Ca y 7M:3T-1.5Ca) respecto al material base. Las proteínas detectadas con ANOVA $p < 0.05$ (en amarillo) y una ratio superior a 1.3 (en verde) o inferior a 0.77 (en rojo) se consideraron significativamente diferentes (en negrita).

Código	Proteína	7M:3T-0.5Ca vs 7M:3T		7M:3T-1Ca vs 7M:3T		7M:3T-1.5Ca vs 7M:3T	
		<i>p</i>	Ratio	<i>p</i>	Ratio	<i>p</i>	Ratio
PLF4 PF4V	Platelet factor 4	0.046	4.82	0.023	9.10	0.231	40.12
APOC4	Apolipoprotein C-IV	0.015	3.58	0.001	3.75	0.002	4.30
PROC	Vitamin K-dependent protein C	0.480	0.67	0.775	0.81	0.685	4.24
HRG	Histidine-rich glycoprotein	0.004	2.41	0.004	2.53	0.000	3.50
S10A9	Protein S100-A9	0.261	0.68	0.325	0.72	0.746	2.90
CLUS	Clusterin	0.060	1.96	0.017	2.16	0.001	2.18
K1C16	Keratin, type I cytoskeletal 16	0.326	0.48	0.722	0.78	0.446	2.14
ACTB	Actin, cytoplasmic 1	0.213	3.45	0.554	0.81	0.251	2.09
APOA	Apolipoprotein(a)	0.123	1.55	0.508	1.19	0.033	2.07
C4BPA	C4b-binding protein alpha chain	0.004	2.68	0.014	2.61	0.011	2.03
K2C6A	Keratin, type II cytoskeletal 6A	0.497	0.50	0.506	0.57	0.222	2.01
FA12	Coagulation factor XII	0.243	1.53	0.210	2.14	0.417	1.92
ANXA2 AXA2L	Annexin A2	0.893	1.09	0.477	1.30	0.110	1.85
PROS	Vitamin K-dependent protein S	0.080	1.58	0.029	1.76	0.018	1.75
IGHG3	Ig gamma-3 chain C region	0.347	2.59	0.001	3.89	0.516	1.73
K22E	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	0.700	0.90	0.366	0.75	0.054	1.71
SAMP	Serum amyloid P-component	0.090	1.37	0.649	1.12	0.026	1.70
K2C6B	Keratin, type II cytoskeletal 6B	0.419	1.44	0.435	0.74	0.165	1.69
PLMN	Plasminogen	0.018	1.76	0.607	1.14	0.012	1.67
VTNC	Vitronectin	0.043	1.40	0.101	1.42	0.073	1.64
CFAB	Complement factor B	0.582	1.17	0.034	1.64	0.005	1.62
AMBP	Protein AMBP	0.302	1.73	0.406	1.32	0.140	1.62

