

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR III



OPTIMIZACIÓN DE MATERIALES PARA REGENERACIÓN ÓSEA.
ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DE HIDROXIAPATITA CON
PROTEÍNAS Y PREPARACIÓN DE ANDAMIOS POROSOS.

(“OPTIMIZATION OF MATERIALS FOR BONE REGENERATION. STUDY OF THE
INTERACTION OF HYDROXYAPATITE WITH PROTEINS AND PREPARATION OF
POROUS SCAFFOLDS”)

TESIS DOCTORAL DE:

BELÉN FERNÁNDEZ-MONTES MORALEDA

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

**LUIS MARÍA RODRÍGUEZ LORENZO
MAR FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ
JULIO SAN ROMÁN DEL BARRIO**

Madrid, 2013

Optimización de materiales para regeneración ósea. Estudio de las interacciones de hidroxiapatita con proteínas y preparación de andamios porosos.

(“Optimization of materials for bone regeneration. Study of the interaction of hydroxyapatite with proteins and preparation of porous scaffolds”)

BELEN FERNANDEZ-MONTES MORALEDA

Directores:

Luis María Rodríguez Lorenzo

Mar Fernández Gutiérrez

Julio San Román del Barrio

Grupo de Biomateriales,

Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II

Facultad de Medicina, UCM, Madrid

INDICE

CAPITULO I. INTRODUCCION	9
1.1. INGENIERIA TISULAR	10
1.2. EL TEJIDO OSEO	13
1.3. INGENIERIA DE TEJIDO OSEO (ITO)	16
1.3.1. Biomateriales	17
1.3.2. Composites.....	19
1.4. MATERIALES Y ANDAMIOS ESTUDIADOS EN ESTA TESIS	22
1.4.1. Hidroxiapatita.....	22
1.4.2. Proteínas	23
1.4.3. Composites Bioactivos	33
1.4.4. Andamios.....	34
1.5. REFERENCIAS.....	41
OBJETIVOS.....	48
CAPITULO II: Estudio de las interacciones de la Hidroxiapatita con el medio biológico, las proteínas.	50
2.1. INTRODUCCION	51
2.1.1. Síntesis Hidroxiapatita.....	51
2.2. INFLUENCE OF SURFACE FEATURES OF THE HYDROXYAPATITE ON THE ADSORPTION OF PROTEINS RELEVANT TO BONE REGENERATION.	53
2.2.1. Abstract	53
2.2.2. Introduction.....	55
2.2.3. Materials and methods.	57
2.2.4. Results.	59
2.2.5. Discussion.....	65
2.2.6. Conclusions.....	71
2.2.7. References.....	72
2.3. Adsorption and conformational modification of Fibrinogen and Fibronectin adsorbed on Hydroxyapatite	77
2.3.1. Abstract	77
2.3.2. Introduction.....	79
2.3.3. Materials and methods	81

2.3.4. Results	83
2.3.5. Discussion.....	91
2.3.6. Conclusions.....	94
2.3.7. References.....	95
2.4. Tailored adsorption of albumin and collagen on hydroxyapatite; study of the influence of surface parameters.....	99
2.4.1. Abstract	99
2.4.2. Introduction.....	101
2.4.3. Experimental Methods.....	103
2.4.4. Results.....	105
2.4.5. Discussion.....	111
2.4.6. Conclusions.....	115
2.2.7. References.....	116
2.5. DISCUSION Y CONCLUSIONES	120
CAPITULO III: Modulación de la porosidad en andamios para ingeniería de tejido óseo.....	123
3.1. INTRODUCCION	124
3.2. PREPARACIÓN DE ANDAMIOS BASADOS EN POLIVINIL PIRROLIDONA	126
3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS	129
3.3. 1. Resonancia Magnética nuclear de protón, ¹ H-RMN.	129
3.3. 2. Espectroscopia infrarroja, ATR-FTIR.....	130
3.3. 3. Análisis termogravimétrico, TGA.....	133
3.3. 4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	137
3.3. 5. Análisis Dinámico Mecánico (DMA)	138
3.3. 6. Densidad/porosidad	141
3.3. 7. Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	144
3.3. 8. Estudios de hinchamiento.....	148
3.4.DISCUSIÓN.....	150
3. 5. ESTUDIOS CELULARES.....	152
3.5.1. Introducción	152
3.5.2 Reactivos, cultivos celulares y muestras celulares.....	152
3.5.3. Métodos	154
3.5.3. Resultados y discusión	157
3.5.4. Conclusiones.....	162

3.6. BIBLIOGRAFIA.....	163
CONCLUSIONES	166
APENDICE 1: Reactivos:.....	169
APÉNDICE 2: Técnicas de caracterización:	170

LISTA DE FIGURAS

Figuras Capítulo I

Figura 1.1. Esquema de la Ingeniería de tejido, los elementos fundamentales.

Figura 1.2. (a) Esquema general del tejido óseo, (b) esquema del proceso de regeneración del hueso.

Figura 1.3. Esquema de los procesos celulares que tienen lugar cuando se implanta un biomaterial en el cuerpo.

Figura 1.4. Esquema conformaciones que pueden adquirir las proteínas fibrosas adsorbidas.

Figura 1.5. Estructura de una molécula de fibrinógeno.

Figura 1.6. Estructura de una molécula de Fibronectina, con los distintos dominios que presenta.

Figura 1.7. Estructura unidad y fibras de colágeno.

Figura 1.8. Estructura de una molécula de albúmina sérica.

Figura 1.9. Esquema organización proteínas estudiadas.

Figura 1.10. Características andamios para regeneración ósea.

Figuras Capítulo II

Figura 2.1. Esquema del equipo "Titrande" utilizado para controlar los parámetros de síntesis.

Figura 2.2. Esquema del reactor utilizado para la síntesis.

Figure 2.3.a), FTIR spectra and b) XRD patterns of synthesized (OHAp, OHAp-aa), and calcined (OHAp-C, OHAp-aa-C) powders.

Figure 2.4. Thermogravimetric analysis of OHAp and OHAp-aa powders

Figure 2.5. TEM images of OHAp and OHAp-aa powders.

Figure 2.6. Zeta potential curves of the apatite powders as a function of pH

Figure 2.7. a) Fibrinogen and b) Fibronectin adsorption vs. protein concentration in solution.

Figure 2.8. Raman spectra of free and adsorbed Fibrinogen for the 1400-1800 cm^{-1} region. The deconvoluted components of the amide II band are also included.

Figure 2.9. Ternary diagrams for the Fg and Fn adsorption analysis. a) SSA and particle size versus Fg adsorbed. b) crystal size and particle size versus Fg adsorbed. c) crystal size and SSA versus Fg adsorbed. d) SSA and particle size versus Fn adsorbed. e) crystal size and particle size versus Fn adsorbed. f) crystal size and SSA versus Fn adsorbed.

Figure 2.10. Mass shifts, ΔM , recorded against time for Fn adsorption on hydroxyapatite samples. Fibrinectin solution was introduced at p1, and PBS solution at p2.

Figure 2.11. Protein concentration of 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for fibrinogen and fibronectin with the entire sample studied.

Figure 2.12. ΔD versus ΔF , for Fibrinogen solution 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for the different samples studied

Figure 2.13. ΔD as a function of ΔF for Fn samples no calcined for the protein concentration 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Figure 2.14. ΔD as a function of ΔF for Fn 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ solutions adsorbed on OHAp and OHAp-aa

Figure 2.15. ΔD as a function of ΔF for Fn 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ solutions adsorbed on OHAp-C and OHAp-aaC

Figure 2.16. ΔD as a function of ΔF for Fn, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Figure 2.17. XRD patterns of apatites. a) Synthesized samples b) Calcined samples

Figure 2.18: a) albumin and b) collagen adsorption vs. protein availability in solution obtained by uv/vis spectroscopy.

Figure 2.19. AD versus time obtained for a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HSA concentration on the QCM-D.

Figure 2.20. HSA adsorption versus CS, PS and SSA of the hydroxyapatites samples for the 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration experiments showing that no linear fit can be established for any of the parameters

Figure 2.21. Coll adsorption versus CS, PS and SSA of the hydroxyapatites samples for the 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration experiments showing that no linear fit can be established for any of the parameters

Supplementary file 2.1. Graphic with each surface characteristic with the different Fibrinogen concentrations.

Supplementary file 2.2. Graphic with each surface characteristic with the different Fibronectin concentrations.

Figuras Capítulo III

Figura 3.1.a) Diagrama de Flujo de síntesis del compuesto.

Figura 3.1.b) Diagrama de Flujo de la preparación de andamios porosos.

Figura 3.2. Espectro del monómero de VP

Figura 3.3. Espectro del polímero sintetizado registrado en CDCl_3 300MHz.

Figura 3.4. Espectros obtenidos de VP, A1.

Figura 3.5. Espectros obtenidos de A1 sintetizado sin hidroxiapatita B1 con un 15% de hidroxiapatita.

Figura 3.6. (a) TGA pérdida de peso en función de la temperatura de los compuestos sin hidroxiapatita. (b) TGA Derivada de la pérdida de peso en función de la temperatura

Figura 3.7. Compuestos sintetizado con distintas proporciones de hidroxiapatita. Figura a porcentaje de pérdida de peso y b derivada de la curva de perdida de peso.

Figura 3.8. Termograma de los monómeros utilizados

Figura 3.9. Termogramas obtenidos de los distintos compuestos estudiados.

Figura 3.10. Módulos de almacenamiento de los compuestos estudiados

Figura 3.11. Gráfica de tan delta de cada uno de los compuestos estudiados.

Figura 3.12. Porcentaje de porosidad de cada una de las muestras frente a las distintas velocidades de enfriamiento estudiadas.

Figura 3.13. Porcentaje de porosidad de todas las muestras estudiadas.

Figura 3. 14. Micrografías de la superficie de fractura en A1.

Figura 3.15. Micrografías del composite C1.

Figura 3.16. (a) B1 (Velocidad de enfriamiento (0.9 °C/min), (b) B2 (0.4 °C/min), (c) B3 (0.2 °C/min).

Figura 3.17. Representación hinchamiento, porcentaje hinchamiento en función del peso de cada una de las muestras estudiadas frente al tiempo.

Figura 3.18. Osteoblastos humanos en cultivo (subcultivo 5) transcurridas 24 h desde su siembra, bajo microscopio invertido de contraste de fases

Figura 3.19. (a) Estructura química del reactivo MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio], (B) mecanismo de acción del reactivo.

Figura 3.20. Esquema del protocolo seguido en los ensayos de citotoxicidad.

*Figura 3.21. Resultados del ensayo MTT para los materiales ensayados. Se representa la media \pm desviación estándar (n= 8) y las diferencias significativas obtenidas con respecto al TMX: * $p < 0,05$.*

Figura 3.22. Osteoblastos humanos en cultivo bajo microscopio electrónico de barrido transcurridas 24 (A) y 48 h (B) desde su siembra sobre la superficie del control negativo TMX.

Figura 3.23. Osteoblastos humanos en cultivo bajo microscopio electrónico de barrido transcurridas 24 (A) y 48 h (B) desde su siembra sobre la superficie del compuesto C3.

Figura 3.24. Osteoblastos humanos en cultivo bajo microscopio electrónico de barrido transcurridas 24 (A) y 48 h (B) desde su siembra sobre la superficie del compuesto C2.

LISTA DE ABREVIATURAS

aa: ácido acrílico

AIBN: 2,2'-azo-bis-isobutironitrilo

ALP: Alcalino Fosfatasa.

ANOVA: Análisis de varianza de una vía

ATR/FTIR: espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier por reflectancia total atenuada

BSA: Albúmina sérica bovina

Coll: colágeno tipo I

DLS: dispersión de luz dinámica

DMA: análisis mecánico diferencial

DMEM: medio mínimo esencial para el cultivo celular

DSC: calorimetría diferencial de barrido

ECM: matriz extracelular

EDTA: etilendiaminotetracético

Fn: fibronectina

Fb: Fibrinógeno

FDA: food and drug Administration

¹H: proton

IC₅₀: concentración inhibitoria del 50%

M_w: peso molecular promedio en peso

MTT: bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

NMR: resonancia magnética nuclear

OHAp: hidroxiapatita

PBS: disolución de tampón fosfato

PEGDMA: polietilenglicoldimetacrilato

PVP: poli (vinilpirrolidona)

QCM-D: microbalanza de cuarzo con disipación

SEM: microscopía electrónica de barrido

T_g: temperatura de transición vítrea

T_{max}: temperatura del máximo grado de descomposición

TEM: microscopía electrónica de transmisión.

TGA: análisis termogravimétrico

UV/Vis: ultravioleta visible

VP: n-vinil-pirrolidona

CAPITULO I. INTRODUCCION

1.1. INGENIERIA TISULAR

La definición de ingeniería de la RAE “*Estudio y aplicación, por especialistas, de las diversas ramas de la tecnología*”.

La **ingeniería biomédica** es el resultado de la aplicación de los principios y técnicas de la ingeniería al campo de la medicina. La ingeniería de tejidos, es la rama de la bioingeniería que se sirve de la combinación de células, métodos de ingeniería de materiales, bioquímica y fisicoquímica para mejorar o reemplazar funciones biológicas, reparar o reemplazar parcial o totalmente tejidos.

La **Ingeniería de Materiales** es una rama de la ingeniería que se fundamenta en las relaciones propiedades-estructura y diseña o proyecta la estructura de un material para conseguir un conjunto predeterminado de propiedades. Esta ingeniería está muy relacionada con la mecánica y la fabricación.

En la ingeniería tisular [1], se ponen a trabajar juntos los conocimientos de biología; celular, molecular y bioquímica. Y como ya hemos mencionado: Química, Ingeniería y materiales. No podría llevarse a cabo la regeneración, reparación de ningún tejido de cuerpo sin alguna de ellas [2].

El cuerpo funciona como un todo, es lo que se denomina proceso sistémico, cuando se produce un daño o lesión, va a poner en marcha toda la maquinaria de la que dispone para repararlo. Aunque el objetivo del cuerpo sea reparar el daño causado, en muchos casos, no dispone de las herramientas necesarias para ello. Las herramientas que se le pueden suministrar son tres:

- Andamios o matrices, deben tener una serie de características claves por cada de tipo de tejido a reparar. La elección del material a utilizar es crucial [3]. En ellos se van a adherir, migrar, diferenciarse y proliferar las células. Debe aportar un sustrato adecuado para que las células puedan llevar a cabo cada una de sus funciones [4].
- células precursoras del tejido, se adhieren a la matriz y deben recrear los tejidos a reconstruir [5].

- Moléculas bioactivas, son necesarias en todos los procesos regenerativos naturales, en los artificiales en mayor medida [6]. Van a asegurar una correcta interacción entre las células y los andamios.

No siempre es necesario, la actuación de los tres elementos. Para reparar pequeñas lesiones, el uso de células aisladas junto con factores de crecimiento puede ser utilizado. Por ejemplo, una técnica que se está utilizando actualmente, para la generación de nuevo tejido, por ejemplo cartílago, está basada en aislar células de una biopsia, usando bioreactores y andamios tridimensionales y luego inyectarlas directamente en el tejido [7]. Otras veces, implantando un polímero en el defecto, las células del tejido circundante colonizan el andamio o incluso se inyectan células que se adhieren al constructo, usando el cuerpo como un bioreactor natural [8]. Debido a las limitaciones de lesiones pequeñas y muy concretas, se está avanzando en el desarrollo de andamios o constructos tridimensionales, que sirvan de guía para el crecimiento celular, síntesis de la matriz extracelular y otras moléculas biológicas, facilitando la formación del nuevo órgano o tejido [9].

No se trata tanto de reparar, sino de regenerar, de estimular los mecanismos ya presentes de forma natural en el organismo. El proceso regenerativo en los tejidos, es mucho más pausado que el de reparación. Por necesidades biológicas de supervivencia, éste tiene que abreviar etapas para restablecer prontamente la integridad estructural. Estos objetivos se cumplen con el empleo de factores bioactivos [10] y de andamios que sirven de vehículos, estructura conductora, apoyo mecánico y guía organizativa [11].

En muchos de los casos de daño tisular, el organismo dispone de varios de los elementos fundamentales. Cada tipo de tejido a reparar presenta unas características críticas y unos elementos que deben ser estudiados en detalle [12].

El objetivo de la Ingeniería de tejido, es aislar células del paciente, por medio de una biopsia o método mínimamente invasivo. Proliferación de las células específicas en un andamio tridimensional, bajo unas condiciones de cultivo controladas. Para una vez obtenidas una determinada población celular, trasplantar este conjunto a la zona deseada del cuerpo, de forma que se dirija la formación del nuevo tejido dentro del andamio, mientras este se va degradando a través del tiempo [13].

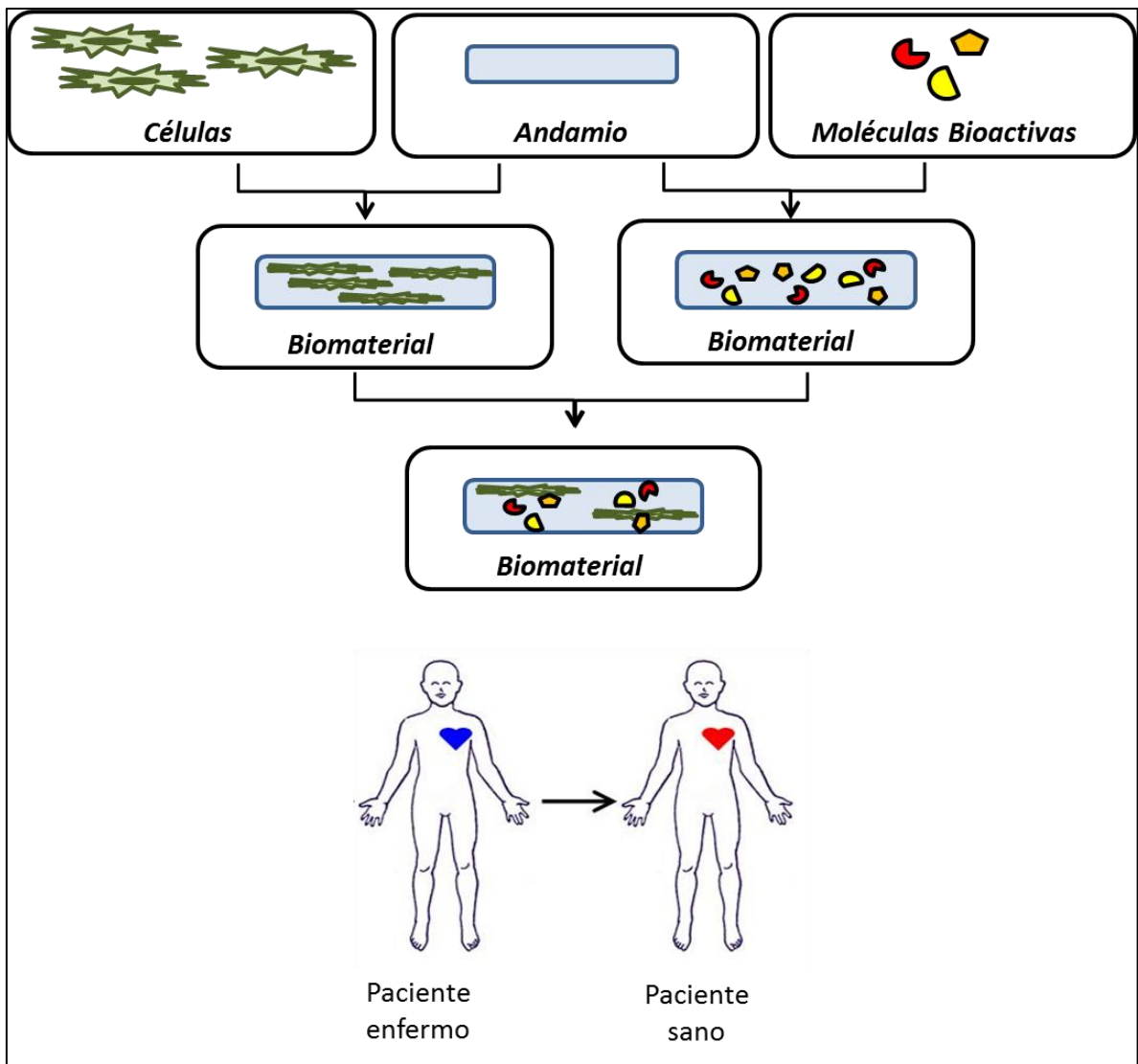


Figura 1.1. Esquema de la Ingeniería de tejido, los elementos fundamentales. Juntos, combinados o cada uno por separado pueden ser utilizados como biomaterial.

1.2. EL TEJIDO OSEO.

El tejido óseo representa la parte más importante del esqueleto. Desde el punto de vista tecnológico es único en cuanto a compendiar gran dureza y fortaleza con el mínimo peso posible. A pesar de su dureza y resistencia, el tejido óseo posee cierta elasticidad, todas propiedades que lo hacen especialmente apto como material esquelético.

El tejido óseo, es una forma especializada de tejido conectivo denso. Los componentes extracelulares sufren calcificación, lo que les da la dureza. El tejido óseo provee al esqueleto de su necesaria fortaleza para funcionar como sitio de inserción y sostén de peso para los músculos y dar cierta rigidez al organizamos para protegerlo.

El hueso es un tejido vivo compuesto por minerales, proteínas, agua, células y otras macromoléculas. Aunque la proporción de las diversas sustancias varía de acuerdo a las diferentes partes del cuerpo, edad del individuo o presencia de alguna enfermedad, el tejido óseo contiene en forma general dos tercios de sustancias inorgánicas y un tercio de sustancias orgánicas. La fase inorgánica o mineral representa entre un 60 y un 70% en peso del tejido óseo, contiene además entre un 5 y un 8% de agua y el resto está constituido por la matriz orgánica la cual está compuesta en un 90% por colágeno y un 5-8% por otras proteínas.

El hueso es un tejido conjuntivo mineralizado duro y elástico que proporciona soporte y protección a los órganos, responsable del mantenimiento de homeostasis mineral y fuente de células troncales hematopoyéticas. Por lo tanto, el tejido óseo esta involucrado en un ciclo constante de resorción y formación (remodelado óseo) controlado por la regulación hormonal y las necesidades mecánicas [14].

Para explicar la organización celular, vamos a describir como tiene lugar el proceso de remodelación ósea, en la que entren el juego los distintos componentes del hueso. Durante todo el crecimiento, los huesos mantienen su forma externa. Esto se debe a que continuamente se produce una remodelación de la superficie del hueso, puesto que se deposita y ser reabsorbe tejido óseo en distintas zonas. La reorganización interna comienza con la formación de grandes espacios cilíndricos alrededor de los vasos sanguíneos, como consecuencia de la actividad osteoclástica, que reabsorbe el tejido óseo formado al principio. Luego se diferencian osteoblastos que depositan capa tras capa de tejido óseo laminar sobre las paredes del conducto, tras lo cual es rellenado y forma el sistema de Havers definitivo. Así la reorganización continua de manera activa durante toda la vida [15].

La **matriz extracelular**, formada por la matriz orgánica, y el mineral óseo. aproximadamente el 90% de las proteínas de la matriz osteoide corresponden al colágeno tipo I, que presenta en su molécula la secuencia RGD (Arg-Gli-Asp), que es reconocida específicamente por las integrinas de las células óseas y constituye una de las vías por las que estas actúan sobre la matriz extracelular. Se puede decir que el colágeno es la proteína estructural de la matriz orgánica del hueso por excelencia, las proteínas no colagénicas, además de contribuir a tal estructura, intervienen o median fundamentalmente en la fisiología dinámica del hueso.

El mineral óseo representa alrededor de las dos terceras partes de su volumen total y se compone esencialmente de hidroxipatita.

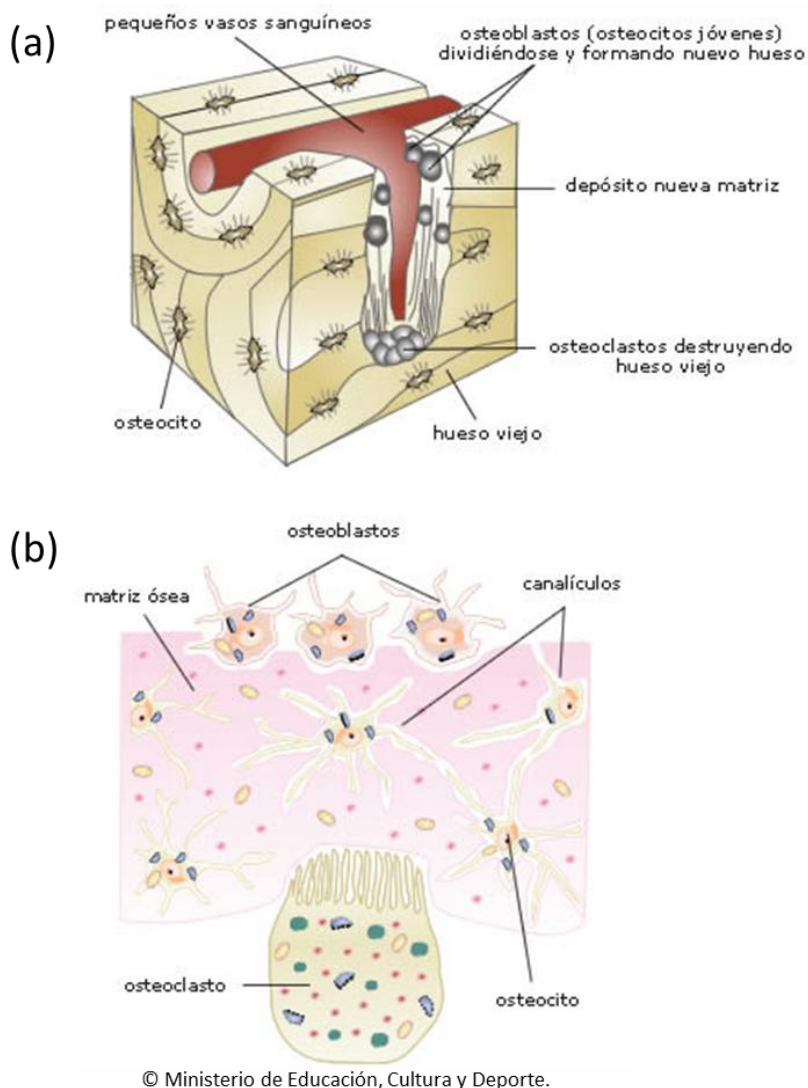


Figura 1.2. (a) Esquema general del tejido óseo, (b) esquema del proceso de regeneración del hueso.

Los **osteoblastos** son las células responsables de la formación de tejido óseo. Un osteoblasto se define como una célula capaz de producir osteoide o matriz ósea. Este tipo de células produce colágeno de tipo I, osteocalcina y sialoproteína, además de proteínas constitutivas de la matriz extracelular ósea. Los osteoblastos rodeados por osteoide (matriz ósea desmineralizada), una vez que han alcanzado el final de su actividad y la matriz ósea se mineraliza, se convierten en osteocitos. Los **osteocitos** representan la población de células vivientes estables y tienen la tarea de mantener al hueso como un tejido vivo.

Los **osteoclastos** son los principales causantes de la reabsorción ósea. Estas células se unen a la superficie del hueso mediante proteínas encargadas de la unión celular llamadas integrinas. Aíslan una zona del hueso a la cual se han unido y bajan el pH localmente mediante la producción de protones a través del sistema de anhidrasa carbónica. El bajo pH incrementa la solubilidad de los cristales de hidroxiapatita, y una vez que la fase mineral ha sido eliminada, los componentes orgánicos de la matriz son hidrolizados por medio de la digestión de ácidos proteolíticos [16].

Cuando se produce una fractura ósea, la consolidación ósea se divide en tres fases: La primera reacción a una fractura es la aparición de un hematoma, *fase de inflamación*, como consecuencia de la rotura de los vasos de la médula ósea y el periostio. Tras la coagulación, viene la *fase de reparación*, el hematoma es invadido por tejido conectivo de crecimiento hacia adentro recientemente formado, La organización del hematoma de fractura proporciona un soporte de fibrina que facilita la migración celular, proliferación y síntesis de matriz ósea, y se forma un tejido de granulación. Los macrófagos eliminan el tejido necrosado y los osteoclastos recientemente formados eliminan los fragmentos óseos. El tejido de granulación se transforma luego en tejido conectivo denso, las células mesenquimales pluripotenciales del foco de fractura y del torrente sanguíneo son las responsables de la neoformación ósea. La composición del callo óseo se modifica a medida que progresa la consolidación, de tal forma que las células sustituyen el coágulo de fibrina por una matriz fibrosa que contiene colágeno tipo I y III, proteoglicanos y glicosaminoglicanos. El callo óseo sufre posteriormente una reorganización a tejido óseo laminar compacto, la *fase de remodelación*. Cuando la remodelación del callo óseo concluye completamente, se recuperan las propiedades mecánicas originales del hueso comprometido [17].

1.3. INGENIERIA DE TEJIDO OSEO (ITO)

El objetivo de la **ingeniería de tejido óseo**, es el desarrollo de un constructo, que se implante en el organismo y cumpla las funciones del hueso, tanto a nivel celular como estructural, sin producir reacciones inmunológicas y permitiendo un crecimiento adecuado del tejido natural [18].

Esta disciplina se hace necesaria como consecuencia de la cantidad de enfermedades musculoesqueléticas o desordenes (ej. artritis, osteoporosis, osteonecrosis, fracturas, tumores, traumas [19]) que afectan a cientos de millones de personas en el mundo. En Estados Unidos, cada año se implantan cerca de 200.000 prótesis en cirugía ortopédica. En Europa, el número de fracturas relacionadas con osteoporosis se ha duplicado en la última década. Se estima que 40% del total de mujeres con más de 50 años de edad sufrirá alguna fractura osteoporótica. Se estima que el número de fracturas de cadera aumentará de aproximadamente 1.7 millones en el año 1990 a 6.3 millones en el año 2050. Las lesiones causadas por accidentes de tráfico producen una elevada demanda de dispositivos para la regeneración y reparación ósea. De hecho, las lesiones por accidentes de tráfico están aumentando rápidamente y representaran aproximadamente un 25% de los gastos del sector salud en los países desarrollados [10, 20].

El tratamiento ideal, sería aquel que mejore y/o imite la respuesta natural del cuerpo ante las lesiones en el hueso, mediante el uso de biomoléculas o factores de crecimiento y células, dando como resultado el crecimiento de hueso natural en el lugar del daño producido. Eliminando así el implante permanente de un material que impida el crecimiento del hueso natural.

Tradicionalmente este tipo de enfermedades, dependiendo de la su naturaleza, se han tratado con dos tipos fundamentales de sustitutivos óseos: los injertos, que corresponden a fragmentos de hueso (que pueden ser del propio paciente; autoinjertos, de otro paciente; autoinjertos, de otra especie; xenoinjerto) y los biomateriales. Dichos materiales mediante cirugía, se introducen en el cuerpo, en la región dañada y se espera la actuación por parte del organismo para que repare el tejido y para ello utilice el material aportado.

1.3.1. Biomateriales

La primera generación de biomateriales utilizados, se clasificó como biomateriales bioinertes. Con el paso de los años, se hizo patente que dichos materiales presentan grandes limitaciones, como por ejemplo que la interacción material-tejido estaba muy comprometida, y nada controlada. Así surgieron los biomateriales bioactivos, cuyo objetivo añadido, es el de interactuar de manera activa con el organismo favoreciendo la integración del biomaterial. Al mismo tiempo surgió el concepto de biomateriales bioreabsorbibles, (“Condición de ciertos biomateriales que, después de ser implantados en un tejido del organismo, experimentan fenómenos de disolución en los fluidos corporales” [7]). Estos fueron clasificados como los biomateriales de segunda generación.

A efectos prácticos, en la actualidad se utilizan en clínica de reparación ósea fundamentalmente biomateriales no reabsorbibles (ej. Materiales de titanio) con elementos bioactivos (ej., recubiertos con fosfatos de calcio).

En los últimos años, se han desarrollado una tercera generación de biomateriales. Estos materiales, buscan interactuar con el tejido de forma específica, mediante estímulos a nivel celular y molecular, y combinan las propiedades de bioabsorbabilidad y bioactividad dentro del mismo material. Por lo que cada vez, los criterios se van acercando más a lo que sería el biomaterial ideal [20].

Los materiales de uso biomédicos pueden tener un origen artificial o biológico. Atendiendo a la naturaleza del material con el que se fabrique el implante, los biomateriales artificiales, se pueden clasificar en materiales metálicos, polímeros, cerámicos o materiales compuestos.

- Biomateriales cerámicos: presentan un número limitado de componentes que pueden utilizarse. El requisito fundamental es su no toxicidad en el organismo. Otra de sus limitaciones es la corrosión, problema general de los metales y más si esta en medio hostil, como es el caso de cuerpo humano.
- Biomateriales poliméricos: ampliamente utilizados en clínica. Presentan enormes posibilidades, tanto en variedad de compuestos como en fabricación, con características muy diversas. Son muy utilizados en muchas áreas médicas (los stents, hilos de sutura, etc.), pero en otras presentan altas limitaciones.

- Biomateriales cerámicos, alta osteointegración, presentan también una baja reactividad química, lo que les hace casi inertes, y por tanto biocompatibles, Las cerámicas utilizadas en cirugía reconstructiva pueden ser tanto bioinertes como bioactivas. Su fragilidad restringe mucho su utilización.
- Materiales compuestos, surgen como consecuencias de las limitaciones de los biomateriales antes mencionados. Dependiendo de los requisitos necesarios, según el campo de aplicación, las limitaciones de cualquiera de los materiales pueden suponer la imposibilidad de uso. Por ello surge la necesidad de combinarlos, dando lugar a materiales que reúnen las características de uno y otro, eliminando o reduciendo las desventajas que por separado puedan presentar.

Para conocer los requisitos de los biomateriales, es necesario conocer las funciones que deben desempeñar, así como el medio en el que van a estar una vez introducidos en el organismo. No solo es importante que el biomaterial ejerza la función para la que ha sido diseñada, si no que interactúe de manera adecuada con el cuerpo.

1.3.2. Composites

Estudios actuales han revelado que un parámetro importante a controlar es la superficie del biomaterial, la cual al modificarse física, química o topográficamente es capaz de inducir una respuesta específica de las células circundantes [21, 22]

Las características de la interfase tejido-material, son de vital importancia para definir el funcionamiento de un biomaterial. Una interfase se define como la conexión física entre dos sistemas independientes, en este caso, el implante y el tejido biológico circundante. Variedad de estudios a este nivel, parecen mostrar, que el tejido biológico, presenta diversos mecanismos para reconocer detalles moleculares que influirán directamente en las interacciones que se producen una vez el implante se encuentra dentro del organismo [23].

La **osteointegración** es la conexión firme, estable y duradera entre un implante y el hueso que lo rodea [24]. El éxito de esta conexión o interfase hueso-implante depende de factores biológicos y sistémicos del paciente y de las características del implante y su superficie [25]. Una adecuada osteointegración está sujeta a la aceptación del implante por parte de los tejidos vivos, sin la formación de tejido fibroso entre hueso-implante y sin la presencia de síntomas de inflamación severa [26]. Esta interfase debe considerarse como el resultado de la interacción de un conjunto de factores que modulan la respuesta biológica y que determinan el éxito de la osteointegración, entre los que se encuentran la respuesta inmune del paciente, el procedimiento de implantación quirúrgica, las características fisiológicas del hueso receptor, los factores mecánicos del implante y su superficie y la acción de cargas mecánicas sobre el hueso y el implante [27].

El éxito del proceso depende de la función de dos procesos previos: la osteoinducción y la osteoconducción [28].

En la figura 1.3, se observa como la osteoinducción (Figura 5a), permite la diferenciación de las células osteoprogenitoras. La osteoconducción (Figura 5b) se basa en la colonización del biomaterial por las células, las cuales llevan a cabo la osteogénesis (Figura 5c). Tanto las que están sobre el biomaterial, como las que están en hueso para concluir con la osteointegración (5d) donde el biomaterial y hueso están unidos.

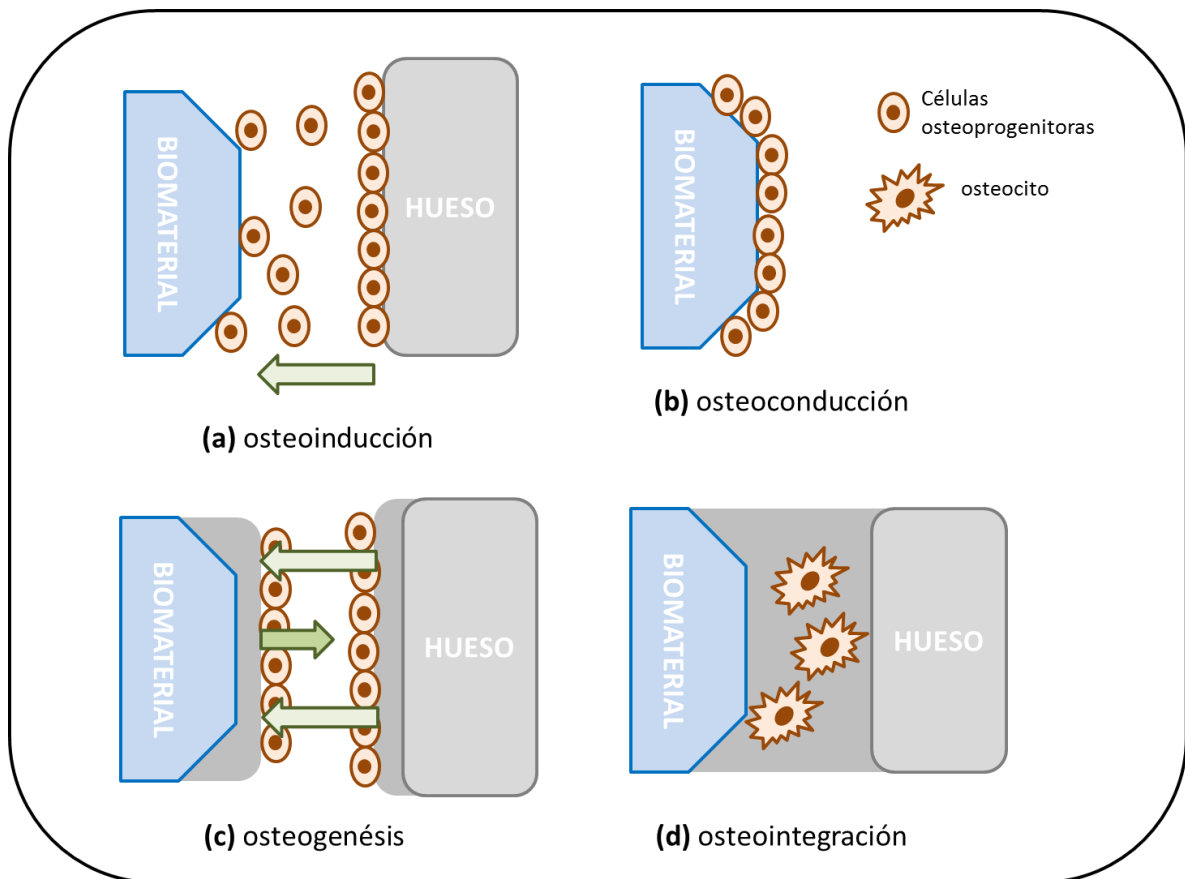


Figura 1.3. Esquema de los procesos celulares que tienen lugar cuando se implanta un biomaterial en el cuerpo.

Cuando se produce una lesión en hueso, ya sea de forma natural, o aquella producida como consecuencia de una cirugía para implantar un biomaterial, el proceso de cicatrización ósea se activa. La matriz mineralizada entra en contacto con fluidos extracelulares, formados por gran variedad de proteínas, enzimas, citoquinas y factores de crecimiento que van a ser los responsables de activar la formación de nuevo hueso.

Los factores de crecimiento, son polipéptidos, contenidos en diferentes tipos celulares y en la matriz extracelular, que juegan un papel fundamental en los diferentes tejidos del organismo, actúan como moléculas de señalización [29]. Promueven la adhesión, proliferación, migración y diferenciación, mediante la regulación del metabolismo de proteínas, factores y receptores. Estos factores, son esenciales para la formación de tejido, juegan un papel muy importante en la regeneración tisular [30]. Todos los estadios del proceso de reparación están controlados por una amplia variedad de citoquinas y factores de crecimiento, actuando localmente como reguladores de las

funciones celulares más básicas además del control de la síntesis y degradación de las proteínas de la matriz extracelular [31]. Su modo de acción comienza al unirse a su receptor extracelular que va a activar la vía intracelular de transducción de señales. El **dominio RGD** (Arg-Gly-Asp), esta presente en distintas proteínas que actúan a nivel óseo y es reconocido por las integrinas de superficie de las células óseas [32]. Cuando este dominio se encuentra libre sobre la superficie de las proteínas, las células óseas (es reconocida por las integrinas de los osteoblastos y osteoclastos) lo identifican y se unen a ellas. Son fundamentales en los procesos de remodelado y regeneración óseos [33].

En concreto con células osteoprogenitoras y líneas osteoblásticas. Desde que se clonaron en 1988 las BMP (osteoproteínas formogénicas), se han estudiado ampliamente todas las biomoléculas que podían tener aplicación en regeneración ósea. Actualmente, aunque existen tratamientos que incluyen el uso de estos factores de crecimiento, se utilizan en cantidades muy altas, siendo un coste/efectividad demasiado elevado. Para limitar el coste y mantener la efectividad de los tratamientos, estudiar los procesos de interacción que se producen entre los materiales y el medio, mediante el diseño de las características del material, se puedan orientar las interacciones, consiguiendo que en vez de incorporar las proteínas al andamio antes de implantarlo, estas se adhieran del propio medio biológico. Lo que no solo disminuye los coste, si no que asegura una efectividad adecuada, el material entrará de forma natural en el proceso de reparación ósea, como elemento activo en el mismo.

1.4. MATERIALES Y ANDAMIOS ESTUDIADOS EN ESTA TESIS

1.4.1. Hidroxiapatita

La hidroxiapatita (OHAp), es una cerámica bioactiva. Entendiendo como material bioactivo aquel que puede inducir una actividad biológica específica. En ingeniería tisular ósea; aquel material que sumergido en suero induce la formación de hidroxiapatita natural [34].

OHAp es un componente natural del hueso, la hidroxiapatita sintética implantada en el organismo, es utilizada por el mismo para la síntesis de OHAp natural.

Con la fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ es el fosfato de calcio más utilizado en la fabricación de implantes para tratamiento de tejido óseo, por ser el compuesto más parecido al componente mineral de los huesos. La diferencia principal entre la hidroxiapatita sintética y la presente en el hueso es la ausencia de impurezas en la estructura de la OHAp sintética, principalmente, iones de carbonato y magnesio [35].

Presenta buenas propiedades como biomaterial tales como biocompatibilidad, bioactividad, osteoconductividad [36, 37] y unión directa al hueso [38]. La hidroxiapatita se comenzó a utilizar en aplicaciones clínicas en 1981, como un granulado para relleno de lesiones periodontales. Se continuaron los estudios obteniéndose datos favorables, ausencia de toxicidad, de respuesta inflamatoria, de formación fibrosa, y la habilidad de unirse al hueso directamente [39, 40]. Estudios experimentales a largo plazo confirmaron su biocompatibilidad [41], lo que llevó a considerar las cerámicas fosfocálcicas los materiales más compatibles, en cuanto a la respuesta del hueso al implante. El seguimiento a largo plazo en aplicaciones clínicas ha confirmado estos estudios. [42]. La capacidad osteoconductor de la OHAp, se debe a que el material puede proporcionar el entramado que facilite la penetración del nuevo hueso en el implante. Un material osteoconductor, puede llegar a ser osteointegrado si se llega a formar una unión físico-química entre el implante y el hueso vivo a partir del crecimiento óseo. Para ello se requieren áreas de íntimo contacto, estabilidad primaria y material bioactivo y compatible con el hueso.

Se encuentran gran cantidad de investigaciones basadas en este componente, centradas en el desarrollo de métodos de conformado para obtener materiales con diversas características morfológicas, estudios de porosidad, característica que influye en la

integración con el hueso, pero no se encuentran estudios comparativos de características texturales que influyan en su aplicación en ingeniería tisular.

En la actualidad, aunque existen hidroxiapatitas comerciales, no ofrecen una homogeneidad adecuada. Entre dos lotes distintos de producto se encuentran grandes diferencias en cuanto a características de tamaño de partículas y superficie específica. Además, otro problema con estas cerámicas comercializadas es que poseen una porosidad y propiedades mecánicas estandarizadas y por tanto, no pueden ser adaptadas a aplicaciones específicas [43].

En el presente estudio, se lleva a cabo una síntesis controlada de hidroxiapatita, para posteriormente modificarse determinados parámetros texturales de la misma y realizar estudios de las interacciones entre las distintas hidroxiapatitas sintetizadas con proteínas y determinar las características que controlan la adhesión celular.

1.4.2. Proteínas

Las proteínas son las macromoléculas más versátiles de los seres vivos, desempeñan funciones cruciales en prácticamente todos los procesos biológicos.

Las proteínas son polímeros lineales contruidos a partir de monómeros llamados aminoácidos. Pueden interactuar entre sí y con otras macromoléculas biológicas para formar asociaciones complejas. Algunas proteínas son muy rígidas, mientras que otras manifiestan una flexibilidad limitada. Contienen un amplio surtido de grupos funcionales. Estos grupos incluyen alcoholes, tioles, tioéteres, ácidos carboxílicos, carboxiamidas y una serie de grupos básicos. Cuando se combinan en varias secuencias, esta diversidad de grupos funcionales es la responsable del amplio espectro de las funciones de las proteínas. Pueden interactuar entre sí y con otras macromoléculas biológicas para formar asociaciones complejas. (Las preferencias conformacionales de los residuos de aminoácidos no están limitadas simplemente a una estructura).