APOA2	Apolipoprotein A-II	0.718	0.89	0.055	1.71	0.062	1.54
C1QC	Complement C1q subcomponent subunit C	0.494	1.54	0.031	1.42	0.040	1.53
DCD	Dermcidin	0.178	0.62	0.886	0.96	0.291	1.52
IGHM	Ig mu chain C region	0.021	1.69	0.084	1.42	0.274	1.51
CD5L	CD5 antigen-like	0.554	1.24	0.167	1.32	0.011	1.51
APOC2	Apolipoprotein C-II	0.124	1.84	0.158	1.60	0.210	1.48
K1C17	Keratin, type I cytoskeletal 17	0.933	0.98	0.285	0.73	0.333	1.47
K1C14	Keratin, type I cytoskeletal 14	0.313	0.66	0.298	0.69	0.488	1.46
FIBA	Fibrinogen alpha chain	0.425	1.36	0.641	0.86	0.389	1.44
CFAH	Complement factor H	0.039	1.71	0.102	1.50	0.121	1.44
K1C10	Keratin, type I cytoskeletal 10	0.788	0.80	0.133	0.51	0.228	1.43
K2C5	Keratin, type II cytoskeletal 5	0.518	0.86	0.125	0.55	0.294	1.43
APOC3	Apolipoprotein C-III	0.057	1.68	0.328	1.17	0.062	1.43
ITIH2	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	0.608	0.93	0.917	1.15	0.217	1.42
KV308	Ig kappa chain V-III region CLL	0.265	1.24	0.050	1.82	0.490	1.39
K2C1	Keratin, type II cytoskeletal 1	0.867	1.27	0.248	0.62	0.297	1.39
KV302	Ig kappa chain V-III region SIE	0.003	1.78	0.027	1.84	0.040	1.39
PEDF	Pigment epithelium-derived factor	0.024	1.71	0.171	1.30	0.374	1.38
HPTR	Haptoglobin-related protein	0.952	1.10	0.791	1.06	0.351	1.38
CO4B	Complement C4-B	0.076	1.63	0.089	1.84	0.122	1.38
FA10	Coagulation factor X	0.860	0.90	0.811	0.92	0.191	1.37
K1C13	Keratin, type I cytoskeletal 13	0.888	0.95	0.747	0.92	0.435	1.36
IC1	Plasma protease C1 inhibitor	0.004	1.65	0.198	1.27	0.395	1.34
IGJ	Immunoglobulin J chain	0.260	1.56	0.597	1.06	0.513	1.33
CO5	Complement C5	0.047	1.64	0.083	1.21	0.112	1.32
KV310 KV113	Ig kappa chain V-III region VH (Fragment)	0.067	1.36	0.024	1.49	0.127	1.32
HEP2	Heparin cofactor 2	0.814	1.01	0.692	0.88	0.204	1.31
C1R	Complement C1r subcomponent	0.102	2.76	0.110	2.56	0.164	1.30
C1QB	Complement C1q subcomponent subunit B	0.370	1.38	0.163	1.56	0.129	1.28

CO9	Complement component C9	0.557	1.20	0.016	1.15	0.075	1.26
C1QA	Complement C1q subcomponent subunit A	0.201	1.66	0.461	1.13	0.316	1.26
PON1	Serum paraoxonase/arylesterase 1	0.353	1.19	0.045	1.14	0.315	1.25
HV306	Ig heavy chain V-III region BUT	0.769	1.04	0.376	0.84	0.494	1.25
C1S	Complement C1s subcomponent	0.117	1.54	0.127	1.25	0.324	1.24
APOB	Apolipoprotein B-100	0.115	1.58	0.052	1.46	0.381	1.23
SAA4	Serum amyloid A-4 protein	0.103	1.63	0.019	1.53	0.869	1.22
ITIH4	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	0.559	1.10	0.083	1.37	0.381	1.18
THRB	Prothrombin	0.393	1.40	0.370	1.13	0.369	1.17
HBB	Hemoglobin subunit beta	0.808	0.95	0.697	0.93	0.279	1.17
APOC1	Apolipoprotein C-I	0.208	1.32	0.107	1.78	0.655	1.16
CO3	Complement C3	0.262	1.21	0.568	1.13	0.505	1.15
TETN	Tetranectin	0.037	1.48	0.097	1.60	0.423	1.14
ITIH1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	0.884	1.22	0.178	1.27	0.952	1.13
APOA4	Apolipoprotein A-IV	0.227	0.80	0.103	0.69	0.646	1.13
KNG1	Kininogen-1	0.731	1.16	0.065	1.28	0.703	1.11
APOD	Apolipoprotein D	0.848	1.03	0.249	0.71	0.792	1.11
APOA1	Apolipoprotein A-I	0.413	1.23	0.972	1.00	0.491	1.09
AACT	Alpha-1-antichymotrypsin	0.270	1.25	0.795	0.96	0.717	1.08
SEPP1	Selenoprotein P	0.135	1.65	0.529	1.24	0.731	1.08
IGHA2	Ig alpha-2 chain C region	0.780	1.25	0.853	1.02	0.853	1.08
LBP	Lipopolysaccharide-binding protein	0.574	1.33	0.124	1.82	0.721	1.06
DSG1	Desmoglein-1	0.929	1.73	0.528	0.83	0.881	1.06
CERU	Ceruloplasmin	0.590	1.24	0.905	0.93	0.737	1.06
APOH	Beta-2-glycoprotein 1	0.898	0.93	0.163	1.55	0.910	1.05
IGHA1	Ig alpha-1 chain C region	0.505	1.24	0.794	0.96	0.601	1.05
TRFE	Serotransferrin	0.798	1.10	0.997	0.99	0.857	1.05
TTHY	Transthyretin	0.518	1.18	0.414	1.23	0.902	1.04
GELS	Gelsolin	0.055	1.63	0.091	1.68	0.875	1.04

ANT3	Antithrombin-III	0.482	1.44	0.135	1.49	0.692	1.02
LAC2	Ig lambda-2 chain C regions	0.376	1.19	0.157	1.28	0.908	1.01
APOE	Apolipoprotein E	0.410	0.87	0.337	0.87	0.964	0.99
SPB3	Serpin B3	0.325	0.85	0.594	1.19	0.661	0.97
LAC1	Ig lambda-1 chain C regions	0.527	1.08	0.343	1.15	0.769	0.95
K1C9	Keratin, type I cytoskeletal 9	0.846	1.40	0.492	0.86	0.656	0.94
LV302	Ig lambda chain V-III region LOI	0.483	0.86	0.388	0.84	0.630	0.94
HV323	Ig heavy chain V-III region 23	0.431	0.85	0.377	0.82	0.547	0.92
KV105 KV101	Ig kappa chain V-I region DEE	0.463	1.23	0.560	0.90	0.581	0.92
IGHG1	Ig gamma-1 chain C region	0.638	0.93	0.975	0.99	0.496	0.89
IGKC	Ig kappa chain C region	0.515	1.07	0.658	1.10	0.310	0.88
CO7	Complement component C7	0.500	1.14	0.589	1.21	0.296	0.87
FHR1	Complement factor H-related protein 1	0.594	0.95	0.554	0.91	0.565	0.87
IGHG4	Ig gamma-4 chain C region	0.331	0.86	0.889	1.00	0.304	0.85
A1AG2	Alpha-1-acid glycoprotein 2	0.802	1.28	0.679	1.22	0.386	0.84
FETUA	Alpha-2-HS-glycoprotein	0.777	1.06	0.758	0.97	0.430	0.83
A1AG1	Alpha-1-acid glycoprotein 1	0.352	0.68	0.596	0.78	0.670	0.82
VTDB	Vitamin D-binding protein	0.560	0.74	0.932	0.96	0.825	0.80
AFAM	Afamin	0.654	0.94	0.840	0.92	0.572	0.76
HEMO	Hemopexin	0.352	0.75	0.995	0.95	0.382	0.76
HV305	Ig heavy chain V-III region BRO	0.702	1.09	0.540	1.08	0.573	0.73
IGHG2	Ig gamma-2 chain C region	0.214	0.86	0.386	1.13	0.176	0.73
HPT	Haptoglobin	0.488	0.90	0.447	0.85	0.105	0.73
K2C79	Keratin, type II cytoskeletal 79	0.698	0.98	0.261	0.49	0.722	0.71
A2MG	Alpha-2-macroglobulin	0.415	0.82	0.324	0.71	0.183	0.62
ALBU	Serum albumin	0.257	0.61	0.995	0.89	0.164	0.54
A1AT	Alpha-1-antitrypsin	0.242	0.61	0.258	0.59	0.103	0.45

Anexo 3. Tabla de proteínas (Sr + Ca)

Tabla A.3. Análisis diferencial Progenesis Q1 de proteínas más y menos adsorbidas en recubrimientos dopados con Sr y Ca respecto al material base. Las proteínas detectadas con ANOVA $p < 0.05$ (en amarillo) y una ratio superior a 1.3 (en verde) o inferior a 0.77 (en rojo) se consideraron significativamente diferentes (en negrita).