Como resumen general sobre las proteínas se puede afirmar, se construyen a partir de una colección de 20 aminoácidos, presentan distintos niveles de agrupación. La estructura primaria, los aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos para formar cadenas polipeptídicas. En la estructura secundaria, las cadenas polipeptídicas se pueden plegar en estructuras regulares (ej. Hélice alfa, hoja plegada beta, etc.). Un nivel superior, estructura terciaria, las proteínas solubles en agua se pliegan en estructuras

compactas con un núcleo no polar, y el último nivel lo forman las cadenas polipeptídicas ensambladas en estructuras de múltiples subunidades, estructura cuaternaria.

Las secuencias de aminoácidos definidas no son los únicos determinantes de la estructura secundaria. Las interacciones terciarias –interacciones entre residuos lejanos en la secuencia- podrían ser decisivas para especificar la estructura secundaria de algunos segmentos. **El contexto es a menudo crucial al determinar el resultado conformacional.** La conformación de una proteína ha evolucionado para trabajar en un entorno o contexto particular. Existen infinidad de proteínas en el organismo, cada una de las cuales desempeña un papel específico. Es sintetizada y dirigida para cumplir una determinada función.

Existen dos clases principales de proteínas. Se denominan proteínas fibrosas y globulares y se distinguen por diferencias estructurales importantes. La clase a la que pertenezcan determina su conformación, se entiende como conformación, la orientación tridimensional que adquieren los grupos característicos de una molécula en el espacio, en virtud de la libertad de giro de éstos sobre los ejes de sus enlaces [44].

Las **proteínas fibrosas** se distinguen de las proteínas globulares por su forma filamentosa o alargada. La mayoría de ellas desempeñan funciones estructurales. Este tipo de proteínas, cuando se adsorben, ya sea sobre células, biomoléculas, tejidos o materiales, van a adquirir unas conformaciones. Dichas orientaciones están limitadas por las características estructurales de las proteínas, y pueden simplificarse en las dos que aparecen en la figura 1.4.: conformación “side-on”, y conformación “end-on”. Pudiendo encontrarse en cualquier inclinación o ángulo entre una y otra conformación [45-48].

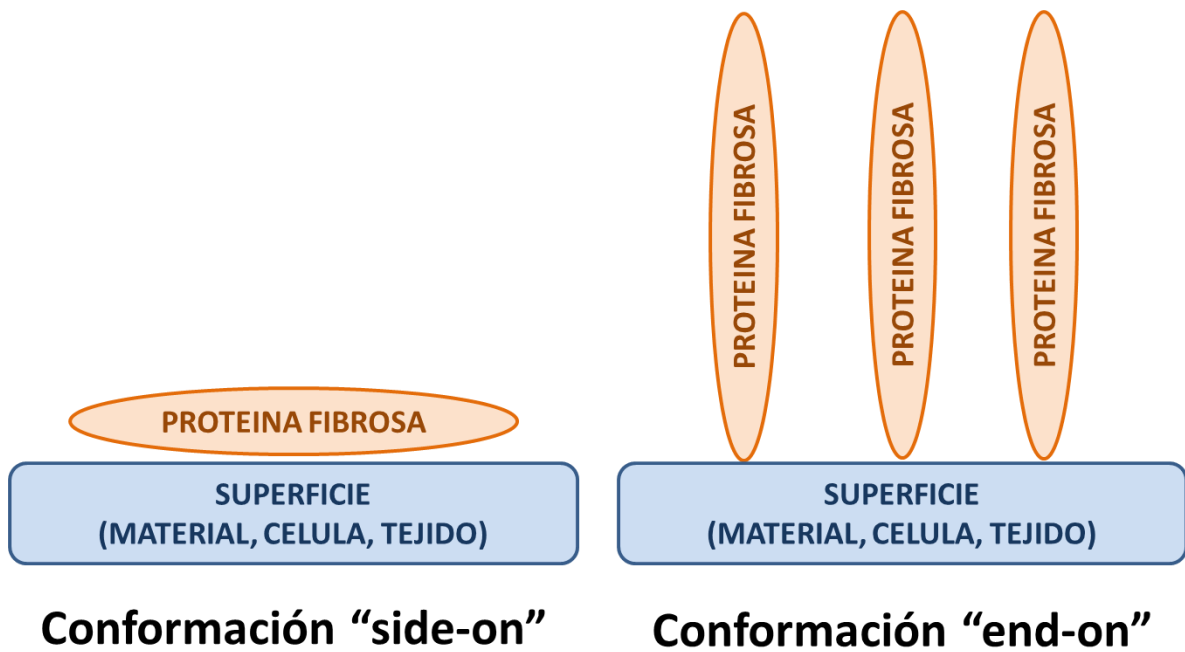


Figura 1.4. Esquema conformaciones que pueden adquirir las proteínas fibrosas adsorbidas.

Las **proteínas globulares**, reciben este nombre debido a que sus cadenas polipeptídicas se pliegan en estructuras compactas muy distintas de las formas filamentos y extendidas de las proteínas fibrosas. La mayoría existen y funcionan como ensamblajes de múltiples subunidades que forman un nivel de estructura cuaternario [48].

De todas las proteínas presentes en el organismos, como se ha mencionado, en el presente trabajo nos vamos a centrar en estudiar las interacciones que tienen lugar entre cuatro proteínas del medio biológicos en contacto con cuatro hidroxapatitas con distintas características superficiales. Las proteínas elegidas forman parte de manera directo a indirecta del proceso de remodelación óseo.

Tras una lesión, como la producida durante el procedimiento quirúrgico de implantación de un material. La matriz ósea mineralizada, se recupera siguiente cuatro etapas, que son: formación del hematoma (sangrado y coagulación), degradación del coágulo y limpieza de la herida (fibrinólisis), formación del tejido granular (fibroplasia y angiogénesis y formación de nueva matriz ósea (modelado óseo).

Durante la cirugía es normal que se produzca sangrado debido a la lesión causada, este sangrado va a influir de manera muy significativa en la osteointegración del biomaterial.

Este sangrado concluye con la formación del coagulo por la acción del **fibrinógeno** que se transforma en fibrina.

El Fibrinógeno, es una de las proteínas más abundantes del plasma sanguíneo. En cuanto los materiales entran en contacto con la sangre o con tejido endotelial dañado, rápidamente se adsorbe fibrinógeno en la superficie. Existen muchos estudios que han demostrado que se producen cambios conformacionales en él cuando el fibrinógeno es adsorbido. Las características estructurales del fibrinógeno adsorbido juegan un papel importante en su interacción con biomoléculas y distintos tipos de líneas celulares.

El coagulo de fibrina, será sustituido por una nueva matriz extracelular, por un proceso conocido por fibroplasia. Dicha matriz extracelular está compuesta por nuevos capilares, macrófagos, fibroblastos y tejido conectivo, y tiene como función facilitar la migración de células osteoprogenitoras. A medida que el proceso de cicatrización avanza, la matriz provisional de fibrina es remplazada por una nueva matriz rica en colágeno y **fibronectina** [49] sintetizada por los fibroblastos que migran dentro de la herida. La fibronectina, es incorporada en forma covalente al coágulo [50], siendo necesaria su presencia para la supervivencia y diferenciación osteoblástica, es un importante regulador de la formación de hueso.

La necesidad de restaurar la red vascular en la región afectada, y con ella, el suministro de oxígeno y alimento para los nuevos tejidos, inicia un proceso paralelo a la fibroplasia denominado angiogénesis [51]. Una vez termina el proceso de recuperación del suministro de sangre, se inicia un proceso de recambio de la matriz provisional de tejido conectivo sintetizada por las células osteoprogenitoras que culmina con la formación de nuevo hueso [52]. Este proceso se conoce como modelado óseo [53].

La formación de hueso, más conocida como osteogénesis, comienza a partir de las estructuras vasculares. Las células osteoprogenitoras migran y se reúnen en las cercanías de un capilar en donde comienzan a diferenciarse en osteoblastos y secretan las primeras **fibras de colágeno**. Sin embargo, el colágeno no tiene gran afinidad por el calcio, por lo que son otras las proteínas implicadas en el depósito mineral.

Estas fibras iniciales son pequeñas, tienen una distribución desordenada y dejan extensos espacios alrededor del capilar. A medida que esto sucede, algunos osteoblastos se convierten en osteocitos que comienzan a secretar factores de inhibición que

disminuyen la tasa de formación de hueso. Cuando la deposición alcanza unos 20 mm de altura comienza la mineralización que se caracteriza por la nucleación de cristales de fosfato cálcico y su conversión en hidroxapatita, principal mineral del hueso [54]. Intervienen proteínas procedentes del plasma que se encuentran en la matriz orgánica ósea, como la **albúmina**, relacionada con la incorporación del calcio a la matriz osteoide.

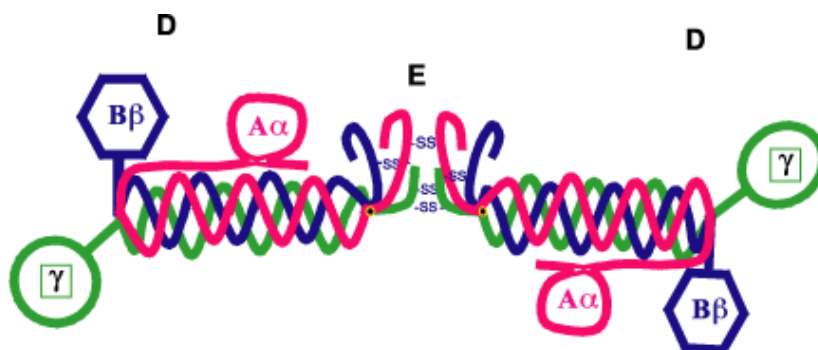
La liberación de estos primeros cristales activa una reacción en cadena que tiene como objetivo la nucleación de cada molécula de colágeno presente en el nuevo osteoide. Finalmente, se produce el remodelado de la matriz mineralizada que convierte la matriz primaria en una matriz rígida que cumple con las condiciones fisiológicas del hueso.

1.4.2.2. Características de las proteínas estudiadas.

❖ Fibrinógeno

El fibrinógeno es una glicoproteína de 340Kda, con una estructura compleja. Como se puede observar en la Figura 1.5, cada molécula de fibrinógeno está compuesta por dos partes simétricas formadas por un grupo de tres cadenas de polipéptidos diferentes llamados $A\alpha$, $B\beta$ y γ que están unidos al dominio amino terminal de E por cinco puentes disulfuro. Cada nódulo distal esta unido al central por una triple hélice.

El fibrinógeno posee tres posibles sitios de unión al complejo GPIIb/IIIa: dos secuencias RGD localizadas en los residuos 95-97 y 572-574 de la cadena $A\alpha$ y una secuencia de 12 residuos (aa 400-411) localizada en el extremo carboxilo de la cadena γ [55]. Los sitios RGD de las cadenas $A\alpha$ poseen mayor importancia cuando el fibrinógeno está inmovilizado sobre una superficie o en forma de fibrina [56].



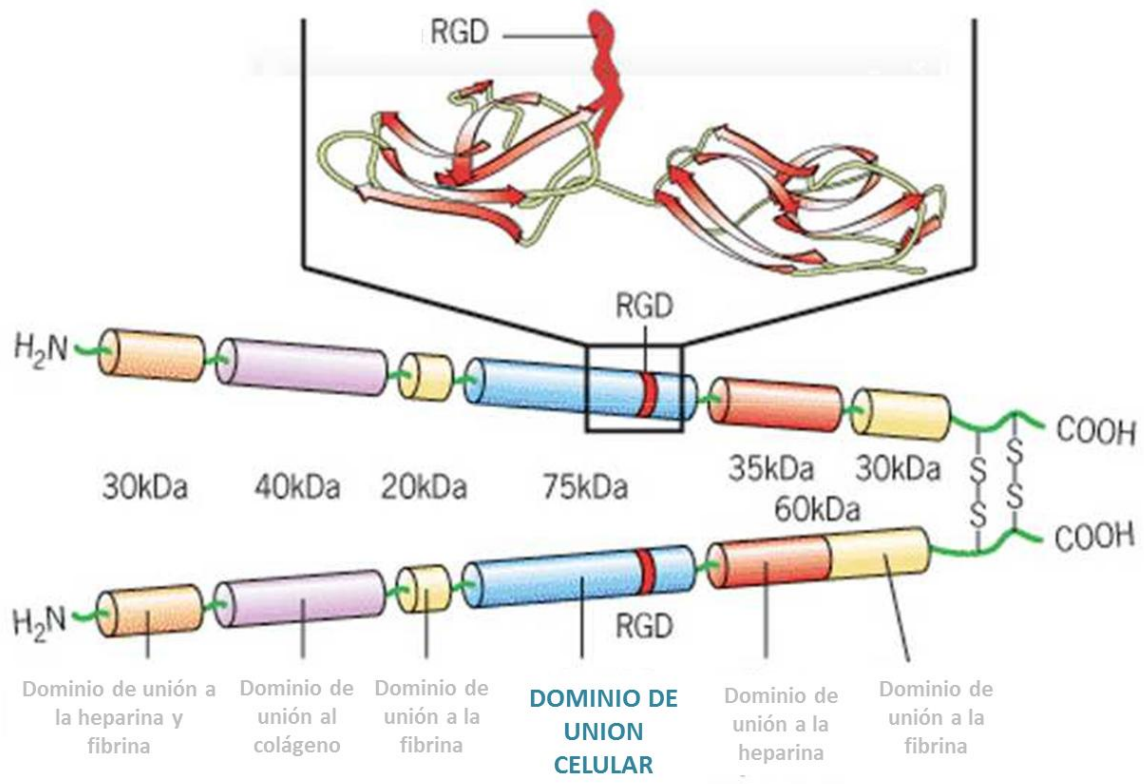
Lauricella, Ana María. Variabilidad de las redes de fibrina. *Acta bioquím. clín. Latinoam*

Figura 1.5. Estructura de una molécula de fibrinógeno.

❖ Fibronectina

La fibronectina es una glicoproteína formada por una molécula asimétrica que consiste de dos subunidades similares de 220 kDa, unidas por puentes disulfuro cerca de su región carboxi-terminal. El dominio RGD de la fibronectina está situado a nivel central [57].

Se sabe que puede adquirir diversas conformaciones cuando se adsorbe sobre los materiales, llevando a cabo distintas respuestas celulares [58]



<http://www.farmacologiaoculare.com/2009/01/19/i-peptidi-rgd-per-la-modulazione-del-deflusso-di-umore-acqueo/>

Figura 1.6. Estructura de una molécula de Fibronectina, con los distintos dominios que presenta.

❖ Colágeno

Básicamente el colágeno mantiene unidos a la mayoría de los animales.

Unidad básica de la fibra de colágeno es una triple hélice de tres cadena polipeptídicas, cada una de ellas con aproximadamente 1000 residuos. Esta estructura helicoidal triple, es única del colágeno. Estas fibras se empaquetan juntas formando una fibra de colágeno de una manera específica. Cada molécula tiene un longitud de aproximadamente 300nm y se solapa con su vecina en aproximadamente 64nm. Las fibras de colágeno se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre aminoácidos y a través de la formación de puentes de piridinolina, entre las hidroxilisinas y lisinas [59].

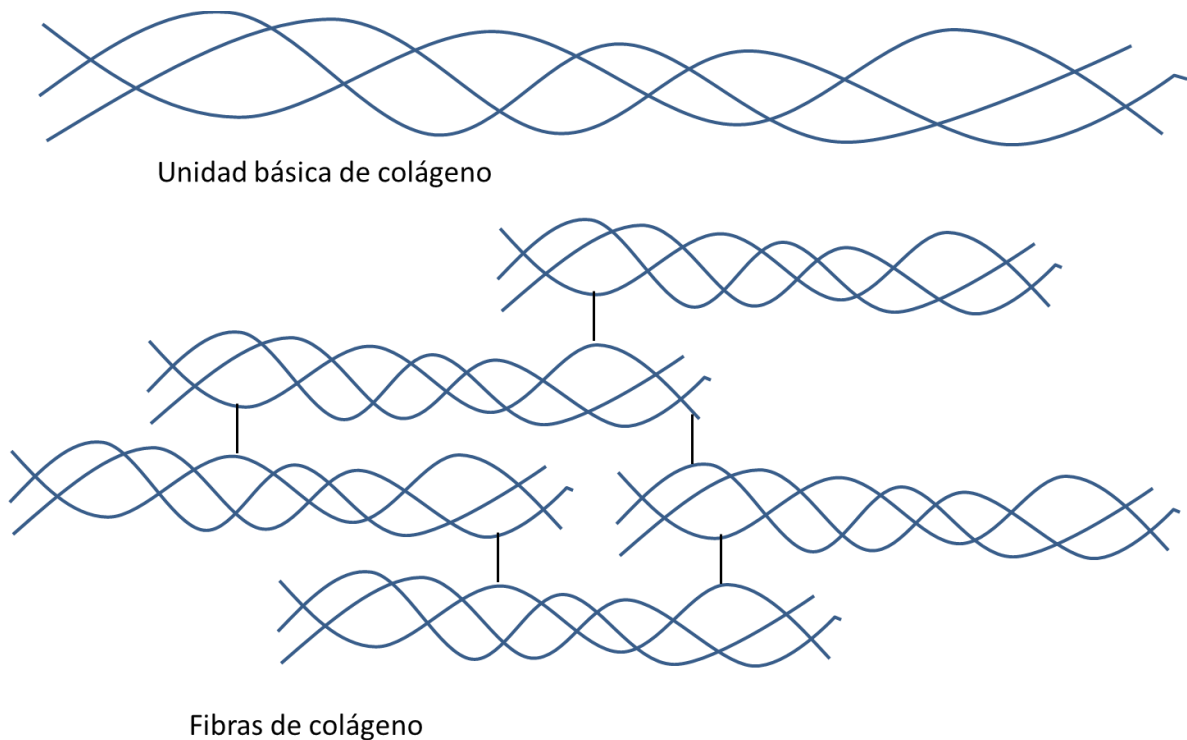


Figura 1.7. Estructura unidad y fibras de colágeno.

Colágeno tipo I, si se consigue que el material se rodee de colágeno, favorecerá el desarrollo del hueso, el colágeno como tal, se utiliza en gran cantidad de mecanismos para favorecer la osteointegración [60].

Existen gran cantidad de estudios que utilizan el colágeno como material natural, componente de la matriz tridimensional [61], pero resulta complicado trabajar con él. Como ya se ha descrito, está presente en el cuerpo de forma natural, lo que se puede interpretar que favoreciendo su adhesión al andamio implantado estará presente de forma natural.

Dentro de las conformaciones previamente mencionadas, de las proteínas fibrosas. El colágeno adquiere únicamente conformación “side-on” como se muestra en la figura 1.4.

❖ Albúmina

Presenta un 76% de secuencia idéntica entre albúmina bovina y albúmina humana. Estos dos tipos de albúminas son indistinguibles físicamente y presentan alta similitud en hidrofobicidad y mismo comportamiento en medio acuoso.

Es la proteína más abundante del plasma y constituye aproximadamente el 50% del total de proteínas plasmáticas en el ser humano [62]. Como se observa en la Figura 1.8. presenta una estructura globular lo que imposibilita que pueda adsorberse alguna de las conformaciones previamente mencionadas.

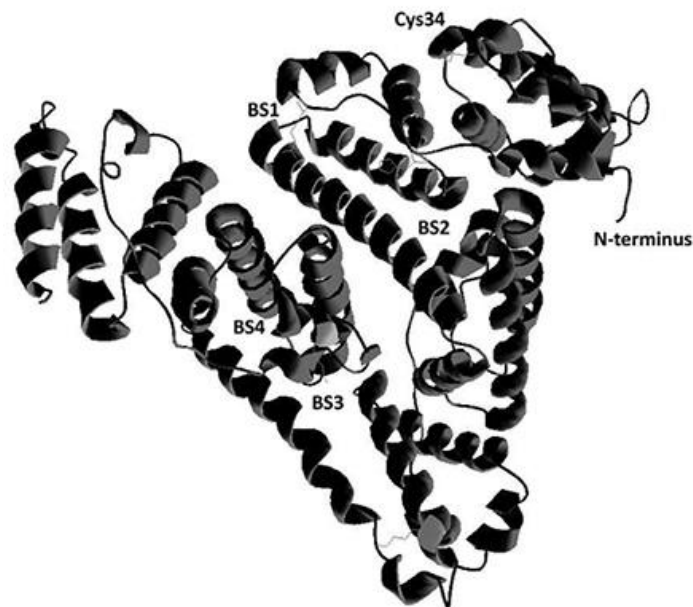


Figura 1.8. Estructura de una molécula de albúmina sérica.

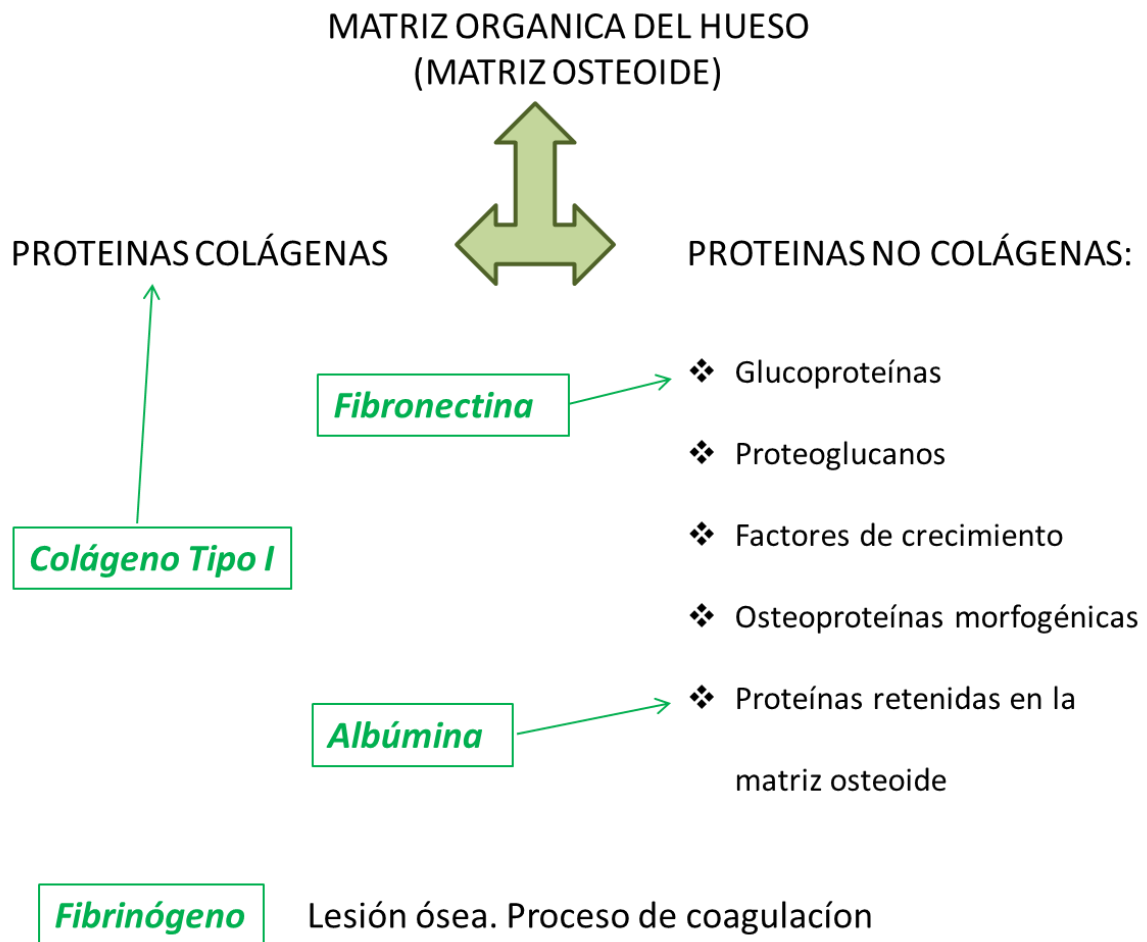


Figura 1.9. Esquema organización proteínas estudiadas.

Las características superficiales de los biomateriales son esenciales para promover la actividad celular, así como la adhesión, proliferación y diferenciación. Conociendo las características que influyen y determinan la interacción con el medio biológico, se obtendrían biomateriales específicos con una actividad celular asegurada hacia los objetivos deseados. El biomaterial implantado en el cuerpo, como se ha descrito, entra en contacto con gran variedad de proteínas, las cuales, adheridas sobre el material, van a influir en como el material interacciona con el resto del medio biológico. Las proteínas adsorbidas sobre la superficie del material pueden llegar a marcar la osteointegración o el rechazo del implante, de forma que un control sobre la adhesión de las proteínas que favorezcan la osteointegración puede marcar la diferencia.

El diseño de materiales para regeneración ósea, requiere de un mayor conocimiento de la adsorción de las distintas proteínas sobre ese material. El estudio simultáneo del proceso de adsorción de varias proteínas sobre distintos materiales, presentaría gran número de variables y sería muy complejo de evaluar. En este estudio, se ha comparado la adsorción de proteínas individuales sobre hidroxiapatitas con características superficiales diferentes.

Los distintos factores que influyen en la adsorción de proteínas sobre un material son, la concentración de proteínas [63], el peso moléculas de las mismas [64], el punto isoelectrico [65], la hidrofobicidad o hidrofiliidad del material [66], la presencia de grupos funcionales, superficie/tamaño de partícula, tamaño de cristal [67, 68], etc. Gran cantidad de literatura se puede encontrar sobre el estudio sobre la energía superficial y los factores relacionados, como se observa en la revisión Vogler et al, [69] y las referencias allí citadas. Menos atención se ha puesto sobre las características superficiales de un determinado material que regulan o determinan la formación y actividad de la capa de proteínas que se adsorbe. Solo se encuentra una regla general, de que un menor tamaño de cristal favorece la regeneración ósea, mientras que una alta cristalinidad favorece la reabsorción [70], así como una aceptación de la importancia de la rugosidad del material.

En este trabajo nos centramos, en el estudio de las características de la hidroxiapatita que favorecen su interacción con las proteínas del medio biológico que forman parte del proceso de remodelación ósea. El objetivo es determinar las características de la superficie de las partículas de hidroxiapatita que favorecen la adsorción de proteínas en su conformación bioactiva.

1.4.3. Composites Bioactivos

La combinación de las ventajas de unos y otros materiales, y compensando las desventajas de unos y otros, dan lugar a la obtención de los materiales compuestos o composites. Estos materiales pueden clasificarse en tres grupos fundamentales que son: Materiales Compuestos reforzados con partículas, materiales compuestos reforzados con fibras y los materiales compuestos estructurales.

Aunque existe una gran variedad de materiales compuestos, en todos se pueden distinguir las siguientes partes:

- **Agente reforzante:** es una fase de carácter discreto y su geometría es fundamental a la hora de definir las propiedades mecánicas del material.
- **Fase matriz** o simplemente matriz: tiene carácter continuo y es la responsable de las propiedades físicas y químicas. Transmite los esfuerzos al agente reforzante. También lo protege y da cohesión al material.

Actualmente, en la ingeniería de tejido óseo, los estudios se han centrado en el desarrollo de compuesto basados en una matriz polimérica con refuerzo de componente cerámico. La matriz polimérica que se utilizan puede ser desde polímeros de origen natural, como el colágeno, hasta distintos polímeros sintéticos, siempre con el objetivo de obtener compuestos lo más parecidos al hueso natural. Uno de los problemas de la utilización de polímeros son las reacciones al cuerpo extraño asociados con la inflamación, que limitan el rendimiento e incluso conllevan un fracaso de los productos de ingeniería tisular [71]. El mecanismo común para disminuir la inflamación local es incorporar un componente cerámico, como la hidroxiapatita. La mezcla del polvo cerámico con el polímero sintético da lugar a un andamio compuesto. Además del beneficio introducido de mejorar la biocompatibilidad, los productos de degradación de las apatitas son básicos, lo que equilibra los productos ácidos de degradación del polímero, de forma que mejora las condiciones desfavorables en las que se encontrarían las células [72].

Como componente cerámico, los derivados de fosfato cálcico y, en concreto, las biocerámicas, son las más utilizadas para la síntesis de andamios. Ya se utilizan solas en otras aplicaciones como cirugía oral y cráneo-facial, odontología, cirugía ortopédica, traumatología y como relleno óseo en cirugías resectivas tumorales [73], lo que hace las hace un candidato ideal, están ampliamente estudiadas en clínica y además existen más de 50 preparados comerciales disponibles en el mercado [74], lo que les hace fáciles de obtener.

Las cerámicas influyen positivamente en la diferenciación y proliferación celular. La adhesión de células a los andamios es a menudo una necesidad, ya que por más de que el andamio posea macro poros completamente interconectados, existe una mortalidad celular muy alta y la supervivencia se restringe a aquellas que se encuentran en la superficie. Con la incorporación de estos componentes, se confiere al compuesto la propiedad de osteoinducción y se aumenta la afinidad de los materiales por las proteínas.

1.4.4. Andamios

Un andamio preparado a partir de un biomaterial es esencial para llenar el defecto y para actuar como transportador de las células y/o de los factores de crecimiento utilizados en la reparación del defecto.

Los requerimientos básicos para cualquier biomaterial utilizado para la síntesis de andamios o constructos, son la biocompatibilidad y las propiedades superficiales adecuadas que favorezcan la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Biodegradabilidad, eficacia mecánica para aplicación específica, bioconductividad, bioactividad, facilidades para esterilización y almacenaje y relación coste-eficacia razonable.

Biomateriales sintéticos (biocerámicas y biopolímeros) son los materiales fundamentales utilizados para la fabricación de andamios. Los sintéticos ofrecen la ventaja sobre los naturales, se pueden modificar, adaptar, en función de las propiedades que se les quiera dar, de forma que su acción es más predecible.

1.4.4.1. Resumen de las características de los andamios:

- ✓ No causar una respuesta inflamatoria significativa.
- ✓ Degradarse liberando productos no tóxicos que puedan ser eliminados por el cuerpo.
- ✓ Fomentar la migración de células reparadoras del hueso a la zona del defecto y estimular su actividad para la regeneración y reparación.
- ✓ Poseer una estructura porosa que permita la vascularización y el crecimiento óseo.
- ✓ Actuar como un substrato para la deposición y crecimiento de los osteoides.
- ✓ Degradarse de manera controlada para facilitar la transferencia de la sollicitación mecánica al hueso en formación y para permitir su crecimiento dentro del defecto.
- ✓ Proveer de resistencia mecánica de manera temporal en el área afectada.
- ✓ Ser esterilizable sin perder su calidad de bioactivo

Como se observa en la Figura 1.10. de las características de composición química, los requisitos mencionados pueden ser obtenidos, mediante la elección de los reactivos adecuados.



Figura 1.10. Características andamios para regeneración ósea.

1) Biocompatibilidad.

La biocompatibilidad se define como la capacidad de un material para cumplir su función en una aplicación específica con una respuesta apropiada por parte del tejido. Capacidad de para cumplir su función terapéutica sin producir efectos indeseados, sean locales o sistémicos, en el beneficiario del tratamiento, pero sí originando la respuesta más apropiada a nivel celular o tisular en esa situación concreta, optimizando así el efecto terapéutico beneficioso más relevante de dicho tratamiento [75].

2) Biodegradabilidad.

Un material biodegradable, es no tóxico y se disuelve al colocarlo en el medio biológico. La composición del material debe ser tal que pueda ser disuelto químicamente por los fluidos fisiológicos o bien consumido por los macrófagos. Diseñado para degradarse gradualmente en el tiempo y ser remplazado por tejido natural. Las velocidades de reabsorción deben calcularse e igualarse a las velocidades de regeneración del tejido [76].

Para la fabricación de las matrices se deben utilizar materiales que tengan tasas de resorción que igualen a las de formación ósea, de tal manera que, para cuando la lesión esté totalmente regenerada, la matriz tridimensional se haya degradado totalmente.

El objetivo de la ingeniería de tejidos es permitir que las propias células del cuerpo, con el tiempo, replacen finalmente el andamio o el tejido implantado. Andamios y constructos, no pretenden ser implantes permanentes. El andamio por lo tanto debe ser biodegradable con el fin de permitir que las células puedan producir su propia matriz extracelular. Los subproductos de esta degradación también deben ser no tóxicos y capaces de salir del cuerpo sin la interferencia con otros órganos.

3) Osteoinductividad.

Es el proceso mediante el cual las células madre y osteoprogenitoras, células pluripotenciales, son reclutadas en el sitio de regeneración ósea y estimuladas para diferenciarse a osteoblastos [77].

4) Propiedades de la superficie.

Tanto las químicas como topográficas pueden controlar y afectar la adhesión y proliferación celular; las propiedades químicas están relacionadas con la habilidad de las células para adherirse al material. Las propiedades topográficas son fundamentales para la osteoconducción, que es el proceso mediante el cual las células osteogénicas (que son aquellas capaces de formar hueso nuevo) migran a la superficie de la matriz tridimensional a través de un coágulo de fibrina, que se establece después de implantado el material [78].

5) Propiedades mecánicas.

Depende del lugar de implantación y de las fuerzas mecánicas a las que se verá expuesto el implante. Debe ser lo bastante fuerte para permitir la manipulación quirúrgica. La síntesis de andamios con adecuadas propiedades mecánicas, es uno de los mayores retos de la ingeniería tisular. Debe ejercer la función del hueso al que debe sustituir, no siendo la misma desde el momento de la implantación del andamio, y una vez finalizado el proceso de remodelado.

Hay que considerar la edad del individuo, el proceso de curación, no se produce a la misma velocidad en un paciente joven, suelen curarse las fracturas en aproximadamente seis semanas, con total mecánica aproximadamente un año, que las personas de edad, donde la tasa de reparación se ralentiza.

Muchos materiales han sido producidos con buenas propiedades mecánicas, pero en perjuicio de mantener una alta porosidad y muchos materiales, que han demostrado potencial in vitro han fracasado cuando implantado en vivo debido a la insuficiente capacidad de vascularización. Está claro que un equilibrio entre las propiedades mecánicas y la porosidad, suficiente para permitir la infiltración celular y la vascularización características claves para el éxito de cualquier andamio.

En la actualidad no existe ningún biomaterial para regeneración ósea que aglutine estas propiedades. El objetivo es conseguir un material que presente la estructura y propiedades biológicas del hueso natural y eso puede facilitarse utilizando combinaciones de ellos.

6) Porosidad.

La arquitectura de los andamios utilizados para la ingeniería de tejidos es de importancia crítica. Existe la necesidad de integrar espacios porosos, tanto para albergar a células y polipéptidos activos como para favorecer la penetración del tejido regenerado [79]. Deben tener poros abiertos e interconectados, necesarios para la difusión de nutrientes y gases y para la eliminación de desechos metabólicos como resultado de la actividad celular, lo cual es fundamental en el hueso, debido a sus características metabólicas, ya que se esperan altas tasas de transferencia de masa, incluso cuando se realizan procesos in vitro [80].

7) Tamaño del poro.

El tamaño ideal del poro para la ITO varía entre 100 y 500 μm [81, 82]. Para una correcta osteogénesis, es necesaria una adecuada vascularización del tejido, los poros son un elemento clave, y no solo la presencia de estos, además el control de su tamaño medio [83]. Se consigue una adecuada vascularización del tejido con poros de aproximadamente 200 micrómetros [84]. Distintos estudios parecen mostrar que, poros de tamaño inferior a 50 μm favorecen la formación de tejido fibroide, menores de 100 μm , favorecen el desarrollo de tejido osteoide, y poros de tamaño mayor de 100 μm , dan lugar a la formación de hueso mineralizado [85].

El objetivo del andamio es la interacción celular, para ello, es necesaria la presencia de determinados grupos químicos, ligandos, en la superficie del material. La superficie disponible dentro de un poro, va a influir en la cantidad de ligando que pueden adherirse a el constructo, que influirá directamente en la adhesión celular.

Esto depende de la mediada del tamaño de los poros en el andamio. Los poros por tanto, deben ser lo suficientemente grandes para permitir que las células migren a la estructura, donde finalmente quedarán ancladas a los ligandos, pero lo suficientemente pequeño para establecer una superficie específica suficientemente alta, lo que lleva a una mínima densidad de ligando que permite la unión eficiente de un número crítico de las células a el andamio [86]. El tamaño de los poros del andamio a sintetizar, dependerá fundamentalmente del tipo de célula que sea necesaria, así como de los ligandos que estas células requieran.

Existe gran variedad de técnicas que permiten obtener andamios porosos. Dependiendo de los reactivos que se vayan a utilizar y de las condiciones requeridas por ellos, así como de los resultados buscados se utilizan una u otra o combinación de varias. Cada técnica utilizada le va a conferir al andamio unas características estructurales diferentes, por lo que es importante elegir la técnica correcta según la aplicación final del andamio. Las más utilizadas con:

- Gel Casting
- Disolución y colada con liberación de partículas
- Laminación de membranas
- Separación de fases
- Saturación con gas
- Unión de fibras
- Liofilización

Por tanto es necesario desarrollar métodos que nos permitan la modulación de la porosidad en función de los requerimientos específicos de los andamios a fabricar. **La liofilización** permite obtener sistemas compuestos de matriz polimérica y con una distribución homogénea de partículas de cerámica así como diseñar las características de la porosidad. Además, al ser el agua el solvente, no conlleva la presencia de ningún residuo tóxico en el material.

Algunos autores han descrito que la porosidad de los andamios preparados con la técnica de liofilización depende de la velocidad de enfriamiento de la solución polimérica [87, 88]. Así, una velocidad de enfriamiento rápido produce una reducción del tamaño de los poros. En el caso de una velocidad de enfriamiento elevada, las dos fases formadas son congeladas rápidamente, dejando pequeños poros después de la etapa de liofilización [89]. Pero al contrario si la velocidad es lenta, se produce el fenómeno de coalescencia de cristales para reducir la energía interfacial, y se producen poros más grandes [90]. Además la concentración de agua en el solvente tiene influencia sobre la morfología de los andamios. Añadir agua tiene tendencia a producir poros más grandes [91]. De la bibliografía estudiada, se puede extraer que hay tres parámetros de fabricación que controlan la morfología de los andamios: la concentración de polímero en la solución inicial, la concentración de agua en el solvente

y la temperatura de enfriamiento. Siendo difícil la reproducibilidad del proceso si no se mantienen constantes [92].

En este trabajo se realiza un estudio comparativo del efecto de diferentes velocidades de enfriamiento en la porosidad resultante en andamios de polivinil pirrolidona sin y con refuerzo con partículas de hidroxiapatita. Se estudia el efecto de las partículas de hidroxiapatita y se intentan determinar unas condiciones reproducibles para la preparación de andamios porosos para regeneración ósea.

1.5. REFERENCIAS

1. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993.**260**(5110): p. 920-926.
2. Hardingham, T., S. Tew, and A. Murdoch, *Tissue engineering: chondrocytes and cartilage*. Arthritis Res, 2002.**4 Suppl 3**: p. S63-8.
3. Kim, B.S., C.E. Baez, and A. Atala, *Biomaterials for tissue engineering*. World J Urol, 2000.**18**(1): p. 2-9.
4. Bell, E., *Strategy for the selection of scaffolds for tissue engineering*. Tissue Eng, 1995.**1**(2): p. 163-79.
5. Muschler, G.F., C. Nakamoto, and L.G. Griffith, *Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering*. J Bone Joint Surg Am, 2004. **86-A**(7): p. 1541-58.
6. Selvamurugan, N., et al., *Transforming growth factor-beta 1 regulation of collagenase-3 expression in osteoblastic cells by cross-talk between the Smad and MAPK signaling pathways and their components, Smad2 and Runx2*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 19327-34.
7. Temenoff, J.S. and A.G. Mikos, *Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage*. Biomaterials, 2000.**21**(5): p. 431-40.
8. Cohen, S., et al., *Design of synthetic polymeric structures for cell transplantation and tissue engineering*. Clin Mater, 1993. **13**(1-4): p. 3-10.
9. Ma, P.X., *Scaffolds for tissue fabrication*. Materials Today, 2004.**7**(5): p. 30-40.
10. Vats, A., et al., *Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications*. Clin Otolaryngol Allied Sci, 2003. **28**(3): p. 165-72.
11. Manjubala, I., et al., *Mineralisation of chitosan scaffolds with nano-apatite formation by double diffusion technique*. Acta Biomater, 2006.**2**(1): p. 75-84.
12. Chapekar, M.S., *Tissue engineering: Challenges and opportunities*. Journal of Biomedical Materials Research, 2000.**53**(6): p. 617-620.
13. Shin, H., S. Jo, and A.G. Mikos, *Biomimetic materials for tissue engineering*. Biomaterials, 2003.**24**(24): p. 4353-64.
14. Nijweide, P.J., E.H. Burger, and J.H. Feyen, *Cells of bone: proliferation, differentiation, and hormonal regulation*. Physiol Rev, 1986.**66**(4): p. 855-86.

15. Manolagas, S.C. and R.L. Jilka, *Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis.* N Engl J Med, 1995. **332**(5): p. 305-11.
16. Roodman, G.D., *Advances in bone biology: the osteoclast.* Endocr Rev, 1996.**17**(4): p. 308-32.
17. Anderson, H.C., *Mechanism of mineral formation in bone.* Lab Invest, 1989. **60**(3): p. 320-30.
18. Jackson, D.W. and T.M. Simon, *Tissue engineering principles in orthopaedic surgery.* Clinical Orthopaedics and Related Research, 1999(367 SUPPL.): p. S31-S45.
19. Braddock, M., et al., *Born again bone: tissue engineering for bone repair.* News Physiol Sci, 2001. **16**: p. 208-13.
20. Porter, J.R., T.T. Ruckh, and K.C. Papat, *Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies.* Biotechnol Prog, 2009. **25**(6): p. 1539-60.
21. Ball, M.D., et al., *Comparison of cell interactions with laser machined micron- and nanoscale features in polymer.* Exp Mol Pathol, 2007.**82**(2): p. 130-4.
22. Zreiqat, H., et al., *The effect of surface chemistry modification of titanium alloy on signalling pathways in human osteoblasts.* Biomaterials, 2005.**26**(36): p. 7579-86.
23. Ratner, B.D., A.B. Johnston, and T.J. Lenk, *Biomaterial surfaces.* J Biomed Mater Res, 1987.**21**(A1 Suppl): p. 59-89.
24. Schenk, R.K. and D. Buser, *Osseointegration: a reality.* Periodontol 2000, 1998.**17**: p. 22-35.
25. Albrektsson, T. and C. Johansson, *Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration.* Eur Spine J, 2001. **10 Suppl 2**: p. S96-101.
26. Branemark, R., et al., *Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: a review.* J Rehabil Res Dev, 2001.**38**(2): p. 175-81.
27. Puleo, D.A. and A. Nanci, *Understanding and controlling the bone-implant interface.* Biomaterials, 1999.**20**(23-24): p. 2311-21.
28. Davies, J.E., *Bone bonding at natural and biomaterial surfaces.* Biomaterials, 2007.**28**(34): p. 5058-67.
29. Garg, A.K., *The use of platelet-rich plasma to enhance the success of bone grafts around dental implants.* Dent Implantol Update, 2000. **11**(3): p. 17-21.

30. Werner, S. and R. Grose, *Regulation of wound healing by growth factors and cytokines*. *Physiol Rev*, 2003.**83**(3): p. 835-70.
31. Anitua, E., et al., *Autologous fibrin matrices: a potential source of biological mediators that modulate tendon cell activities*. *J Biomed Mater Res A*, 2006.**77**(2): p. 285-93.
32. Bongio, M., et al., *Biomimetic modification of synthetic hydrogels by incorporation of adhesive peptides and calcium phosphate nanoparticles: in vitro evaluation of cell behavior*. *Eur Cell Mater*, 2011.**22**: p. 359-76.
33. Barczyk, M., S. Carracedo, and D. Gullberg, *Integrins*. *Cell Tissue Res*, 2010.**339**(1): p. 269-80.
34. Woo, K.M., et al., *Suppression of apoptosis by enhanced protein adsorption on polymer/hydroxyapatite composite scaffolds*. *Biomaterials*, 2007.**28**(16): p. 2622-2630.
35. Böhner, M., *Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements*. *Injury*, 2000.**31 Suppl 4**: p. 37-47.
36. Yuan, H., et al., *Cross-species comparison of ectopic bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) scaffolds*. *Tissue Engineering*, 2006.**12**(6): p. 1607-1615.
37. Yuan, H., et al., *A comparison of the osteoinductive potential of two calcium phosphate ceramics implanted intramuscularly in goats*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2002. **13**(12): p. 1271-1275.
38. Daculsi, G. *CERALIQUE: A new injectable calcium phosphate bioceramic for bone filling*. in *Transactions of the Annual Meeting of the Society for Biomaterials in conjunction with the International Biomaterials Symposium*. 1996. Toronto, Can: Soc for Biomaterials.
39. Jarcho, M., *Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics*. *Clin Orthop Relat Res*, 1981.**157**: p. 259-78.
40. Cook, S.D., et al., *Hydroxyapatite-coated porous titanium for use as an orthopedic biologic attachment system*. *Clin Orthop Relat Res*, 1988(230): p. 303-12.
41. Gumaer, K.I., et al., *Tissue response in dogs to dense hydroxylapatite implantation in the femur*. *J Oral Maxillofac Surg*, 1986. **44**(8): p. 618-27.
42. Geesink, R. and N. Hoefnagels, *Eight years results of HA-coated primary total hip replacement*. *Acta Orthop Belg*, 1997. **63 Suppl 1**: p. 72-5.