Código	Proteína	7M:3T-0.5Sr-0.5Ca vs 7M:3T		7M:3T-1Sr-0.5Ca vs 7M:3T		7M:3T-1.5Sr-0.5Ca vs 7M:3T	
		<i>p</i>	Ratio	<i>p</i>	Ratio	<i>p</i>	Ratio
HBA	Hemoglobin subunit alpha	0.008	14.09	0.091	10.82	0.011	13.48
APOF	Apolipoprotein F	0.001	10.44	0.002	12.54	0.000	11.01
APOL1	Apolipoprotein L1	0.034	5.46	0.028	8.82	0.013	10.02
ITIH3	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	0.334	1.82	0.157	3.50	0.008	7.53
K2C5	Keratin type II cytoskeletal 5	0.236	3.06	0.636	1.90	0.084	7.01
CO5	Complement C5	0.201	3.71	0.428	2.50	0.088	6.58
CLUS	Clusterin	0.000	4.75	0.001	5.48	0.001	6.32
FINC	Fibronectin	0.130	2.86	0.287	2.97	0.022	5.47
APOA4	Apolipoprotein A-IV	0.000	5.62	0.019	4.52	0.001	5.26
CO7	Complement component C7	0.189	4.13	0.636	2.11	0.127	5.25
CO4A	Complement C4-A	0.000	9.50	0.000	4.77	0.001	5.13
ZPI	Protein Z-dependent protease inhibitor	0.165	2.80	0.728	1.58	0.043	5.08
ITIH1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	0.179	1.57	0.113	1.94	0.003	4.46
KLKB1	Plasma kallikrein	0.612	0.54	0.536	2.20	0.190	3.99
PLTP	Phospholipid transfer protein	0.136	3.56	0.084	5.04	0.121	3.97
RET4	Retinol-binding protein 4	0.089	1.84	0.058	2.23	0.044	3.94
IGLL1	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1	0.013	3.38	0.153	2.79	0.006	3.88
F13B	Coagulation factor XIII B chain	0.025	4.43	0.071	3.67	0.035	3.59
ITIH2	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	0.577	1.31	0.317	2.39	0.020	3.46
ANGT	Angiotensinogen	0.862	0.88	0.041	2.14	0.028	3.43
CD14	Monocyte differentiation antigen CD14	0.592	1.33	0.041	5.93	0.046	3.41
APMAP	Adipocyte plasma membrane-associated prot	0.101	2.70	0.153	2.71	0.050	3.31

IGHD	Immunoglobulin heavy constant delta	0.824	1.23	0.297	3.05	0.108	3.22
PCYOX	Prenylcysteine oxidase 1	0.295	1.87	0.774	0.73	0.059	3.21
HEP2	Heparin cofactor 2	0.094	2.25	0.268	2.54	0.027	3.16
FBLN1	Fibulin-1	0.235	1.87	0.180	5.76	0.227	3.09
BLMH	Bleomycin hydrolase	0.238	2.31	0.505	1.47	0.113	3.06
APOM	Apolipoprotein M	0.095	2.15	0.897	1.20	0.054	2.89
CO4B	Complement C4-B	0.004	4.13	0.020	3.51	0.016	2.86
ALS	Insulin-like growth factor-binding protein	0.498	0.56	0.546	1.59	0.046	2.67
HABP2	Hyaluronan-binding protein 2	0.245	3.64	0.394	3.13	0.407	2.67
HRG	Histidine-rich glycoprotein	0.033	2.71	0.132	1.89	0.013	2.58
CXCL7	Platelet basic protein	0.890	0.90	0.418	0.35	0.156	2.57
K2C6C	Keratin type II cytoskeletal 6C	0.101	3.01	0.309	2.69	0.235	2.56
K2C78	Keratin type II cytoskeletal 78	0.762	0.71	0.620	1.75	0.371	2.56
CO9	Complement component C9	0.013	1.90	0.087	2.13	0.001	2.55
K2C4	Keratin type II cytoskeletal 4	0.433	0.62	0.527	1.84	0.204	2.49
FETUA	Alpha-2-HS-glycoprotein	0.049	2.87	0.277	2.34	0.054	2.42
HBD	Hemoglobin subunit delta	0.507	1.44	0.842	1.21	0.140	2.41
APOA1	Apolipoprotein A-I	0.004	2.15	0.028	2.02	0.002	2.39
AACT	Alpha-1-antichymotrypsin	0.061	1.69	0.785	1.24	0.008	2.32
GPX3	Glutathione peroxidase 3	0.602	1.30	0.837	1.30	0.018	2.29
CBG	Corticosteroid-binding globulin	0.647	1.54	0.774	1.39	0.323	2.27
CO8A	Complement component C8 alpha chain	0.035	2.12	0.125	2.33	0.033	2.23
K1H1	Keratin type I cuticular Ha1	0.914	1.16	0.929	0.90	0.497	2.23
IGHM	Immunoglobulin heavy constant mu	0.734	1.11	0.672	1.40	0.053	2.12
TGM3	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	0.350	2.19	0.292	2.33	0.352	2.09
SEMG1	Semenogelin-1	0.564	0.81	0.594	1.38	0.453	2.05
HVC33	Immunoglobulin heavy variable 3-30-3	0.113	3.62	0.825	1.29	0.275	2.01
PON1	Serum paraoxonase/arylesterase 1	0.239	1.34	0.323	1.69	0.030	1.99
FA11	Coagulation factor XI	0.992	1.01	0.932	0.92	0.345	1.98