43. Almirall, A., et al., *Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an $\hat{I}\pm$ -TCP paste*. *Biomaterials*, 2004.**25**(17): p. 3671-3680.
44. Zhou, C., et al., *Human immunoglobulin adsorption investigated by means of quartz crystal microbalance dissipation, atomic force microscopy, surface acoustic wave, and surface plasmon resonance techniques*. *Langmuir*, 2004.**20**(14): p. 5870-8.
45. Monkawa, A., et al., *Fabrication of hydroxyapatite ultra-thin layer on gold surface and its application for quartz crystal microbalance technique*. *Biomaterials*, 2006.**27**(33): p. 5748-54.
46. Osterberg, E., et al., *Protein-rejecting ability of surface-bound dextran in end-on and side-on configurations: comparison to PEG*. *J Biomed Mater Res*, 1995.**29**(6): p. 741-7.
47. Gorbunoff, M.J., *Protein chromatography on hydroxyapatite columns*. *Methods Enzymol*, 1990.**182**: p. 329-39.
48. Roach, P., D. Farrar, and C.C. Perry, *Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes*. *J Am Chem Soc*, 2005. **127**(22): p. 8168-73.
49. Makogonenko, E., et al., *Interaction of fibrin(ogen) with fibronectin: further characterization and localization of the fibronectin-binding site*. *Biochemistry*, 2002.**41**(25): p. 7907-13.
50. Wierzbicka-Patynowski, I. and J.E. Schwarzbauer, *The ins and outs of fibronectin matrix assembly*. *J Cell Sci*, 2003.**116**(Pt 16): p. 3269-76.
51. Traini, T., et al., *Bone microvascular pattern around loaded dental implants in a canine model*. *Clin Oral Investig*, 2006.**10**(2): p. 151-6.
52. Moreo, P., J.M. Garcia-Aznar, and M. Doblare, *Modeling mechanosensing and its effect on the migration and proliferation of adherent cells*. *Acta Biomater*, 2008.**4**(3): p. 613-21.
53. Sikavitsas, V.I., J.S. Temenoff, and A.G. Mikos, *Biomaterials and bone mechanotransduction*. *Biomaterials*, 2001.**22**(19): p. 2581-93.
54. Joos, U., et al., *Mineralization at the interface of implants*. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2006.**35**(9): p. 783-90.

55. Kloczewiak, M., S. Timmons, and J. Hawiger, *Localization of a site interacting with human platelet receptor on carboxy-terminal segment of human fibrinogen gamma chain*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1982.**107**(1): p. 181-7.
56. Savage, B., E. Bottini, and Z.M. Ruggeri, *Interaction of integrin alpha IIb beta 3 with multiple fibrinogen domains during platelet adhesion*. *J Biol Chem*, 1995.**270**(48): p. 28812-7.
57. LaFlamme, S.E., S.K. Akiyama, and K.M. Yamada, *Regulation of fibronectin receptor distribution*. *J Cell Biol*, 1992.**117**(2): p. 437-47.
58. Petrie, T.A., et al., *Integrin specificity and enhanced cellular activities associated with surfaces presenting a recombinant fibronectin fragment compared to RGD supports*. *Biomaterials*, 2006.**27**(31): p. 5459-70.
59. Brodsky, B. and J.A. Ramshaw, *The collagen triple-helix structure*. *Matrix Biol*, 1997.**15**(8-9): p. 545-54.
60. Ferreira, A.M., et al., *Collagen for bone tissue regeneration*. *Acta Biomaterialia*, 2012.**8**(9): p. 3191-3200.
61. Rothamel, D., et al., *Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat*. *Clin Oral Implants Res*, 2005.**16**(3): p. 369-78.
62. Carter, D.C. and J.X. Ho, *Structure of serum albumin*. *Adv Protein Chem*, 1994.**45**: p. 153-203.
63. Oyane, A., H. Tsurushima, and A. Ito, *Highly efficient gene transfer system using a laminin-DNA-apatite composite layer*. *Journal of Gene Medicine*, 2010.**12**(2): p. 194-206.
64. Krishnan, A., C.A. Siedlecki, and E.A. Vogler, *Mixology of protein solutions and the Vroman effect*. *Langmuir*, 2004.**20**(12): p. 5071-5078.
65. Oyane, A., et al., *Enhanced immobilization of acidic proteins in the apatite layer via electrostatic interactions in a supersaturated calcium phosphate solution*. *Acta Biomaterialia*, 2011.**7**(7): p. 2969-2976.
66. Clare, T.L., et al., *Functional monolayers for improved resistance to protein adsorption: Oligo(ethylene glycol)-modified silicon and diamond surfaces*. *Langmuir*, 2005.**21**(14): p. 6344-6355.
67. Iafisco, M., et al., *Adsorption and conformational change of myoglobin on biomimetic hydroxyapatite nanocrystals functionalized with alendronate*. *Langmuir*, 2008.**24**(9): p. 4924-4930.

68. Ribeiro, N., S.R. Sousa, and F.J. Monteiro, *Influence of crystallite size of nanophased hydroxyapatite on fibronectin and osteonectin adsorption and on MC3T3-E1 osteoblast adhesion and morphology*. Journal of Colloid and Interface Science, 2010.**351**(2): p. 398-406.
69. Vogler, E.A., *Protein adsorption in three dimensions*. Biomaterials, 2011.**33**(5): p. 1201-1237.
70. Rosen, C.J., *Building bones by knocking down genes*. Nat Med, 2012.**18**(2): p. 202-4.
71. Hutmacher, D.W., *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*. Biomaterials, 2000.**21**(24): p. 2529-2543.
72. Kempen, D.H.R., et al., *Controlled drug release from a novel injectable biodegradable microsphere/scaffold composite based on poly(propylene fumarate)*. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 2006. **77**(1): p. 103-111.
73. Chim, H. and A.K. Gosain, *Biomaterials in craniofacial surgery: experimental studies and clinical application*. J Craniofac Surg, 2009. **20**(1): p. 29-33.
74. Heary, R.F., et al., *Persistent iliac crest donor site pain: independent outcome assessment*. Neurosurgery, 2002.**50**(3): p. 510-6; discussion 516-7.
75. Williams, D.F., *On the mechanisms of biocompatibility*. Biomaterials, 2008.**29**(20): p. 2941-53.
76. Adhikari, R., et al., *Biodegradable injectable polyurethanes: synthesis and evaluation for orthopaedic applications*. Biomaterials, 2008.**29**(28): p. 3762-70.
77. Costantino, P.D. and C.D. Friedman, *Synthetic bone graft substitutes*. Otolaryngol Clin North Am, 1994. **27**(5): p. 1037-74.
78. Cypher, T.J. and J.P. Grossman, *Biological principles of bone graft healing*. J Foot Ankle Surg, 1996.**35**(5): p. 413-7.
79. Ohgushi, H., V.M. Goldberg, and A.I. Caplan, *Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats*. Acta Orthop Scand, 1989. **60**(3): p. 334-9.
80. Simon, C.G., Jr., et al., *Preliminary report on the biocompatibility of a moldable, resorbable, composite bone graft consisting of calcium phosphate cement and poly(lactide-co-glycolide) microspheres*. J Orthop Res, 2002.**20**(3): p. 473-82.

81. Karageorgiou, V. and D. Kaplan, *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis*. *Biomaterials*, 2005.**26**(27): p. 5474-91.
82. White, E. and E.C. Shors, *Biomaterial aspects of Interpore-200 porous hydroxyapatite*. *Dent Clin North Am*, 1986. **30**(1): p. 49-67.
83. Petite, H., et al., *Tissue-engineered bone regeneration*. *Nature Biotechnology*, 2000.**18**(9): p. 959-963.
84. Hulbert, S.F., et al., *Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses*. *J Biomed Mater Res*, 1970.**4**(3): p. 433-56.
85. Guillemin, G., et al., *Comparison of coral resorption and bone apposition with two natural corals of different porosities*. *J Biomed Mater Res*, 1989.**23**(7): p. 765-79.
86. Shieh, S.J. and J.P. Vacanti, *State-of-the-art tissue engineering: from tissue engineering to organ building*. *Surgery*, 2005.**137**(1): p. 1-7.
87. Schugens, C., et al., *Polylactide macroporous biodegradable implants for cell transplantation. II. Preparation of polylactide foams by liquid-liquid phase separation*. *J Biomed Mater Res*, 1996.**30**(4): p. 449-61.
88. Nam, Y.S. and T.G. Park, *Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation*. *J Biomed Mater Res*, 1999.**47**(1): p. 8-17.
89. Haugh, M.G., C.M. Murphy, and F.J. O'Brien, *Novel freeze-drying methods to produce a range of collagen- glycosaminoglycan scaffolds with tailored mean pore sizes*. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 2010. **16**(5): p. 887-894.
90. Zeltinger, J., et al., *Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition*. *Tissue Engineering*, 2001.**7**(5): p. 557-572.
91. Hu, Y., et al., *Fabrication of poly(alpha-hydroxy acid) foam scaffolds using multiple solvent systems*. *J Biomed Mater Res*, 2002.**59**(3): p. 563-72.
92. Deville, S., et al., *Freezing as a path to build complex composites*. *Science*, 2006. **311**(5760): p. 515-518.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es estudiar las condiciones que permitan optimizar el diseño de materiales (hidroxiapatita) para aplicaciones específicas. Por ejemplo, la regeneración de tejidos calcificados y ayudar a comprender las diferentes respuestas de los tejidos receptores tras el implante de materiales aparentemente análogos. Para ello será necesario:

- » Obtener partículas de hidroxiapatita con diferentes características superficiales.
- » Determinar las características de la superficie de las partículas de hidroxiapatita que favorecen la adsorción de proteínas en su conformación bioactiva.
- » Determinar la relación entre disponibilidad de proteínas en el medio y su adsorción.

Otro objetivo de este trabajo es estudiar la utilidad de la técnica de la microbalanza de cuarzo con disipación (QCM-D en su acrónimo en inglés) en los estudios de adsorción de proteínas sobre materiales.

El tercer objetivo general de este trabajo es intentar obtener unas condiciones reproducibles para la preparación de andamios porosos que puedan ser útiles para regeneración ósea

- » Se prepararán andamios tridimensionales porosos basados en sistemas poliméricos altamente hidrofílicos cargados con hidroxiapatita.
- » Se estudiará si la liofilización es una técnica adecuada para la preparación de este tipo de andamios
- » Se estudiará como controlar el porcentaje y tamaño de poros en andamios de polivinil pirrolidona sin y con refuerzo con partículas de hidroxiapatita.

OBJECTIVES

The goals of this work are to optimize the design parameters on materials for specific applications such as devices for the regeneration of calcified tissues and help to understand the different response from host tissues to apparently analogous materials.

Specific goals include:

- » To obtain hydroxyapatite particles with different surface features.
- » Determine the surface features that enhance protein adsorption plus favour the adsorption in the bioactive conformation.
- » To establish the relationship between the protein availability in the media and their adsorption.

A second goal is to study the potential of the Quartz Crystal Microbalance with dissipation (QCM-D) in the analysis of protein adsorption on the surface of materials.

The third objective of this work is to establish reproducible conditions for the manufacturing of porous scaffolds for bone regeneration.

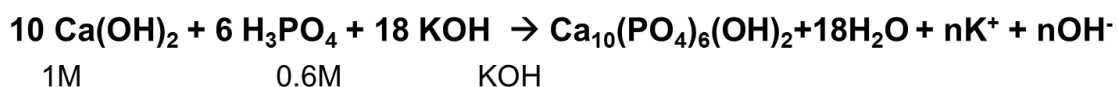
- » Tridimensional scaffolds based on hydrophilic polymers loaded with hydroxyapatite will be prepared.
- » The suitability of the freeze drying technique for the preparation of these scaffolds will be tested.
- » The control of percentage of porosity and pore size on poly vinyl pyrrolidone scaffolds hydroxyapatite-free and hydroxyapatite-loaded will be studied.

**CAPITULO II: Estudio de las
interacciones de la Hidroxiapatita
con el medio biológico, las
proteínas.**

2.1. INTRODUCCION

2.1.1. Síntesis Hidroxiapatita

Las síntesis de las distintas muestras, se llevaron a cabo por la ruta de la Vía Húmeda. La Hidroxiapatita se preparó mediante la reacción de una solución 1 M de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, con una solución 0.6M de H_3PO_4 a pH constante. El ajuste del pH se realizó mediante la adición de cantidades adecuadas de KOH (1M) durante el proceso de precipitación.



El control de las condiciones de síntesis fue posible gracias a la utilización de un equipo “Titrandó”.

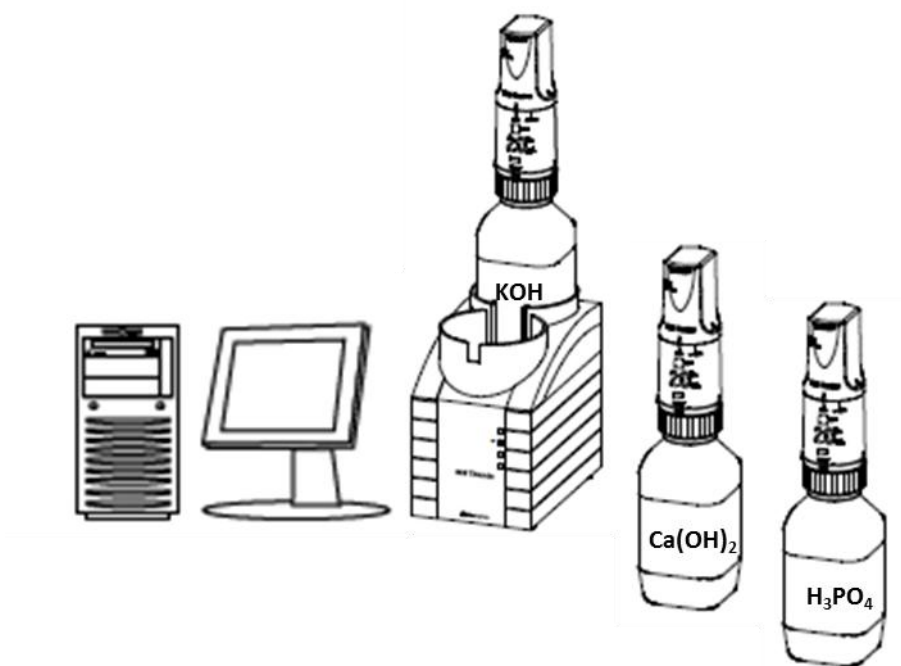


Figura 2.1. Esquema del equipo “Titrandó” utilizado para controlar los parámetros de síntesis.

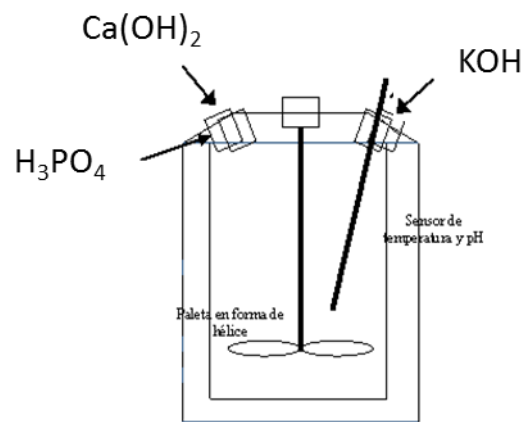


Figura 2.2. Esquema del reactor utilizado para la síntesis.

2.2. INFLUENCE OF SURFACE FEATURES OF THE HYDROXYAPATITE ON THE ADSORPTION OF PROTEINS RELEVANT TO BONE REGENERATION.

Belén Fernández-Montes Moraleda, Julio San Román, Luis M. Rodríguez-Lorenzo

2.2.1. Abstract

Protein-surface interaction may determine the success or failure of an implanted device. Not much attention have been paid to the specific surface parameters of hydroxyapatite that modulates and determines the formation and potential activity of the layer of proteins that is first formed when the material get in contact with the host tissue. The influence of specific surface area, crystallite size and particle size of hydroxyapatite on the adsorption of proteins relevant for bone regeneration is evaluated in this paper. Hydroxyapatite have been prepared by a wet chemical reaction of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ with H_3PO_4 . One set of reactions included poly acrylic acid in the reactant solution to modify the properties of the powder. Fibrinogen (Fg) Fraction I, type I: from Human plasma, (67% Protein), and Fibronectin (Fn) from Human plasma were selected to perform the adsorption experiments. The analysis of protein adsorption was carried out by UV / VIS spectrometry. A lower specific surface area and a different aspect ratio are obtained when the acrylic acid is included in the reaction badge. The deconvolution of the amide I band on the Raman spectra of free and adsorbed proteins reveals that the interaction apatite –protein happens through the carboxylate groups of the proteins. The combined analysis of crystallite size, specific surface area and particle size should be considered on the design of hydroxyapatite materials intended to interact with proteins.

Resumen

La interacción que se produce entre proteínas –material, determinará el éxito o fallo del material implantado. Hasta ahora no se ha dado mucha importancia a las características superficiales de la hidroxiapatita, las cuales modulan y determinan la formación y actividad, de la capa de proteínas que se forman cuando un material entra en contacto con el tejido biológico. La influencia de la superficie específica, el tamaño de cristal y tamaño de partícula, son evaluados en este estudio. Hidroxiapatita, ha sido sintetizada por precipitación, haciendo reaccionar $\text{Ca}(\text{OH})_2$ con H_3PO_4 . Adicionando ácido poliacrílico a un grupo de síntesis para obtener modificaciones en las características de

las muestras obtenidas. Fibrinógeno (Fg) Fracción I, tipo I de plasma Humano, y Fibronectina (Fn), de plasma humano, fueron seleccionadas para llevar a cabo los experimentos de adsorción. Para medir la adsorción se utilizó espectroscopía uv / vis. Menos superficie específica así como una distinta orientación, se obtiene cuando se incluye ácido poliacrílico en la síntesis. La deconvolución de la banda de amida I en el espectro Raman de la proteína sola comparada con la proteína adsorbida, confirma la interacción apatita-proteína, que tiene lugar a través del grupo carboxílico. El análisis combinado del tamaño de cristal, superficie específica y tamaño de partícula, debería ser considerado en el diseño de materiales basados en hidroxiapatita, que vayan a estar en contacto con proteínas.

2.2.2. Introduction.

Protein-surface interaction is the first event in the process of integration of an implanted device with a hosting tissue ¹. This first event may determine the success or failure of the implanted device. However the parameters that affect protein adsorption on inorganic compounds are not fully understood and this knowledge is essential to optimize the design of the materials for specific applications such as protein constructs in sensors or in the design of devices for the regeneration of calcified tissues ². Cellular responses such as attachment to materials surfaces, proliferation, and phenotypic changes have been shown to be linked to the concentration, composition and conformation of the layer of proteins that adsorbs first on synthetic materials ^{3,4}. The purpose of this work is to evaluate the adsorption of proteins involved in the earlier states of integration of hydroxyapatite in an osseous tissue.

Hydroxyapatite (OHAp) functions as a bioactive material that directly regulates the behavior of both normal and transformed cells ⁵. For example, OHAp has been shown to enhance normal bone formation and to alter growth and expression profiles of bone metastatic tumors ⁶. Also, OHAp can bypass a host foreign body response system and integrate with the surrounding tissues, unlike other artificial materials ⁷. OHAp shows a high affinity for proteins ⁸ and the thorough understanding of the protein-surface interaction should help to understand the different response from host tissues to implanted OHAp and the design of tailored medical devices for specific needs ⁹. The adsorption of proteins on solid surfaces is a complicated process consisting in many events. Factors affecting protein adsorption on material surfaces include, protein concentration ¹⁰, molecular weight of the protein (MW) ¹¹, isoelectrical point (PI) of the protein ⁷, hydrophilicity or hydrophobicity of the material ¹², presence of functional groups ⁹, surface grain/particle size, crystallite size ¹³ etc. And while plenty of literature can be found on the protein or surface energy related factors, see review ¹⁴ and references there of, less attention have been paid to the specific surface parameters of a particular material that modulates and eventually determines the formation and potential activity of a layer of proteins. Only a general rule that a small crystal size/small particle size favor bone regeneration while a high crystallinity favors bone resorption ¹⁵ and a common agreement on the importance of roughness ¹⁶ are generally acknowledged. A combined analysis of the influence of specific surface area (SSA), crystallite size (CS)

and particle size (PS) of hydroxyapatite on the adsorption of proteins relevant for bone regeneration is performed in this work.

Fibrinogen (Fg) and Fibronectin (Fn) have been selected in this work to study the adsorption capacity of OHAp with different characteristics. Fg is a structural glycoprotein in blood plasma with an isoelectrical point (PI) 5.5, a moderate molecular weight, 340 kDa and size, 45 nm length¹⁷. The structure contains a central hydrophobic domain connected to two other hydrophobic external domains through a coiled-coin chain. These domains are negatively charged on neutral pH conditions whereas there are also Arg and Lys residues positively charged and substantially more hydrophylic¹⁸. Fn is a dimeric glycoprotein with a 250 kDa molecular weight and a pI 5.6-6¹⁹. Each of the dimers are composed of three different regions. Two of them bind to heparin and collagen and the third one contains an ARG-Gly-ASP (RGD) aminoacid sequence which is a cell binding domain²⁰. The integrin molecule which mediates platelet adhesion for Fg and Fn is the same, Integrin α IIb β 3) and the interaction between this ligand/receptor is responsible for immobilization, activation, and aggregation of platelets²¹. Also both present conformational changes on adsorption that may determine their activity²². The main difference from the activity standpoint may be the presence and availability of the RGD sequence on Fn that promotes osteoblast adhesion¹⁶. However studies that relate the adhesion of these two glycoproteins with the surface parameters of OHAp are lacking. OHAp with different surface characteristics have been prepared for this work and the adsorption of Fg and Fn evaluated under the same conditions.

2.2.3. Materials and methods.

Hydroxyapatite (OHAp) have been prepared by reaction of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ with H_3PO_4 at pH 9.4. One set of reactions included poly acrylic acid (*aa*) in the reactant solution (OHAp-*aa*). Powders were washed, freeze dried, and calcined at 900°C for 2 hours and ball milled for 24 hours to deagglomerate the particles²³. (OHAp-C and OHAp-*aa*C). Fibrinogen (Fg) Fraction I, type I: from Human plasma, (67% Protein), and Fibronectin (Fn) from Human plasma were purchased from Sigma.

All the ceramic powders were characterized with the following techniques. Fourier transform infrared ray (FTIR) spectroscopy was performed using KBr pellets (2 mg/300 mg KBr) on a Perkin-Elmer-Spectrum One spectrophotometer with a resolution of 2.00 cm^{-1} and 16 scans. Infrared spectra were recorded in the range $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. Thermogravimetric analysis (TGA) was performed under a nitrogen atmosphere with a TGA Q500 (TA Instruments) thermobalance at a heating rate of $10^\circ\text{C}/\text{min}$ and a temperature interval $30\text{--}950^\circ\text{C}$. X-ray diffraction (XRD) patterns were recorded with a Bruker D8 Advance set up with a $\text{Cu K}\alpha$ radiation between 2θ $10\text{--}60^\circ$ with a step size of 0.024° and 0.2 s per step. Crystallite size has been determined by using the Scherrer equation²⁴. The degree of crystallinity has been calculated following the procedure proposed by L. Keller on where a linear background can be assumed between 25 and 38 2θ for 100% crystalline hydroxyapatite²⁵. The morphology of the particles was analyzed by Transmission electron microscopy (TEM) on a Zeiss, EM10C Instrument operating at an acceleration voltage of 50kV. A drop of particle suspension was put on a 10 mesh copper grid. Specific surface area of the powders was calculated from a N_2 isotherm using the BET method²⁶ with a MS-13, Quantachrome Autosorb, USA. Particle size distribution was determined by laser scattering using a Coulter LS320 (Beckman). Approximately 10 mg of the particles were thoroughly dispersed in water. The gas displacement pycnometer (Helio, Accupyc 1330) was used to determine density and specific surface area was determined by the BET method in a Monosorb Surface Area Analyser MS-13, Quantachrome Co. Zeta potential was calculated by using the Smoluchowski equation²⁷ from electrophoretic mobility measurements in a Zetasiser, Halvern Instrument. Samples were suspended in Phosphate buffered saline (PBS) and PH modified with NaOH/HCl. measurements at pH 4, 5, 6, 7 and 8 were taken. Each sample was determined 3 times (the average of 40 runs each) in folded capillary cells.

Adsorption of proteins was measured with a UV/VIS Spectrometer Lambda 16. Solutions were prepared by mixing 10 mg of the samples with 1.5 mL of the different proteins dissolved in PBS Buffer at pH 7 at different concentrations (0.1, 0.2, 0.5 mg/mL) in a 2 mL conical polyethylene Eppendorf tube for a total protein quantity of: 150 , 300 and 750 μ g. The mixture was maintained in a bascule bath at 37 °C for 24 h. The solid, for the Raman spectroscopy investigation, was recovered by centrifuging and freezing. The supernatant solution was assayed for protein content by UV spectroscopy, Fibrinogen at 265 nm and Fibronectin at 203 nm. The amount of adsorbed protein was calculated from the difference between the concentrations of the initial solution and the supernatant. All the measurement were triplicated. Protein binding was studied by Raman spectroscopy in a Renishaw inVia-Reflex Raman Microscope with a 785 nm notch laser with a grating ratio 1200l/mm (633/780) and a Master Renishaw CCD camera detector Laser power was 100% for exposure /line 10.00 at a focal distance 30mm.

2.2.4. Results.

IR spectra of both synthesized powders are characteristic of apatite compounds as shown in Fig. 2.3a. The spectra only show bands that can be assigned to phosphate groups in an apatite environment²⁸. XRD patterns of the synthesized powders reveal an apatite structure with broadened maxima as displayed in fig 2.3b. No additional phases could be detected other than apatite. Crystallite sizes from [0 0 2] maxima have been calculated with the Scherrer equation. Results are displayed on Table 2.1 together with the degree of crystallinity.

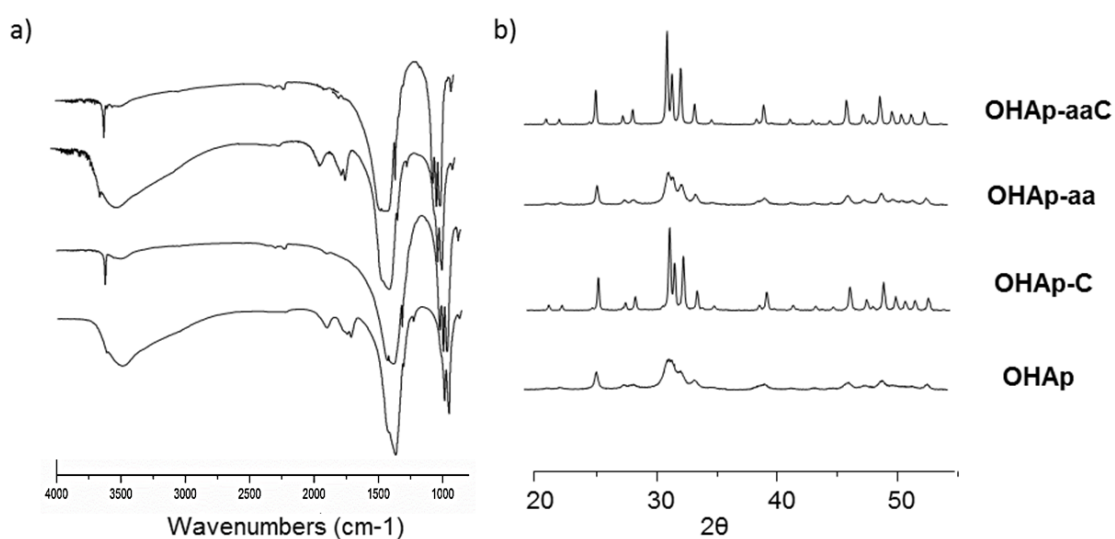


Figure 2.3.a), FTIR spectra and b) XRD patterns of synthesized (OHAp, OHAp-aa), and calcined (OHAp-C, OHAp-aa-C) powders.

Table 2.1. Crystallite size (CS) from 002 and 300 maxima, degree of crystallinity, specific surface area, density and carbonate content of the products assayed. Standard deviation of the last figure is shown in brackets

Sample code	CS (002) (Å)	CS (300) (Å)	Degree of crystallinity (%)	SSA (m ² /g)	Density (g/mL)	CO ₃ ²⁻ (%)
OHAp	526	-	95(5)	62(3)	2,92(6)	1.5(1)
OHAp-aa	858	-	97(5)	34(2)	2,95(1)	2.0(1)
OHAp-c	3135	2367	100	7(1)	3,21(1)	0.3(<1)
OHAP-aac	4290	4602	100	3(1)	3,21(1)	0.4(<1)

No significant weight loss can be appreciated on heating between 400 and 800°C for any of the synthesized powders, see fig. 2.4. Thus the presence of HPO₄²⁻ groups can be rule out and a Ca/P ratio of 1.66 can be assumed²⁹.

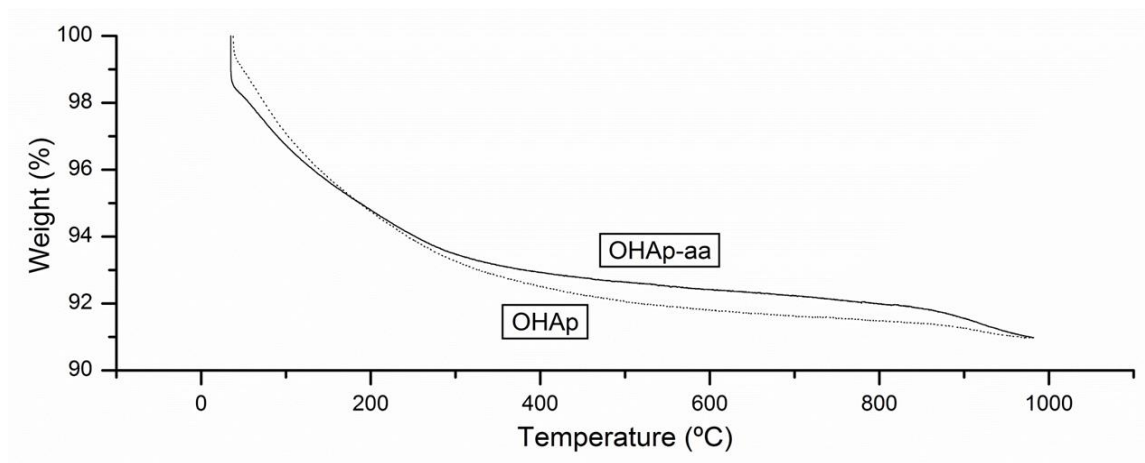


Figure 2.4. Thermogravimetric analysis of OHAp and OHAp-aa powders.

TEM images of the apatites are displayed on fig 2.5. Particles from both samples display an acicular shape with a significant difference. While OHAp sample appear as individual particles with width sizes from 40 to 170 nm and lengths from 300 to 1000 nm, OHAP-aa particles have a fibre-like appearance and widths between 50 and 170 nm.

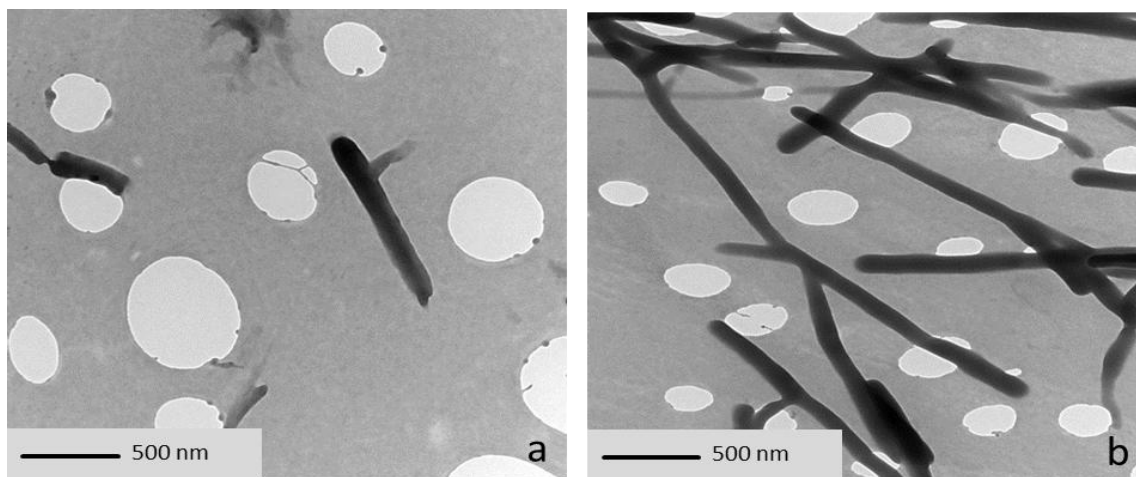


Figure 2.5. TEM images of OHAp and OHAP-aa powders.

Fig. 2.6 shows the zeta potential curves of the apatite powders plotted as a function of pH. It is impossible to detect any IEP up to an acidic pH value of 4. Below pH 4, it was impossible to measure the electrophoretic mobility due to the increase of the solubility of the powders. All the powders possess an anionic nature at the physiological pH 7.4. No significant differences can be observed between synthesized powders or between calcined powders. However a decrease in the Z potential can be appreciated after calcination for both types of powders. Specific surface area and density of the powders are also collected on table 2.1.

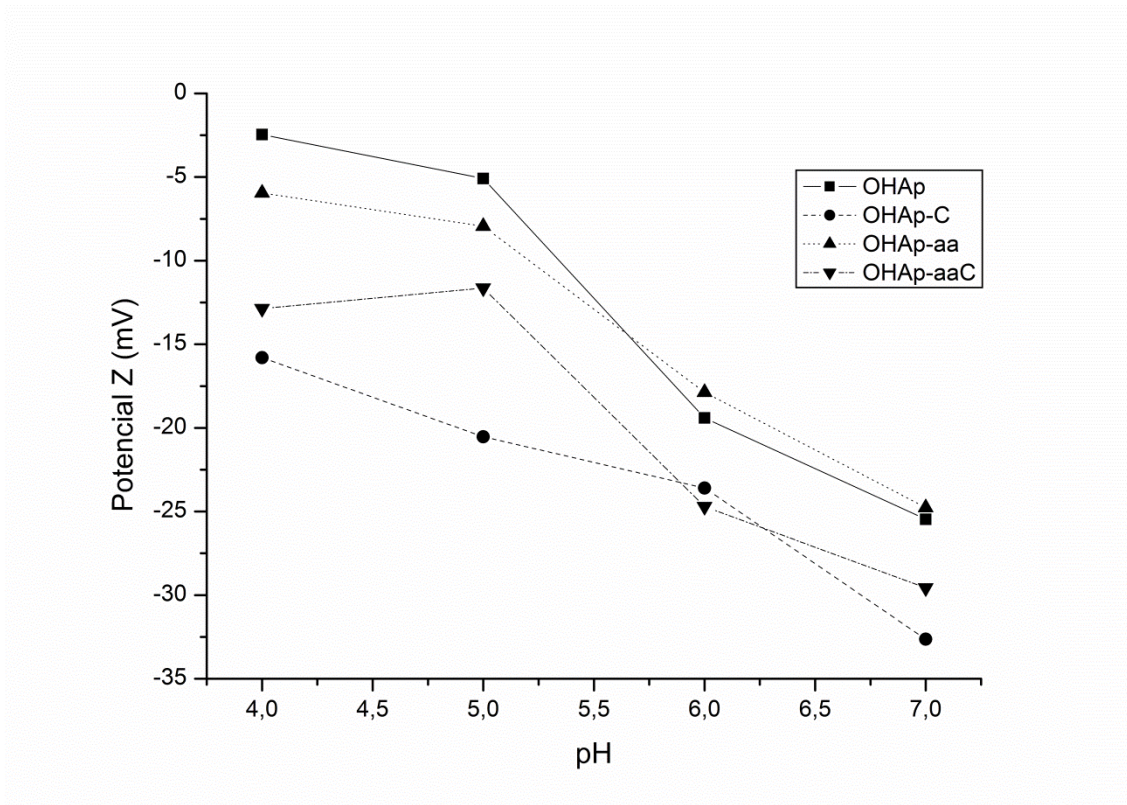


Figure 2.6. Zeta potential curves of the apatite powders as a function of pH

IR spectra and XRD patterns of calcined powders are also displayed on fig 2.3a and 2.3b. Bands that can be assigned to hydroxyl groups and could not be appreciated on synthesized samples can be assigned in both FTIR spectra. XRD patterns are characteristic of well crystallized hydroxyapatite. The presence of secondary phases could not be detected. Crystal sizes on the 002 and 300 directions are collected on table 2.1 together with the results of the specific surface area and density of the powders. Carbonate content of all the samples calculated from the elemental analysis is also collected on table 2.1

The protein adsorption results are collected on table 2.2. Protein adsorption versus protein content is displayed on figure 2.7, a similar behaviour can be observed for both, fibrinogen and fibronectin. In a first approach, an increase in the adsorption can be correlated with an increase in the content of protein in solution. However for Fn a minimum of relative adsorption for the solution containing 200 $\mu\text{g/ml}$ can be appreciated. This minimum can be related with protein-protein interactions or with the

conformation of the adsorbed protein. However, a correlation coefficient of $r: 0.986$ for fibronectin and $r: 0.996$ for fibrinogen can be established.

Table 2.2. Fibrinogen and fibronectin adsorption at different concentrations. Standard deviation of the last figures are shown in brackets

	Fg	Fg	Fg	Fn	Fn	Fn
	100	200	500	100	200	500
	($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)
OHAp	156(8)	195(8)	399 (12)	138(7)	259(9)	440(16)
OHAp-aa	125(6)	55(5)	353(16)	94(4)	194(9)	343(12)
OHAp-c	159((8)	197(9)	429 (19)	150(6)	277(10)	444(11)
OHAP- aac	137(7)	113(6)	409 (20)	106(4)	205(8)	343(11)

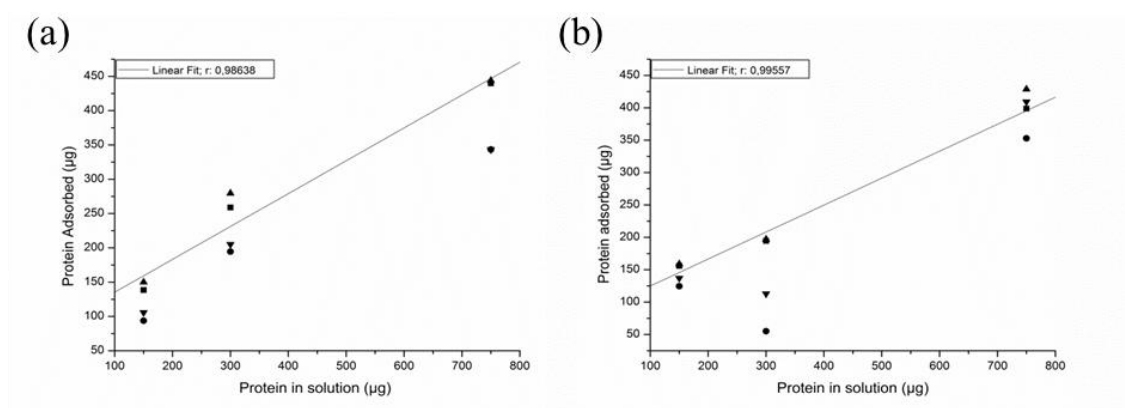


Figure 2.7. a) fibrinogen and b) fibronectin adsorption vs protein concentration in solution.

Raman spectra of free and adsorbed Fg, from a 200mg Fg containing solution, can be observed on figure 2.8. Significant bands assigned for the free Fg spectrum includes, the amide I band, which is sensitive to the secondary structure in protein, at 1667 cm^{-1} . The 1603 cm^{-1} band assigned to the aromatic C=C stretching vibration of phenylalanine and tyrosine. The multiplet at 1452 cm^{-1} assigned to the deformation modes of both CH_3 and CH_2 vibrations. The 1415 cm^{-1} band assigned to a COO^- stretching mode and the amide III band at 1244 cm^{-1} . For the adsorbed Fg a band at 1722 cm^{-1} can be assigned to the carboxylate stretching vibration of the surface adsorbed carboxylate groups³⁰.

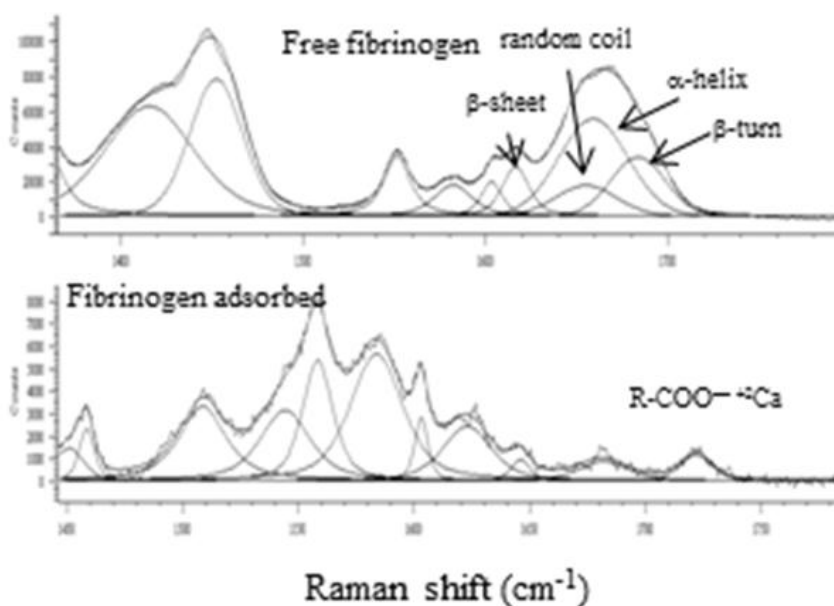


Figure 2.8. Raman spectra of free and adsorbed Fibrinogen for the $1400\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ region. The deconvoluted components of the amide II band are also included.

2.2.5. Discussion

There are numerous studies related with the adsorption of proteins to various kinds of surfaces^{1,14,20,31} but detailed studies that relate materials surface features with the ability to bind proteins are still needed. For hydroxyapatite, most of the studies focus on one specific parameter such as crystallinity³² or surface charge³³. However a combined study including crystallite size, calculated with the Scherrer method, surface charge from electrophoretic mobility measurements, specific surface area calculated with the BET method and particle size measured with a laser scattering method is still lacking.

Hydroxyapatite with different surface features has been prepared by adding a certain amount of acrylic acid in one badge of reactions. A lower SSA is obtained when the *aa* is included in the reaction badge whereas no significant differences are observed on the density of the powders (table 2.1) and a different aspect ratio can be observed in the TEM pictures (Fig 2.5). *aa* has been described as an inhibitor for the crystallization of apatite crystals via interactions between the negatively charged acrylic groups and positively charged Ca ions that delays the interactions between P and Ca³⁴⁻³⁶. It seems that for the low *aa* concentration used in the current work, these interactions result in an inhibition of the nucleation process. Then, the lower amount of nuclei result in larger crystals and grains as it can be observed in the TEM pictures, crystallite size calculations and SSA measurements collected in table 2.1. Crystallite size calculated with the Scherrer method will be used on the discussion related with protein adsorption instead of the crystal/particle size observed in TEM for convenience, since both parameters are related and larger crystallite sizes yield larger crystals.

The apatite-protein interaction on inorganic surfaces may happen through different kind of interactions^{14,37}. The prevalence of one or the other depends on the protein structure and the physic-chemical features of the inorganic surface. For apatites is generally accepted that the main interactions are hydrophobic and electrostatic^{2,38}. However hydroxyapatite present a hydrophilic character ($\theta < 60$)¹³ and in hydrophilic surfaces, repulsive solvation forces arising from strongly bound water occurs and they should avoid protein binding^{39,40}. A stark transition between protein adherent and protein non-adherent materials has been found to happen on water contact angles 60-65°⁴¹ which is consistent with the appearance of hydrophobic interactions⁴². Also, surface wettability has to be considered together with the dehydration of the surface. The former one expels proteins from solution but proteins will only be adsorbed on a surface when the energy

necessary for dehydrating the surface is lower. i.e. ΔG_0 (Phobic effect) $>$ $\square G_0$ (dehydration)⁴⁰. The hydrophobic effect is the energy that expels protein from solution to recover hydrogen bonds among water molecules otherwise separated by proteins. Thus, hydrophobic effect is not the dominant effect on the adsorption of Fg and Fn on hydroxyapatite surfaces.

Fg and Fn isoelectric points are 5.5-5.8 and 5.6-6.1 respectively. Thus, both are negatively charged at physiological pH. And although the overall negative net charge measured in each of the powders^{13,23}, they may interact through the positively charged calcium ions to the negatively charged carboxylate groups of the amino acid side chains or the terminal carboxylate groups^{7,30}. To check this point the Raman spectra of free and adsorbed proteins were registered.

The deconvoluted profile, using a Voight profile, of the Raman spectra of free and adsorbed fibrinogen spectra are displayed on fig 2.8. The assignation of the components bands of the amide I band is as follow. 1612-1640 to β -sheet, 1640-1650 to random coil, 1650-1658 to α -helix and 1660-1670 to β -turn structure². A significant reduction on helicity can be deduced for both Fg and Fn when they are adsorbed on the hydroxyapatite surfaces. An increase in the β -turns which is the most flexible structure on hydrophilic aminoacids and a decrease on the α -helix can be observed. Also a new band at 1745 cm^{-1} can be appreciated for the adsorbed Fg that can be assigned to the adsorbed carboxylate on the surface of the apatite³⁰.

The ratio protein adsorbed / protein remaining in solution decrease for all the specimens when the protein content rises from $100\mu\text{g/ml}$ to $200\mu\text{g/ml}$ and decreases again when the initial concentration is $500\mu\text{g/ml}$. This effect has to be related with the different types of interaction that may happen; protein-PBS, protein-protein, material-PBS and protein-material⁴³. Protein-PBS and material PBS interaction are mainly related with the protein's PI and hydrophilic character of the materials respectively and can be dismissed due to the similar PI and hydrophilic character of the components of the system. Protein-protein interactions should be greater for greater concentrations whatever the influence, thus the dominant factor seems to be the protein-material interaction.

Which parameter of the apatite powders determines Fg and Fn adsorption capability is the main subject of the current work. Surface charge influence can be rule out after

examining Z potential values, fig 2.6, and chemical composition after examining chemical and spectroscopy analysis, figs 2.3-2.5 and table 2.1. Degree of crystallinity can be rule out as well, not only because of the high figures obtained, table 2.1, but also because it is unlikely that the amorphous and well crystallized fractions coexist as separated phases. It is more likely that the degree of “crystalline perfection” on the Bragg peak producing the hydroxyapatite fraction varies with the amorphous content and the quantities obtained can be no more than a figure of merit with limited physical meaning since the state of crystalline order is not described²⁵

Thus, crystallite size, specific surface area and particle size are the remaining parameters that need to be analysed. Figs 2.9a, b and c show the ternary diagrams for Fg adsorption considering CS, SSA and PS.