VTDB	Vitamin D-binding protein	0.030	2.33	0.184	2.71	0.046	1.97
K22O	Keratin type II cytoskeletal 2 oral	0.974	0.99	0.915	1.08	0.219	1.95
CFAH	Complement factor H	0.654	1.11	0.817	1.17	0.072	1.95
PGRP2	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	0.583	1.31	0.491	1.91	0.219	1.94
HV108	Immunoglobulin heavy variable 1-8	0.951	1.03	0.541	1.38	0.222	1.92
CD5L	CD5 antigen-like	0.146	0.74	0.687	0.57	0.042	1.91
ANXA2	Annexin A2	0.137	2.62	0.199	2.27	0.423	1.90
C4BPA	C4b-binding protein alpha chain	0.539	0.78	0.875	0.87	0.117	1.87
CO8B	Complement component C8 beta chain	0.197	1.78	0.790	0.77	0.158	1.86
A1BG	Alpha-1B-glycoprotein	0.139	1.87	0.070	2.58	0.151	1.84
ZA2G	Zinc-alpha-2-glycoprotein	0.484	1.83	0.375	2.31	0.464	1.78
ITIH4	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	0.079	1.34	0.478	1.33	0.017	1.78
HPTR	Haptoglobin-related protein	0.704	1.15	0.642	1.49	0.187	1.78
AMBP	Protein AMBP	0.474	1.49	0.284	2.04	0.165	1.77
PROS	Vitamin K-dependent protein S	0.203	0.63	0.840	0.88	0.120	1.77
TSK	Tsukushin	0.292	1.89	0.955	1.05	0.426	1.74
CERU	Ceruloplasmin	0.162	1.60	0.094	1.87	0.103	1.72
C4BPB	C4b-binding protein beta chain	0.125	0.39	0.765	0.80	0.349	1.71
CO8G	Complement component C8 gamma chain	0.933	0.98	0.492	0.57	0.040	1.69
CFAB	Complement factor B	0.181	1.83	0.751	1.30	0.256	1.66
PLF4	Platelet factor 4	0.538	1.62	0.583	1.47	0.470	1.66
K22E	Keratin type II cytoskeletal 2 epidermal	0.751	0.89	0.941	1.04	0.360	1.59
C1S	Complement C1s subcomponent	0.707	1.13	0.739	1.15	0.169	1.56
PIGR	Polymeric immunoglobulin receptor	0.679	0.72	0.734	1.45	0.690	1.55
TFPI1	Tissue factor pathway inhibitor	0.043	2.08	0.415	1.37	0.326	1.55
IC1	Plasma protease C1 inhibitor	0.201	1.33	0.431	1.46	0.101	1.54
APOH	Beta-2-glycoprotein 1	0.495	1.43	0.769	1.29	0.380	1.54
APOB	Apolipoprotein B-100	0.517	0.76	0.990	0.99	0.224	1.53
CO6	Complement component C6	0.952	1.04	0.119	4.07	0.598	1.52

A1AG2	Alpha-1-acid glycoprotein 2	0.115	1.81	0.046	2.28	0.200	1.50
CO3	Complement C3	0.466	1.18	0.673	1.21	0.123	1.49
DSG1	Desmoglein-1	0.188	1.63	0.240	1.58	0.252	1.47
A1AG1	Alpha-1-acid glycoprotein 1	0.283	1.46	0.162	1.91	0.296	1.45
ANXA1	Annexin A1	0.388	1.80	0.428	2.06	0.588	1.43
APOA	Apolipoprotein(a)	0.142	2.03	0.630	1.47	0.447	1.43
GELS	Gelsolin	0.932	0.95	0.936	0.94	0.481	1.41
A2AP	Alpha-2-antiplasmin	0.893	0.90	0.811	1.22	0.640	1.41
HBB	Hemoglobin subunit beta	0.161	1.51	0.323	1.52	0.268	1.41
TTHY	Transthyretin α 26	0.589	0.76	0.807	1.17	0.500	1.41
TRFE	Serotransferrin	0.157	1.53	0.198	1.92	0.333	1.41
MASP1	Mannan-binding lectin serine protease 1	0.717	0.74	0.306	2.48	0.750	1.38
PLAK	Junction plakoglobin	0.728	1.13	0.435	1.41	0.437	1.38
A2MG	Alpha-2-macroglobulin	0.921	0.98	0.589	1.16	0.071	1.37
IGHA1	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	0.214	1.16	0.977	1.02	0.034	1.35
IGJ	Immunoglobulin J chain	0.141	0.50	0.650	0.61	0.532	1.33
APOA2	Apolipoprotein A-II	0.441	0.56	0.858	0.87	0.483	1.33
C1R	Complement C1r subcomponent	0.568	1.17	0.801	1.19	0.363	1.32
KV117	Immunoglobulin kappa variable 1-17	0.571	1.45	0.410	2.08	0.674	1.32
K1C13	Keratin type I cytoskeletal 13	0.056	3.95	0.246	2.26	0.573	1.31
ALBU	Serum albumin	0.037	1.61	0.066	1.72	0.231	1.31
HEMO	Hemopexin	0.095	1.61	0.370	1.52	0.316	1.30
K2C1	Keratin type II cytoskeletal 1	0.295	1.41	0.895	0.90	0.634	1.29
LUM	Lumican	0.665	1.25	0.614	1.28	0.615	1.27
PEDF	Pigment epithelium- derived factor	0.160	1.27	0.669	1.16	0.144	1.27
HPT	Haptoglobin	0.510	1.41	0.099	1.93	0.372	1.26
CPN2	Carboxypeptidase N subunit 2	0.694	1.12	0.024	2.37	0.376	1.26
AFAM	Afamin	0.463	1.61	0.086	3.35	0.729	1.26
TGM1	Protein-glutamine gamma- glutamyltransferase K	0.762	1.13	0.080	0.23	0.675	1.24