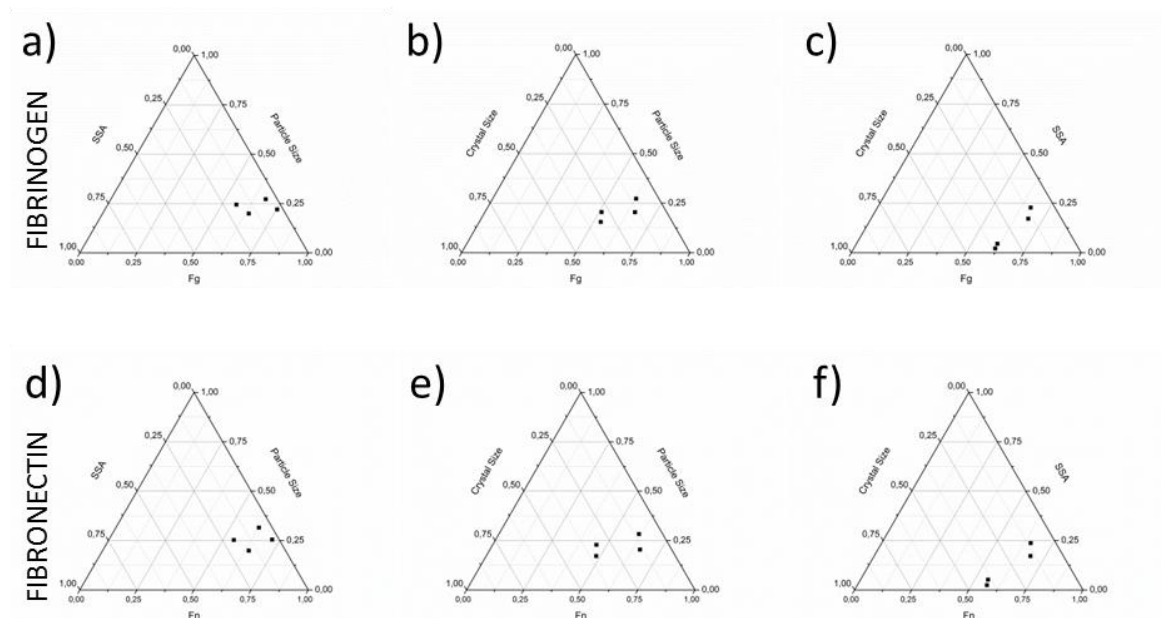
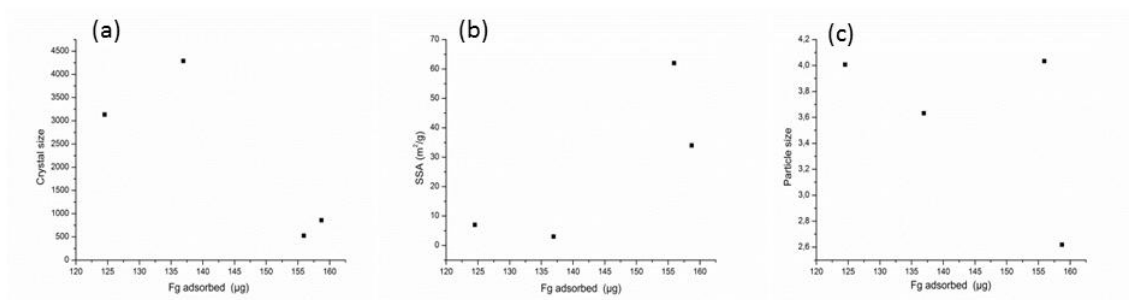


Figure 2.9. Ternary diagrams for the Fg and Fn adsorption analysis. a) SSA and particle size versus Fg adsorbed. b) Crystal size and particle size versus Fg adsorbed. c) Crystal size and SSA versus Fg adsorbed. d) SSA and particle size versus Fn adsorbed. e) crystal size and particle size versus Fn adsorbed. f) Crystal size and SSA versus Fn adsorbed.

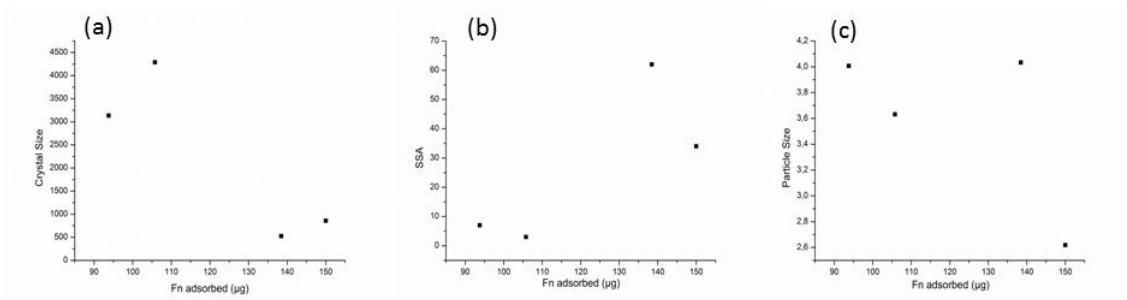
The analysis of data from tables 2.1 and 2.2 confirms “the general knowledge” that an increase in crystal size results in a decrease of the protein adsorption⁴⁴⁻⁴⁶. Also, an increase in specific surface area yields an increase in protein adsorption and an increase in particle size produces a decrease in protein adsorption. However, it is not possible to draw a linear correlation between any of the parameters and the FG adsorption, see Figure 2.10, thus, a cooperative effect of the parameters can be thought. The comprehensive analysis of these parameters requires a quaternary diagram in the system: protein adsorption-crystal size-specific surface area-particle size that enables to draw a map that may predict the protein adsorption on a specific material and the design of materials in the same way that phase diagrams allows to design the properties on ceramic materials⁴⁷⁻⁴⁹. A quaternary diagram should be drawn as a tetrahedron but for a better understanding of the information provided in 2D, ternary diagrams are more convenient to represent.



Supplementary file 2.1. Graphic with each surface characteristic with the different Fibrinogen concentrations.

Fig 2.9 reproduces the ternary diagrams for Fg and Fn adsorption on the prepared samples. On Fig 2.9a it can be appreciated that specimens with a similar SSA yield different Fg adsorption and specimens with similar particle sizes yield different adsorption as well. When the two parameters are considered together, larger SSA yields less Fg adsorption, suggesting the prevalence of the influence of PS over the influence of SSA. This can be represented as: $Ps > SSA$. When crystal size and particle size are considered together, fig 2.9b, it cannot be observed an influence of the particle size on the Fg adsorption modulated by the crystal size but an influence can effectively be appreciated on the crystal size over the ability to bind Fg determined by the PS: thus $CS > PS$. Fig 2.9c displays the ternary diagram considering the influence of crystal size and SSA on the adsorption of Fg. In this diagram it can be observed that for a larger

SSA a larger FG adsorption is obtained which it does not happen when SSA is considered as a unique parameter, see Supp file 2.1. Also in fig 2.9c, a larger Fg adsorption can be observed for a smaller Cs which again it cannot be observed when CS is considered as a unique parameter, supp. file 2.1: Thus, qualitatively both parameters have a similar influence on each other: CS= SSA. The combination of the three graphs suggests that none of the parameters prevails over the other in determining the ability of hydroxyapatite to adsorb Fg. Thus, the three of them should be considered together to predict the ability of apatite powders to bind Fg. In our samples, powders with a combination of a larger specific surface area and a smaller crystal size favour the adsorption of Fg whereas the particle size seems to play a modifying role. For Fn, fig 2.9d represents the combined analysis of the influence of PS and SSA and both parameters seem to have a strong influence on each other when compared to the analysis of the parameters without external influence (supplementary file 2.2).



Supplementary file 2.2. Graphic with each surface characteristic with the different Fibronectin concentrations.

Same result can be obtained for the combined analysis of CS and PS, fig 2.9e. However it can be highlighted that the combined analysis of CS and SSA, fig 2.9f, results in the expected trend of greater Fn adsorption for greater SSA that is not observed when SSA is considered as a unique parameter.

In summary a combined analysis of powder characteristic seems necessary to design hydroxyapatite materials with controlled protein binding ability. This analysis should also consider that powder characteristics may influence in a different way the adsorption of different proteins.

Protein Adsorption is a complex phenomenon. Other authors have proved that not only protein concentration determines the efficiency of protein immobilization but also other factors such as the molecular weight of the proteins protein-PBS, protein-protein, material-PBS, protein-material interactions and competition between the different proteins^{7,50}. Fn concentration tested in this study is within the range found in serum, 250-400 µg/mL⁵¹ while Fg concentration is lower than the found in serum⁵¹. However the same concentrations have been maintained for a better comparison. Also, according to the Vroman effect⁵², a rapid exchange related to the molecular weight of the proteins should follow the adsorption indicating that eventually Fn would replace Fg on the surface of the material. However, not much attention had been paid up to date to the influence of the implant material features. Reviewing bone remodelling mechanisms, it can be observed that bone resorption surfaces are made of highly crystalline hydroxyapatite whereas bone formation surfaces are made of low crystalline hydroxyapatite¹⁵. Globally, skeletal turnover occurs in bone multicellular units (BMUs) that are composed of bone-resorbing osteoclasts, bone-forming osteoblasts that arise from mesenchymal stromal cells (MSCs) and osteocytes, which are former osteoblasts embedded within the bone matrix and cell-material interaction occurs through an adsorbed protein layer. Thus, new strategies for selectively stimulating bone formation without promoting bone resorption should go through the specific design of materials to selectively adsorb the appropriate protein layer for the target cell/tissue/application. Ternary diagrams applied in this study may be used to study the protein adsorption on a specific material.

2.2.6. Conclusions

Hydroxyapatite with different characteristics can be obtained with the addition of *aa* to the reactant solutions. A lower specific surface area and a different aspect ratio are obtained when the acrylic acid is included in the reaction badge. An increase in the Fg and Fn adsorption can be correlated with an increase in the content of protein in solution. Protein adsorption on hydroxyapatite is not determined by a single parameter. A combined analysis of the different parameters is necessary to design materials intended for protein interaction. Hydroxyapatites with a combination of larger specific surface area and a smaller crystallite size favour the adsorption of Fg and Fn whereas the particle size plays a modifying role.

2.2.7. References

1. Rodriguez-Lorenzo LM. In: Dumitriu S, Popa V, editors. Polymeric biomaterials: CRC press; 2012.
2. Iafisco M, Sabatino P, Lesci IG, Prat M, Rimondini L, Roveri N. Conformational modifications of serum albumins adsorbed on different kinds of biomimetic hydroxyapatite nanocrystals. *Col Surf b* 2010;81(1):274-284.
3. Hylton DM, Shalaby SW, Latour RA. Direct correlation between adsorption-induced changes in protein structure and platelet adhesion. *J Biomed Materials Res A* 2005;73A(3):349-358.
4. Wu YG, Simonovsky FI, Ratner BD, Horbett TA. The role of adsorbed fibrinogen in platelet adhesion to polyurethane surfaces: A comparison of surface hydrophobicity, protein adsorption, monoclonal antibody binding, and platelet adhesion. *J Biomed Materials Res A* 2005;74A(4):722-738.
5. Balasundaram G, Sato M, Webster TJ. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. *BIOMATERIALS* 2006;27(14):2798-2805.
6. Pathi SP, Lin DDW, Dorvee JR, Estroff LA, Fischbach C. Hydroxyapatite nanoparticle-containing scaffolds for the study of breast cancer bone metastasis. *BIOMATERIALS* 2011;32(22):5112-5122.
7. Oyane A, Ootsuka T, Hayama K, Sogo Y, Ito A. Enhanced immobilization of acidic proteins in the apatite layer via electrostatic interactions in a supersaturated calcium phosphate solution. *Acta Biomater*;7(7):2969-2976.
8. Tanaka T, Hirose M, Kotobuki N, Ohgushi H, Furuzono T, Sato J. Nano-scaled hydroxyapatite/silk fibroin sheets support osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal cells. *Mat Sci Eng C* 2007;27(4):817-823.
9. Iafisco M, Palazzo B, Falini G, Di Foggia M, Bonora S, Nicolis S, Casella L, Roveri N. Adsorption and conformational change of myoglobin on biomimetic hydroxyapatite nanocrystals functionalized with alendronate. *Langmuir* 2008;24(9):4924-4930.
10. Oyane A, Tsurushima H, Ito A. Highly efficient gene transfer system using a laminin-DNA-apatite composite layer. *J Gene Med* 2010;12(2):194-206.
11. Krishnan A, Siedlecki CA, Vogler EA. Mixology of protein solutions and the Vroman effect. *Langmuir* 2004;20(12):5071-5078.

12. Clare TL, Clare BH, Nichols BM, Abbott NL, Hamers RJ. Functional monolayers for improved resistance to protein adsorption: Oligo(ethylene glycol)-modified silicon and diamond surfaces. *Langmuir* 2005;21(14):6344-6355.
13. Ribeiro N, Sousa SR, Monteiro FJ. Influence of crystallite size of nanophased hydroxyapatite on fibronectin and osteonectin adsorption and on MC3T3-E1 osteoblast adhesion and morphology. *J Colloid Interf Sci* 2010;351(2):398-406.
14. Vogler EA. Protein adsorption in three dimensions. *BIOMATERIALS* 2012;33(5):1201-1237.
15. Rosen CJ. Building bones by knocking down genes. *Nature Med* 2012;18(2):202-204.
16. Palin E, Liu HN, Webster TJ. Mimicking the nanofeatures of bone increases bone-forming cell adhesion and proliferation. *Nanotechnology* 2005;16(9):1828-1835.
17. Madrazo J, Brown JH, Litvinovich S, Dominguez R, Yakovlev S, Medved L, Cohen C. Crystal structure of the central region of bovine fibrinogen (E-5 fragment) at 1.4-angstrom resolution. *Proc Nat Aca Sci* 2001;98(21):11967-11972.
18. Monkawa A, Ikoma T, Yunoki S, Yoshioka T, Tanaka J, Chakarov D, Kasemo B. Fabrication of hydroxyapatite ultra-thin layer on gold surface and its application for quartz crystal microbalance technique. *BIOMATERIALS* 2006;27(33):5748-5754.
19. Gugutkov D, Altankov G, Hernandez JCR, Pradas MM, Sanchez MS. Fibronectin activity on substrates with controlled -OH density. *J Biomed Materials Res A* 2010;92A(1):322-331.
20. Dolatshahi-Pirouz A, Jensen T, Foss M, Chevallier J, Besenbacher F. Enhanced Surface Activation of Fibronectin upon Adsorption on Hydroxyapatite. *Langmuir* 2009;25(5):2971-2978.
21. Bennett JS, Berger BW, Billings PC. The structure and function of platelet integrins. *J Thromb Haemos* 2009;7:200-205.
22. Nakanishi K, Sakiyama T, Imamura K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *J Biosci Bioeng* 2001;91(3):233-244.

23. Rodriguez-Lorenzo LM, Vallet-Regi M, Ferreira JMF. Colloidal processing of hydroxyapatite. *Biomaterials* 2001;22(13):1847-1852.
24. Scherrer WN, Jenkins R. Profile fitting for Quantitative. Analysis in X-Ray Powder Diffraction. *Adv X-ray analysis* 1983;26:141.
25. Keller L. X-ray powder diffraction patterns of calcium phosphates analyzed by the Rietveld method. *J Biomed Materials Res* 1995;29(11):1403-1413.
26. Brunauer, Emmet PH, Teller E. Adsorption of gases in multimolecular layer, *J. Amer. Chem. Soc.* 1938;60:309.
27. García-Salinas MJ, Romero-Cano MS, De las Nieves FJ. Zeta potential study of a polystyrene latex with variable surface charge: Influence on the electroviscous coefficient. Volume 115; 2000. p 112-116.
28. Fowler BO. Infrared studies of apatites I: vibrational assignment for calcium, strontium and barium hydroxyapatite utilizing isotopic substitution. *Inorg. Chem.* 1974;13(1):194-207.
29. Vallet-Regi M, Rodriguez-Lorenzo LM, Salinas AJ. Synthesis and characterization of calcium deficient apatites. *Solid State Ionics* 1997;101-103:1279-1285.
30. Strehle MA, Rosch P, Petry R, Hauck A, Thull R, Kiefer W, Popp J. A Raman spectroscopic study of the adsorption of fibronectin and fibrinogen on titanium dioxide nanoparticles. *Phys Chem Chem Phys* 2004;6(22):5232-5236.
31. Jensen T, Dolatshahi-Pirouz A, Foss M, Baas J, Lovmand J, Duch M, Pedersen FS, Kassem M, Bunger C, Soballe K and others. Interaction of human mesenchymal stem cells with osteopontin coated hydroxyapatite surfaces. *Col Surf b* 2010;75(1):186-193.
32. Lee WH, Zavgorodniy AV, Loo CY, Rohanizadeh R. Synthesis and characterization of hydroxyapatite with different crystallinity: Effects on protein adsorption and release. *J Biomed Materials Res A* 2012.
33. Yin G, Liu Z, Zhan J, Ding F, Yuan N. Impacts of the surface charge property on protein adsorption on hydroxyapatite. *Chem Eng J* 2002;87(2):181-186.
34. Liou SC, Chen SY, Liu DM. Synthesis and characterization of needlelike apatitic nanocomposite with controlled aspect ratios. *BIOMATERIALS* 2003;24(22):3981-3988.

35. Liou SC, Chen SY, Liu DM. Manipulation of nanoneedle and nanosphere apatite/poly(acrylic acid) nanocomposites. *J Biomed Materials Res B* 2005;73B(1):117-122.
36. Wang LJ, Nancollas GH. Calcium Orthophosphates: Crystallization and Dissolution. *Chem Reviews* 2008;108(11):4628-4669.
37. Xu LC, Siedlecki CA. Atomic force microscopy studies of the initial interactions between fibrinogen and surfaces. *Langmuir* 2009;25(6):3675-3681.
38. Yang Q, Zhang YY, Liu ML, Zhang YQ, Yao SZ. Study of fibrinogen adsorption on hydroxyapatite and TiO₂ surfaces by electrochemical piezoelectric quartz crystal impedance and FTIR-ATR spectroscopy. *Anal Chim Acta* 2007;597(1):58-66.
39. Israelachvili J, Wennerstrom H. Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions. *Nature* 1996;379(6562):219-225.
40. Noh H, Vogler EA. Volumetric interpretation of protein adsorption: Mass and energy balance for albumin adsorption to particulate adsorbents with incrementally increasing hydrophilicity. *Biomaterials* 2006;27(34):5801-5812.
41. Xu L-C, Siedlecki CA. Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials* 2007;28(22):3273-3283.
42. Yoon RH, Flinn DH, Rabinovich YI. Hydrophobic interactions between dissimilar surfaces. *J Col Interf Sci* 1997;185(2):363-370.
43. Hall CE, Slayter HS. The fibrinogen molecule: its size, shape, and mode of polymerization. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 1959;5(1):11-16.
44. Ikoma T, Tagaya M, Hanagata N, Yoshioka T, Chakarov D, Kasemo B, Tanaka J. Protein adsorption on hydroxyapatite nanosensors with different crystal sizes studied in situ by a quartz crystal microbalance with the dissipation method. *J Am Ceram Soc* 2009;92(5):1125-1128.
45. Kandori K, Kuroda T, Wakamura M. Protein adsorption behaviors onto photocatalytic Ti(IV)-doped calcium hydroxyapatite particles. *Col Surf B* 2011;87(2):472-479.
46. Zhu XD, Zhang HJ, Li DX, Fan HS, Zhang XD. Study on the enhanced protein adsorption of microwave sintered hydroxyapatite nanoceramic particles: Role of microstructure. *J Biomed Materials Res B* 2012;100B(2):516-523.

47. Diaz LA, Torrecillas R, de Aza AH, Pena P. Effect of spinel content on slag attack resistance of high alumina refractory castables. *J Europ Ceram Soc* 2007;27(16):4623-4631.
48. Diaz LA, Torrecillas R, De Aza AH, Pena P, De Aza S. Alumina-rich refractory concretes with added spinel, periclase and dolomite: A comparative study of their microstructural evolution with temperature. *J Europ Ceram Soc* 2005;25(9):1499-1506.
49. Magallanes-Perdomo M, De Aza AH, Sobrados I, Sanz J, Pena P. Structure and properties of bioactive eutectic glasses based on the Ca-3(PO₄)(₂)-CaSiO₃-CaMg(SiO₃)(₂) system. *Acta Biomater* 2012;8(2):820-829.
50. Oyane A, Murayama M, Yamazaki A, Sogo Y, Ito A, Tsurushima H. Fibronectin-DNA-apatite composite layer for highly efficient and area-specific gene transfer. *J Biomed Materials Res A* 2010;92A(3):1038-1047.
51. Procyk R, Blomback B. Factor XIII-induced crosslinking in solutions of fibrinogen and fibronectin. *Biochim Biophys Acta* 1988;967(2):304-313.
52. Vroman L, Adams AL. Findings with the recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid/solid interfaces. *Surf Sci* 1969;16(C):438-446.

2.3.ADSORPTION AND CONFORMATIONAL MODIFICATION OF FIBRINOGEN AND FIBRONECTIN ADSORBED ON HYDROXYAPATITE

Belén Fernández-Montes Moraleda, Julio San Román, Luis M. Rodríguez-Lorenzo

2.3.1. Abstract

The first interaction of a biomaterial with the body occurs with blood proteins. Cell adhesion and activation is influenced by the conformation of the initially adsorbed layer of proteins. Some protein conformations can hide or denature the cell binding site so, biological activity highly dependent on its conformation.

In this study four different hydroxyapatites (OHAp) were used to study the interactions with two blood proteins: Fibrinogen (Fg) and Fibronectin (Fn). The apatite-protein adsorption is a complex phenomenon that involves different kind of interactions. The Quartz Crystal Microbalance with Dissipation is the technique employed to study the interaction between the proteins and the OHAp samples. From changes in the slope of the fitting correlation graph of $\Delta D/\Delta F$, the changes in the conformation of the adsorbed protein layer can be calculated. The specificities and differences of the adsorption of both proteins are shown in this paper and the interest in obtaining an “end on” or a “side on” conformation discussed. Fg adsorbs in a greater quantity than Fn for the same availability in the media... Fg trend to acquire an “end-on” conformation for large coverages whereas Fn is adsorbed in a side on conformation only for a low coverage. This conformation mode presents the RGD domains available and represents the active mode of fibronectin, both adsorbed more on.

Keywords. Protein adsorption; Hydroxyapatite; QCM-D; Fibrinogen; Fibronectin.

Resumen

La adsorción de proteínas es el primer paso en la respuesta biológica aguda a los materiales artificiales. Adsorción de proteínas seguida de catalizadores, mediadores y moderadores, seguido de cascadas de reacciones bioquímicas, que en último grado controlan la biocompatibilidad. Determinadas conformaciones de proteínas pueden esconder o desnaturalizar el sitio de unión de las células, la actividad biológica es

altamente dependiente de la conformación o estructura cuaternaria de la primera capa de proteínas adsorbidas.

En este estudio, cuatro tipos de hidroxiapatita (OHAp) fueron usados para estudiar la interacción con dos proteínas de la sangre: Fibrinógeno (Fg) y Fibronectina (Fn). La adsorción apatita-proteínas, es un fenómeno complejo, que involucra diferentes tipos de interacciones. La microbalanza de cuarzo con Disipación, es la técnica utilizada para estudiar la interacción entre las proteínas y las distintas muestras de OHAp. Los cambios obtenidos en la pendiente de la gráfica $\Delta D/\Delta F$, permiten calcular los cambios que se producen en la capa formada de proteínas adsorbidas. Las especificidades y diferencias de adsorción de ambas proteínas estudiadas se muestran en este estudio, así como los motivos de preferencia en la obtención de una determinada conformación, “end-on” o bien “side-on” son discutidos. Fg es adsorbida en mayor cantidad que Fn en soluciones con la misma concentración de moléculas en el medio. Fg tiende a adquirir una conformación “end-on” en altas concentraciones mientras que Fn tiende a adsorberse en conformación “side-on”. Esta conformación deja el dominio RGD accesible, es la conformación activa de la Fibronectina.

2.3.2. Introduction

Protein adsorption is the first step in the acute biological response to artificial materials [1]. Adsorbed proteins, then, catalyzes, mediates and moderates subsequent biochemical reactions that ultimately control biocompatibility. The interaction of proteins with biomaterials has been, therefore, a subject of an intense research for biomedical scientist for a long time [2, 3]. However, this is an elusive topic [1] and many questions remain open such as, how does proteins selectively collect at biomaterials surfaces or how to design materials for specific applications [4]. There are many parameters which determinate the adsorption and conformation of proteins. These parameters include, hydrophylicity or hydrophobicity of the material [5], presence of functional groups, surface grain/particle size, crystal size [6], protein concentration [7], molecular weight of the protein [8], isoelectrical point of the protein [9], protein structure (conformation), medium conditions, protein-protein, and biomaterial-protein interactions [10, 11]. In a recent paper, the influence of surface parameters of hydroxyapatite such as specific surface area, crystallite size and particle size on the adsorption of proteins relevant for bone regeneration has been evaluated [12]. Here, the influence of the surface parameters of hydroxyapatite on the conformation that fibrinogen and fibronectin adopt when they are adsorbed is evaluated.

The conformation defined as the three-dimensional arrangement of side groups on a molecule which can rotate freely into different positions without breaking any bonds [13, 14] determines whether the protein is bioactive or not [15]. In nature proteins adopt conformations and orientations that allow them to deliver signals. Thus, surfaces of biomaterials must be designed to control the conformation and orientation of the proteins they adsorb.

However and although some partial studies can be found in the literature [6, 9, 16-18] works that relate the amount of protein adsorbed with the conformation they adopt and as a consequence with the potential bioactivity of the adsorbed layer proteins are still scarce.

In this work, the adsorption and conformational changes of two serum proteins; Fibrinogen (Fg) and Fibronectin (Fn) adsorbed onto hydroxyapatite is studied with a Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Energy (QCM-D).

The molecular weight (MW) and isoelectric points (pI) of fibrinogen and fibronectin are very similar, (Fibrinogen: MW; 400kDa, pI; 5.6-6.1 and Fibronectin: MW; 500 kDa, pI; 5.5-5.6) [19]. Both proteins may suffer conformational changes when they are adsorbed on the surface of a material that may significantly determine the quantity adsorbed and their potential bioactivity [10].

Hydroxyapatites (OHAp) with different surface features have been selected for this study. OHAp shows a high affinity for proteins [20, 21] and the thorough understanding of the protein-surface interaction should help to understand the different response from host tissues to implanted OHAp.

There are two parameters on the protein adsorption that need to be studied: amount of adsorbed protein and conformational changes of the proteins. The Quartz Crystal Microbalance with dissipation (QCM-D) is a high sensitive and practical tool that can provide information about the adsorption-desorption process [10], the conformational changes, average thickness and viscoelastic properties of the adsorbed layer of proteins [22, 23].

The QCM-D microbalance is a mass sensing device with the ability to measure very small changes in mass on a quartz crystal resonator in real-time. The mass change results from the variation of the normalized resonant frequency (Δf) of an oscillating quartz crystal when adsorption occurs on the surface using the Sauerbrey equation [24]. The dissipation factor (ΔD) provides a measure of the energy losses in the system.

QCM measurements have been used before to study the crystal growth of OHAp in simulated body fluid or the adsorption of macromolecules on apatites sputtered films on gold showing the potential of this technique for the study on the proteins adsorption on several surfaces [15, 25].

2.3.3. Materials and methods

Hydroxyapatite (OHAp) have been prepared by reaction of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ with H_3PO_4 at pH 9.4. One set of reactions included poly acrylic acid (*aa*) in the reactant solution (OHAp-*aa*). Powders were washed, freeze dried, and calcined at 900°C for 2 hours and ball milled for 24 hours (OHAp-C and OHAp-*aa*C). A detailed description of the synthesis and characterization can be found somewhere else [12, 26], the surface characteristics of the samples studied are displayed on Table 2.3. Fibrinogen (Fg) Fraction I, type I: from Human plasma, (67% Protein, sodium citrate and sodium chloride), and Fibronectin (Fn) from Human plasma were purchased from Sigma. Protein solutions of 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were prepared in PBS Buffer at pH 7

Measurements of protein mass adsorption on the surface of hydroxyapatite, Viscoelastic properties of the formed layer and conformational changes were done with a KSV QCM-Z500 microbalance can measure the quality factor (Q), dissipation (D) and different harmonics of the quartz crystal giving additional information on the state of the layer adsorbed to the quartz crystal surface [27].

Gold sensors (QSX-301) were purchased from Q-Sense Inc. The KSV QCM-Z500 uses a Parallel Flow Measurement Chamber [28]. The hydroxyapatite powders were dispersed in Ethanol absolute (0.4g/ml), with ultrasonic stirring and a solvent casting procedure was employed to load the golden electrodes. Then, the loaded sensors are placed in the chamber and a, PBS solution was circulated. Once the frequency is stabilized the protein solutions are circulated for 150 second, then, when is stabilized, PBS solution is circulated again to wash out the proteins that have not being adsorbed on the sample, and wait until frequency is completely stabilized All the measurement was done 3 times, for each protein concentration.

The QCM-D (Z500) measurements were performed at $24.0 \pm 0.05^\circ\text{C}$ by monitoring frequency shifts (Δf , in Hz) and dissipation shifts (ΔD , 10^{-6}) at 45MHz [29] that corresponds to the 9th resonance frequency [30].

The mass change was calculated using the Sauerbrey equation [24]:

$$\Delta m = -C \times \Delta f n = 9/9 \quad [21]$$

Where C is a constant equal to $17.7 \text{ ng Hz}^{-1} \text{ cm}^{-2}$

Viscoelastic properties of the adsorbed proteins were evaluated by the time-saturated value taken from the $\Delta D / (1/fn=9/9)$ plot. Mass adsorption introduces changes on the dissipation energy of the layer that can be used to characterize structural change on it [31]. The second derivative can be used as an easier way of determining the nature of critical points (whether they are maximum points, minimum points or points of inflection).

ΔD provides quantitative and qualitative information about the physical properties of the film [32, 33]. Data analysis was carried out using the Browse Experiments program provided with the QCM-D equipment. The Δf and ΔD were simulated with the Voigt-based model [34] to characterize the adlayer. [35].

Table 2.3. Crystallite size from 002 maxima, specific surface area (SSA) and particle size (PS, d_{50}) of the apatite powders assayed

Sample code	Crystallite size (002)	SSA (m^2/g)	PS (μm)
OHAp	526	62	3.0
OHAp-aa	858	34	2.6
OHAp-c	3135	7	4.0
OHAP-aac	4290	3	3.6

2.3.4. Results

The results of the Fn adsorption experiments with the Fn100 $\mu\text{g/ml}$ solution are displayed on figure 2.10. (p1: the protein solution starts flowing through the chamber. P2: PBS solution start flowing to eliminate the non-adsorbed proteins) .The sample designated as OHAp-aa is the material that adsorbs the greater amount of protein. Also, the calcined samples adsorb less protein than their corresponding synthesized samples.

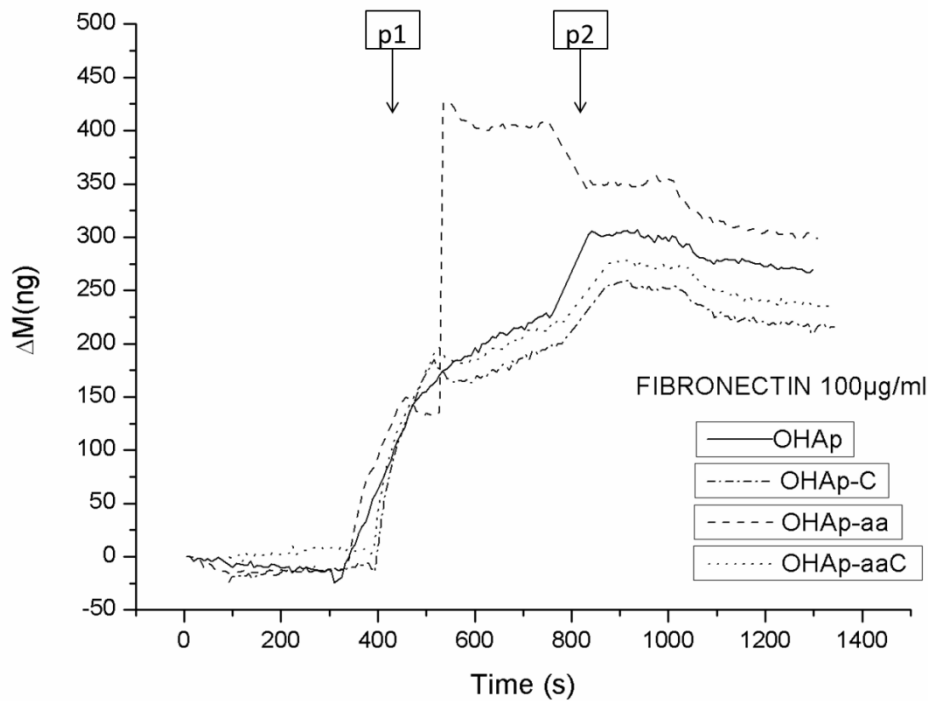


Figure 2.10. Mass shifts, ΔM , recorded against time for Fn adsorption on hydroxyapatite samples. Fibronectin solution was introduced at p1, and PBS solution at p2.

Fibrinogen and Fibronectin mass adsorption results are displayed on table 2.4. On figure 2.11, an increase in the adsorbed mass of Fg and Fn can be observed when the experiments are carried out with 200 $\mu\text{g/mL}$ solutions compared with the experiments carried out with 100 $\mu\text{g/ml}$ solutions.

Table 2.4. ΔM after soaking apatites in 100 and a 200 $\mu\text{g/ml}$ Fibrinogen and Fibronectin solutions.

SAMPLE CODE	FIBRINOGEN		FIBRONECTIN	
	$\Delta M(100)$ (ng)	$\Delta M(200)$ (ng)	$\Delta M(100)$ (ng)	$\Delta M(200)$ (ng)
OHAp	985(8)	1080(7)	245(2)	522(3)
OHAp-C	785(9)	916(8)	213(2)	430(4)
OHAp-aa	1001(7)	1146(8)	278(2)	529(4)
OHAp-aaC	908(7)	949(8)	235(1)	487(4)

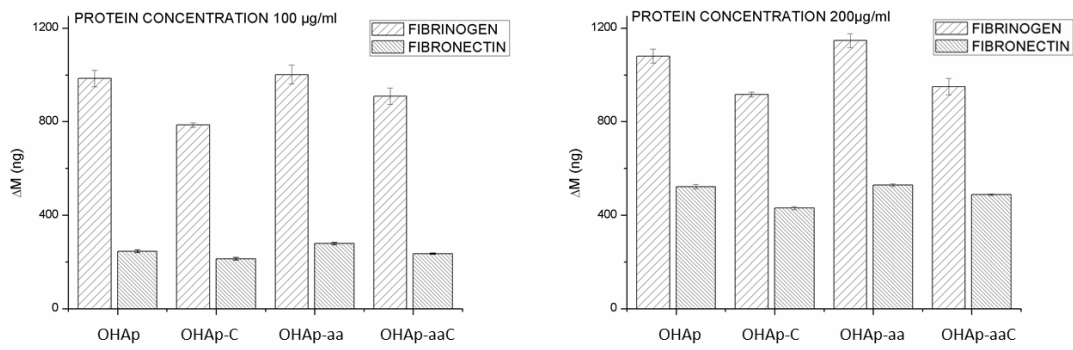


Figure 2.11. Protein concentration of 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ for fibrinogen and fibronectin with the entire sample studied.

Dissipation energy versus frequency change ($\Delta D/\Delta f$) results for the 100 $\mu\text{g/ml}$ Fg solution adsorbed on each samples is displayed on figure 2.12. A comparison of the fitting plot for all the samples tested is displayed on it. Changes in the slope of the fitting correlation graph suggest changes in the conformation of the adsorbed protein layer [36]. The critical points where the slope changes can also be found in table 2.5 together with the mass of adsorbed Fg where it can be assumed that the end on configuration start to prevail over the side on configuration. Also the dissipation energy at the end of the experiment can be found on this table.

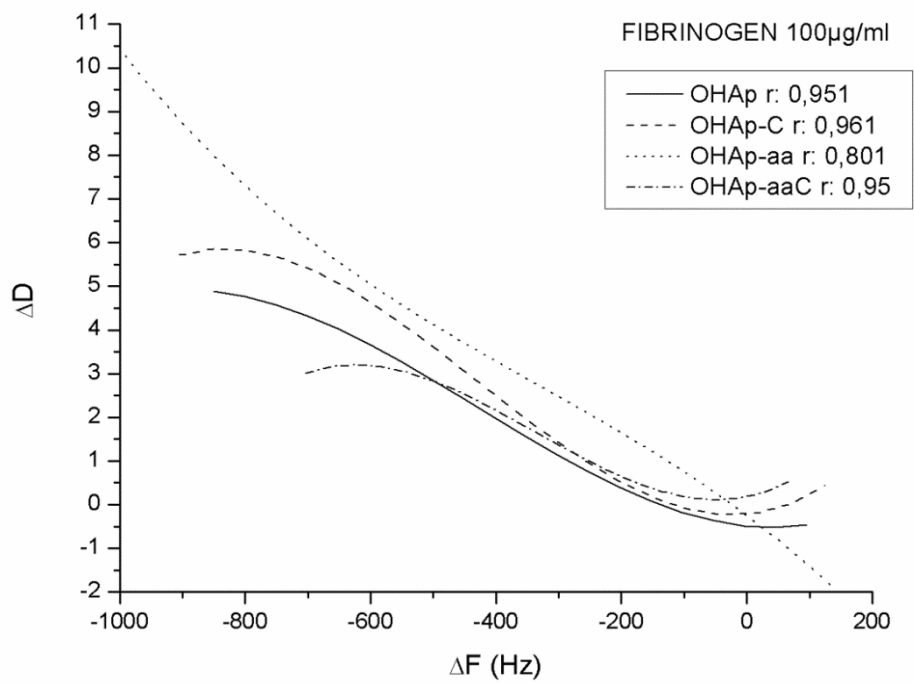


Figure 2.12. ΔD versus ΔF , for Fibrinogen solution 200 $\mu\text{g/ml}$ for the different samples studied

Table 2.5. Best fit adsorption parameters of Fg onto different apatites calculated according Voigt-based model. Frequency at the stationary point. Mass adsorbed at the critical point, ΔM_{sp} . Dissipation at the end of the experiments, ΔD , and Elastic Shear Modulus (μ_{ad}),

SAMPLE	FIBRINOGEN 100 μ g/ml				FIBRINOGEN 200 μ g/ml			
	critical point (Hz)	ΔM_{sp} (ng)	ΔD	μ_{ad} (MPa)	critical point (Hz)	ΔM (ng)	ΔD	μ_{ad} (MPa)
OHAp	-39,47	60	3,8	5			4,5	1
OHAp-C	-23,94	36	1,5	0.03			3,4	0.01
OHAp-aa	-332	505	6,9	90	-176,88	271	2,7	4
OHAp-aaC	-41,49	63	3,1	0.3			3,6	0.01

Fg acquire a “Side on” conformation in all the samples at the beginning of the experiment except for OHAP-aa where an “End on” conformation is obtained during the whole experiment. Side on and end on conformation modes will be discussed below. The change in conformation happens at relatively low values of mass adsorption and this different “history” eventually yields a layer of adsorbed proteins with different elastic properties [36]. The layer formed with no change in conformation is more elastic (greater ΔD) than those that suffer a transformation during the growing process [37].

The dissipation energy versus frequency change ($\Delta D/\Delta f$) for the 200 mg/mL Fg solution adsorption experiments is displayed on figure 2.13. For this solution a change in conformation can only be observed for the sample OHAp-aa. For the other samples an “End on” conformation is obtained for the whole experiment. The elasticity of the eventually formed layer is; however, lower than the elasticity of the layer formed for the experiments with a 100 mg/mL where no change in conformation was observed.

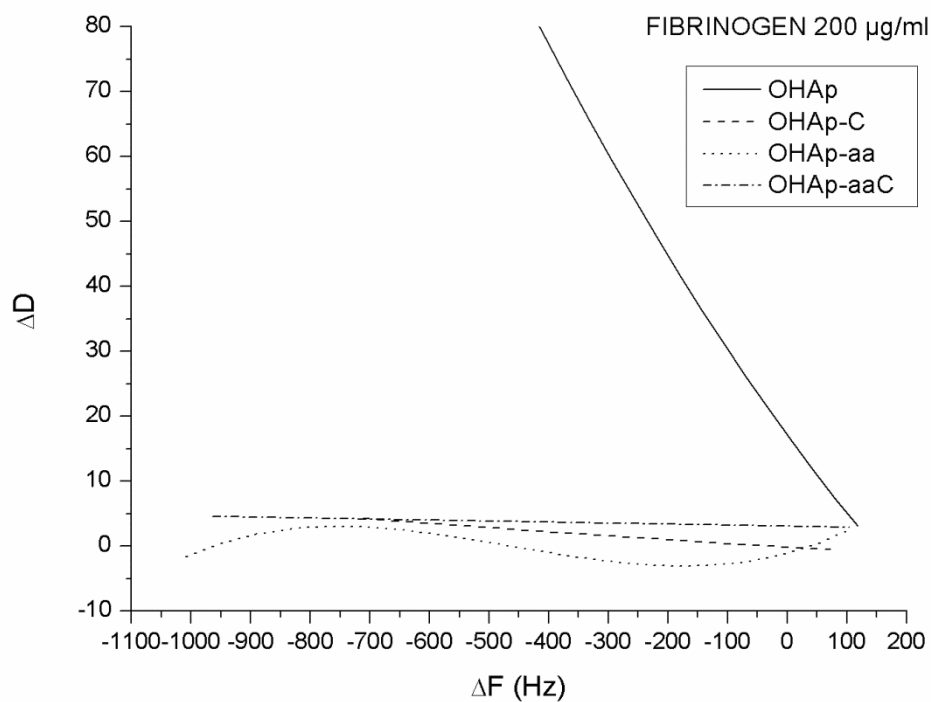


Figure 2.13. ΔD as a function of ΔF for Fn samples no calcined for the protein concentration 100 $\mu\text{g/ml}$

For the 100 $\mu\text{g/ml}$ Fn adsorption experiments results can be divided in two different patterns. A linear fit can be established for OHAp and OHAp-aa with no change of Fn conformation during the whole experiment, figure 2.14. Whereas, a change in the conformation can be observed for OHAp-C and OHAP-aaC, figure 2.15.

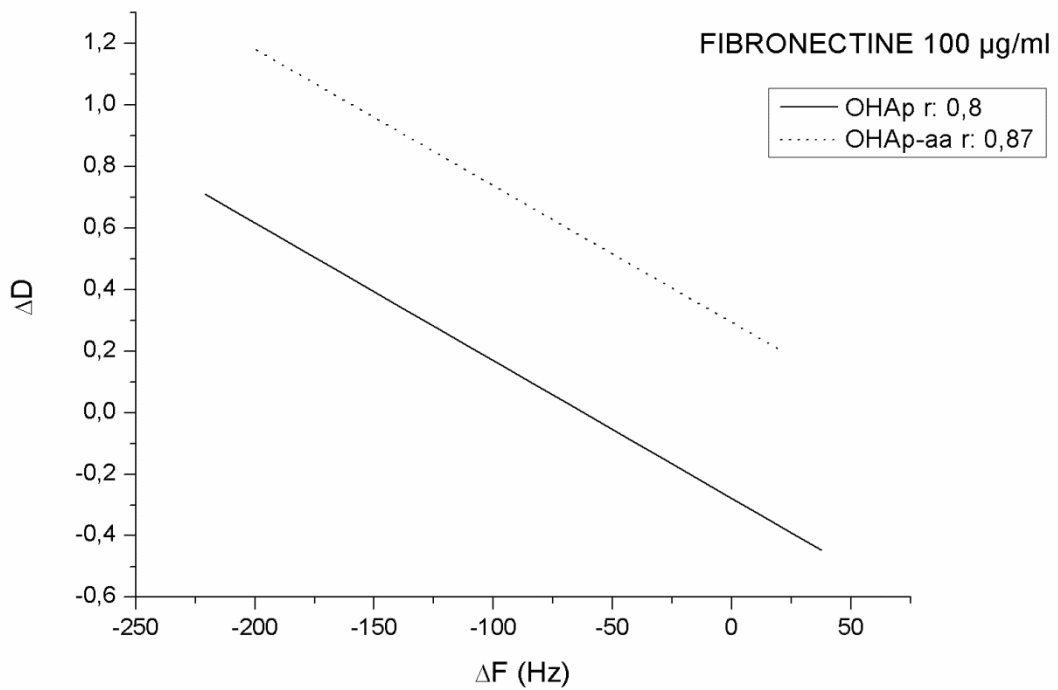


Figure 2.14. ΔD as a function of ΔF for Fn 100 $\mu\text{g/ml}$ solutions adsorbed on OHAp and OHAp-aa

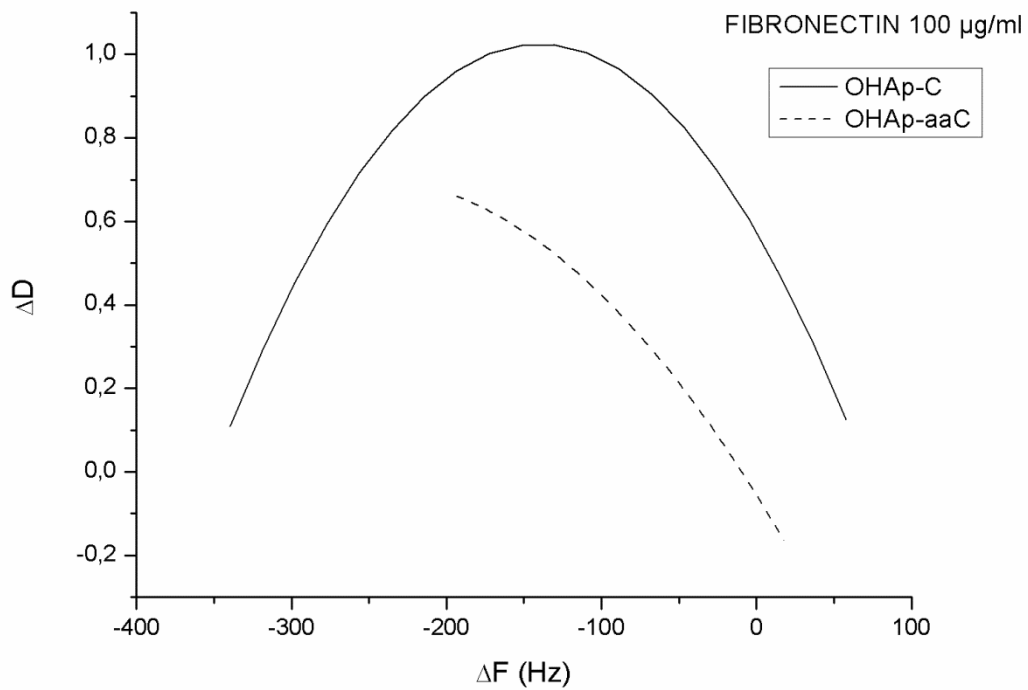


Figure 2.15. ΔD as a function of ΔF for Fn 100 $\mu\text{g/ml}$ solutions adsorbed on OHAp-C and OHAp-aaC

For the 200 $\mu\text{g/ml}$ Fn adsorption experiments, a linear fit can be obtained for each of the apatites, figure 2.16. No conformational changes are observed. The samples OHAp and OHAp-aaC have the same variation on the dissipation energy, while having different protein adsorption, (table 2.6). The sample OHAp-C has the greater dissipation energy, being the one with the less Fn adsorption.

Table 2.6. Best fit adsorption parameters of Fn onto different apatites calculated according Voigt-based model. Frequency at the critical point. Mass adsorbed at the critical point, ΔM_{cp} . Dissipation at the end of the experiments, ΔD , and Elastic Shear Modulus (μ_{ad}),

SAMPLE	FIBRONECTIN 100 μ g/ml				FIBRONECTIN 200 μ g/ml			
	critical point (Hz)	ΔM (ng)	ΔD	μ_{ad} (MPa)	critical point (Hz)	ΔM (ng)	ΔD	μ_{ad} (MPa)
OHAp			1	0.008			3,2	0.008
OHAp-C	-140	236	1	10			3	0.00038
OHAp-aa			0,4	0.10			1,9	40
OHAp-aaC	-88	135	0,5	0.05			1,9	9

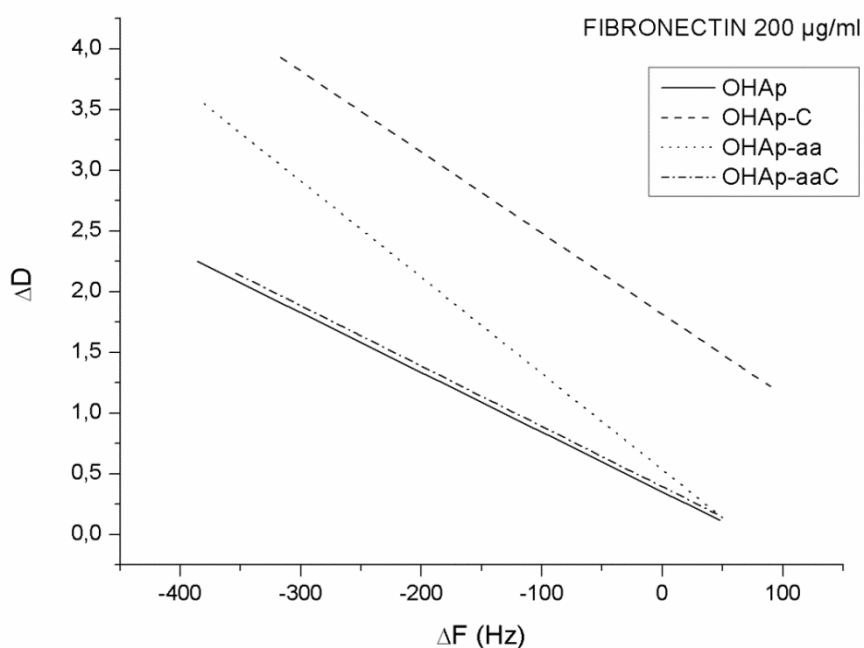


Figure 2.16. ΔD as a function of ΔF for Fn, 200 μ g/ml

2.3.5. Discussion

Protein adsorption experiments with a QCM rise the question of whether desorption of the proteins may follow. When the amount of protein adsorbed at the beginning (p1) and at the end (p2), of the experiment is compared, it is found that the mass adsorbed at p1 is always greater than the mass adsorbed at p2, Figure 2.10. The mass at time point p2 can be considered as the mass effectively adsorbed on the apatite and it corresponds to the fraction of the protein that forms a stable link to the material [38]. The most likely mode of interaction between Fn, Fg and apatites is through the positively charged calcium ions of the apatite crystals [9] and the negatively charged domains of the proteins, since, at the pH of the experiment, both Fn and Fb are [25] are negatively charged. However, the apatite-protein adsorption is a complex phenomenon that involves different kind of interactions: protein-PBS, protein-protein, material-PBS and the target one: protein-material [1, 39]. The prevalence of one or the other determines whether the protein is effectively adsorbed or not. But, from the parameters obtained with the QCM, ΔF and ΔD : frequency and dissipation energy, it is possible to determine not only which interaction prevails but also, information on the interactions mentioned above and on the elastic properties of the layer of proteins that grows. ΔM calculated with the Sauerbrey equation is related with the prevalence of the union protein-material over protein-PBS protein-protein and material-PBS [40]. While the variations on the dissipation energy are related with changes on the conformation of the adsorbed layer and with repulsion forces between proteins [41]

Fg and Fn are both fibroid proteins capable of acquiring two different conformations when they are adsorbed onto the surface of hydroxyapatite, “side-on” and “end-on [36, 42] “Side-on”, involves a parallel conformation of the fibrillar protein to the surface. The long axis of the protein is found parallel to the surface with the negatively charged D and E domains attached to the positively charged Ca ions of the apatite [12, 26] On “End-on” conformation, proteins acquire a perpendicular orientation on the surface with only one of the domains attached. In reality there will be many orientations with angles relative to the surface intermediate between 0 and 90°. The variation on the slope on the ΔD versus ΔF can be assumed to be where the end on configuration start to prevail over the side on configuration

The variation on the dissipation energy obtained, indicate changes on the elasticity of the adsorbed layer consequence of a change of conformation of the proteins. Adsorption

behavior is represented with ΔD - Δf plots [20]. The change in the slope of the $\Delta D/\Delta f$ graph allows to calculate the adsorbed mass at which repulsion between molecules dominate originating the change in conformation. When proteins are in an “end-on” conformation, the dissipation energy trend to increase, whereas in the side-on conformation the dissipation energy trend to decrease, due to the more rigid nature of the formed layer. As a consequence layers formed with no change in conformation are more elastic (greater ΔD) than those that suffer a transformation during the growing process. This is observed for OHAp-aa when the layer is formed with a 100 μ g/ml Fg solution, Figure 2.12 and table 2.4. However OHAp-aa adsorption curve presents an stationary point that has to be related with protein- protein interactions [1, 11, 43]. For the 200 μ g/ml Fg solution, a change on the conformation can only be observed for the sample OHAp-aa at the point -176Hz it has to be attributed to repulsion between proteins. However, the variation of the dissipation energy is low (Figure 2.13), because of the high quantity of proteins adsorbed on the sample surface that forms a very rigid layer as it can be observed in table 2.5.

When the results from both concentration experiments are compared; an increase on ΔD with the increase in the protein concentration can be observed (table 2.5). Indicating the formation of a more rigid protein monolayer. The exception is OHAp-aa. For this sample, the conformation change is not accompanied by an increase of the dissipation energy. The explanation is related with the possibility of attachment of more Fg molecules when the already adsorbed molecules changes into an end-on conformation. That changes leave a gap on the surface where more Fg molecules can be adsorbed.

For OHAp, the slope of the dissipation energy is significantly different to the others. (Figure 2.13). The reason can be the greeter SSA that allow the Fg to form a monolayer with no repulsion between molecules, thus, the dissipation energy is greater. For the sample OHAp-C there is no a conformation change, but because of the small SSA of this sample, the variation on the dissipation is very small, which indicates that the adsorbed layer on the surface is very rigid., There is interaction between molecules, and a high adsorption yields a very low dissipation energy.

For the Fibronectin adsorption experiments, there is also an increase on dissipation energy for all samples for greater protein concentration as it can be seen on Table 2.6

[44]. For the adsorption tests made with a 100 μ g/ml solution, the results can be splitted in two different patterns. For non calcined samples, a greater protein adsorption, ΔM , and a linear relationship for ΔD can be established, Figure 2.14. However, for calcined samples, there is a change on the dissipation energy, from high dissipation to low, that means, that proteins first attach in a side on conformation followed by a reorganization due to to obtain a conformation with less dissipation energy Figure 2.15. [45].

For the 200 μ g/ml concentration solution, (figure 2.16) the samples OHAp and OHAp.aaC have the same variation on the dissipation energy, instead of having different protein adsorption. It can be attributed to the different surface features of the apatite and capacity of binding proteins that is further the subject of the current paper. Since, they also have different adsorption globally, the viscoelastic behaviour of the adlayer of proteins is the same for both cases. The sample OHAp-C combines the greater dissipation energy with the less quantity of protein adsorbed. The result is that the protein molecules on the surface have a greater mobility than the molecules attached to the other samples; because they do not suffer from protein-protein repulsion.

Mass adsorption (ΔM) is greater for the Fg than for the Fn. However, according to the Vroman effect [46], the order of the exchange adsorption is related to different parameters, including the molecular weight of the proteins. In the studied conditions, Fn will replace Fg on the surface of the material, once implanted on the body. The analysis of the interaction (ΔD) and the resulting conformation of the adlayer is significantly more important. From the dissipation results, Fg is adsorbed on the materials with an “end-on” conformation and also Fn with an “end-on” conformation. Fn is active when the N-terminal is accessible. That occurs the best in the side-on conformation, but with space between molecules, with end-on conformation, cells can attack to them. Fg, has the active domain in E and D domains which are not accessible in the “end-on” conformation [47]. Where the D domain of fibrinogen is accessible, macrophages will attack them since the Mac-1 receptor pathway would be activated, which is a pro-inflammatory receptor [48]. Thus, Fibrinogen adsorbed in a large quantity acquires a “side-on” conformation that may trigger an immunological reaction. The integrin molecule which mediates platelet adhesion for Fg and Fn is the same (Integrin α I**IIb** β 3) [49]. This indicates that although of not having the same tertiary structure both proteins have a similar active conformation. This analysis suggest that whether these materials are implanted in a host tissue, the attachment of Fg would not

promote the formation of fibrin while Fn, with the RGD domains accessible, would be active for the activation of cells and regeneration of the tissue [50, 51].

As a summary, our results indicate, that though both proteins can be attached to different kinds of hydroxyapatite materials, Fg in a greater amount than Fn, the active conformation only occurs for Fn for low coverage, end-on conformation. [42].

Biomaterials should be specific for each intended cell/tissue interaction and their success can largely depend on the early protein material interaction. Thus, the design of materials for selectively stimulating cell activation without promoting inflammation or other adverse effect should consider how these materials are going to adsorb the appropriate protein layer.

2.3.6. Conclusions

An increase in the Fg and Fn adsorption can be correlated with an increase in the availability of proteins in solution. For the same availability, Fg adsorbs in a greater quantity than Fn. It is also possible to control the conformation mode of attachment of Fg and Fn. Fn will be adsorbed in a bioactive mode with the RGD domains available. QCM-D is a useful tool to characterize the viscoelastic properties of fibrillar proteins adsorbed on materials.

2.3.7. References.

1. Vogler, E.A., *Protein adsorption in three dimensions*. Biomaterials, 2011. **33**(5): p. 1201-1237.
2. Zhanga, S., et al., *Biological surface engineering: A simple system for cell pattern formation*. Biomaterials, 1999. **20**(13): p. 1213-1220.
3. Zhuo, R., C.A. Siedlecki, and E.A. Vogler, *Autoactivation of blood factor XII at hydrophilic and hydrophobic surfaces*. Biomaterials, 2006. **27**(24): p. 4325-4332.
4. Truong, M.Y., et al., *A pH-responsive interface derived from resilin-mimetic protein Recl-resilin*. Biomaterials, 2010. **31**(15): p. 4434-4446.
5. Clare, T.L., et al., *Functional monolayers for improved resistance to protein adsorption: Oligo(ethylene glycol)-modified silicon and diamond surfaces*. Langmuir, 2005. **21**(14): p. 6344-6355.
6. Ribeiro, N., S.R. Sousa, and F.J. Monteiro, *Influence of crystallite size of nanophased hydroxyapatite on fibronectin and osteonectin adsorption and on MC3T3-E1 osteoblast adhesion and morphology*. Journal of Colloid and Interface Science, 2010. **351**(2): p. 398-406.
7. Oyane, A., H. Tsurushima, and A. Ito, *Highly efficient gene transfer system using a laminin-DNA-apatite composite layer*. Journal of Gene Medicine, 2010. **12**(2): p. 194-206.
8. Krishnan, A., C.A. Siedlecki, and E.A. Vogler, *Mixology of protein solutions and the Vroman effect*. Langmuir, 2004. **20**(12): p. 5071-5078.
9. Oyane, A., et al., *Enhanced immobilization of acidic proteins in the apatite layer via electrostatic interactions in a supersaturated calcium phosphate solution*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(7): p. 2969-2976.
10. Nakanishi, K., T. Sakiyama, and K. Imamura, *On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001. **91**(3): p. 233-244.
11. Piazza, R., *Protein interactions and association: An open challenge for colloid science*. Current Opinion in Colloid and Interface Science, 2004. **8**(6): p. 515-522.
12. B.Fernandez-Montes-Moraleda, J.S. Roman, and L.M.Rodriguez-Lorenzo, *Influence of surface features of hydroxyapatite on the adsorption of proteins relevant to bone regeneration*. Journal of biomedical materials research. Part A 2012.
13. Zhou, C., et al., *Human immunoglobulin adsorption investigated by means of quartz crystal microbalance dissipation, atomic force microscopy, surface acoustic wave, and surface plasmon resonance techniques*. Langmuir, 2004. **20**(14): p. 5870-8.
14. Roach, P., D. Farrar, and C.C. Perry, *Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(22): p. 8168-73.

15. Iafisco, M., et al., *Adsorption and conformational change of myoglobin on biomimetic hydroxyapatite nanocrystals functionalized with alendronate*. Langmuir, 2008. **24**(9): p. 4924-4930.
16. Hook, F.F., et al., *A comparative study of protein adsorption on titanium oxide surfaces using in situ ellipsometry, optical waveguide lightmode spectroscopy, and quartz crystal microbalance/dissipation*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2002. **24**(2): p. 155-170.
17. Giambianco, N., et al., *Fibronectin conformation switch induced by coadsorption with human serum albumin*. Langmuir, 2010. **27**(1): p. 312-319.
18. Chittur, K.K., *FTIR/ATR for protein adsorption to biomaterial surfaces*. Biomaterials, 1998. **19**(4-5): p. 357-369.
19. Brown, J.H., et al., *The crystal structure of modified bovine fibrinogen*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(1): p. 85-90.
20. Iafisco, M., et al., *Conformational modifications of serum albumins adsorbed on different kinds of biomimetic hydroxyapatite nanocrystals*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010. **81**(1): p. 274-284.
21. Sauerbrey, G., *Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung*. Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei, 1959. **155**(2): p. 206-222.
22. Martins, G.V., et al., *Crosslink Effect and Albumin Adsorption onto Chitosan/Alginate Multilayered Systems: An in situ QCM-D Study*. Macromolecular Bioscience, 2010. **10**(12): p. 1444-1455.
23. Jung, H., et al., *Change of viscoelastic property and morphology of fibrin affected by antithrombin III and heparin: QCM-Z and AFM study*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2009. **68**(1): p. 111-119.
24. Lucklum, R. and P. Hauptmann, *Quartz crystal microbalance: mass sensitivity, viscoelasticity and acoustic amplification*. Sensors and Actuators, B: Chemical, 2000. **70**(1-3): p. 30-36.
25. Pei, J., H. Hall, and N.D. Spencer, *The role of plasma proteins in cell adhesion to PEG surface-density-gradient-modified titanium oxide*. Biomaterials, 2011. **32**(34): p. 8968-8978.
26. B. Fernández-Montes Moraleda, J.S.R., L. M. Rodríguez-Lorenzo, *Influence of surface features of hydroxyapatite on the adsorption of proteins relevant to bone regeneration*. Book of abstracts 24th European Conference on Biomaterials 2011.
27. Hook, F., et al., *Variations in coupled water, viscoelastic properties, and film thickness of a Mefp-1 protein film during adsorption and cross-linking: A quartz crystal*

- microbalance with dissipation monitoring, ellipsometry, and surface plasmon resonance study*. Analytical Chemistry, 2001. **73**(24): p. 5796-5804.
28. Tagaya, M., et al., *Effect of interfacial proteins on osteoblast-like cell adhesion to hydroxyapatite nanocrystals*. Langmuir, 2011. **27**(12): p. 7645-7653.
 29. Voinova, M.V., et al., *Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces: Continuum mechanics approach*. Physica Scripta, 1999. **59**(5): p. 391-396.
 30. Dutta, A.K. and G. Belfort, *Adsorbed gels versus brushes: Viscoelastic differences*. Langmuir, 2007. **23**(6): p. 3088-3094.
 31. Cernosek, R.W., et al., *Comparison of lumped-element and transmission-line models for thickness-shear-mode quartz resonator sensors*. IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, 1998. **45**(5): p. 1399-1407.
 32. Moseke, C. and A. Ewald, *Cell and protein adsorption studies using quartz crystal microgravimetry with dissipation monitoring*. Materialwissenschaft und Werkstofftechnik, 2009. **40**(1-2): p. 36-42.
 33. Bandey, H.L., *Modeling the responses of thickness-shear mode resonators under various loading conditions*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(11): p. 2205-2214.
 34. Rossikhin, Y.A. and M.V. Shitikova, *New method for solving dynamic problems of fractional derivative viscoelasticity*. International Journal of Engineering Science, 2001. **39**(2): p. 149-176.
 35. Serro, A.P., et al., *Bovine serum albumin conformational changes upon adsorption on titania and on hydroxyapatite and their relation with biomineralization*. Journal of biomedical materials research. Part A, 2004. **70 A**(3): p. 420-427.
 36. Ikoma, T., et al., *Protein adsorption on hydroxyapatite nanosensors with different crystal sizes studied in situ by a quartz crystal microbalance with the dissipation method*. Journal of the American Ceramic Society, 2009. **92**(5): p. 1125-1128.
 37. Rodahl, M. and B. Kasemo, *Frequency and dissipation-factor responses to localized liquid deposits on a QCM electrode*. Sensors and Actuators, B: Chemical, 1996. **37**(1-2): p. 111-116.
 38. Dixit, N., K.M. Maloney, and D.S. Kalonia, *Application of quartz crystal microbalance to study the impact of pH and ionic strength on protein-silicone oil interactions*. International Journal of Pharmaceutics, 2011. **412**(1-2): p. 20-27.
 39. Doostmohammadi, A., et al., *Bioactive glass nanoparticles with negative zeta potential*. Ceramics International, 2011. **37**(7): p. 2311-2316.
 40. Hall, C.E. and H.S. Slayter, *The fibrinogen molecule: its size, shape, and mode of polymerization*. The Journal of biophysical and biochemical cytology, 1959. **5**(1): p. 11-16.

41. Lord, M.S., M. Foss, and F. Besenbacher, *Influence of nanoscale surface topography on protein adsorption and cellular response*. Nano Today, 2010. **5**(1): p. 66-78.
42. Monkawa, A., et al., *Fabrication of hydroxyapatite ultra-thin layer on gold surface and its application for quartz crystal microbalance technique*. Biomaterials, 2006. **27**(33): p. 5748-5754.
43. Ianeselli, L., et al., *Protein-protein interactions in ovalbumin solutions studied by small-angle scattering: Effect of ionic strength and the chemical nature of cations*. Journal of Physical Chemistry B, 2010. **114**(11): p. 3776-3783.
44. Cheng, S.S., et al., *The Conformation of Fibronectin on Self-Assembled Monolayers with Different Surface Composition: An FTIR/ATR Study*. Journal of Colloid and Interface Science, 1994. **162**(1): p. 135-143.
45. Tagaya, M., et al., *Competitive adsorption of fibronectin and albumin on hydroxyapatite nanocrystals*. Science and Technology of Advanced Materials, 2011. **12**(3).
46. Vroman, L. and A.L. Adams, *Findings with the recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid/solid interfaces*. Surface Science, 1969. **16**(C): p. 438-446.
47. Xu, L.C. and C.A. Siedlecki, *Atomic force microscopy studies of the initial interactions between fibrinogen and surfaces*. Langmuir, 2009. **25**(6): p. 3675-3681.
48. Deng, Z.J., et al., *Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation*. Nature Nanotechnology, 2011. **6**(1): p. 39-44.
49. Bennett, J.S., B.W. Berger, and P.C. Billings, *The structure and function of platelet integrins*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2009. **7**(SUPPL. 1): p. 200-205.
50. Lord, M.S., et al., *The effect of silica nanoparticulate coatings on serum protein adsorption and cellular response*. Biomaterials, 2006. **27**(28): p. 4856-4862.
51. Sivaraman, B. and R.A. Latour, *Delineating the roles of the GPIIb/IIIa and GP-Ib-IX-V platelet receptors in mediating platelet adhesion to adsorbed fibrinogen and albumin*. Biomaterials, 2011. **32**(23): p. 5365-5370.

2.4. TAILORED ADSORPTION OF ALBUMIN AND COLLAGEN ON HYDROXYAPATITE; STUDY OF THE INFLUENCE OF SURFACE PARAMETERS.

Belén Fernández-Montes Moraleda, Julio San Román, Luís M. Rodríguez-Lorenzo

2.4.1. Abstract

Protein adsorption is the first step in the acute biological response to artificial materials. Adsorbed proteins, then, catalyzes, mediates and moderates subsequent biochemical reactions that ultimately control biocompatibility. The main goal of this paper is to investigate the surface parameters that control the amount of collagen and albumin that is adsorbed on hydroxyapatite. Two hydroxyapatite powders, synthesized by a wet chemical route, named OHAp and OHAp-aa, and two calcined powders OHAp-C and OHAp-aaC are studied. Proteins used are Albumin from Human Serum (HSA) and Purified Type I Collagen (Coll) from Bovine origin. UV/Vis spectroscopy and Quartz Crystal Microbalance with Dissipation (QCM-D) were used for the quantification of the adsorption and the evaluation of the viscoelastic properties of the adsorbed protein layers. HSA and Coll solutions were prepared in PBS Buffer at 100, 200 and 500 $\mu\text{g/mL}$ for the UV/Vis experiments and 100 and 200 $\mu\text{g/mL}$ for the QCM-D experiments. The QCM-D measurements were performed at 24.0 ± 0.05 °C by monitoring frequency shifts (Δf , in Hz) and dissipation shifts (ΔD , 10^{-6}) at 45MHz that corresponds to the 9th resonance frequency. The same adsorption trend is obtained for UV/Vis spectroscopy and QCM-D; OHAp-aa > OHAp > OHAp-aaC > OHAp-C. At low concentrations specific surface area, crystal size and particle size of the hydroxyapatite allow to control the amount of HSA that is adsorbed. The thickness of the adlayer calculated for the different albumin concentration is compatible only with the formation of a monolayer. Collagen adsorption can be controlled at the physiological concentration by designing the features of the material to be implanted.

Keywords. Hydroxyapatite, albumin adsorption, collagen adsorption, QCM-D, UV/Vis-spectroscopy.

Resumen

Adsorción de proteínas es el primer proceso que tiene lugar cuando un material entra en contacto con el medio biológico. Dicha adsorción va a determinar los siguientes

procesos, siendo el la biocompatibilidad el último proceso bioquímico. El objetivo principal de este trabajo es determinar las características superficiales que determinan la cantidad de colágeno y albumina adsorbidas sobre la hidroxiapatita. Dos tipos de hidroxiapatitas fueron sintetizadas por la vía de precipitación, nombradas OHAp y OHAp-aa, calcinadas y obtenidas dos tipos mas, OHAp-C y OHAp-aaC. Las proteínas utilizadas fueron Albumina, de plasma Humano (HSA) y Colágeno Tipo I purificado de origen Bovino (Coll). Las técnicas de espectroscopia UV /VIS y microbalanza de cuarzo con disipación (QCM-D) fueron utilizadas para cuantificar la cantidad de proteínas adsorbida y evaluar las propiedades viscoelásticas de la capa de proteínas que se forma. Las soluciones de HSA y Coll, fueron preparadas en tampón PBS de 100, 200 y 500 µg/ml para las medidas UV/Vis y de 100 y 200µg/ml para QCM-D. La misma tendencia de adsorción se obtiene en ambas técnicas utilizadas: OHAp-aa > OHAp > OHAp-aaC >OHAp-C. A menores concentraciones, la superficie específica, el tamaño de cristal y tamaño de partícula permiten un determinado control de la cantidad de HSA que es adsorbida. El grosos de la capa formada calculada para las distintas concentraciones de albumina, solo puede explicarse con la formación de una monocapa de proteínas adsorbidas. La adsorción de colágeno, puede ser controlada con la concentración fisiológica y diseñando el material implado.

2.4.2. Introduction.

Biocompatibility is the ability of any material, which is going to be in contact with the body, to carry out its task without producing any undesired reaction [1-2]. Protein adsorption is the first step in the acute biological response to artificial materials. Adsorbed proteins, then, catalyzes, mediates and moderates subsequent biochemical reactions that ultimately control biocompatibility. [3-4]. When any material is implanted on a hosting tissue, a layer of proteins is first adsorbed, then, this “adlayer” will interact with the integrin of the cell membrane [5]. Whether the appropriate composition and protein distribution of this adlayer is obtained, it may determine the fate of the implant/device [6]. A way of accelerating the healing process may be the seeding of the artificial material with an adequate layer of proteins. However, a vast amount of literature generated in recent years on the topic of protein adhesion to materials has yield a “striking” lack of consensus so extreme that no general conclusions can be extracted on the subject of material design parameters that favors protein adhesion [7-10].

The factors which are going to determinate protein adsorption include, hydrophylicity or hydrophobicity of the material [11], presence of functional groups, surface grain/particle size, crystal size [12], protein concentration [13] molecular weight of the protein [14], isoelectric point of the protein [15] protein structure (conformation), medium conditions, protein-protein, and biomaterial-protein interaction [16-17]. The design of materials for bone regeneration requires a better understanding of the adsorption of blood proteins to those materials. The simultaneous study of several proteins adsorption over different materials may result in a myriad of data complicated to evaluate [15]. Thus, our approach has consisted in the comparison of the adsorption of individual proteins over hydroxyapatite with different surface parameters. Hydroxyapatite is a bioactive ceramic frequently used for bone engineering due to its biocompatibility and mechanical strength [18]. Spindle or plate-shaped crystals of hydroxyapatite are found on the collagen fibers and within or between them in the bone matrix [19]. They tend to be oriented in the same direction as the collagen fibers [20]. In bone regeneration, Osteoblasts are osteogenic cells associated with bone formation by producing osteoid and mineralization of the osteoid matrix [21]. Hydroxyapatite is considered effective as a cell culture substrate and osteoblasts show enhanced maturation and functional activity in the presence of hydroxyapatite

Two relevant proteins for bone regeneration that are present in the blood serum, Albumin and Collagen, have been studied. Serum albumin is the most abundant protein in blood plasma. Although, Albumin does not have a direct function in bone regeneration, it has a function on the deposition of calcium i.e. mineralization in the osteoid matrix. Also, platelet adhesion to a material is suppressed by prior adsorption of albumin [22]. And Albumin adsorption to a material is known to improve blood compatibility of the material. Albumin has an asymmetric heart-like structure in which three domains are divided into six unit subunit domains and the dissociated carboxyl and imidazole groups; these groups strongly interact with the positively charged calcium ions of the Hydroxyapatite surface [23]. The size of the molecules is and $3 \times 8.2 \times 8.5 \text{ nm}^3$ [24]. And there is only a “side-on” adsorption model/conformation [10].

Type I Collagen is an extracellular matrix protein. The presence of collagen on the surface of a biomaterial will produce the attraction of bone-progenitors cells that will attach to the biomaterial and start bone regeneration [21]. The molecule is a semiflexible helix formed by three polypeptide chains (molar mass around 300Kg/ml, length around 300 nm, diameter around 1.5nm) [25]. Collagen has the property to assemble and form fibrils. Type I collagen comprises approximately 95% of the entire collagen content of bone and about 80% of the total proteins present in bone [26].

The main goal of this paper is to investigate the surface parameters that control the amount of collagen and albumin that is adsorbed on hydroxyapatite. Two different techniques have been used for the study: UV/Vis spectroscopy and Quartz Crystal Microbalance with dissipation (QCM-D). UV/Vis spectroscopy gives information about the quantity of protein adsorbed on the surface of the samples, whereas with the QCM-D the viscoelastic properties of the adlayer can be evaluated.

2.4.3. Experimental Methods.

Hydroxyapatite (OHAp) have been prepared by reaction of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ with H_3PO_4 at pH 9.4. One set of reactions included poly acrylic acid (*aa*) in the reactant solution (OHAp-*aa*). Powders were washed, freeze dried, and calcined at 900°C for 2 hours and ball milled for 24 hours (OHAp-C and OHAp-*aa*C) A detailed description of the synthesis and characterization can be found somewhere else [27].Albumin from Human Serum (HSA) was purchased from Sigma. Purified Type I Collagen (Col) from Bovine origin was purchased from Symatase biomateriaux.

X-ray diffraction (XRD) patterns were recorded with a Bruker D8 Advance set up with a Cu K radiation between 2α 10-60 ° with a step size of 0.024° and 0.2 s per step. Crystal size has been determined by using the Scherrer equation[28]. Specific surface area of the powders was calculated from a N_2 isotherm using the BET method [29] with a MS-13, Quantachrome Autosorb, USA. Particle size distribution was determined by laser scattering using a Coulter LS320 (Beckman). Approximately 10 mg of the particles were thoroughly dispersed in water. Particle size distribution was determined by laser scattering using a Coulter LS320 (Beckman). Approximately 10 mg of the particles were thoroughly dispersed in water.

Protein binding was studied with a UV/Vis Spectrometer Lambda 16. The solutions used were prepared by mixing 10 mg of the samples with 1.5 mL of the different proteins dissolved in PBS Buffer at pH 7 at different concentrations (0.1, 0.2, 0.5 mg/mL) in a 2 mL conical polyethylene Eppendorf tube. The mixture was maintained in a bascule bath at 37 °C for 24 h. The supernatant solution was assayed for protein content by UV spectroscopy, using a different λ for each protein, Collagen (211 nm) and Albumin (278 nm). The amount of adsorbed protein was calculated from the difference between the concentrations of the initial solution and the supernatant. All the measurements were done in a triplicate form.

The KSV QCM-Z500 microbalance was used to measure protein adsorption and viscoelastic properties of the adsorbed proteins. Mass adsorption introduces changes on the dissipation energy of the layer that can be used to calculate the thickness of the adlayer formed [30]. Gold sensors (QSX-301) were purchased from Q-Sense Inc

The KSV QCM-Z500 uses a Parallel Flow Measurement Chamber [31] and provides with the quality factor (Q), the dissipation energy (D) and different harmonics of the quartz crystal resonator, giving additional information on the state of the layer adsorbed to the quartz crystal surface [32]. The samples were dispersed in Ethanol absolute

(0.4g/ml) with ultrasonic stirring. A solvent casting procedure was employed to load the golden electrodes. Then, the loaded sensors are placed in the chamber and a PBS solution was circulated. Once the frequency is stabilized the protein solutions are circulated for 150 second, and the PBS solution is circulated again to wash out the proteins that have not being adsorbed on the sample and wait until frequency is completely stabilized All the measurement were triplicated for each protein concentration and apatite sample. HSA solutions were prepared in PBS Buffer, pH 7 at 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. For the collagen solution, the pH was adjusted to 7.2 by adding appropriate amounts of 1.5 M NaCl, 0.1M Na_2HPO_4 and 0.1m NaOH.

The QCM-D (Z500) measurement was performed at 24.0 ± 0.05 °C by monitoring frequency shifts (Δf , in Hz) and dissipation shifts (ΔD , 10^{-6}) at 45MHz [33]. Data analysis was carried out using the Browse Experiments program provided with the QCM-D equipment.

Time-depend change in the frequency was recorded continuously by a frequency counter and stored in a microcomputer during the adsorption process [20]. The data recorder were used to calculate the mass adsorbed on the surface of the apatites (ΔM) using the Sauebrey model. The Δf and ΔD were simulated with the Voigt-based model [34] to calculate the thickness of the adlayers [35]. The 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ solutions cannot be studied because of the overloading of the gold electrodes.

2.4.4. Results.

A full description of the apatite powder synthesized can be found somewhere else [36-37]. However, it is necessary to highlight here that XRD patterns reveal an apatite structure with broadened maxima. No additional phases could be detected other than apatite as it can be observed on fig 2.17a. XRD patterns of the calcined powders are characteristic of well crystallized hydroxyapatite. The presence of secondary phases could not be detected, fig 2.17b. Crystal sizes (CS) from [0 0 2] maxima have been calculated with the Scherrer equation. Results are displayed on Table 2.7. Specific surface areas (SSA) and particle size (PS) of the powders are also collected on table 2.7.

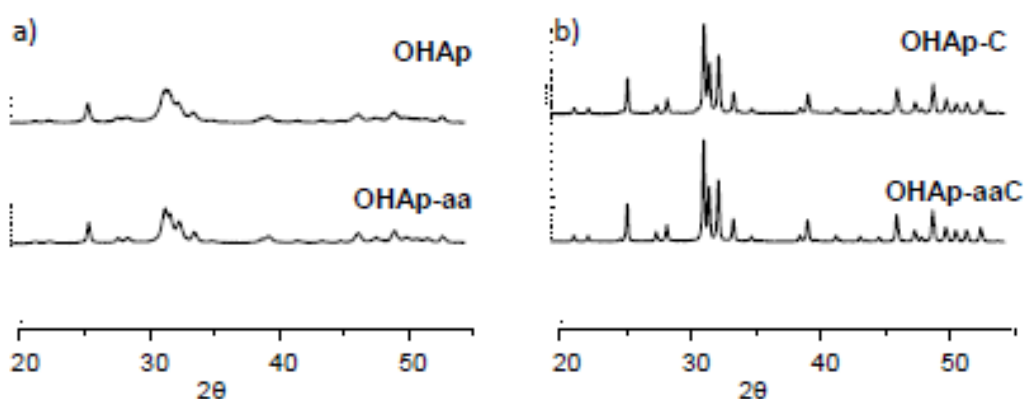


Figure 2.17. XRD patterns of apatites. a) Synthesized samples b) Calcined samples

Table 2.7. Crystal size, CS, specific surface area, SSA, and particle size, PS of the hydroxyapatite samples.

Sample code	CS (002)	SSA (m ² /g)	PS
OHAp	526	62	4,034
OHAp-c	3135	7	2,619
OHAp-aa	858	34	4,007
OHAP-aac	4290	3	6,362

The proteins adsorption results obtained with the UV/Vis spectrometer are collected on table 2.8. Albumin and collagen adsorption versus protein content in solution are displayed on figure 2.18. A similar behaviour can be observed for both, albumin and collagen. In both cases, an increase in the amount of absorbed protein can be correlated with a greater availability in the medium. The behavior is similar for all the samples and a global linear fit can be drawn with a r coefficient of: 0.9852 for albumin and r : 0.999 for collagen. Percentage of adsorption versus protein availability is also displayed on table 2.8. A different percentage of absorption is observed depending on the availability in solution. These differences have to be related with the protein-protein interactions or the influence of the materials properties on their ability to absorb proteins as it will be discussed later.

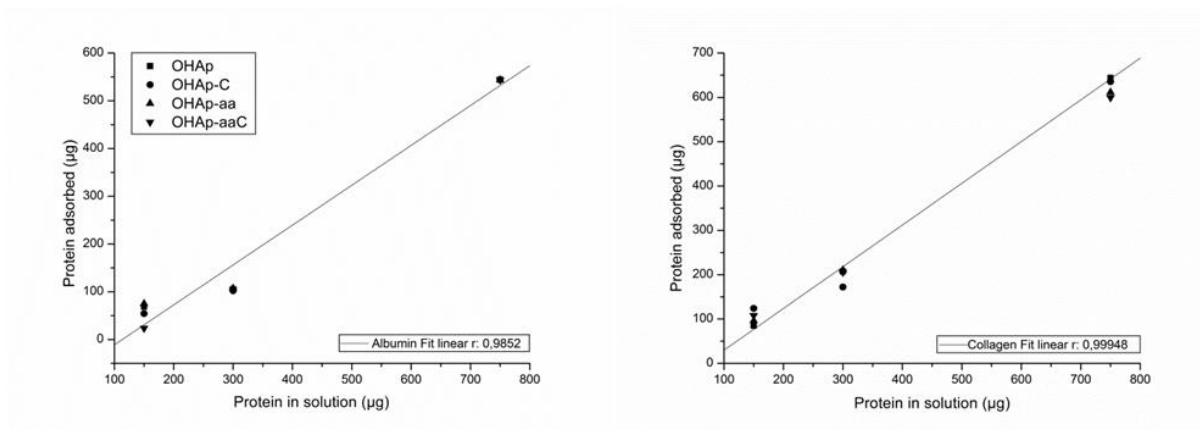


Figure 2.18: a) albumin and b) collagen adsorption vs. protein availability in solution obtained by uv/vis spectroscopy.

Table 2.8. Total ($\mu\text{g/ml}$) and percentage versus availability (%) Albumin and collagen adsorption at different concentrations obtained by uv/vis spectroscopy.

	HSA 100		HSA 200		HSA 500		COL 100		COL 200		COL 500	
	($\mu\text{g/ml}$)	(%)	($\mu\text{g/ml}$)	(%)	($\mu\text{g/ml}$)	(%)	($\mu\text{g/ml}$)	(%)	($\mu\text{g/ml}$)	(%)	($\mu\text{g/ml}$)	(%)
OHAp	68(2)	46	106(4)	35	544(3)	73	85(2)	56	207(3)	69	644(8)	86
OHApC	54(1)	36	102(4)	34	544(4)	73	125(3)	83	172(4)	57	635(8)	85
OHAp-aa	75(2)	50	107(4)	36	544(4)	73	96(2)	54	210(4)	70	612(8)	82
OHAp-aaC	24(3)	16	103(4)	35	544(4)	73	108(2)	72	205(4)	68	600(10)	80

HSA and Coll mass adsorption results obtained with the QCM-D are collected on tables 2.9 and 2.10. Information of the thickness of the layer formed for Albumin and Collagen adsorption experiments are also displayed on them. An increase on the proteins adsorbed for a greater concentration in solution is observed for both HSA and Coll. For HSA, the increment is similar for all the samples and the medium increment is ≈ 100 ng. The sample with the greater adsorption is OHAp-aa for both HSA concentrations followed by OHAp. Then the sequence is repeated for the calcined samples, OHAp-aaC absorb more HSA than OHAp-c. In the case of the Collagen, a significant increment in the adsorption from the $100\mu\text{g/ml}$ protein concentration to the $200\mu\text{g/ml}$ can be appreciated. The increment is greater for OHAp and OHAp-C than for OHAp-aa and OHAp-aaC. It is noteworthy to mention that for the $100\mu\text{g/ml}$ concentration the sample with the greater adsorption is OHAp-aa, whereas for the $200\mu\text{g/ml}$ concentration is OHAp.

Table 2.9. ΔM calculated with the Sauebrey model from the ΔF ; Dissipation at the end of the experiments, ΔD and thickness of the Adlayer, d_{ad} , for the experiments with Albumin (HSA) at 100 and a 200 $\mu\text{g/ml}$.

<u>HSA 100 $\mu\text{g/ml}$</u>			
SAMPLE	$\Delta M(\text{ng})$	ΔD	d_{ad} (nm)
OHAp	287(7)	1.53(4)	2(0.05)
OHAp-C	253(6)	1.829((4)	2.7(0.6)
OHAp-aa	312(7)	0.3750(9)	6(0.1)
OHAp-aaC	263(6)	0.079(1)	2.5(0.6)
<u>HSA 200 $\mu\text{g/ml}$</u>			
OHAp	363(9)	3.245(8)	3(0.075)
OHAp-C	305(7)	0.447(1)	2.56(6)
OHAp-aa	375(9)	1.059(2)	6(0.1)
OHAp-aaC	343(8)	1.137(3)	2(0.05)

Table 2.10. ΔM calculated with the Sauebrey model from the ΔF ; Dissipation at the end of the experiments, ΔD and thickness of the Adlayer, d_{ad} , for the experiments with Collagen (Coll) at 100 and a 200 $\mu\text{g/ml}$.

<u>Coll100 $\mu\text{g/ml}$</u>			
SAMPLE	$\Delta M(\text{ng})$	ΔD	d_{ad} (nm)
OHAp	510(12)	158,516(3)	4(0.075)
OHAp-C	321(8)	13,506(0.3)	2.25(0.05)
OHAp-aa	587(12)	25,201(0.6)	5.5(0.1)
OHAp-aaC	370(9)	47,535(1)	1(0.03)
<u>Coll200 $\mu\text{g/ml}$</u>			
OHAp	2182(54)	99,303(2)	27(0.6)
OHAp-C	2139(53)	99,419(2)	25(0.6)
OHAp-aa	1652(41)	32,498(0.8)	12(0.3)
OHAp-aaC	1542(38)	30,434(0.75)	17(0.4)

Figure 2.19 shows Dissipation energy variations (ΔD) versus time for HSA. The graph confirms the absence of conformational changes once HSA is adsorbed on the surface. This lack of conformational change is characteristic of the globular character of HSA. However, a singular point can be observed for all the samples but OHAP-aaC. This critical point has to be related with protein-protein interactions [17, 38] ΔD at the end of the experiments are collected on Table 2.9.

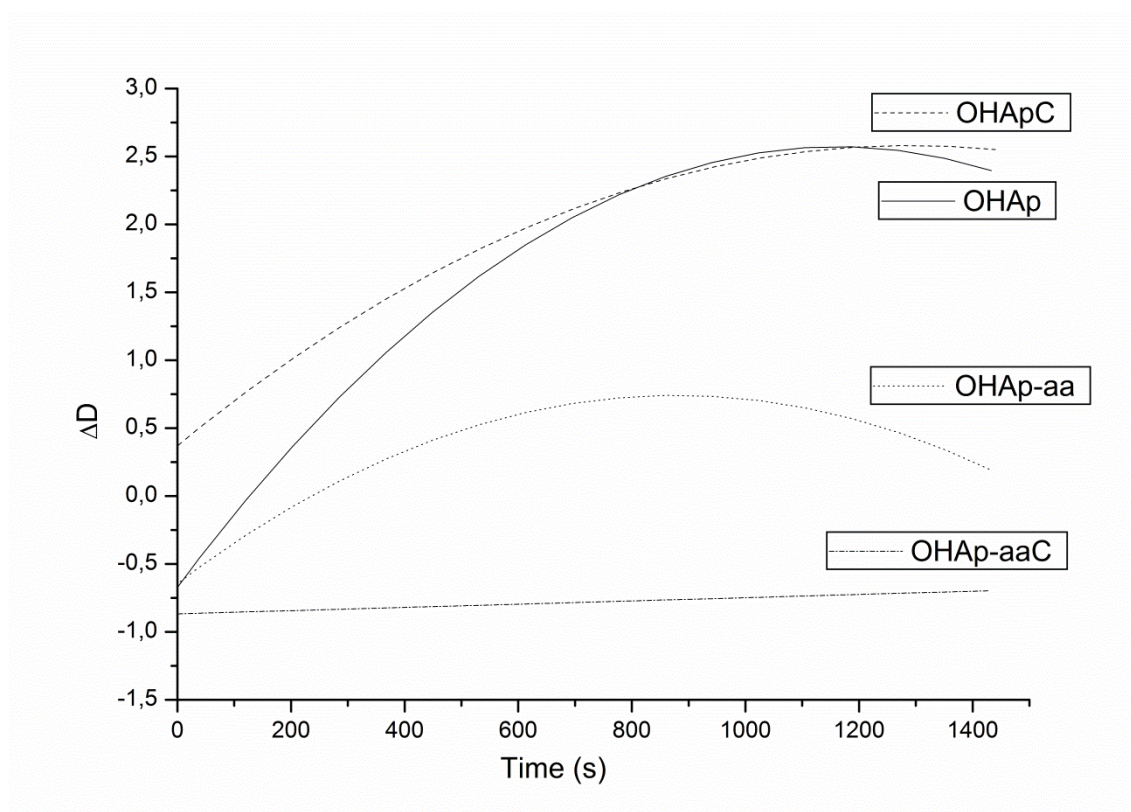


Figure 2.19. AD versus time obtained for a 100 $\mu\text{g/ml}$ HSA concentration on the QCM-D.