PIP	Prolactin-inducible protein	0.070	2.13	0.060	2.02	0.510	1.21
IGHG2	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	0.552	1.14	0.899	1.05	0.452	1.17
K1C10	Keratin type I cytoskeletal 10	0.538	1.14	0.750	0.89	0.519	1.16
SPB12	Serpin B12	0.163	0.36	0.988	0.99	0.787	1.15
HV551	Immunoglobulin heavy variable 5-51	0.659	0.88	0.855	0.86	0.787	1.10
CASPE	Caspase-14	0.214	0.47	0.170	2.11	0.883	1.08
DESP	Desmoplakin	0.786	0.85	0.627	1.53	0.867	1.07
CFAI	Complement factor I	0.296	1.14	0.821	0.96	0.741	1.07
K2C71	Keratin type II cytoskeletal 71	0.863	0.93	0.571	0.58	0.899	1.05
FHR2	Complement factor H-related protein 2	0.782	0.85	0.628	1.35	0.924	1.05
IGHG4	Immunoglobulin heavy constant gamma 4	0.186	1.48	0.293	1.54	0.945	1.02
CRP	C-reactive protein	0.220	0.49	0.223	0.28	0.984	1.01
MASP2	Mannan-binding lectin serine protease 2	1.000	1.00	0.669	1.20	1.000	1.00
LV147	Immunoglobulin lambda variable 1-47	1.000	1.00	0.298	1.92	1.000	1.00
CATA	Catalase	1.000	1.00	1.000	1.00	1.000	1.00
SAA2	Serum amyloid A-2 protein	1.000	1.00	0.322	0.70	1.000	1.00
PF4V	Platelet factor 4 variant	1.000	1.00	1.000	1.00	1.000	1.00
PHLD	Phosphatidylinositol-glycan-specific phosphatase D	0.045	2.07	0.221	2.38	1.000	1.00
DSC1	Desmocollin-1	1.000	1.00	1.000	1.00	1.000	1.00
KVD40	Immunoglobulin kappa variable 2D-40	0.907	0.95	0.780	0.80	0.990	0.99
ENOA	Alpha-enolase	0.840	0.89	0.730	0.82	0.988	0.99
KAIN	Kallistatin	0.291	0.48	0.911	1.07	0.908	0.96
A1AT	Alpha-1-antitrypsin	0.863	0.93	0.784	1.22	0.904	0.95
K1C16	Keratin type I cytoskeletal 16	0.073	2.35	0.670	0.64	0.916	0.94
C1QB	Complement C1q subcomponent subunit B	0.407	0.76	0.611	0.68	0.756	0.91
PSMD1	26S proteasome non-ATPase regulatory sub 1	0.725	1.25	0.400	1.72	0.871	0.89
KVD33	Immunoglobulin kappa variable 1D-33	0.227	0.40	0.915	1.06	0.751	0.88
IGHG3	Immunoglobulin heavy constant gamma 3	0.050	0.26	0.283	0.36	0.717	0.86
KV320	Immunoglobulin kappa variable 3-20	0.292	0.74	0.565	0.77	0.461	0.81

CPSM	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia] mitochondrial	0.573	0.58	0.900	1.13	0.822	0.80
IGKC	Immunoglobulin kappa constant	0.024	0.68	0.359	0.77	0.249	0.80
LG3BP	Galectin-3-binding protein	0.063	0.36	0.224	0.22	0.626	0.80
ACTB	Actin cytoplasmic 1	0.045	0.41	0.341	0.68	0.805	0.79
FHR5	Complement factor H-related protein 5	0.811	0.87	0.523	0.67	0.758	0.79
KV127	Immunoglobulin kappa variable 1-27	0.578	0.62	0.556	0.48	0.784	0.78
PLMN	Plasminogen	0.077	0.52	0.359	0.55	0.410	0.77
IGHG1	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	0.066	0.58	0.253	0.63	0.353	0.77
THRB	Prothrombin	0.020	0.56	0.234	0.65	0.312	0.77
K1C14	Keratin type I cytoskeletal 14	0.594	0.80	0.280	0.29	0.513	0.76
APOC4	Apolipoprotein C-IV	0.428	0.58	0.724	0.62	0.818	0.76
PKP1	Plakophilin-1	0.005	0.42	0.030	0.22	0.180	0.75
PCOC1	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	0.649	0.73	0.285	0.42	0.650	0.73
K1C9	Keratin type I cytoskeletal 9	0.738	1.11	0.676	0.88	0.517	0.71
FIBB	Fibrinogen beta chain	0.150	0.53	0.300	1.81	0.430	0.70
FCN2	Ficolin-2	0.123	0.40	0.984	0.99	0.315	0.66
K1C17	Keratin type I cytoskeletal 17	0.665	1.31	0.678	0.71	0.444	0.66
APOE	Apolipoprotein E	0.211	0.74	0.615	0.77	0.185	0.65
HV118	Immunoglobulin heavy variable 1-18	0.237	0.62	0.266	0.38	0.168	0.64
IPSP	Plasma serine protease inhibitor	0.284	0.55	0.416	0.48	0.437	0.63
FA5	Coagulation factor V	0.906	0.95	0.779	1.15	0.444	0.62
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein	0.477	0.78	0.289	0.49	0.261	0.61
IGLL5	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	0.022	0.41	0.108	0.51	0.057	0.61
IGHA2	Immunoglobulin heavy constant alpha 2	0.681	0.71	0.352	1.47	0.498	0.58
IGLC6	Immunoglobulin lambda constant 6	0.014	0.51	0.107	0.60	0.022	0.57
S10A7	Protein S100-A7	0.935	1.05	0.668	1.50	0.475	0.56
CO2	Complement C2	0.172	3.99	0.496	0.33	0.543	0.54
KCRM	Creatine kinase M-type	0.112	0.36	0.202	0.33	0.269	0.52
FA12	Coagulation factor XII	0.115	0.17	0.283	0.27	0.413	0.50