An increment on the dissipation energy of the protein layer adsorbed can be observed for OHAp, OHAp-aa and OHAp-aaC for the 200 μ g/ml solution in comparison with the ΔD obtained for the 100 μ g/ml solution. For OHAp-C, a decrease in the ΔD for a greater protein concentration on the medium is observed. On the basis of the Voigt-based viscoelastic model [39], the thickness (d_{ad}) of the adlayer has been calculated and no change from the different protein concentration studied can be appreciated as discussed later, Table 2.9. Collagen fibers are bundles of fibrils. Although having a fibroid structure, a conformation change has not been observed. For the samples OHAp and OHAp-C, a direct relationship for $\Delta D/\Delta f$ can be observed. Dissipation energy values at the end of the experiment are collected on table 2.10 together with the thickness of the adlayer. For the samples OHAp-aa and OHAp-aaC, a lower ΔD than in OHAp and OHAp-c can be observed. Also the latter curves splitted in two sections. Values are collected on table 2.10. On the contrary than for HSA, the thickness of the adlayer is significantly greater for greater Coll concentration in the medium.

2.4.5. Discussion

The subject of protein adsorption on materials has generated a vast amount of literature in recent years [8-10]. However the very different techniques used for the studies [10, 23] and the large number of parameters [32, 38] that can be studied had led to a “striking” lack of consensus so extreme that no general conclusions can be extracted [7]. The design of materials for bone regeneration requires a better understanding of the adsorption of blood proteins to those materials, specifically of blood proteins that play a role in the different steps on bone regeneration. The influence of the surface parameters of hydroxyapatite on the adsorption of two important proteins to the process of bone regeneration HSA and Coll are studied in this work. However the different characteristics of these proteins: molecular weight, isoelectric points, structural form (globular, fibroid); conformational changes etc. discourage a direct comparison between them. A more conclusive approach can be to study how the material surface properties affect the adsorption of each protein individually.

The ratio protein adsorbed/protein remaining in solution decreases for all the specimens when the protein content rises from 100 μ g/ml to 200 μ g/ml but is greater when the available concentration is 500 μ g/ml. This effect has to be related with the different types of interaction that may happen; protein-PBS, protein-protein, material-PBS and protein-material. Protein-PBS and material PBS interaction are mainly related with the hydrophilic character of the materials and can be dismissed due to the similar hydrophilic character of the components of the system. Protein-protein interactions should be greater for greater concentrations and whether this force dominates it should lead to similar HSA adsorption independently of the characteristic of the material. This happens at the concentrations of 200 and 500 μ g/ml but for the lowest concentration the influence of the material features seems to dominate. HSA has a globular structure that it does not allow a conformational change when it is adsorbed. However, a linear relationship could not be established between the amount of adsorbed HSA and any of the surface parameters of the hydroxyapatite studied SSA, crystal or particle size. See Figure 2.10. Suggesting that a combination of parameters must be considered together to understand the nature of albumin adsorption on hydroxyapatite at low concentration.

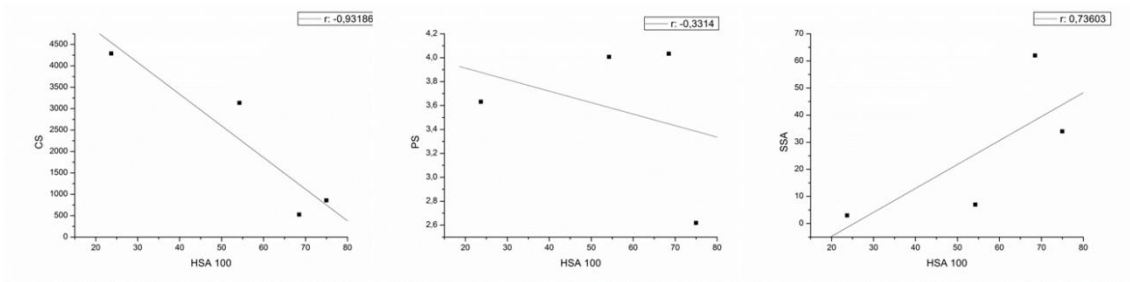


Figure 2.20. HSA adsorption versus CS, PS and SSA of the hydroxyapatites samples for the 100 µg/ml concentration experiments showing that no linear fit can be established for any of the parameters

For collagen, a greater availability in the media leads also to a greater adsorption, Table 2.8, but once again, no linear trend line can be established between the adsorption and any on the parameters of the powder, SSA, crystal or particle size (Figure 2.11) suggesting the prevalence of the protein-material interactions and a cooperative effect of the material parameters that needs to be clarified in order to improve the design of blood contacting materials. It is also noteworthy to mention that the quantity of collagen adsorbed on the biomaterial surface is greater than the quantity of albumin adsorbed as it can be observed also on table 2.8.

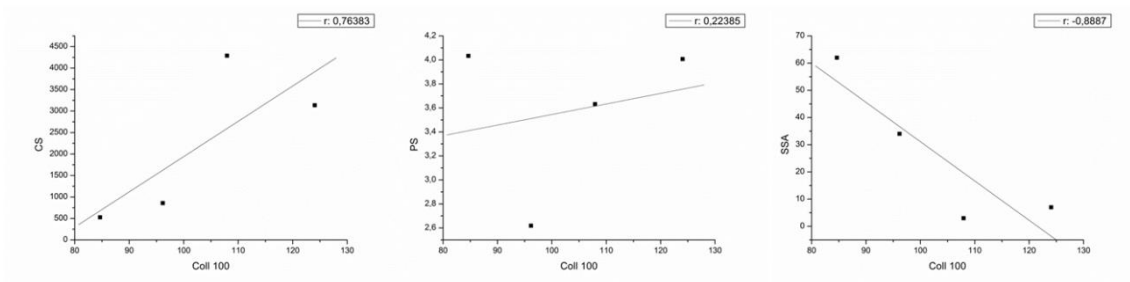


Figure 2.21. Coll adsorption versus CS, PS and SSA of the hydroxyapatites samples for the 100 µg/ml concentration experiments showing that no linear fit can be established for any of the parameters

The interaction that occurs between protein molecules and the different apatite samples has been studied with the help of QCM-D equipment. Figures should not be compared between results obtained by UV-V spectroscopy and QCM and Microbalance due to the different nature of the experiments. QCM actually measures the viscoelastic response of the adlayer. QCM-D results for HSA, confirms the absence of conformational changes that correspond to a globular protein. The same adsorption trend is obtained for the QCM-D and the UV; OHAp-aa > OHAp > OHAp-aaC > OHAp-C. The thickness of the adlayer calculated for the different protein concentration is compatible only with the formation of a monolayer (Table 2.9). The data does not suggest the formation of a multilayer by increasing the availability in the medium.

The interactions between collagen and hydroxyapatite are different than the observed for albumin and hydroxyapatite. The material-protein interaction seems to prevail over the protein-protein interactions resulting in a different adsorption of Coll for the different samples. Considering together data from tables 2.10 and 2.7, it seems that for a 100 µg/ml Coll concentration, the greater SSA results in a lower adsorption which is an unexpected result since is generally considered that larger surfaces provides with more adhesion points for the protein and is the factor that limits the amount of adsorbed proteins [40]. On the contrary a larger crystal size does yield a larger adsorption. Also particle size seems to play a role. But, as it can be appreciated on supplementary file 2.4, no linear trend line can be drawn for any of the parameters suggesting that a cooperative effect of these parameters is what determines how much collagen can be adsorbed. Collagen protein, as explain before, has a fibroid structure, but no conformational changes are expected. However, on the contrary than HSA, the formation of multilayers can be deduced from the thickness of the adlayer formed, Table 2.10. The diameter and the length of the molecule size 1.5 nm and 300nm respectively [41]. ΔD is greater for a greater Coll concentration for OHAp-C and OHAp-aa as displayed also on table 2.10. This increment can be related to the SSA of the samples, (Table 2.7). For samples: OHAp-C, OHAp-aa, the high Coll adsorption results in the covering of the entire sample surface yielding a lower ΔD . In the case of OHAp with a greater SSA (62 m²/g), some of the surface remains free of adsorbed protein yielding a high dissipation. This ΔD for OHAp decreases when increasing the adsorbed proteins on the surface because of the formation of multilayers. $\Delta D/\Delta F$ also provides information on the sequence of Coll adsorption. While for OHAp and OHAp-

C the adsorption of Coll proceeds on a continuous way: A step can be appreciated for OHAp-aa and OHAp-aaC, fig 2.20b, that it can be related with the formation of different layers. The first layer formation ends producing a ΔF of around -500 Hz, and the next one produces a sudden shift up to -1000Hz. A similar behavior is appreciated for a 200 $\mu\text{g/ml}$ Coll concentration suggesting that is the characteristics of these hydroxyapatites what determines the growing of the multiple layers. However none of the analyzed parameters seems to determine the different growing behaviors.

Proteins, albumin and collagen are present in the human serum and the first contact between a host tissue and an implanted biomaterial will proceed through them. Albumin concentration on the serum is 3.4 to 5.4 grams per deciliter (g/dL) [1]. And according to our results the contact between hydroxyapatite and albumin will produce a full coverage of the sample, independently of the characteristics of the powder. No considering in this first approach, the competition with the rest of serum proteins. However, considering that HSA has a Molecular Weight of 67kDa and according to the Vroman effect [42], that states that the competitive nature of protein adsorption onto the surface primarily relies upon a protein's molecular weights. HSA will be displaced by higher-molecular weight and/or more strongly interacting proteins. For example, Fibronectin, also present in blood serum, which possesses a 450 kDa MW and plays a significant role in cell adhesion, growth, migration, and differentiation [43] requires the appropriate structural conformation for maximizing the interaction with cells. This active conformation can be tune on with the adequate pre-adsorption of HSA[44]. Collagen adsorption on the contrary can be controlled by designing the features of the material to be implanted [45]. The concentration of collagen on blood serum is lower than the solutions assayed and whether the maximum amount of Coll adsorption is required materials with a medium SSA but large crystal size should be recommended. As a consequence, the most important parameter to consider for the design of a biomaterial is to be as specific as possible for the target cell/tissue/application.

As described on the introduction, the presence of collagen on the surface of a biomaterial will produce the attraction of bone- progenitor's cells that will attach to the biomaterial and start bone regeneration [21]. In that way, the presence of as much collagen as possible on the surface should be favored [20, 46] samples like OHAp-aaC, which yield a high collagen adsorption but a small quantity of albumin, will be the material of choice. On the other hand, if the target of the material/device is mineralization as in osteoporotic defects treatments, the adsorption of albumin should be favored and the better option will be OHAp since it adsorbs a higher quantity of albumin and albumin can be related to the deposition of calcium in the osteoid matrix [47, 48].

2.4.6. Conclusions.

An increase in the HSA and Coll adsorption can be correlated with an increase in the availability of proteins in solution. Same trend can be measured with UV/Vis spectroscopy and QCM-D. For HSA, concentrations lower than 100µg/ml is required to tailoring the quantities adsorbed. Collagen adsorption can be controlled at the physiological concentration by designing the features of the material to be implanted. .For applications which require the adsorption of high quantities of collagen, samples with a high SSA and a small crystal size would be preferred.

STADISTIC ANALYSIS

Differences between experimental groups and the control groups were evaluated using the statistical analysis package Stata. The $p < 0.05$ was accepted to be significant.

2.2.7. References.

1. Muller, K.M., *The Pathology of Devices*. 1994.
2. Williams, D., *Definitions in Biomaterials*. Elsevier, 1987.
3. *ISO 10993 Part 1*. 1997.
4. Otto, M., et al., *Modification of human platelet adhesion on biomaterial surfaces by protein preadsorption under static and flow conditions*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2004. **15**(1): p. 35-42.
5. Kirkpatrick, C.J., et al., *Tissue response and biomaterial integration: The efficacy of in vitro methods*. *Biomolecular Engineering*, 2002. **19**(2-6): p. 211-217.
6. Tagaya, M., et al. *Protein adsorption and subsequent fibroblasts adhesion on hydroxyapatite nanocrystals*. in *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2011.
7. Vogler, E.A., *Protein adsorption in three dimensions*. *Biomaterials*, 2012. **33**(5): p. 1201-1237.
8. Yang, Z. and C. Zhang, *Adsorption/desorption behavior of protein on nanosized hydroxyapatite coatings: A quartz crystal microbalance study*. *Applied Surface Science*, 2009. **255**(8): p. 4569-4574.
9. Chang, H., et al., *Study of albumin and fibrinogen membranes formed by interfacial crosslinking using microfluidic flow*. *Biofabrication*, 2010. **2**(3).
10. Kalasin, S. and M.M. Santore, *Non-specific adhesion on biomaterial surfaces driven by small amounts of protein adsorption*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2009. **73**(2): p. 229-236.
11. Clare, T.L., et al., *Functional monolayers for improved resistance to protein adsorption: Oligo(ethylene glycol)-modified silicon and diamond surfaces*. *Langmuir*, 2005. **21**(14): p. 6344-6355.
12. Ribeiro, N., S.R. Sousa, and F.J. Monteiro, *Influence of crystallite size of nanophased hydroxyapatite on fibronectin and osteonectin adsorption and on MC3T3-E1 osteoblast adhesion and morphology*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010. **351**(2): p. 398-406.
13. Oyane, A., H. Tsurushima, and A. Ito, *Highly efficient gene transfer system using a laminin-DNA-apatite composite layer*. *Journal of Gene Medicine*, 2010. **12**(2): p. 194-206.

14. Krishnan, A., C.A. Siedlecki, and E.A. Vogler, *Mixology of protein solutions and the Vroman effect*. Langmuir, 2004. **20**(12): p. 5071-5078.
15. Oyane, A., et al., *Enhanced immobilization of acidic proteins in the apatite layer via electrostatic interactions in a supersaturated calcium phosphate solution*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(7): p. 2969-2976.
16. Nakanishi, K., T. Sakiyama, and K. Imamura, *On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001. **91**(3): p. 233-244.
17. Piazza, R., *Protein interactions and association: An open challenge for colloid science*. Current Opinion in Colloid and Interface Science, 2004. **8**(6): p. 515-522.
18. Dorozhkin, S.V., *Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials*. Journal of Materials Science, 2009. **44**(9): p. 2343-2387.
19. Ferreira, A.M., et al., *Collagen for bone tissue regeneration*. Acta Biomaterialia, 2012. **8**(9): p. 3191-3200.
20. Liu, L., et al., *Controlling the orientation of bone osteopontin via its specific binding with collagen I to modulate osteoblast adhesion*. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 2007. **80**(1): p. 102-110.
21. Viguet-Carrin, S., P. Garnero, and P.D. Delmas, *The role of collagen in bone strength*. Osteoporosis International, 2006. **17**(3): p. 319-336.
22. Uchida, M., et al., *Reduced platelet adhesion to titanium metal coated with apatite, albumin-apatite composite or laminin-apatite composite*. Biomaterials, 2005. **26**(34): p. 6924-6931.
23. Meder, F., et al., *Protein adsorption on colloidal alumina particles functionalized with amino, carboxyl, sulfonate and phosphate groups*. Acta Biomaterialia, 2012. **8**(3): p. 1221-1229.
24. Gurdak, E., et al., *Resolution of the vertical and horizontal heterogeneity of adsorbed collagen layers by combination of QCM-D and AFM*. Langmuir, 2005. **21**(23): p. 10684-10692.
25. Alarcon, E.I., et al., *The biocompatibility and antibacterial properties of collagen-stabilized, photochemically prepared silver nanoparticles*. Biomaterials, 2012. **33**(19): p. 4947-4956.

26. Burgeson, R.E. and M.E. Nimni, *Collagen types: Molecular structure and tissue distribution*. Clinical Orthopaedics and Related Research, 1992(282): p. 250-272.
27. B.Fernandez-Montes-Moraleda, J.S. Roman, and L.M.Rodriguez-Lorenzo, *Influence of surface features of hydroxyapatite on the adsorption of proteins relevant to bone regeneration*. Journal of biomedical materials research. Part A 2012.
28. Scherrer, W.N. and R. Jenkins, *Advances on X-ray analysis*, 1983. **26**: p. 141.
29. Brunauer, P.H. Emmet, and E. Teller, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1938. **60**: p. 309.
30. Cernosek, R.W., et al., *Comparison of lumped-element and transmission-line models for thickness-shear-mode quartz resonator sensors*. IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, 1998. **45**(5): p. 1399-1407.
31. Lucklum, R. and P. Hauptmann, *Quartz crystal microbalance: mass sensitivity, viscoelasticity and acoustic amplification*. Sensors and Actuators, B: Chemical, 2000. **70**(1-3): p. 30-36.
32. Ikoma, T., et al., *Protein adsorption on hydroxyapatite nanosensors with different crystal sizes studied in situ by a quartz crystal microbalance with the dissipation method*. Journal of the American Ceramic Society, 2009. **92**(5): p. 1125-1128.
33. Voinova, M.V., et al., *Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces: Continuum mechanics approach*. Physica Scripta, 1999. **59**(5): p. 391-396.
34. Rossikhin, Y.A. and M.V. Shitikova, *New method for solving dynamic problems of fractional derivative viscoelasticity*. International Journal of Engineering Science, 2001. **39**(2): p. 149-176.
35. Serro, A.P., et al., *Bovine serum albumin conformational changes upon adsorption on titania and on hydroxyapatite and their relation with biomineralization*. Journal of biomedical materials research. Part A, 2004. **70** A(3): p. 420-427.
36. Fernandez-Montes-Moraleda, B., J. San Roman, and L.M. Rodriguez-Lorenzo, *Influence of surface features of hydroxyapatite on the adsorption of proteins relevant to bone regeneration*. Journal of biomedical materials research. Part A 2012.

37. B. Fernández-Montes Moraleda, J.S.R., L. M. Rodríguez-Lorenzo, *Influence of surface features of hydroxyapatite on the adsorption of proteins relevant to bone regeneration*. Book of abstracts 24th European Conference on Biomaterials 2011.
38. Ianeselli, L., et al., *Protein-protein interactions in ovalbumin solutions studied by small-angle scattering: Effect of ionic strength and the chemical nature of cations*. Journal of Physical Chemistry B, 2010. **114**(11): p. 3776-3783.
39. Tagaya, M., et al., *Effect of interfacial proteins on osteoblast-like cell adhesion to hydroxyapatite nanocrystals*. Langmuir. **27**(12): p. 7645-7653.
40. Parhi, P., et al., *Volumetric interpretation of protein adsorption: Capacity scaling with adsorbate molecular weight and adsorbent surface energy*. BIOMATERIALS, 2009. **30**(36): p. 6814-6824.
41. Xu, S., et al., *Effects of denaturation and association of collagen on adsorption behavior: Two-dimensional nanostructure and its property*. Colloid and Polymer Science, 2007. **285**(8): p. 899-906.
42. Vroman, L. and A.L. Adams, *Findings with the recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid/solid interfaces*. Surface Science, 1969. **16**(C): p. 438-446.
43. Turbill, P., T. Beugeling, and A.A. Poot, *Proteins involved in the Vroman effect during exposure of human blood plasma to glass and polyethylene*. Biomaterials, 1996. **17**(13): p. 1279-1287.
44. Giambianco, N., et al., *Fibronectin Conformation Switch Induced by Coadsorption with Human Serum Albumin*. Langmuir, 2011. **27**(1): p. 312-319.
45. Yu, S.M., Y. Li, and D. Kim, *Collagen mimetic peptides: Progress towards functional applications*. Soft Matter, 2011. **7**(18): p. 7927-7938.
46. Ahn, A.C. and A.J. Grodzinsky, *Relevance of collagen piezoelectricity to "Wolff's Law": A critical review*. Medical Engineering and Physics, 2009. **31**(7): p. 733-741.
47. Stern, P.H., *Albumin-induced resorption of fetal rat bone in vitro*. Calcified Tissue Research, 1971. **7**(1): p. 67-75.
48. Feng, B., et al., *Characterization of titanium surfaces with calcium and phosphate and osteoblast adhesion*. Biomaterials, 2004. **25**(17): p. 3421-3428.

2.5. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Se han estudiado las interacciones que se producen entre cuatro hidroxiapatitas, con distintas características superficiales: tamaño de cristal, superficie específica y tamaño de partícula. Con cuatro proteínas, a distintas concentraciones. Análisis de adsorción UV nos da información cuantitativa. Microbalanza, da información cualitativa, tipo de interacción que se establece, conformación. Se realizan ambos estudios para cada una de las proteínas estudiadas.

Cada proteína interacciona con el material estudiado, de una manera y en una cantidad. No existe ningún único parámetro que estudiado por separado puede predecir el comportamiento de un material dentro del organismo. Para poder aproximarnos a una predicción razonable, es necesario no solo estudiar cada uno de parámetros superficiales del material, además del tipo de respuesta que esperamos por parte del cuerpo.

Para la síntesis de los andamios o matrices tridimensionales se determinó cual de las cuatro hidroxiapatitas sintetizadas, reunía las mejores características para ser utilizada. Analizando los resultados obtenidos con las distintas proteínas, así como las caracterización de las muestras sintetizadas, se concluyó que la hidroxiapatita que mejor cumplía los requisitos fue la OHAp-aa. Cuyas características son:

SSA: 34(2) (m²/g)

Tamaño de cristal: 858

Tamaño de partícula: 2.6

Cuyos resultados en adsorción de proteínas son:

Tabla 2.11. Resultados obtenidos de las medidas de UV/vis para la muestra OHAp-aa

UV	100 µg/ml	200 µg/ml	500 µg/ml
Fibrinógeno	159(8)	197(9)	429 (19)
Fibronectina	150(6)	277(10)	444(11)
Colágeno	96(2)	210(4)	635(8)
Albúmina	75(2)	107(4)	544(4)

Tabla 2.12. Resultados obtenidos con la microbalanza para la muestra OHAp-aa

MICROBALANZA	100µg/ml	200 µg/ml	Datos
Fibrinógeno	1001(7)	1146(8)	Conformación End-on
Fibronectina	278(2)	529(4)	Conformación End-on
Colágeno	587(12)	1652(41)	d _{ad} 100: 5.5(0.1) nm d _{ad} 200: 12(0.3) nm
Albúmina	312(7)	375(9)	d _{ad} 100: 6(0.1)nm d _{ad} 200: 6(0.1)nm

De los resultados obtenidos, la elección se obtuvo del análisis de los resultados obtenidos con la microbalanza, las interacciones que se establecen entre la muestra y las distintas proteínas estudiadas. Así pues, la hidroxiapatita OHAp-aa, es la que presenta la mayor adsorción de fibrinógeno, el cual se adsorbe en todas las concentraciones estudiadas en conformación end-on. De las medidas con las distintas concentraciones de fibronectina, se concluye, que de las muestras de hidroxiapatita estudiadas, también es la que más cantidad adsorbe, en conformación end-on.

De las pruebas realizadas con albúmina y colágeno, aunque no es la muestra que adsorbe en todas las concentraciones de ambas proteínas, la que más, si que se mantienen dentro de unos rangos muy altos.

Por todo ello, siendo la muestra que adsorbe más fibronectina, la cual es la proteína de las estudiadas, más especializada en la regeneración ósea. Se puede deducir, que una vez implantado el andamio en el tejido, se van a adsorber altas cantidades de fibrinógeno, en conformación end-on, la cual tiene el dominio proinflamatorio desactivado, pero el dominio RGD libre, lo que favorecerá la adhesión de células osteogénicas. Cuando se produzca fibronectina, esta podrá adsorberse a la muestra sustituyendo al fibrinógeno, gracias al ya descrito efecto Vroman, el cual describe, como unas proteínas influidas por distintos parámetros desplazan a otras sobre la superficie de los materiales. En el caso de la fibronectina y el fibrinógeno, cabría esperar que esta sustituya al fibrinógeno, debido a su mayor peso molecular (fibrinógeno 400kDa y Fibronectina 500kDa). En su interacción con colágeno, se observa como es una de las muestras que más proteína adsorbe, lo mismo que ocurre con la albúmina, sin formar unas capas de proteína adsorbidas demasiado rígidas que pudieran limitar la entrada de otras biomoléculas.

Todas las síntesis de los andamios que fueron llevadas a cabo, como se describe detalladamente en el capítulo III de la presente memoria, con la muestra OHAp-aa de las cuatro hidroxiapatitas estudiadas.

CAPITULO III: Modulación de la porosidad en andamios para ingeniería de tejido óseo.

3.1. INTRODUCCION

En capítulos anteriores, se han estudiado las interacciones que se establecen entre la hidroxiapatita y el medio biológico. En este capítulo se describe la preparación, caracterización y estudios celulares de andamios tridimensionales basados en poli vinil pirrolidona a los que se añade el componente cerámico previamente estudiado.

Las características que deben cumplir dichos andamios están desarrolladas en el primer capítulo del presente trabajo (pagina: 30). De las características mencionadas: Biocompatibilidad, biodegradabilidad, osteoinducción, porosidad y tamaño de poro, propiedades superficiales y propiedades mecánicas. En este capítulo nos centraremos en el control y optimización de la porosidad y del tamaño de poro. Se describe la preparación de andamios basados en composites de matriz polimérica con una fase discreta cerámica [1]. Los reactivos escogidos son aquellos de probada biocompatibilidad [2] y biodegradabilidad [3]. Se han preparado andamios de polivinil pirrolidona (VP) entrecruzada con dimetacrilato de polietilenglicol (PEGDMA) y quitosano, con partículas de hidroxiapatita como componente cerámico.

La **polivinil pirrolidona** es un polímero biodegradable que confiere a la matriz un alto grado de hidrofilia, característica fundamental para la adhesión celular [4, 5].

El **dimetacrilato de polietilenglicol**, actúa como el entrecruzante. Su función básica es la mejora de las propiedades físicas del andamio ya que aporta al composite dureza, estabilidad e insolubilidad. Cada doble enlace es capaz de formar parte de una polimerización por adición de radicales libres, dando lugar a un compuesto con elevado grado de entrecruzamiento [6].

El **quitosano** es un buen candidato como material de andamiaje por sus buenas propiedades mecánicas, su biodegradabilidad y su biocompatibilidad en numerosas aplicaciones [7]. Los ensayos “in vivo” han demostrado que las células se adhieren y proliferan en su superficie [8, 9]. Se ha descrito el quitosano como un buen promotor de la formación de hueso [10, 11]. Y las células madres mesenquimales cultivadas en presencia del mismo han mostrado un aumento en la diferenciación a osteoblastos [12] comparado con los cultivos en ausencia del mismo [13].

Sobre la matriz polimérica se han dispersado partículas de **hidroxiapatita**, de forma análoga a las características del hueso natural [14]. La hidroxiapatita sintética introducida será utilizada por el organismo para la síntesis de apatita natural y los compuestos se irán degradando y eliminando conforme se vaya formando el nuevo hueso [15]. Con el paso de tiempo el defecto óseo, por el que fue necesaria la implantación del biomaterial, desaparecerá quedando sustituido por tejido óseo natural. La hidroxiapatita utilizada fue ampliamente descrita en el capítulo anterior.

Los poros son necesarios, ya que van a permitir la migración y proliferación de los osteoblastos y células mesenquimales así como la vascularización del tejido, además una superficie porosa mejora la interacción entre el biomaterial implantado y el tejido natural proporcionando una mayor estabilidad mecánica en la interfaz, siendo esta un elemento crítico en los implantes óseos[16]. El tamaño mínimo de poro adecuado para aplicaciones óseas es de 100 a 500 micrómetros [17, 18] y para conseguir un control del tamaño de poro se utilizan diversas técnicas como son: el lavado de sales, soplado de un gas, separación de fases y liofilización, la utilización de unas u otras depende de las características de los materiales utilizados para la fabricación del andamio. En la preparación de los andamios porosos estudiados, se utiliza la liofilización como técnica para controlar el tamaño de poro. En el presente trabajo, se estudia el proceso al que se somete el sistema para controlar las características físicas y químicas y el tamaño e interconectividad de los poros.

3.2. PREPARACIÓN DE ANDAMIOS BASADOS EN POLIVINIL PIRROLIDONA

Se ha llevado a cabo una polimerización radical utilizando AIBN como iniciador. Las condiciones de polimerización se han seleccionado en base a estudios previos [19]. Por ejemplo, se llevaron a cabo gran variedad de pruebas, para determinar las proporciones de reactivos y solventes adecuadas, la influencia del orden de adición de los reactivos en las características del producto final: tamaño de poro e interconectividad de los mismos. En el presente trabajo se exponen las síntesis que permitieron un control adecuado de la polimerización y una dispersión homogénea y controlada del componente cerámico. Las proporciones de hidroxiapatita a utilizar están también seleccionadas en base a estudios previos [19] y a las referencias: [20, 21]. Brevemente se ha utilizado el porcentaje máximo de componente cerámico que permitía la obtención de productos homogéneos, un 30% de componente inorgánico. Estudiándose también materiales con un 15% para estudiar la evolución de las propiedades y la relación entre los componentes orgánicos e inorgánico.

Las cantidades de reactivos se mantuvieron constantes en todas las síntesis presentadas en esta memoria. Las proporciones de reactivos añadidas son las siguientes: 96,5 % de VP, 2% de PEGDMA y 1% quitosano en disolución acuosa, con una gota de ácido acrílico, y 1,5% del iniciador AIBN. El PEGDMA se solubiliza en agua en un primer matraz. Posteriormente se añade el componente cerámico, se realizan distintas síntesis, sin componente cerámico, composición A, con un 15%, composición B, y con un 30% de componente cerámico, composición C, bajo continua agitación, hasta conseguir una buena dispersión. A continuación se añade al matraz el quitosano, con una gota de ácido y se inyecta nitrógeno sobre la mezcla, para desplazar todo el oxígeno que haya, y así evitar la formación de radicales secundarios que puedan influir en la polimerización deseada.

En otro matraz se mezcla el monómero de VP con el iniciador y se inyecta nitrógeno. A continuación ambos productos se mezclan y se introducen en el agitador orbital a 40°C bajo agitación constante durante 24 horas. Estas condiciones producen una agitación constante, que asegura una dispersión homogénea de las partículas de hidroxiapatita dentro del sistema polimérico.

Una vez finalizada la polimerización, las muestras son congeladas (-80°C) y liofilizadas. Finalmente, se procede a la diálisis en agua destilada con membranas de diálisis (Slide-A- Lyser 3.5K, PIERCE) con un límite de peso molecular de 3500Da para eliminar todos los reactivos residuales durante 48 horas. A continuación, se introduce el compuesto obtenido en el criostato, con una rampa de enfriamiento controlada hasta una temperatura de -12°C. El producto congelado se pasa al liofilizador dejando paso a la formación del material poroso. Se utilizaron tres diferentes rampas de enfriamiento. Los materiales preparados se muestran en la tabla 3.1.

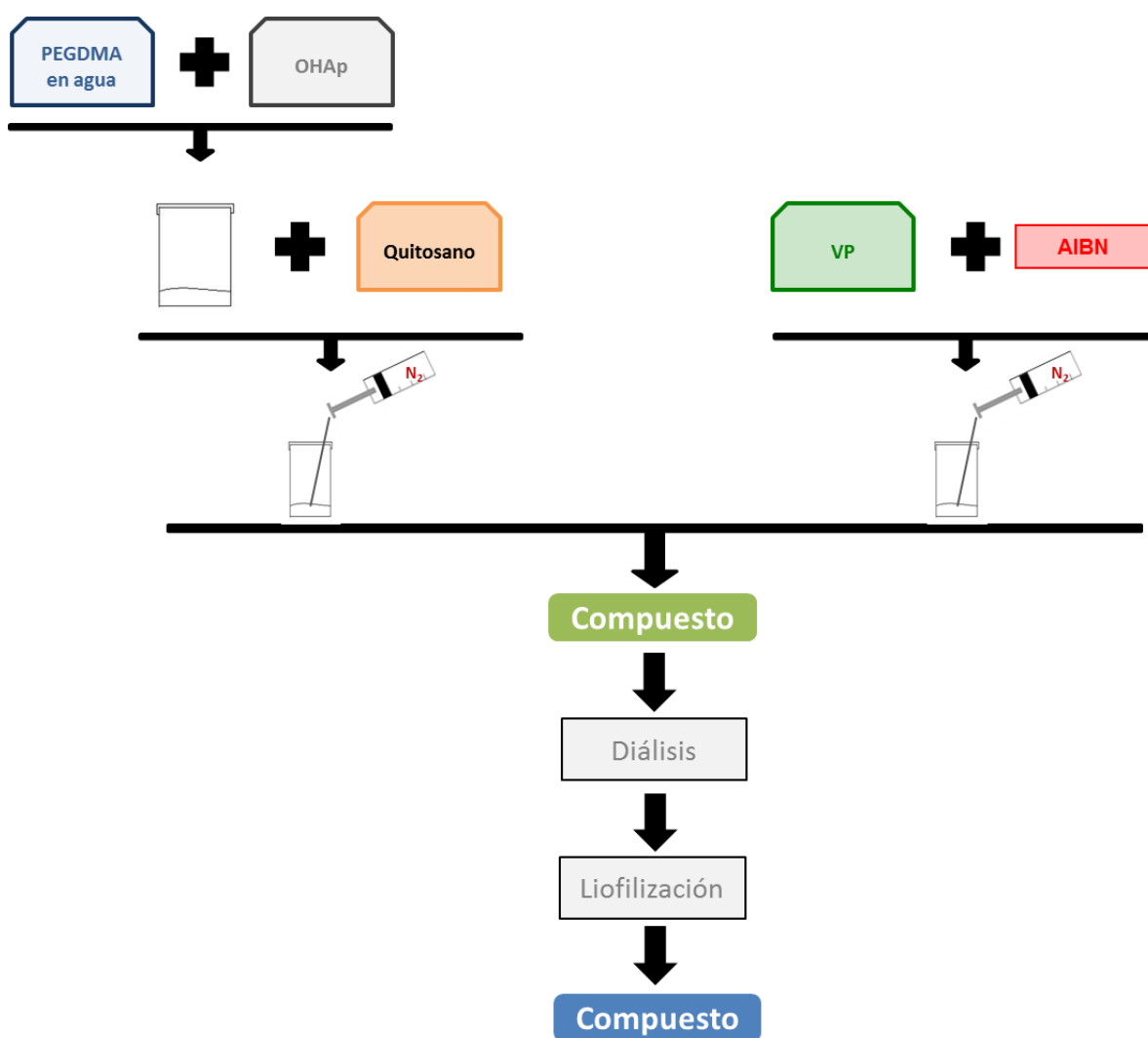


Figura 3.1.a) Diagrama de Flujo de síntesis del compuesto.

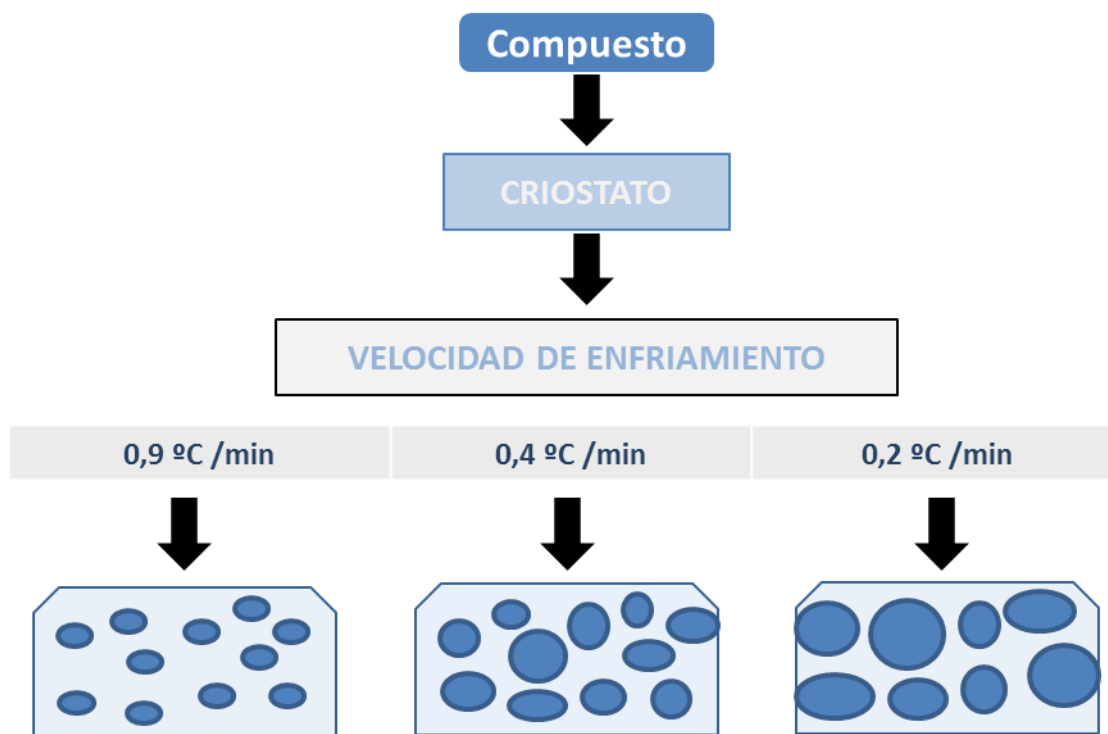


Figura 3.1.b) Diagrama de Flujo de la preparación de andamios porosos.

Tabla 3.1. Códigos de las muestras sintetizadas con distintas concentraciones de hidroxiapatita utilizadas a distintas Velocidades de enfriamiento (VE)

	0% Hidroxiapatita	15 % Hidroxiapatita	30 % Hidroxiapatita
VE 1 (0.9 °C/min)	A1	B1	C1
VE 2 (0.4 °C/min)	A2	B2	C2
VE 3 (0.2 °C/min)	A3	B3	C3

3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS

3.3. 1. Resonancia Magnética nuclear de protón, ^1H -RMN.

Los espectros de ^1H -RMN de los compuestos obtenidos (A1-C3) son análogos. En la Figura 3.2 se muestra el espectro del monómero de VP utilizado en las polimerizaciones, con la asignación correspondiente de cada uno de los picos obtenidos.

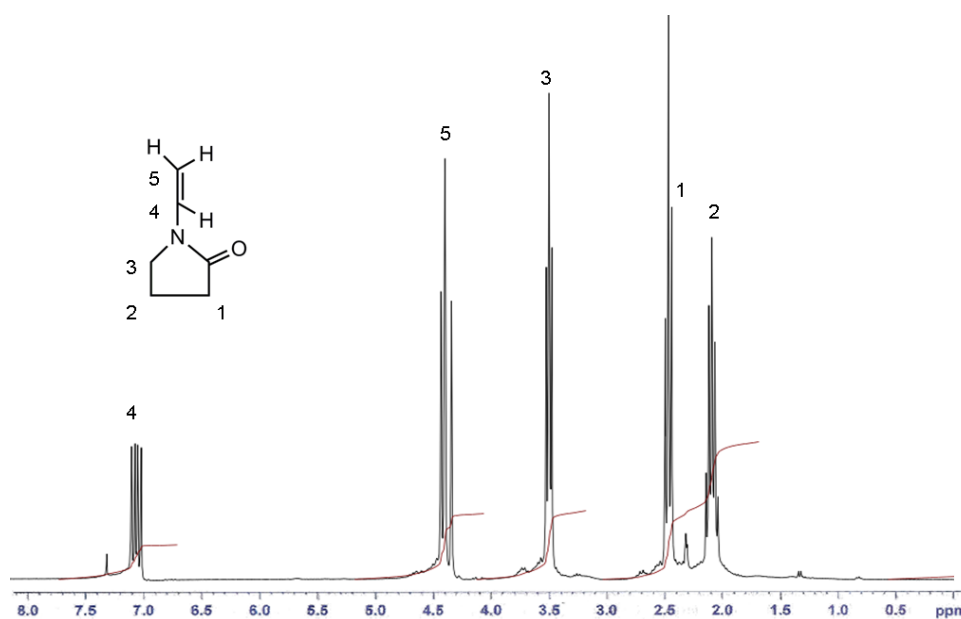


Figura 3.2. Espectro del monómero de VP

En la Figura 3.3. Se representa el espectro de la composición A1. Se aprecia la desaparición de los bandas correspondientes a los protones vinílicos (las bandas a 7 y 6 ppm) que se aprecian en los espectros del monómero de VP, confirmando la formación del polímero y la ausencia de monómero residual.

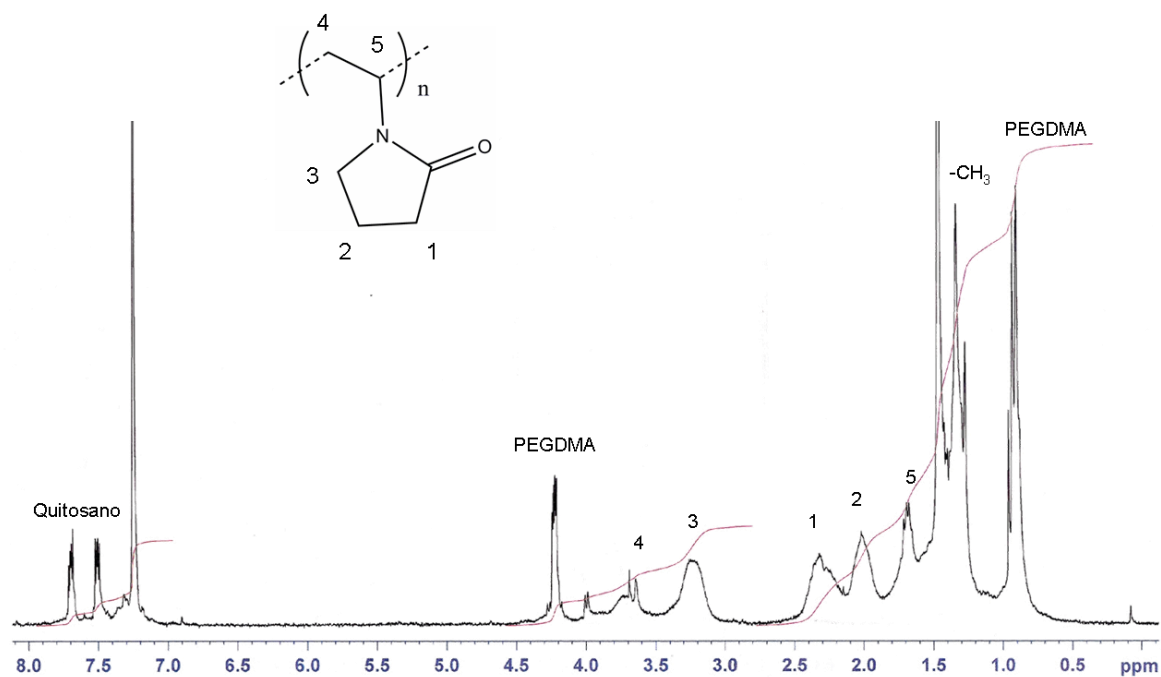


Figura 3.3. Espectro del polímero sintetizado registrado en CDCl₃ 300MHz.

Una de las mayores limitaciones en el uso de polímeros en ingeniería de tejidos proviene de la presencia de monómeros residuales que tienen efectos tóxicos en las células [14] y tejidos con los que ha de entrar en contacto. Para evitar este problema se diseñaron los dilatados tiempos de diálisis descritos en la sección de preparación. La resonancia magnética de protón permite predecir que nuestros materiales no presentarán este problema de toxicidad celular.

3.3. 2. Espectroscopia infrarroja, ATR-FTIR

En la Figura 3.4 se representan los espectros ATR-FTIR registrados para el monómero de partida así como el espectro obtenido del compuesto A1. Este espectro es análogo a los espectros de todos los compuestos sintetizados. La asignación de las bandas se recoge en la tabla 3.2.

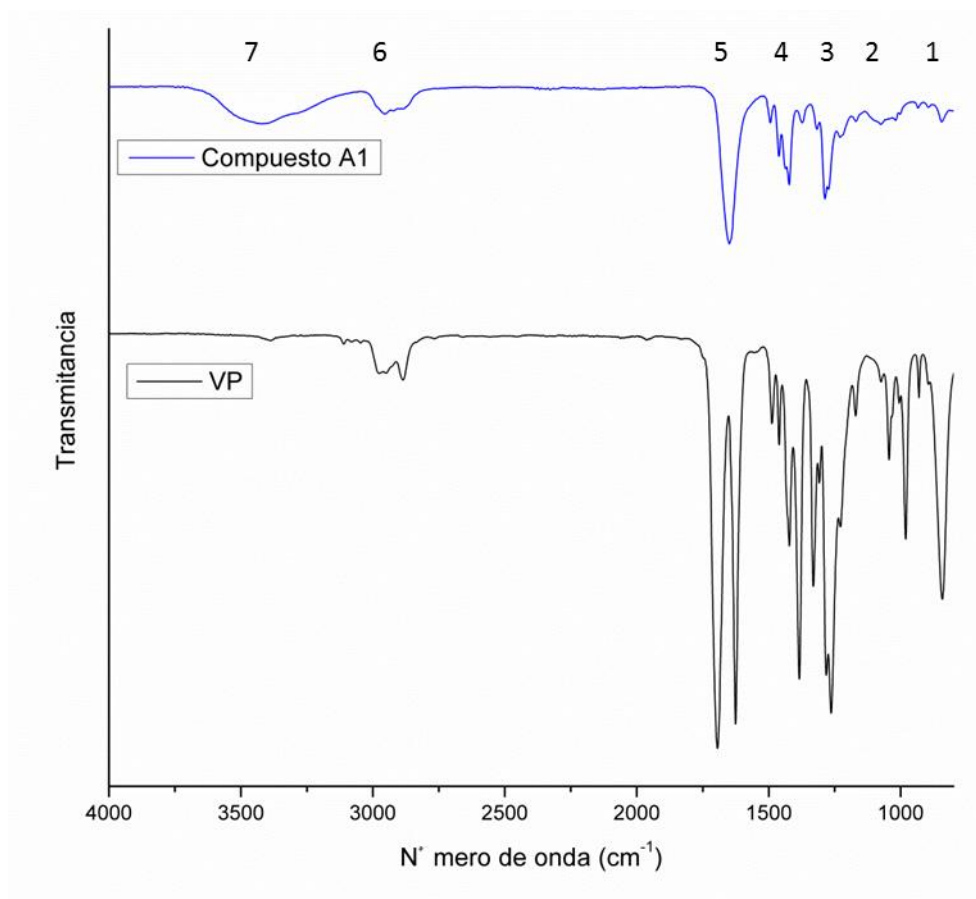


Figura 3.4. Espectros obtenidos de VP, A1.

Tabla 3.2. Bandas características de ATR-FTIR asignadas en los espectros de la Figura 3.4

Bandas características de ATR-FTIR		
Número de onda (cm⁻¹)	Asignación	Numero asignación figura 3.4
810	alquenos	1
1300, 1330 y 1170	C-O-C ⁻⁵	2
1280	Tensión grupos -CH del anillo de VP ⁻⁴	3
1390-1400	-N-C=O ⁻	4
1675	carbonilo	5
3000-3800	Tensión -OH	6
1640-1680		
3250-3500	Tensión -OH (H ₂ O)	7

Los espectros obtenidos de ATR-FTIR, confirman que la polimerización ha tenido lugar. La desaparición de las bandas correspondientes a los dobles enlaces de los monómeros (1690 y 810 cm^{-1}) es la principal indicación en este sentido.

Con la incorporación al sistema de la hidroxiapatita, obtenemos espectros como los que se muestran en la figura 3.3, siendo las bandas asignadas a la apatita las que se mencionan en la tabla 3.3. El resto de bandas, como se puede apreciar, corresponden al sistema polimérico, siendo las mismas que en la tabla 3.2.

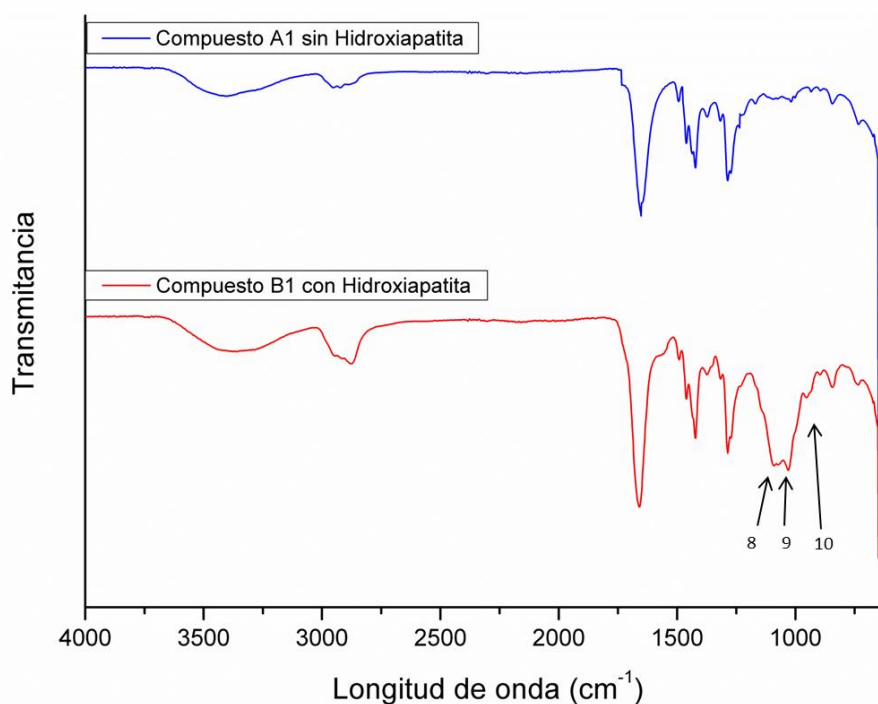


Figura 3.5. Espectros obtenidos de A1 sintetizado sin hidroxiapatita B1 con un 15% de hidroxiapatita.

Tabla 3.3. Bandas características de ATR-FTIR de la hidroxiapatita. Asignación grupos fosfatos

Bandas características de ATR-FTIR		
Longitud de onda (cm⁻¹)	Asignación	Numero asignación figura 3.5
1072, 1085	$\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$	8
1018	$\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$	9
970	$\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$	10

El carácter altamente hidrofílico del sistema se ve reflejado en la aparición de bandas anchas correspondientes a los grupos hidroxilos centradas en (3450 cm⁻¹) (figura 3.5 composición A1 y B1). Estas bandas indican la presencia de agua en el sistema pese al proceso de liofilización efectuado.

3.3. 3. Análisis termogravimétrico, TGA

Los resultados obtenidos en el análisis termogravimétrico se muestran en la Figura 3.6.a. Se observa una pérdida de peso de un 10% en el rango de temperatura de 30 a 70 grados que se puede atribuir a la pérdida de agua retenida en el sistema. A continuación, se produce una pérdida de peso en el rango de temperatura de 275-500°C que se puede atribuir a la descomposición de los compuestos orgánicos y que resultan mayoritariamente en H₂O y CO₂ que se volatilizan. Posteriormente, el peso se mantiene estable hasta la temperatura máxima del estudio 970 °C sin dejar residuo volátil seco.

La derivada de la gráfica de peso-temperatura se muestra en figura 3.6.b. En ella se puede apreciar que la pérdida de peso entre 275 y 500°C se produce en dos etapas. La pequeña pérdida de peso que se observa entre 275 y 325°C se puede atribuir a la ruptura de los anillos laterales de la polivinil pirrolidona. Esta ruptura daría lugar a la formación de compuestos que no son estables a esa temperatura lo que produce su total escisión y la brusca pérdida de peso observada hasta 500°C [22].

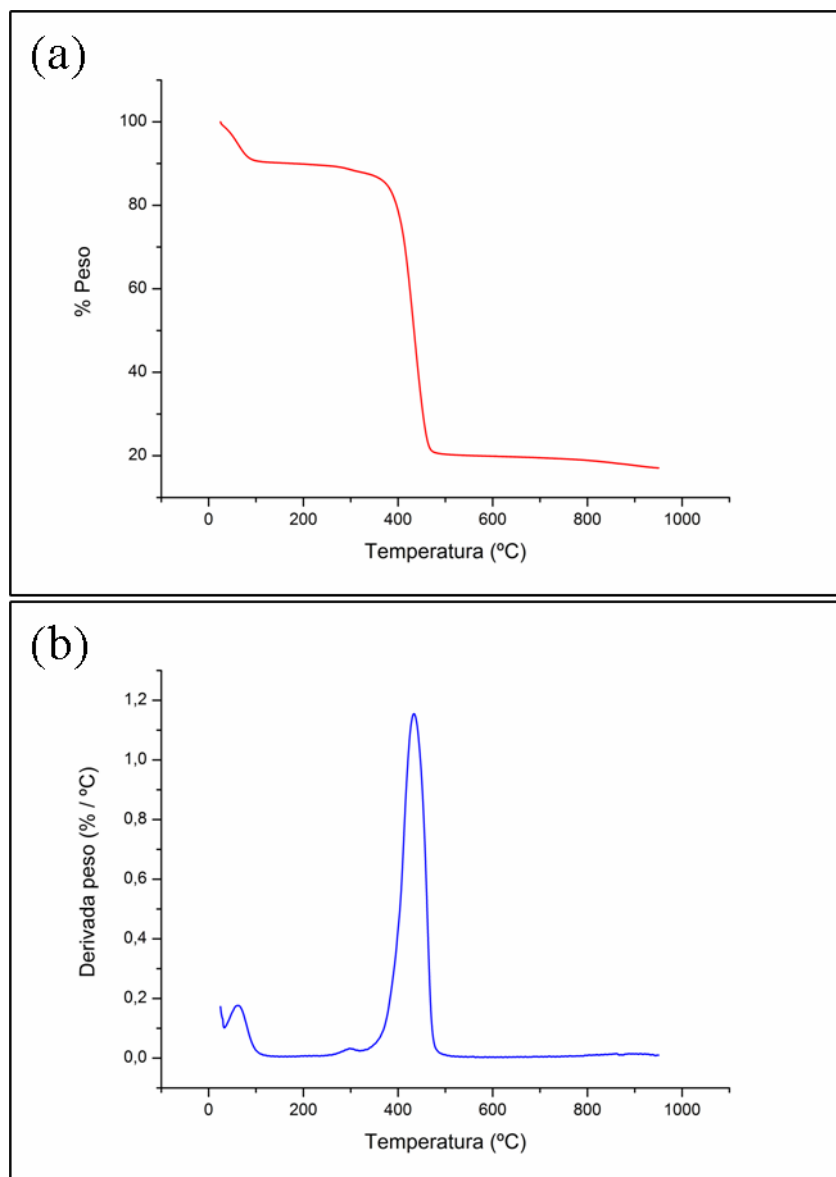


Figura 3.6. (a) TGA pérdida de peso en función de la temperatura de los compuestos sin hidroxiapatita. (b) TGA Derivada de la pérdida de peso en función de la temperatura.

En la Figura 3.7.a se presenta las gráficas obtenidas de los compuestos con las distintas proporciones de hidroxiapatita estudiadas. Todos los productos sintetizados presentan pérdidas de peso en los mismos rangos de temperatura. Las variaciones encontradas en porcentaje de pérdida de peso, están directamente relacionadas con la cantidad de componente cerámico. Esto permite cuantificar la presencia de la apatita dentro de la

muestra. Se observa como en las muestras sintetizadas con un 30% de componente cerámico, una vez volatilizado los componentes orgánicos alcanzados los 500°C queda un residuo seco de 24 ± 1 %, siendo dicho residuo en los compuestos B del $12\pm 1\%$. También permite afirmar que dicha hidroxiapatita presenta una sola fase, ya que si no fuera así se produciría una descomposición de las muestras en el intervalo 600-800°C[22]. En la Figura 3.7.b se muestran las derivadas de la pérdida de peso de los compuestos con distintas proporciones de apatita, donde se confirma la reproducibilidad de los intervalos de pérdida de peso para todas las muestras ensayadas. Comparando dicha cantidad con la añadida en la preparación se obtiene una relación de la cantidad de apatita que se pierde durante la síntesis de la matriz. El porcentaje de pérdida se establece en un 5%, lo que se atribuye a la hidroxiapatita que se pierde por el manejo de los productos. Permite confirmar la reproducibilidad del procedimiento de síntesis.

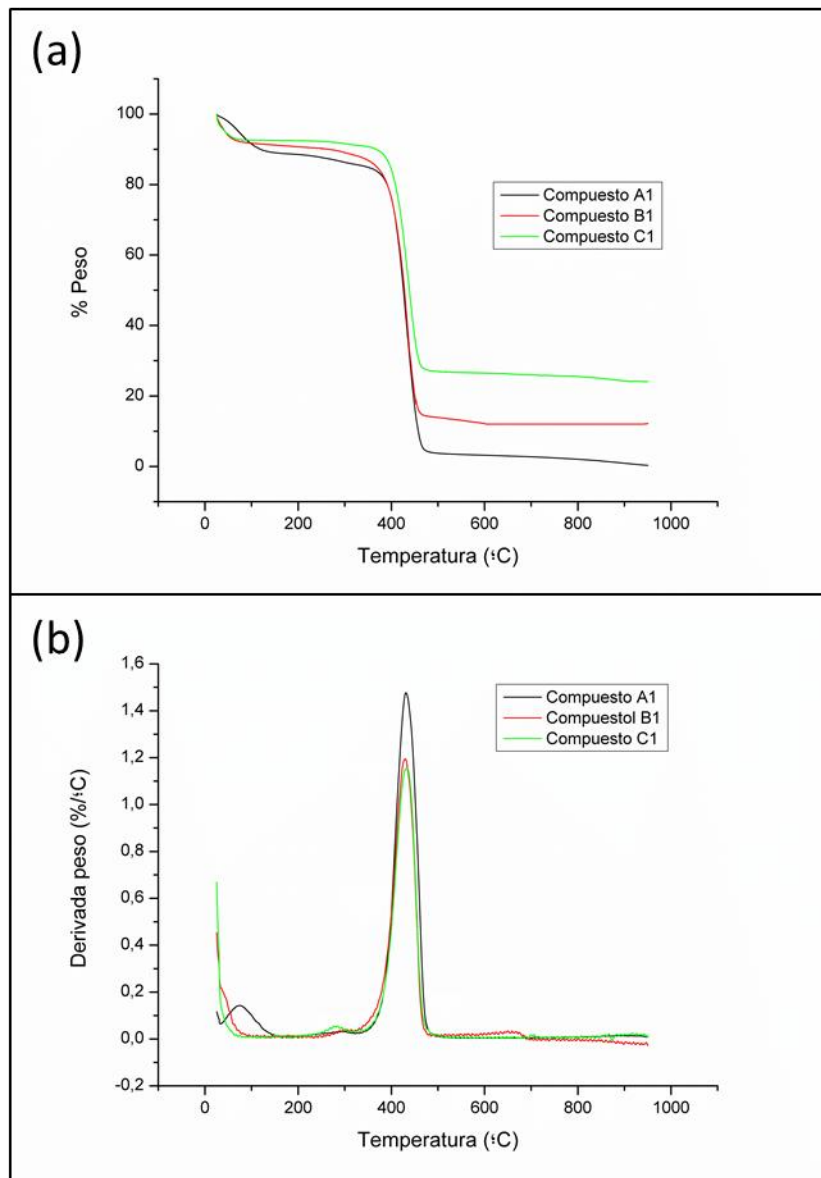


Figura 3.7. Compuestos sintetizado con distintas proporciones de hidroxiapatita. Figura a porcentaje de pérdida de peso y b derivada de la curva de perdida de peso.

3.3. 4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los termogramas mostrados son los obtenidos después de eliminar toda el agua residual de las matrices. [23]. Se llevaron a cabo estudios tanto de los reactivos utilizados en la síntesis como de cada uno de los productos obtenidos. La transición vítrea, T_g , se determinó en los materiales, tanto sin componente cerámico como con los que poseen un 15 y 30% de hidroxiapatita.

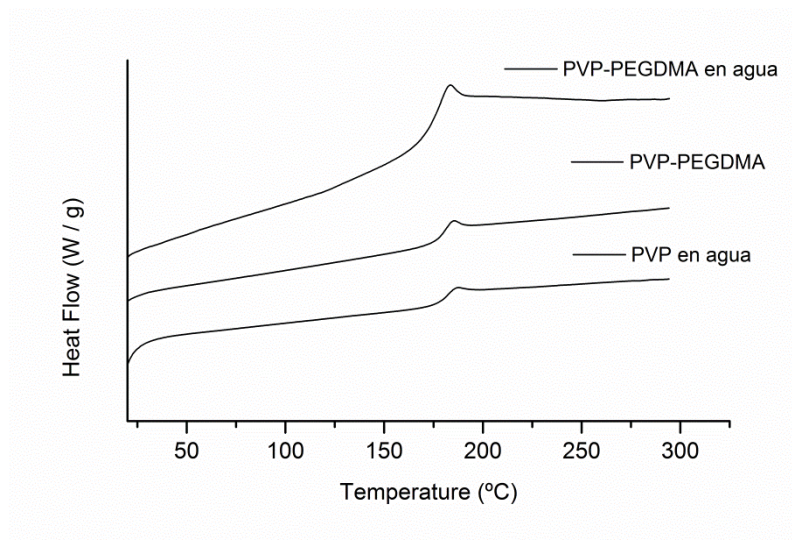


Figura 3.8. Termograma de los monómeros utilizados

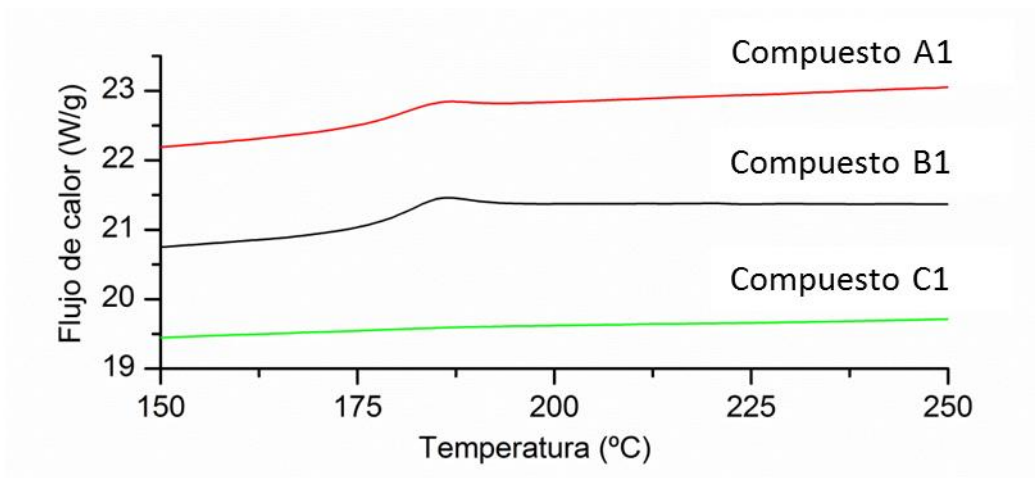


Figura 3.9. Termogramas obtenidos de los distintos compuestos estudiados.

Para las muestras sin componente cerámico y aquellas que presentan un componente cerámico del 15% se obtuvieron temperaturas de transición vítrea de 180°C, lo cual corresponde a la Tg de VP según se ha descrito en la bibliografía y se observa en la figura 3.8. [23, 24]. En aquellos compuestos con un 15% de componente cerámico no se aprecia una variación en la Tg, lo cual correspondería a la no presencia de interacciones intermoleculares entre la hidroxiapatita y las moléculas poliméricas, como consecuencia de ello no se aprecian variaciones en las propiedades térmicas del mismo.

En las muestras con un 30% de componente cerámico se observa la desaparición del pico exotérmico, lo que podría explicarse por el aumento de la cristalinidad del composite que produce un reordenamiento de las moléculas disminuyendo la flexibilidad de las cadenas. En consecuencia se obtiene un producto con gran cristalinidad.

Como se puede observar en la Figura 3.9, los termogramas de cada una de las muestras analizadas presentan un flujo de calor que puede ser comparable, las líneas obtenidas son paralelas entre si. Siendo las muestras con mayor componente cerámico, aquellas que presentan un mejor flujo de calor, y aquellas con un componente cerámico de un 15 % las que presentan un mayor flujo. Esto podría explicarse, debido a la presencia de componente cerámico, existe menor cantidad de componente polimérico en la muestras, lo que modifica cuantitativamente la respuesta térmica de la misma. Las partículas de hidroxiapatita se comportan como “defectos” en la matriz polimérica, limitando los enlaces interfaciales en la matriz del mismo [25]. En la muestra con un componente cerámico del 30 %, las moléculas inorgánicas si modifican la respuesta del composite, como se puede apreciar en la figura, donde desaparece el pico correspondiente a la temperatura de transición vítrea.

3.3. 5. Análisis Dinámico Mecánico (DMA)

Los módulos de almacenamiento medidos que están representados en la figura 3.10, muestran como aquellas muestras con componente cerámico presentan un mayor modulo de almacenamiento que aquellas exclusivamente poliméricas. La variación del módulo de A1 a B1 es del 68% a 100°C, una vez eliminada el agua adsorbida. Y de 30% de B1 a C1. El modulo de almacenamiento de B1 aumenta con la temperatura hasta los 212 °C mientras el modulo de almacenamiento de C1 permanece estable.

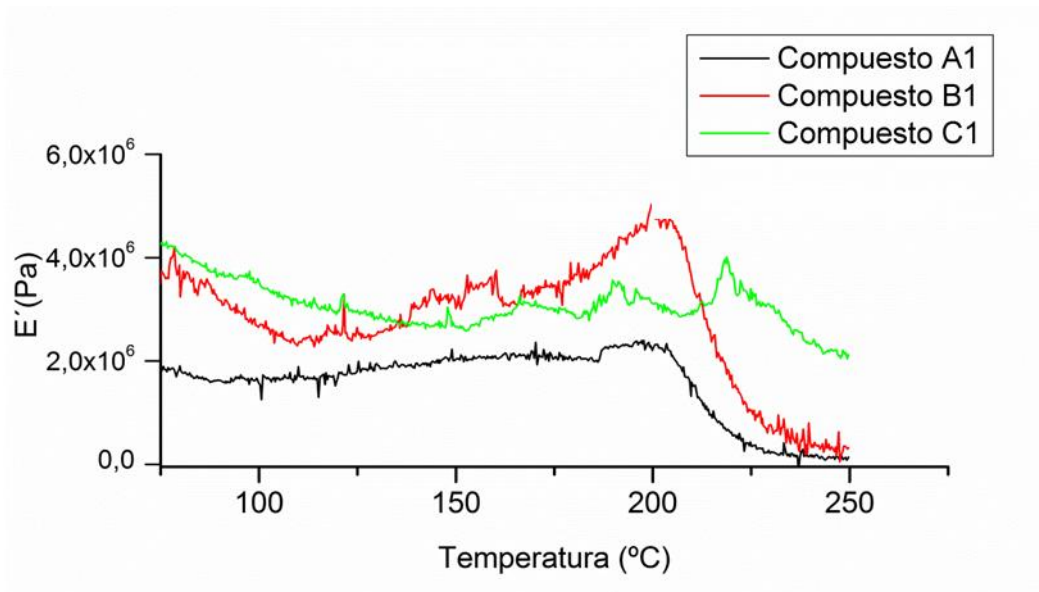


Figura 3.10. Módulos de almacenamiento de los compuestos estudiados

En el caso de las gráficas correspondientes a la representación de la tan delta Figura 3.11, se observa la misma tendencia en las muestras A1 y B1, siendo la gráfica correspondiente al espécimen C1 distinta ya que no presenta pico de transición vítrea. La transición vítrea en A1 y B1 se produce a 216°C :

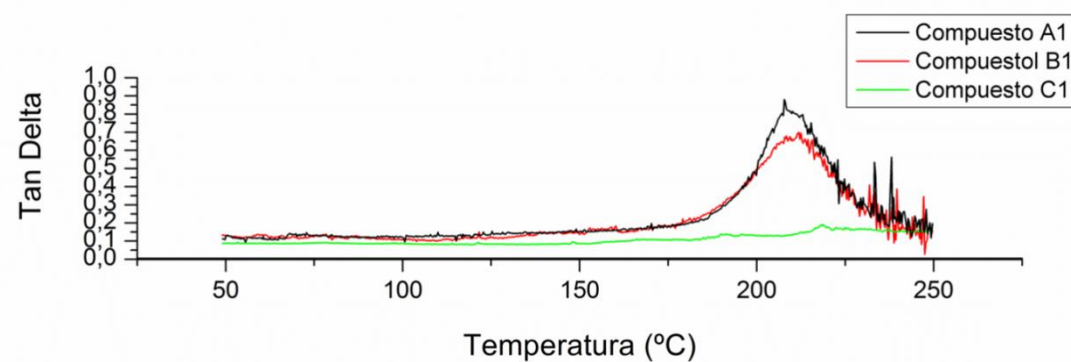


Figura 3.11. Gráfica de tan delta de cada uno de los compuestos estudiados.

Los resultados obtenidos informan de la no homogeneidad de las muestras ensayadas, las graficas obtenidas de cada uno de ellos presentan variaciones (Diferencias en los valores de $\tan \delta$), debidas a la heterogeneidad de las muestras analizadas, el dato mas importante extraído de los resultados obtenidos es la presencia del pico en la $\tan \delta$, que se produce en todas las muestras a la misma temperatura (216°C) lo cual permite confirmar que la composición del material, las características intrínsecas del mismo, en todas las muestras, son siempre las mismas, las variaciones existentes entre unas graficas y otras están relacionadas con las propiedades físicas de las muestras (porosidad, dispersión del componente cerámico, humedad de las muestras..) pero no con la composición química de las mismas. Se observa una disminución de la intensidad con el aumento de proporción de hidroxiapatita. Esto se puede atribuir, a la no relajación de parte de la masa polimérica [26]. Cuando se aumenta la cantidad de componente cerámico, se reduce la movilidad de los segmentos poliméricos. Su capacidad de reorganización se ve reducida, el compuesto se vuelve más rígido con la presencia de hidroxiapatita.

En resumen, los resultados obtenidos indicarían que lo que se obtiene es un composite aglomerado. Las interacciones partículas cerámicas con la matriz polimérica, no tiene lugar a nivel atómico o molecular. Las partículas inorgánicas, restringen los movimientos de la matriz y soportan parte importante de la fuerza que se ejerce sobre ellas. La efectividad mejora con la cohesión matriz-partícula que se establezca. Esto explica la desaparición del pico de T_g en los composites con un 30% de componente cerámico.

3.3. 6. Densidad/porosidad

Los datos obtenidos tanto de las medidas de densidad real realizadas con el picnómetro de helio y de densidad aparente obtenidas de la aplicación del método de Arquímedes se recogen en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Densidades reales y aparentes, con los porcentajes de densidad y porosidad de cada una de las muestras estudiadas.

MUESTR A	VELOCIDAD DE ENFRIAMIENT O (°C/min)	DENSIDAD REAL (picnómetro)	DENSIDAD APARENTE (Arquímedes)	% DENSIDA D	% POROSIDA D
SIN HIDROXIAPATITA					
A1	0.9	1,16(1)	0,36(<1)	30(1)	70(1)
A2	0.4	1,16(1)	0,29<1	25(1)	75(1)
A3	0.2	1,16(1)	0,23<1	20(1)	80(1)
15% HIDROXIAPATITA					
B1	0.9	1,34(2)	0,36<1	27(2)	73(2)
B2	0.4	1,34(2)	0,34<1	25(2)	80(2)
B3	0.2	1,34(2)	0,16<1	12(2)	88(2)
30% HIDROXIAPATITA					
C1	0.9	2,22(8)	1,22(1)	55(8)	45(8)
C2	0.4	2,22(8)	1,07(1)	49(8)	51(8)
C3	0.2	2,22(8)	0,89<1	40(8)	60(8)

Como se observa en la tabla, se obtiene una variación de la porosidad cuando se varían la velocidad de enfriamiento. Para la misma composición se obtiene un mayor porcentaje de porosidad cuando se utiliza una menor velocidad de enfriamiento. Estos datos se pueden apreciar en la grafica 3.12.

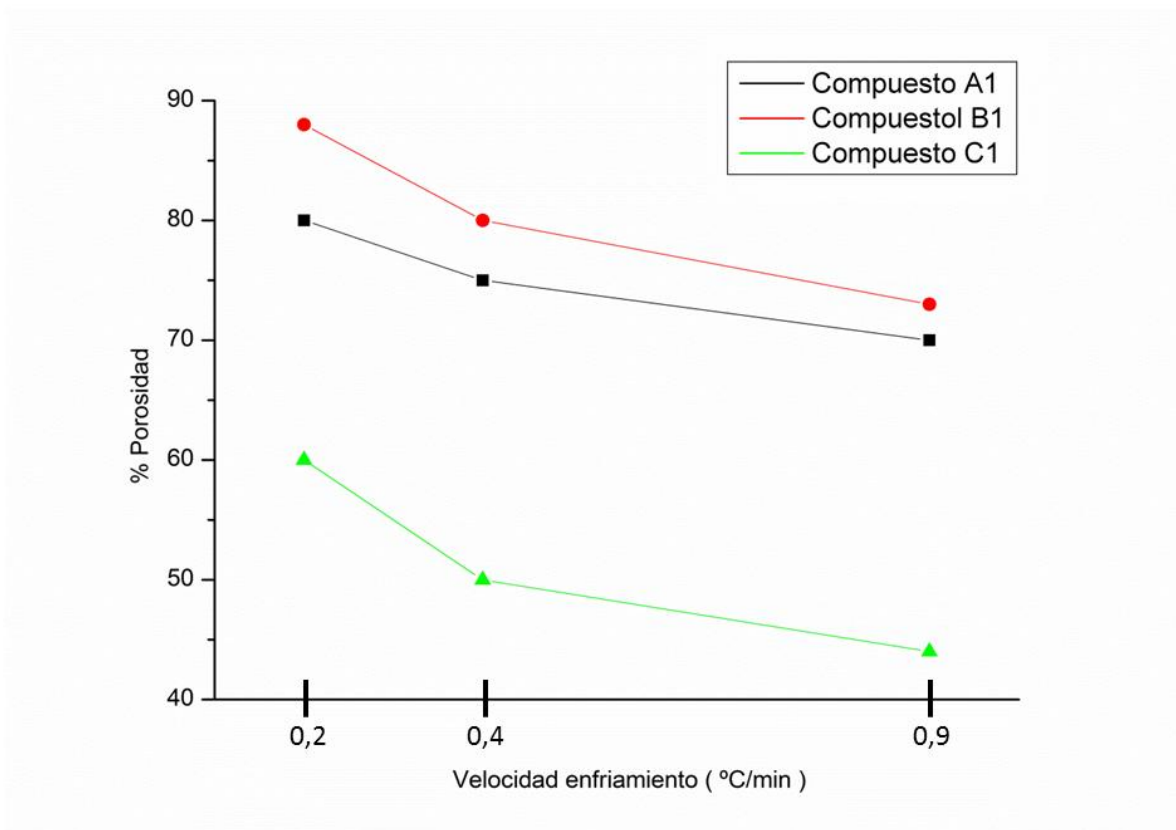


Figura 3.12. Porcentaje de porosidad de cada una de las muestras frente a las distintas velocidades de enfriamiento estudiadas.

En la tabla 3.4 también se puede apreciar como para cada velocidad de enfriamiento, se obtienen una variación de la porosidad en función de la composición. Siendo, en todos los casos dicha porosidad mayor en aquellas composiciones con un 15 % de componente cerámico, llegando hasta un 88 % de porosidad, en las muestras sometidas a la menor velocidad de enfriamiento. Esto puede apreciarse en la figura 3.13.

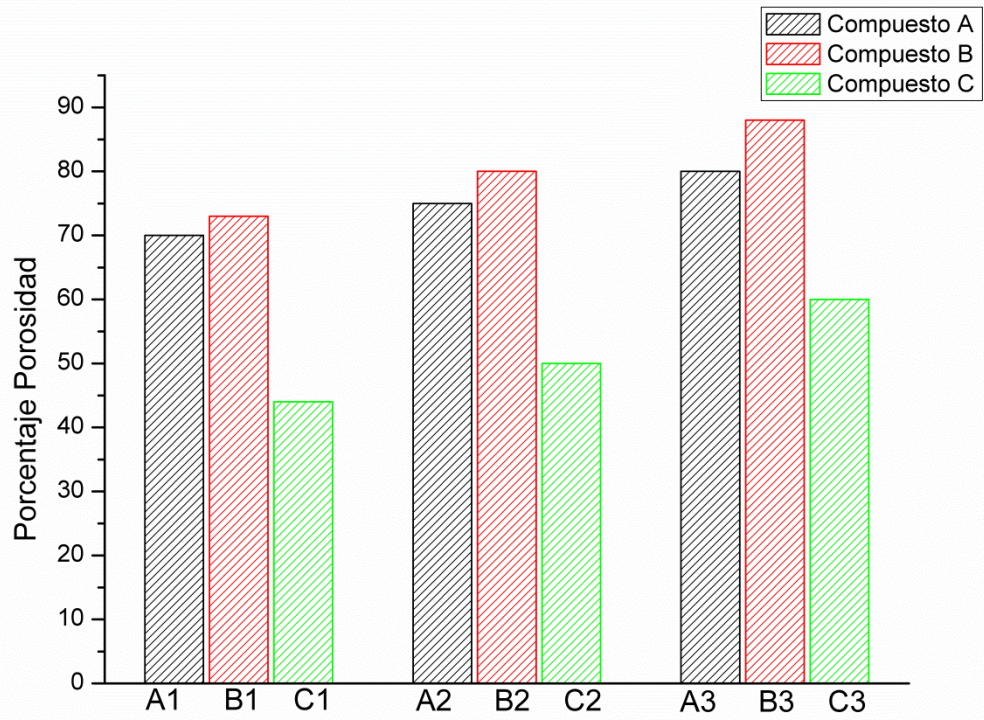


Figura 3.13. Porcentaje de porosidad de todas las muestras estudiadas.

3.3. 7. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La morfología de los poros de los especímenes preparados se analizó mediante microscopia electrónica de barrido (SEM). Las micrografías de las superficies de fractura obtenidas se muestran en las figuras 3.14 y 3.15.

En la figura 3.14, en la imagen del compuesto A1 se observa una estructura porosa, que presenta tamaños de poro de hasta 70 micrómetros. Los poros están interconectados, y se observan interconexiones entre 15 y 40 micrómetros. El grosor de las paredes que separan los poros es pequeño, de aproximadamente un micrómetro, se aprecia como en algunas partes de la muestra el poro está quebrado, esto se puede atribuir a la preparación de la muestra para su observación.

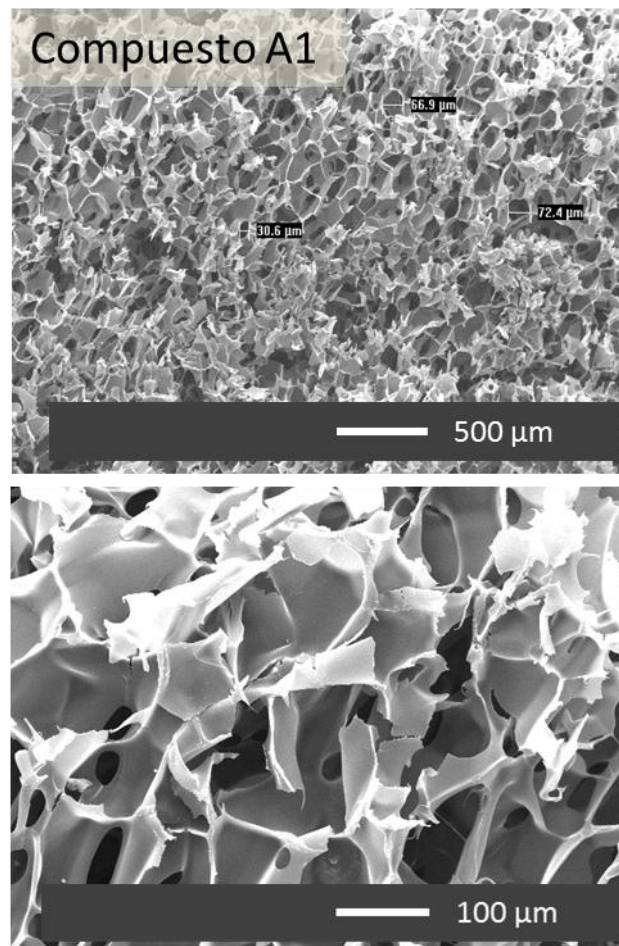


Figura 3. 14. Micrografías de la superficie de fractura en A1.

En la imagen 3.15 se observa el compuesto C1, Se puede apreciar una estructura también porosa, con numerosas interconexiones en el rango de 18 a 25 micrómetros. También se encuentran otros poros con mayor tamaño, de hasta 100 micrómetros dentro de los cuales se aprecian otros de menor tamaño, aproximadamente de unos 60 micrómetros. En esta muestra se puede observar la hidroxiapatita como agregados por toda la muestra. La distribución de la misma es homogénea cubriendo las paredes de la estructura, no aparece ocluyendo los poros.

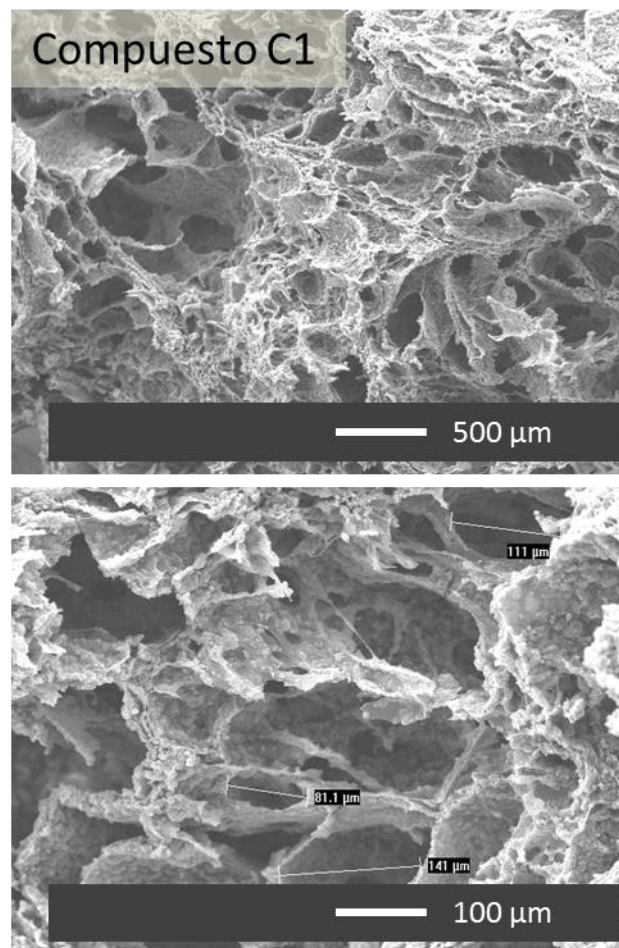


Figura 3.15. Micrografías del compuesto C1.

En la Figura 3.16 se comparan las micrografías obtenidas cuando se varía la velocidad de enfriamiento al que se sometió a las muestras después de la polimerización.

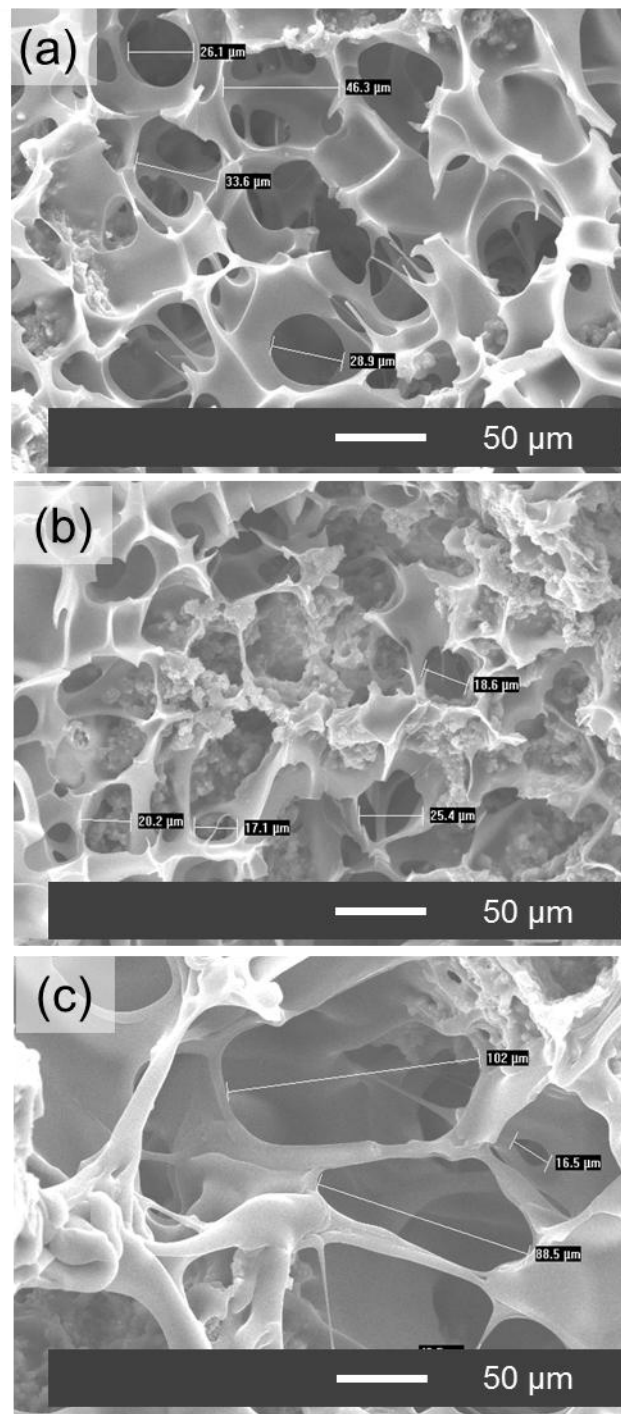


Figura 3.16. (a) B1 (Velocidad de enfriamiento (0.9 °C/min), (b) B2 (0.4 °C/min), (c) B3 (0.2 °C/min).

En la imagen de B1 se observa un sistema poroso con gran cantidad de poros, dichos poros presentan un tamaño que va desde unos 11 micrómetros hasta los 27 micrómetros. Las paredes de los poros presentan un grosor de aproximadamente 5 micrómetros.

En la muestra B2, el tamaño de poro que aparece esta en un rango mayor que en A1. Entre 20 y 60 micrómetros. Se observa también mayor variabilidad en los tamaños de los poros de la estructura. Muchos de los poros presentan las paredes rotas, como quebradas, esto se atribuye a la preparación de la muestra para su observación en microscopía. Los poros están interconectados y se pueden observar los poros más internos. Las paredes de los poros presentan un grosor de unos 2 micrómetros.

En la figura 10(c) que corresponde al compuesto B3, se pueden encontrar una estructura porosa, en el que el tamaño de poro se sitúa aproximadamente entre los 90 y 100 micrómetros. Poros interconectados, con una pared de poro de aproximadamente unas 10 micrómetros.

En todas se observa la presencia de hidroxiapatita en distintas partes del sistema, pero no cubre totalmente el polímero.

No solo el control de la velocidad de enfriamiento ejerce un efecto sobre la porosidad de los andamios obtenidos, el porcentaje de componente inorgánico añadido también parece tener influencia. Como se observa en la figura 3.13, el andamio con mayor porcentaje de hidroxiapatita, presenta un menor porcentaje de porosidad, siendo las muestras con un 15% de componente cerámico el que presenta la mayor porosidad. Esto se explica por las interacciones que se establecen entre los componentes inorgánicos y orgánicos presentes en las muestras. En aquellos andamios que presentan una mayor proporción de hidroxiapatita, las partículas impiden la formación de poros de tamaño grande. En el caso de las muestras que presentan un 15% de componente cerámico, que son las que tienen una mayor proporción de porosidad. Esto podría deberse a la falta de integración de las partículas cerámicas con el polímero que permite una mayor adsorción de agua previa al proceso de congelación. Este efecto, sin embargo parece que se compensa en el caso de los composites con un 30% de hidroxiapatita con la mayor rigidez que este porcentaje de carga dota al composite que debe impedir la adsorción de una mayor proporción de agua.

3.3. 8. Estudios de hinchamiento.

Los resultados obtenidos de las pruebas de hinchamiento aparecen en la figura 3.12. Se observa como se produce un hinchamiento inicial cuando los compuestos entran en contacto con el medio, característico de los polímeros muy hidrofílicos, como es el caso de la polivinil pirrolidona. Dicho estado hinchado se mantiene constante, dentro de un rango, con el paso el tiempo. Se ha llegado hasta 31 días sin que una vez alcanzado el máximo de hinchamiento se produzcan variaciones significativas en el peso de los especímenes estudiados.

Se observan diferencias entre los distintos compuestos. Aquellos que no incorporan componente cerámico, compuesto A1, presentan un mayor grado de hinchamiento desde el primer día ($38\pm 5\%$), seguida de una pérdida de peso hasta el $26\pm 1\%$. En el compuesto con un 15% de hidroxiapatita, B1, se observa un hinchamiento menor y se necesita un mayor tiempo para alcanzar el valor máximo de hinchamiento, $42\pm 7\%$ a los 6 días aunque no se observa degradación posterior,

Por el contrario en el caso del compuesto con un 30% de componente cerámico, C1. Se produce un hinchamiento mucho menor de hasta el $12\pm 4\%$ y constante en el tiempo. No se aprecian cambios significativos.

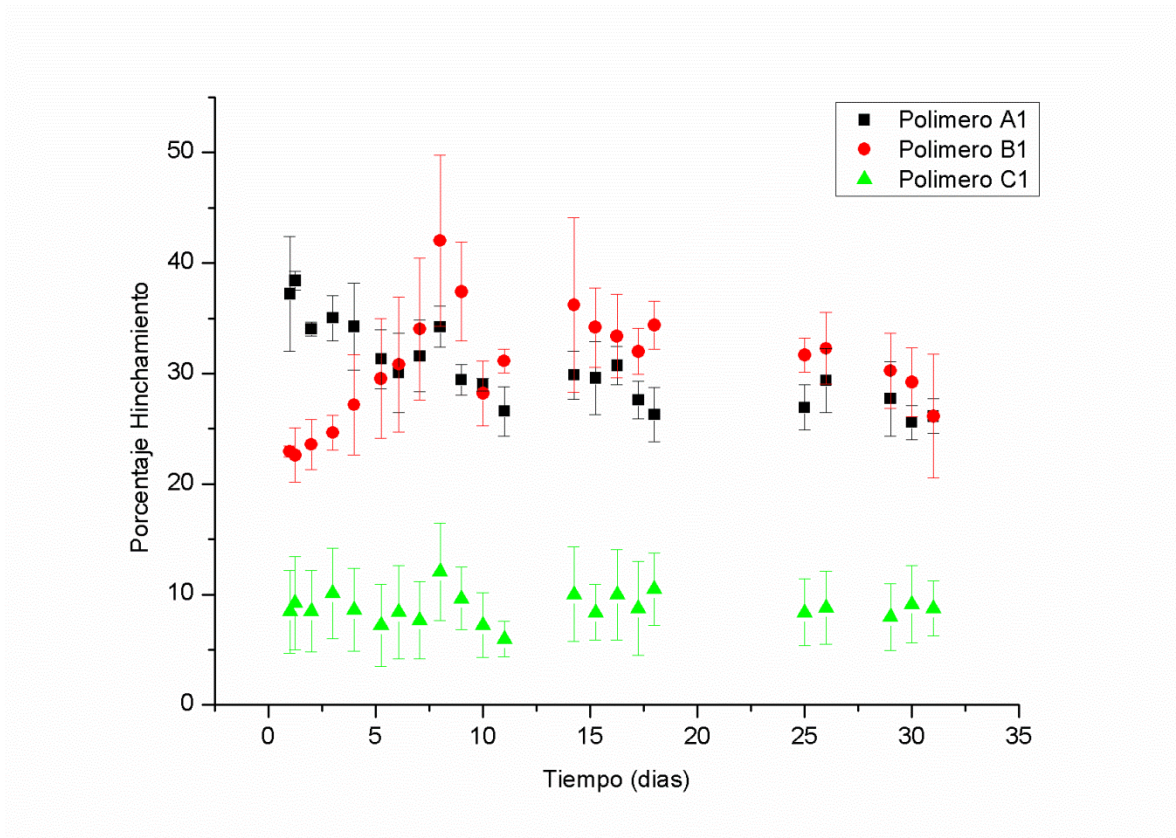


Figura 3.17. Representación hinchamiento, porcentaje hinchamiento en función del peso de cada una de las muestras estudiadas frente al tiempo.