K2C1B	Keratin type II cytoskeletal 1b	0.036	0.16	0.346	0.37	0.214	0.49
HSPB1	Heat shock protein beta-1	0.167	0.37	0.581	0.58	0.328	0.49
KNG1	Kininogen-1	0.565	0.82	0.369	0.45	0.283	0.48
G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.016	0.33	0.296	0.30	0.205	0.46
KV106	Immunoglobulin kappa variable 1-6	0.011	0.36	0.118	0.35	0.020	0.38
SAA1	Serum amyloid A-1 protein	0.228	0.48	0.032	0.34	0.065	0.38
CBPB2	Carboxypeptidase B2	0.304	0.30	0.197	0.23	0.357	0.37
VTNC	Vitronectin	0.006	0.33	0.047	0.32	0.006	0.36
IBP4	Insulin-like growth factor-binding protein 4	0.002	0.18	0.048	0.48	0.013	0.35
ANT3	Antithrombin-III	0.000	0.23	0.004	0.27	0.001	0.31
FABP5	Fatty acid-binding protein 5	0.940	0.89	0.336	0.24	0.302	0.24
FA9	Coagulation factor IX	0.258	0.28	0.062	0.19	0.032	0.17
S10A9	Protein S100-A9	0.016	0.03	0.019	0.03	0.261	0.10
PRG4	Proteoglycan 4	0.003	0.13	0.013	0.08	0.008	0.10
FA10	Coagulation factor X	0.004	0.08	0.001	0.04	0.003	0.09
PROC	Vitamin K-dependent protein C	0.002	0.01	0.004	0.02	0.000	0.02

Anexo 4. Listado de abreviaturas

ALP	Fosfatasa alcalina
BIC	Hueso en contacto
BMP	Proteínas morfogenéticas óseas
ECM	Matriz extracelular
EDX	Espectroscopia por energía dispersiva de Rayos X
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FBGC	Células gigantes de cuerpo extraño
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FTIR/ATR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada
GPTMS	3-Glicidoxipropiltrimetoxisilano
HA	Hidroxiapatita
ICP-AES	Espectroscopia de emisión con plasma acoplado inductivamente
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IM	Vía intramuscular
LC	Cromatografía líquida
MAC	Complejo de ataque a membrana
MALDI	Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz
MC3T3-E1	Línea celular de osteoblastos de ratón de laboratorio
MS	Espectrometría de masas
MTMOS	Metiltrimetoxisilano
OD	Densidad óptica
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PE	Polietileno
PI	Punto isoeléctrico
PMMA	Polimetilmetacrilato
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
PTFE	Politetrafluoroetileno
PTH	Hormona paratiroidea

RAW 264.7	Línea celular de macrófagos de ratón murino
RFGD	Descarga luminiscente de radiofrecuencia
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SC	Vía subcutánea
SEM	Microscopia Electrónica de Barrido
TEOS	Tetraetoxisilano
TF	Factores tisulares
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TOF	Tiempo de vuelo
tPA	Activador tisular del plasminógeno
uPA	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VTES	Viniltrietoxisilano