La presencia de una mayor cantidad de componente cerámico, limita la capacidad del compuesto para adsorber agua y aumenta la estabilidad de las muestras.

3.4.DISCUSIÓN

La liofilización, es una técnica comúnmente empleada para preparar compuestos porosos. Se basa en la eliminación de disolventes por separación de fases. Se congela la solución, con la formación de una red de cristales de hielo. A continuación dichos cristales son eliminados por sublimación dando lugar a la formación de un andamio poroso que replica la estructura de los cristales de hielo [27]. El proceso de congelación es un paso determinante en la formación de los poros que se van a obtener, la nucleación es la etapa fundamental y limitante del proceso, seguida del crecimiento de los cristales [28].

La velocidad de enfriamiento es un factor importante en el proceso de congelación, influye directamente en la formación de poros en los biomateriales, tiene particular efecto en la mayor o menor formación de núcleos de hielo y la velocidad de crecimiento de estos cristales de hielo, rampas rápidas dan lugar a la formación de gran cantidad de pequeños núcleos, mientras que rampas lentas producen cristales de mayor tamaño [29]. En las imágenes de SEM, se puede apreciar como el tamaño de poro de los andamios se ve influido directamente por las condiciones de congelación. Se observa como los tamaños de poro son más grandes con rampas más lentas de temperatura. A una velocidad de 0.2 °C/ el tamaño de los poros es del orden de las 100 micrómetros, mientras que a una velocidad de 0.9 °C/min es de 20 micrómetros. Esto se explica por el mayor tiempo de cristalización disponible. Los núcleos de cristalización son los mismos, pero cuanto mayor es el tiempo que transcurre hasta alcanzar el punto de congelación, mayor es el crecimiento de los núcleos de cristalización. Esto permite que se produzca la unión de varios de estos núcleos dando lugar a la formación de cristales de mayor tamaño. Los cuales cuando son sometidos a sublimación dejan un poro mayor que aquellos cristales que no han podido crecer y fusionarse como consecuencia de una velocidad de congelación mucho mayor.

En los biomateriales para regeneración ósea es necesaria la presencia de poros [30, 31]. La presencia de estos poros permite la infiltración celular en el interior del material, el intercambio iónico con el medio, así como la adhesión, diferenciación y proliferación de células que formaran el nuevo hueso [32].

El mínimo tamaño de poro, como ya se ha mencionado, para regeneración ósea es de unas 100 micrómetros, a partir de este tamaño de poro se observa una diferenciación celular hacia la formación de hueso. Con tamaños de poro de 300-400 micrómetros se

observa la aparición de capilares que favorecen el crecimiento celular [33], sin embargo aunque los implantes con poros de 300 micrómetros presenten una formación de hueso mayor, aquellos con 200 micrómetros presenta una mayor osteointegración. [34]. Además, no solo influye el tamaño de poro, sino la forma del mismo. Poros largos y estrechos impiden la penetración de células mesenquimales al interior del implante así como la formación de capilares, lo que se traduce en la formación de hueso nuevo solo en la parte superficial del mismo [35].

El tamaño del poro adecuado para un biomaterial cuya aplicación va a ser la regeneración de tejido óseo-cartilaginoso depende del tipo de hueso-cartílago que se quiere sustituir y remplazar, así pues poros grandes favorecen la osteogénesis, ya que permiten vascularización y alta oxigenación, mientras que poros pequeños favorecen la osificación osteocondral, mayor actividad de la fosfatasa alcalina y expresión de la osteocalcina [17].

Controlando el tamaño de poro que se obtiene podremos adecuar el biomaterial a la zona del organismo donde va a ser implantada, intentando favorecer al máximo la adhesión, diferenciación y proliferación celular dentro del implante, para así asegurar la biocompatibilidad de nuestro material.

De los datos de porosidad, se observa como en las muestras con mayor componente cerámico se obtienen los menores porcentajes de porosidad, en todas las condiciones estudiadas. Esto se explica por la interacción que se establece entre el agua y la hidroxiapatita, que impide que quede agua libre para evaporarse y actuar como porógeno.

3. 5. ESTUDIOS CELULARES

3.5.1. Introducción

Con los resultados de la caracterización de los andamios preparados, Se eligieron aquellos con la mayor proporción de componente cerámico, 30%, y se estudiaron los andamios con distintas porosidad

La fosfatasa alcalina es un indicador precoz de la diferenciación osteoblástica y juega un papel importante en la mineralización de la matriz extracelular. Se llevaron a cabo distintos estudios para determinar la respuesta células in vitro de aquellos andamios, que por sus características reúnen las propiedades adecuadas para ser utilizados en ingeniería de tejido óseo.

Se llevaron a cabo distintos estudios que determinan la citotoxicidades de las muestras estudiadas, el comportamiento celular, morfología de las células en contacto con las materiales y se llevo a acabo un estudio de diferenciación basado en la determinación de la fosfatasa alcalina.

La función de la fosfatasa alcalina es hidrolizar el fósforo orgánico y liberar fósforo inorgánico para la formación de la hidroxiapatita del hueso. Este enzima es indispensable para la formación del hueso, y su secreción o actividad indica la formación de hueso o el inicio de la etapa de diferenciación.

Los ensayos de citotoxicidad se describen en la Norma UNE-EN ISO 10993-5 2009

3.5.2 Reactivos, cultivos celulares y muestras celulares

Como control negativo (no citotóxico) se utilizan discos Thermanox™ (TMX), suministrados por Labclinics y como control positivo una disolución acuosa de agua oxigenada (20mM).



Figura 3.18. Osteoblastos humanos en cultivo (subcultivo 5) transcurridas 24 h desde su siembra, bajo microscopio invertido de contraste de fases (Nikon ECLIPSE TS100; 200x)

El material plástico es suministrado por Sarstedt. Los medios de cultivo, aditivos, tripsina, tampón salino fosfato (PBS) y el bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) proceden de Sigma. La línea celular empleada son osteoblastos humanos (HOB; Pharmakine DPK-BOBC-H) cultivados a 37° C en una atmósfera con un 5% de CO₂.

El medio de cultivo utilizado para los osteoblastos es una mezcla 1:1 de Medio Modificado de Eagle-Dulbecco y solución nutritiva de Ham F-12 (DMEM/F12 HAM) modificada con HEPES (Sigma), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB; Gibco) y un 1% de una disolución de penicilina estreptomina (10000 U/ml penicilina y 10 mg/ml estreptomina; Sigma).

Los osteoblastos empleados en los distintos ensayos se encuentran entre los subcultivos 4 y 11. Cada pase se realiza antes de alcanzar el 90% de la confluencia, transcurrido un periodo de entre 3 y 4 días después de realizar la siembra, utilizando una disolución de tripsina (0,5 g/l) y ácido etilendiaminotetracético (EDTA; 0,2 g/l) en una solución salina balanceada de Hank (Sigma), para liberar las uniones intercelulares y las de las células con la superficie de cultivo.

Las muestras fueron esterilizadas con radiación gamma, a una dosis superficial de 25KGy. Se llevaron a cabo mapas de Dosis acorde a la ISO 11137.

3.5.3. Métodos

- Cuantificar la citotoxicidad de los productos liberados en medio de cultivo (eluyentes) por los sistemas estudiados durante un periodo de 7-14 días, mediante la utilización del reactivo MTT [36]).
- Analizar la viabilidad celular y la adhesión en cultivos establecidos sobre la superficie de las formulaciones estudiadas mediante su análisis bajo microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Determinar la actividad de la enzima alcalina fosfatasa, ALP.

3.5.3.1. Ensayo de citotoxicidad:

El reactivo, es una sal de tetrazolio que puede ser absorbida activamente por las células cultivadas y reducida en una reacción dependiente de la actividad mitocondrial, generando formazán y virando su color. Este producto se acumula en el interior de las células, ya que no es capaz de atravesar la membrana celular. Tras la adición de un disolvente, como el dimetilsulfóxido (DMSO), los cristales de formazán formados se disuelven, pudiendo cuantificar colorimétricamente la intensidad.

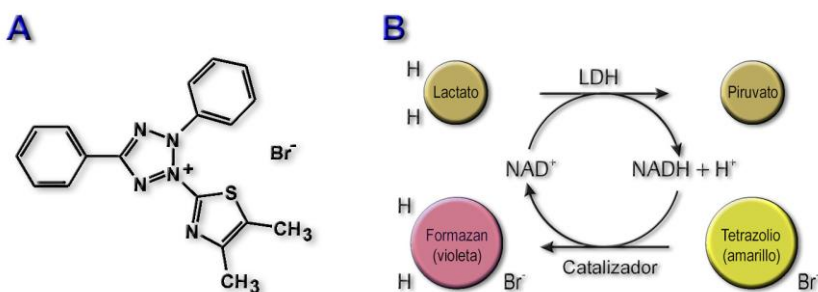


Figura 3.19. (a) Estructura química del reactivo MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio], (B) mecanismo de acción del reactivo.

En nuestro caso utilizamos este ensayo para estudiar el efecto de los productos que el biomaterial pueda liberar cuando está en contacto con medio de cultivo fresco (productos de degradación, monómero residual, etc.).

El protocolo a seguir es el siguiente:

Se realiza la siembra de células, a una concentración de 9×10^4 células/ml, utilizando medio de cultivo completo fresco sobre placas de 96 pocillos. Tras 24 h de incubación a 37° C en una atmósfera con un 5% de CO₂, se extrae el medio, añadiendo en su lugar

100 μ l de los eluyentes obtenidos a los distintos tiempos incubando a continuación las muestras a 37° C-5% de CO₂ durante otras 24 h. Transcurrido ese tiempo, se retira el contenido de los pocillos, añadiendo en su lugar la disolución de trabajo en medio de cultivo libre de suero del reactivo MTT, a una concentración de 0,5 mg/ml, obtenida tras diluir al 10% la disolución madre de MTT en tampón fosfato (PBS) y filtrarla. El reactivo MTT se mantiene en contacto con los cultivos, de nuevo a 37° C y CO₂, durante 4 h, tras las que se extrae el contenido de los pocillos, para añadir en cada uno de ellos 100 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO), con el fin de disolver los cristales de formazán que se pudieran haber formado.

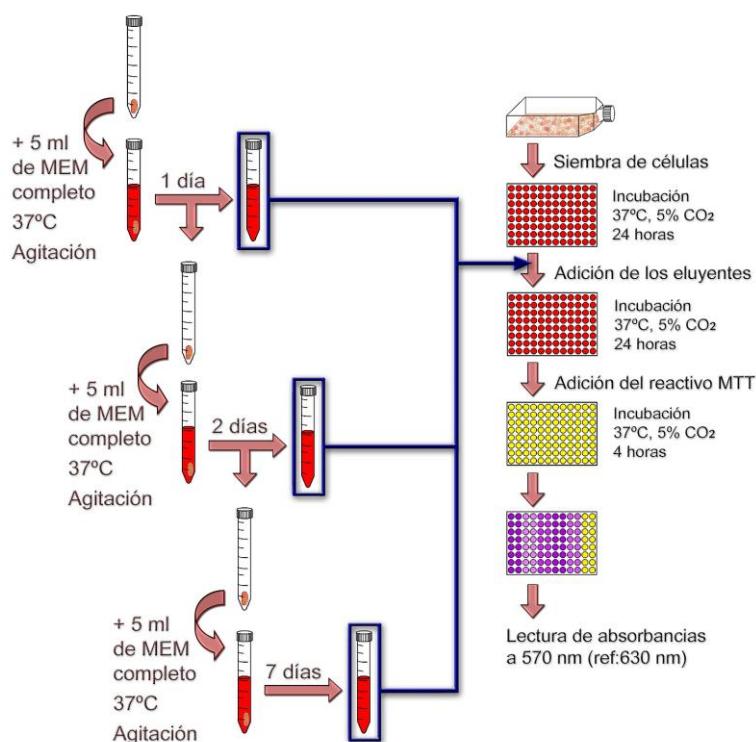


Figura 3.20. Esquema del protocolo seguido en los ensayos de citotoxicidad.

Después de mezclar el contenido de los pocillos mediante agitación, se mide la densidad óptica (DO) utilizando un detector Biotek Synergy HT, a una longitud de onda de 570 nm, y una longitud de onda de referencia de 630 nm.

Una vez realizada la lectura, la viabilidad celular relativa (%VR) se calcula aplicando la siguiente ecuación:

$$\% VR = ((DO_S - DO_B) / DO_C) * 100$$

Donde, DO_S , DO_B y DO_C son las medidas de densidad óptica de la muestra, el blanco (medio introducido en pocillos sin células) y el control, respectivamente.

A partir de los valores de viabilidad celular relativa se realizan una serie de análisis de la varianza (ANOVA), con el objetivo de detectar la existencia de diferencias significativas entre la distribución de los valores medidos para el control negativo y los obtenidos para los grupos experimentales estudiados.

3.5.3.2. Morfología celular y adhesión mediante Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Se lleva a cabo el estudio microscópico de los osteoblastos humanos sembrados y mantenidos, durante 24 y 48 h, sobre la superficie del control TMX y los cementos experimentales bajo microscopía electrónica de barrido (SEM).

Para completar este estudio se aplica el siguiente protocolo:

1. Siembra de células (n=2), utilizando medio de cultivo completo fresco, a una concentración adecuada (10^5 células/ml), sobre las muestras de las formulaciones estudiadas introducidas en placas de 24 pocillos (1 ml de concentrado de células/pocillo).
2. Incubación 24 y 48 h a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO_2 .
3. Extracción del medio de cultivo contenido en los pocillos, adicionando en su lugar 1 ml por pocillo de una disolución al 2,5% de glutaraldehído (Fluka) en agua destilada.
4. 4 h a temperatura ambiente en oscuridad (posteriormente las muestras se conservan en oscuridad a 4°C).
5. 2 lavados con agua destilada estéril.
6. Secado de las muestras a 37°C .
7. Metalizado de las muestras y observación bajo microscopio electrónico de barrido (Philips XL30) a una aceleración de voltaje de entre 15 y 20 KeV.

3.5.3.3. Ensayo de actividad de fosfatasa alcalina.

Las células HOB fueron cultivadas a una densidad de 8×10^4 células/ml sobre los materiales colocados en placa de 24 pocillos. Los materiales estuvieron en contacto con las células durante 5 y 8 días. Transcurridos estos tiempos se procedió a determinar la actividad de la fosfatasa alcalina (FA) [37].

La fosfatasa alcalina actúa sobre el p-nitrofenilfosfato (pNPP) dando lugar a pnitrofenol, el cual presenta color amarillo, que se puede cuantificar espectrofotométricamente a 405 nm.

Se incubaron por duplicado 50 μ l del medio en el que se mantuvieron las células con los materiales durante 5 y 8 días con 50 μ L del reactivo sustrato para esta enzima (SIGMA P7998), se agitó durante 2 minutos a 37°C y se midió la absorbancia a 405 nm a distintos tiempos (0, 1 y 5 minutos). Tras ese tiempo, se paró la reacción con 120 μ l de NaOH 3 N.

3.5.3. Resultados y discusión

De los **ensayos de citotoxicidad**, los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.21. Todas las formulaciones ensayadas muestran una viabilidad igual o superior al 70% en todos los tiempos. Esta viabilidad aumenta a medida que se van cambiando los medios por medios frescos en los tiempos marcados. Esto es más acusado para la muestra C1 que alcanza el 100% de viabilidad a los 14 días.

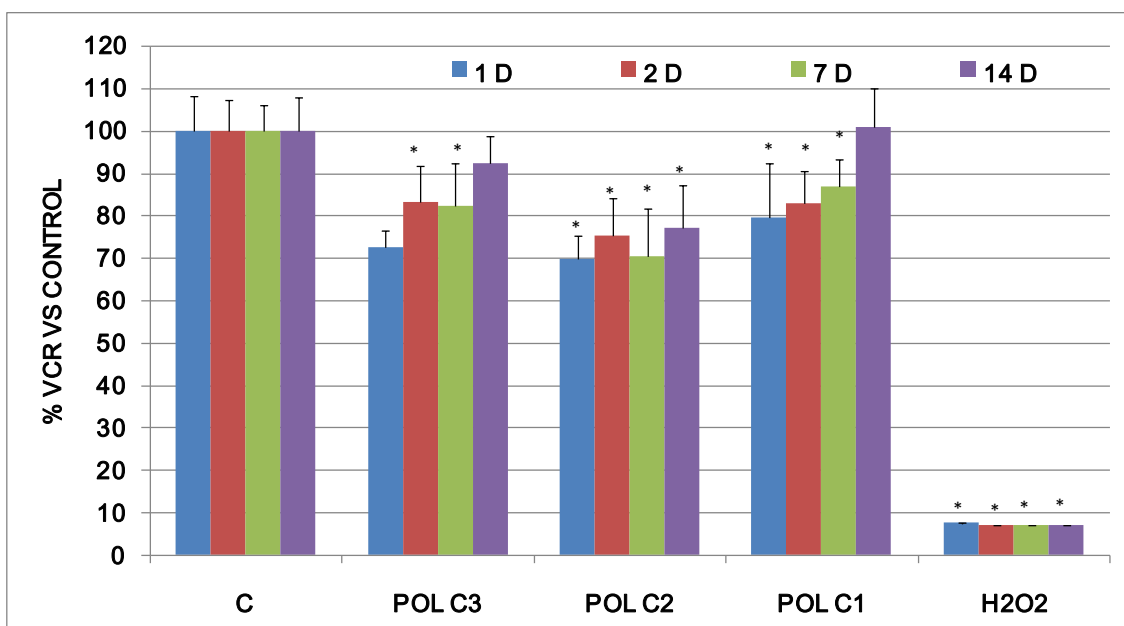


Figura 3.21. Resultados del ensayo MTT para los materiales ensayados. Se representa la media \pm desviación estándar (n= 8) y las diferencias significativas obtenidas con respecto al TMX: * p<0,05.

Todos los compuestos estudiados muestran una viabilidad celular igual o superior al 70%. Esto Basandonos en las normas de la ISO 10993-5:2009 indica que no son citotóxicos, y pueden ser utilizadas como biomateriales. Delas muestras estudiadas, el compuesto C1 es el que presenta una mayor biocompatibilidad.

La **morfología celular** y adhesión mediante fue determinada por microscopía electrónica de barrido (SEM). Como puede verse en la Figura xx, los cultivos sembrados sobre el control negativo TMX presentan osteoblastos perfectamente adheridos a su superficie tras 24 h. En las muestras mantenidas en cultivo durante 48 h el número de células es superior, lo que indica que bajo las condiciones empleadas en este estudio los cultivos se encuentran activos, y que las células que los componen han proliferado sobre la superficie de este control.

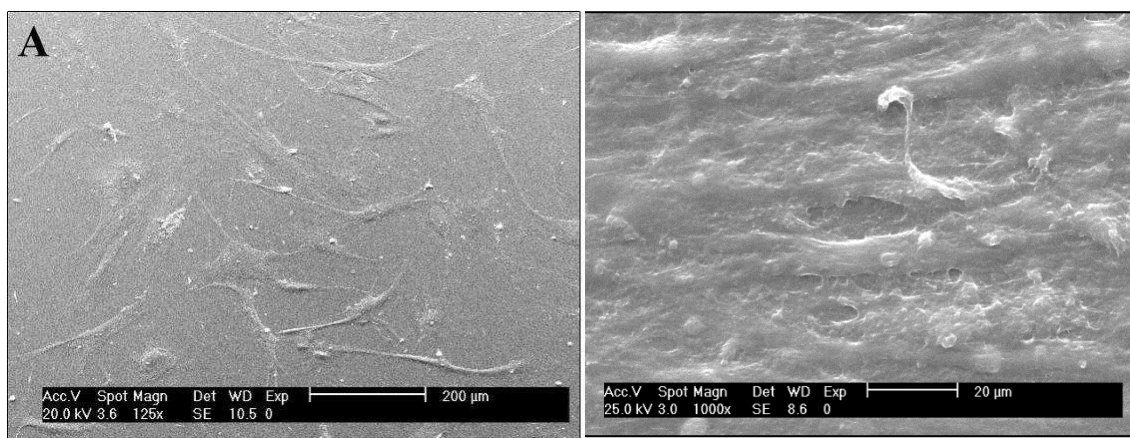


Figura 3.22. Osteoblastos humanos en cultivo bajo microscopio electrónico de barrido transcurridas 24 (A) y 48 h (B) desde su siembra sobre la superficie del control negativo TMX.

Como puede apreciarse en las siguientes micrografías de SEM., las células sembradas directamente sobre los materiales C1, C2 y C3 ensayados se presentan en un número bastante inferior en comparación al control tras 24h post siembra. La adhesión celular se ve muy disminuida, aunque podemos apreciar que las pocas células que se han fijado se adaptan a la rugosidad de la superficie y proliferan transcurridas 24 horas más (48h post siembra).

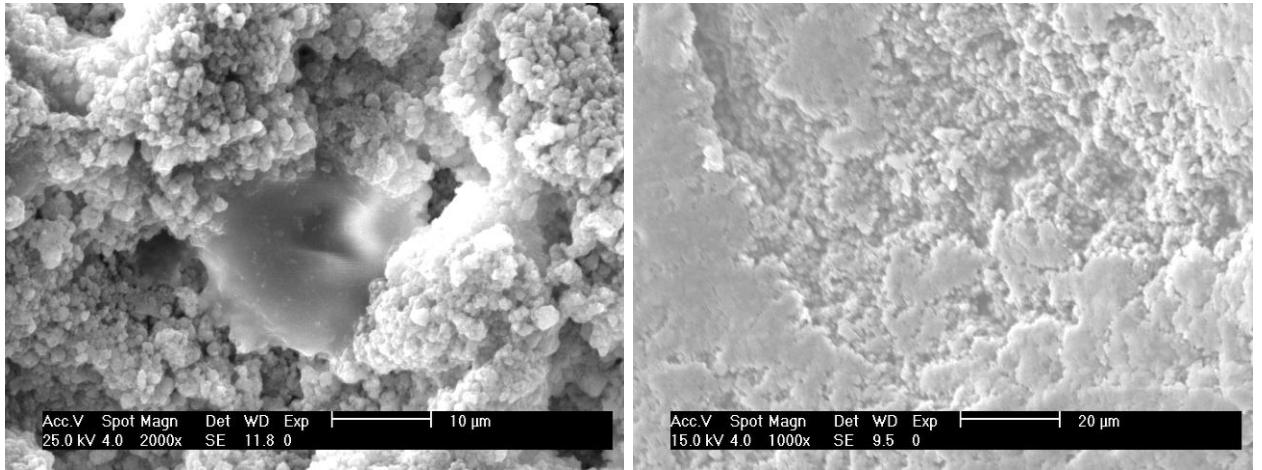


Figura 3.23. Osteoblastos humanos en cultivo bajo microscopio electrónico de barrido transcurridas 24 (A) y 48 h (B) desde su siembra sobre la superficie del compuesto C3.

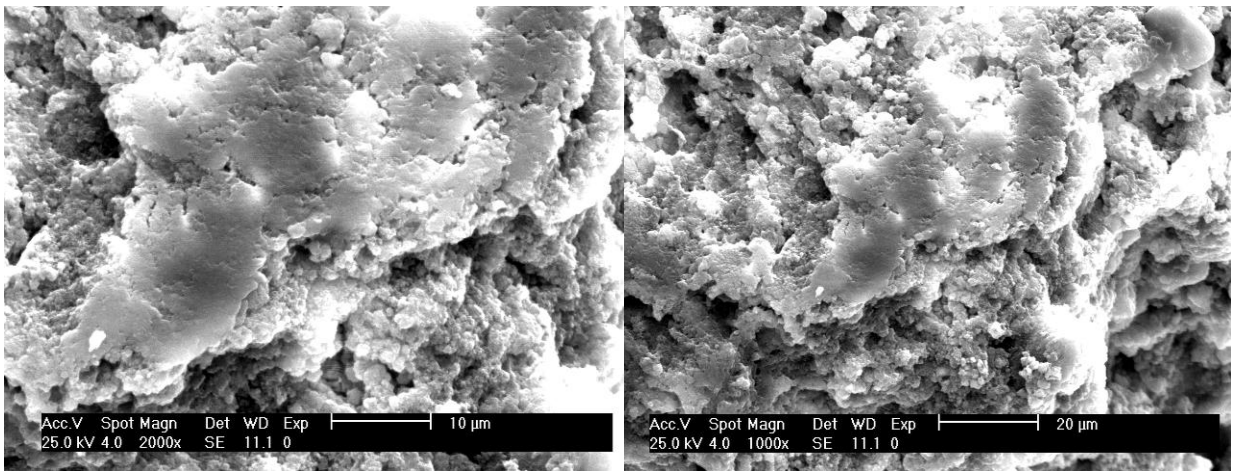


Figura 3.24. Osteoblastos humanos en cultivo bajo microscopio electrónico de barrido transcurridas 24 (A) y 48 h (B) desde su siembra sobre la superficie del compuesto C2.

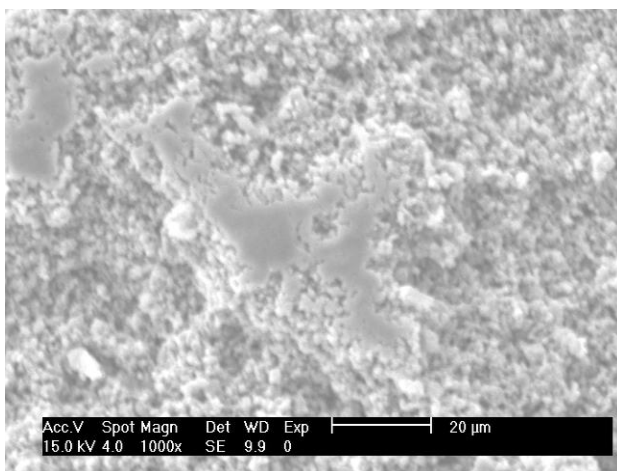


Figura 3.25. Osteoblastos humanos en cultivo bajo microscopio electrónico de barrido transcurridas 48 h desde su siembra sobre la superficie del compuesto C1.

De los resultados obtenidos por SEM, se observa que aunque a los materiales se fijan poca cantidad de células, aquellas que lo hacen, se mantienen vivas y en condiciones adecuadas durante el tiempo que duran los experimentos. De los andamios estudiados, el compuesto C1, a los dos días es el que muestra mayor cantidad de células adheridas.

De la **actividad de la fosfatasa alcalina**, Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.26. Donde se observa como la actividad de esta enzima se ve aumentada en presencia del compuesto C1, cuando los osteoblastos están en contacto con el material durante al menos 8 días. En el caso del compuesto C2 esta actividad se incrementa a los 5 días pero disminuye a los 8 días. Para el compuesto C3 no existe un aumento significativo de la actividad a ninguno de los tiempos ensayados.

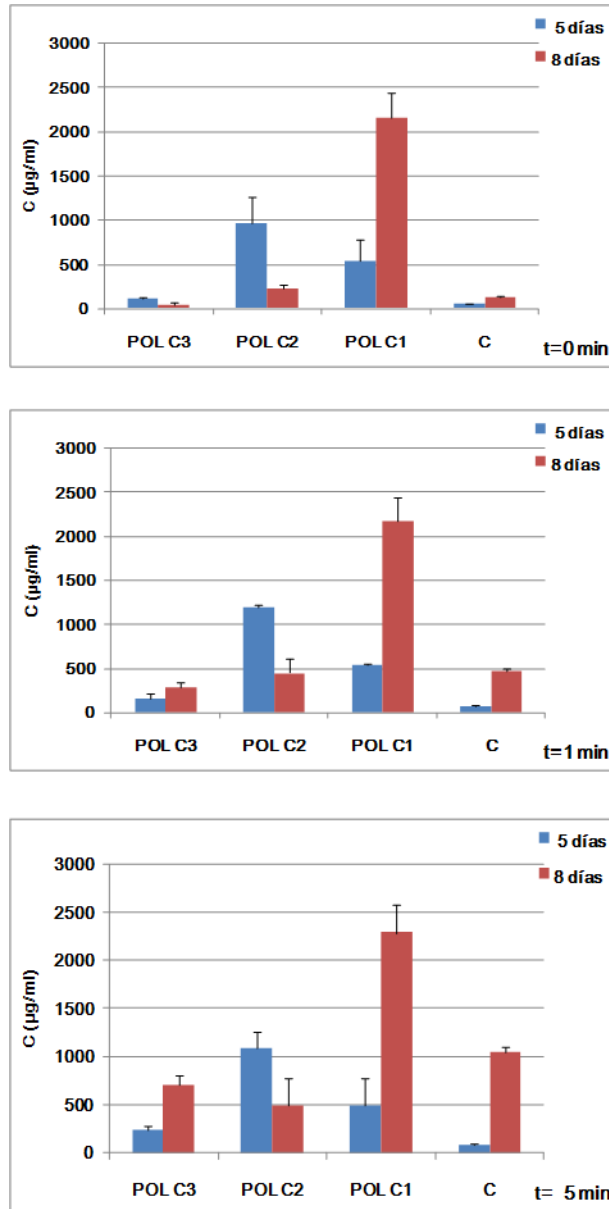


Figura 3.26. Resultados obtenidos en el ensayo de actividad de la fosfatasa alcalina. Se representan la media \pm ds (n=3) de μg por ml enzima medidos en los eluyentes obtenidos a 5 y 8 días.

De los resultados obtenidos, se observa como los compuestos C1, son los que presentan una mayor activación de la fosfatasa alcalina, lo que indica una mayor actividad osteoblástica, los osteoblastos están en condiciones adecuadas que les permite realizar

funciones de mineralización. Los compuestos C2, también producen una diferenciación osteoblásticas.

De las muestras estudiadas en cultivos celulares, aquellas con mayor tamaño de poro, C3, no han demostrado una mejor biocompatibilidad ni actividad osteoblástica, aun siendo las que cumplen de manera mas precisa con los requisitos de la ingeniería de tejido óseo para ser utilizada como andamio óseo. Los compuestos C1 y C2, presentan los resultados mas adecuados para esta aplicación.

3.5.4. Conclusiones

Por lo anteriormente expuesto concluimos que los andamios porosos preparados en este estudio son adecuados para la proliferación de osteoblastos. Los compuestos C1 y C2 son los que presentan una actividad osteoblásticas mayor.

Estudios celulares más completos deben de llevarse a cabo para poder determinar que compuestos son los más adecuados.

3.6. BIBLIOGRAFIA

1. Jansen, E.J.P., et al., *Hydrophobicity as a design criterion for polymer scaffolds in bone tissue engineering*. *Biomaterials*, 2005. **26**(21): p. 4423-4431.
2. Weiss, C.M., *A comparative analysis of fibro-osteal and osteal integration and other variables that affect long term bone maintenance around dental implants*. *The Journal of oral implantology*, 1987. **13**(3): p. 467-487.
3. Bauer, T.W. and S.T. Smith, *Bioactive materials in orthopaedic surgery: Overview and regulatory considerations*. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2002(395): p. 11-22.
4. Hasrc, V., et al., *Versatility of biodegradable biopolymers: Degradability and an in vivo application*. *Journal of Biotechnology*, 2001. **86**(2): p. 135-150.
5. Hayama, M., et al., *How polysulfone dialysis membranes containing polyvinylpyrrolidone achieve excellent biocompatibility?* *Journal of Membrane Science*, 2004. **234**(1-2): p. 41-49.
6. Killion, J.A., et al., *Mechanical properties and thermal behaviour of PEGDMA hydrogels for potential bone regeneration application*. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2011. **In Press, Corrected Proof**.
7. Li, Q., et al., *Synthesis and characterization of chitosan-based hydrogels*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009. **44**(2): p. 121-127.
8. Rinaudo, M., *Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials*. *Polymer International*, 2008. **57**(3): p. 397-430.
9. Fakhry, A., et al., *Chitosan supports the initial attachment and spreading of osteoblasts preferentially over fibroblasts*. *Biomaterials*, 2004. **25**(11): p. 2075-2079.
10. Muzzarelli, R.A.A., et al., *Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan*. *Biomaterials*, 1994. **15**(13): p. 1075-1081.
11. Bumgardner, J.D., et al., *The integration of chitosan-coated titanium in bone: An in vivo study in rabbits*. *Implant Dentistry*, 2007. **16**(1): p. 66-79.
12. Zhao, F., et al., *Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds*. *Biomaterials*, 2002. **23**(15): p. 3227-3234.
13. Guzmán-Morales, J., et al., *Effect of chitosan particles and dexamethasone on human bone marrow stromal cell osteogenesis and angiogenic factor secretion*. *Bone*, 2009. **45**(4): p. 617-626.

14. Dong, Z., Y. Li, and Q. Zou, *Degradation and biocompatibility of porous nano-hydroxyapatite/polyurethane composite scaffold for bone tissue engineering*. Applied Surface Science, 2009. **255**(12): p. 6087-6091.
15. Jayabalan, M., et al., *Effect of hydroxyapatite on the biodegradation and biomechanical stability of polyester nanocomposites for orthopaedic applications*. Acta Biomaterialia, 2010. **6**(3): p. 763-775.
16. Story, B.J., et al., *In Vivo Performance of a Modified CSTi Dental Implant Coating*. International Journal of Oral and Maxillofacial Implants, 1998. **13**(6): p. 749-757.
17. Karageorgiou, V. and D. Kaplan, *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis*. Biomaterials, 2005. **26**(27): p. 5474-5491.
18. Wei, G. and P.X. Ma, *Macroporous and nanofibrous polymer scaffolds and polymer/bone-like apatite composite scaffolds generated by sugar spheres*. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 2006. **78**(2): p. 306-315.
19. Fernandez-Montes, B., in *Biología Molecular 2011*, Universidad Complutense de Madrid: Madrid.
20. Converse, G.L., T.L. Conrad, and R.K. Roeder, *Mechanical properties of hydroxyapatite whisker reinforced polyetherketoneketone composite scaffolds*. J Mech Behav Biomed Mater, 2009. **2**(6): p. 627-35.
21. Kurtz, S.M. and J.N. Devine, *PEEK biomaterials in trauma, orthopedic, and spinal implants*. Biomaterials, 2007. **28**(32): p. 4845-69.
22. Vallet-Regi, M., L.M. Rodriguez-Lorenzo, and A.J. Salinas, *Synthesis and characterization of calcium deficient apatites*. Solid State Ionics, 1997. **101-103**: p. 1279-1285.
23. Mendes, L.C., R.C. Rodrigues, and E.P. Silva, *Thermal, structural and morphological assessment of PVP/HA composites*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2008. **101**(3): p. 899-905.
24. Turner, D.T. and A. Schwartz, *The glass transition temperature of poly(N-vinyl pyrrolidone) by differential scanning calorimetry*. Polymer, 1985. **26**(5): p. 757-762.
25. Roeder, R.K., et al., *Hydroxyapatite-reinforced polymer biocomposites for synthetic bone substitutes*. JOM, 2008. **60**(3): p. 38-45.
26. Chrissafis, K., et al., *Thermal and dynamic mechanical behavior of bionanocomposites: Fumed silica nanoparticles dispersed in poly(vinyl pyrrolidone), chitosan, and poly(vinyl alcohol)*. Journal of Applied Polymer Science, 2008. **110**(3): p. 1739-1749.
27. Zhao, K., et al., *Porous hydroxyapatite ceramics by ice templating: Freezing characteristics and mechanical properties*. Ceramics International, 2011. **37**(2): p. 635-639.

28. Li, F.F. and J. Liu, *Characterization of micro-/nano-scale Ice crystal formation in cryo-biomedical engineering: A review*. Journal of Computational and Theoretical Nanoscience, 2010. **7**(1): p. 85-96.
29. Lombrana, J.I. and C. Urrutia, *Porous matrix properties of freeze dried products as induced by their thermal history during freezing*. Vacuum, 1989. **39**(7-8): p. 851-854.
30. Kuboki, Y., et al., *BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: Topology of osteogenesis*. Journal of Biomedical Materials Research, 1998. **39**(2): p. 190-199.
31. Harvey, E.J., et al., *Effect of flexibility of the femoral stem on bone-remodeling and fixation of the stem in a canine total hip arthroplasty model without cement*. Journal of Bone and Joint Surgery - Series A, 1999. **81**(1): p. 93-107.
32. Simon, J.L., et al., *Engineered cellular response to scaffold architecture in a rabbit trephine defect*. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 2003. **66**(2): p. 275-282.
33. Kuboki, Y., Q. Jin, and H. Takita, *Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis*. Journal of Bone and Joint Surgery - Series A, 2001. **83 A Suppl 1**(Pt 2): p. S105-115.
34. Gotz, H.E., et al., *Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants*. Biomaterials, 2004. **25**(18): p. 4057-4064.
35. Jin, Q.M., et al., *Effects of geometry of hydroxyapatite as a cell substratum in BMP-induced ectopic bone formation*. Journal of Biomedical Materials Research, 2000. **52**(4): p. 491-499.
36. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
37. Oreffo, R.O., et al., *Patients with primary osteoarthritis show no change with ageing in the number of osteogenic precursors*. Scand J Rheumatol, 1998. **27**(6): p. 415-24.

CONCLUSIONES

- Se pueden modificar las características superficiales de la hidroxiapatita mediante la adición de ácido acrílico durante el proceso de síntesis.
 - La introducción de ácido acrílico durante la síntesis de hidroxiapatita permite obtener materiales con menor superficie específica y mayor relación de aspecto.
- Se observa un aumento de la adsorción de proteínas por parte de la hidroxiapatita cuando existen más proteínas disponibles en el medio.
- No existe un único parámetro superficial que determine la cantidad de proteínas adsorbidas.
 - Hidroxiapatitas con una combinación de gran superficie específica y pequeño tamaño de cristal favorecen la adsorción de fibrinógeno y fibronectina. El tamaño de partícula ejerce un papel modulador de la adsorción.
- Para las mismas concentraciones en el medio, el fibrinógeno se adsorbe en mayor cantidad que la fibronectina. La fibronectina se adsorbe con los dominios Arginina-Glicina-Ácido Aspártico (RGD) disponibles para su interacción biológica solo cuando es adsorbida en pequeñas cantidades.
- La adsorción de albúmina solo se puede controlar para concentraciones menores a 100µg/ml en el medio.
- La adsorción de colágeno puede ser controlado mediante el control de la concentración de proteínas en el medio y diseñando materiales con determinadas características superficiales. Para aplicaciones que requieran altas concentraciones de colágeno, adsorbido, materiales con alta superficie específica y pequeño tamaño de cristal serían los óptimos.
- La microbalanza de cuarzo, es una técnica con una gran utilidad en la caracterización de la interacción de materiales con biomoléculas.
- La hidroxiapatita sintetizada en presencia de ácido acrílico (OHAp-aa) es la que presenta la mayor adsorción de fibrinógeno y fibronectina en conformación "end-on" y aunque no es la muestra que adsorbe más albúmina y colágeno si se

observa una alta adsorción de estas proteínas. OHAP-aa ha sido, por tanto, seleccionada para incorporarla en los andamios porosos tridimensionales.

- Se han preparado andamios tridimensionales porosos basados en sistemas poliméricos sin y con refuerzo de hidroxiapatita. Se puede modular la porosidad en los andamios variando la velocidad de enfriamiento previa al proceso de liofilización.
- La incorporación de hidroxiapatita mejora las propiedades mecánicas de los andamios para su utilización en regeneración ósea. Aquellos con un 30% en peso en el componente cerámico presentan las mejores características para ello.
- Los estudios celulares realizados en los andamios que resultaron más prometedores para su utilización en regeneración ósea mostraron ser no citotóxicos y presentar una alta actividad osteoblástica.

CONCLUSIONS

- Hydroxyapatite with different characteristics can be obtained with the addition of acrylic acid to the reactant solutions. A lower specific surface area and a different aspect ratio are obtained when the acrylic acid is included in the reaction badge.
- An increase in the protein adsorption can be correlated with an increase in the content of protein in solution.
- Protein adsorption on hydroxyapatite is not determined by a single parameter.
 - Hydroxyapatites with a combination of large specific surface area and a small crystallite size favor the adsorption of Fibrinogen and Fibronectin whereas the particle size plays a modifying role.
- For the same availability, Fibrinogen adsorbs in a greater quantity than Fibronectin. Fibronectin would be adsorbed in a bioactive mode with the Arginine-Glycine-Aspartic acid (RGD) domains available only for a low coverage.
- For albumin, concentrations values lower than 100µg/ml in the media are required to tailoring the quantities adsorbed.
- Collagen adsorption can be controlled at the physiological concentration by designing the features of the material to be implanted. For applications which

require the adsorption of high quantities of collagen, samples with a high surface specific area and a small crystal size would be preferred.

- A combined analysis of the different parameters is necessary to design materials intended for protein interaction.
- The quartz microbalance, QCM-D is a useful tool to characterize interactions that occurs between materials and biomolecules.
- The amount of Fibrinogen and Fibronectin adsorbed in the active conformation *end-on* is greater for the Hydroxyapatite synthesized in presence of acrylic acid than in the other samples analysed. The adsorption of Albumin and Collagen is also high. Thus, OHAP-aa has been selected as the inorganic component in the preparation of tridimensional scaffolds.
- Porous 3D scaffolds based on polymer systems, hydroxyapatite-free and hydroxyapatite loaded, have been prepared. The porosity can be modulated by varying the cooling rate in the freezing step previous to the freeze-drying process.
- The incorporation of hydroxyapatite enhances the mechanical properties of the scaffolds with potential for their use in bone regeneration. Those with a 30% weight load exhibit the best features for this purpose.
- Cell studies performed on the scaffolds that had shown a greater potential for bone regeneration have shown that the scaffolds were non cytotoxic and they bore a high osteoblastic activity.

APENDICE 1: Reactivos:

- 1-Vinil-2-pirrolidona (VP) (Aldrich, >99%). Monómero purificado por destilación a presión reducida.
- Dimetacrilato depolietilenglicol(PEGMA) (Acros). Peso molecular de 875. Utilizado sin purificación posterior.
- Quitosano. (Fluka) Peso Molecular 150000. Se purificó hinchándolo en agua destilada (1% p/v) al que se le añadió unas gotas de ácido acético glacial (Normasol, 99,5 % pureza) hasta llegar a un pH aproximado de 4. La disolución viscosa se filtra con el fin de eliminar todo el residuo sólido insoluble y el filtrado se precipita con una disolución de hidróxido sódico al 40%. El sólido se aísla por filtrado y posteriormente se liofiliza durante 48 horas.
- Acido Acrílico anhídrido. (Aldrich). Purificado por destilación a presión reducida.
- Hidroxiapatita sintetizada por vía húmeda según se describe en el segundo capítulo del presente estudio (OHAp-aa).
- 2,2'- Azobis-isobutironitrilo (AIBN) (Merck). Iniciador radical purificado por recristalización en metanol.

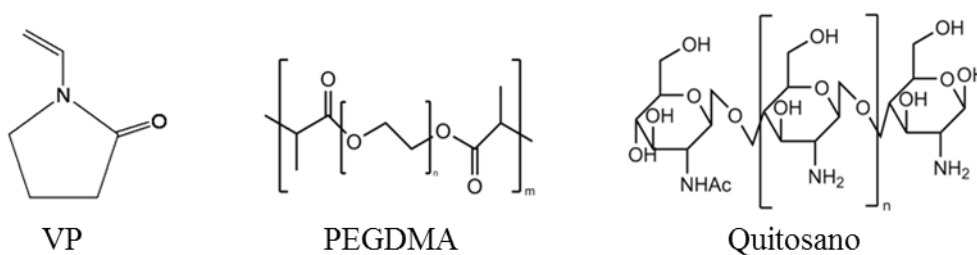


Figura A.1. Estructura química de los reactivos utilizados.

APÉNDICE 2: Técnicas de caracterización:

Técnicas espectroscópicas

- La caracterización de los polímeros se realizó mediante Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de protón (^1H -RMN). Todos los espectros de resonancia se registraron a temperatura ambiente (25°C) en un espectrómetro Brucker-300, empleando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3 ; Sigma-Aldrich) y tetrametilsilano como referencia interna. Los espectros se hicieron a partir de soluciones al 25%(p/v) con el espectrómetro operando a 300 MHz.

- Mediante Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier por Reflectancia Total Atenuada (ATR-FTIR) se caracterizaron los polímeros obtenidos, con el uso de un equipo Perkin-Elmer Spectrum One, en el intervalo $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$, con una resolución de 2 cm^{-1} y 16 barridos en cada medida.

Técnicas calorimétricas

- El análisis termogravimétrico se realizó en un equipo de la marca TA instrument, modelo TGA Q500 V 20.6. Los termogramas registraron la pérdida de peso de cada una de las muestras sometidas a una velocidad de calentamiento constante de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ en el intervalo de temperaturas de $30\text{ a }970^\circ\text{C}$, manteniendo un caudal de flujo de N_2 de $10\text{ ml}/\text{min}$.

- Las medidas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) se han llevado a cabo en un aparato Perkin-Elmer DSC-7; differential scanning calorimeter (DSC; Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT). Purgado con nitrógeno en la celda de análisis y calibrado con patrones de indio y zinc. Las muestras aproximadamente de 10 mg , se cerraron herméticamente en cápsulas de aluminio y se realizaron dos rampas de calentamiento/enfriamiento desde 0°C hasta 300°C , siendo la velocidad de la primera rampa de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, para eliminar el agua residual de las muestras, y la segunda de $20^\circ\text{C}/\text{min}$ que es la utilizada para determinar la temperatura de transición vítrea [1]. La transición vítrea se detecta como un salto brusco en el calor específico al enfriar o calentar la muestra y depende de la velocidad de calentamiento porque tiene un componente cinético en su constitución. Por lo tanto en estudios comparativos es necesario utilizar la misma velocidad.

Se calcula la transición vítrea, T_g, como la temperatura correspondiente a la mitad del incremento en el calor específico durante la transición.

-DMA, Análisis Dinámico Mecánico. Se realizó en un equipo DMA 8000 marca Perkin Elmer, en el modo única frecuencia, utilizando una configuración/ ensayo single cantiléver con un desplazamiento de 0.05 mm. Las muestras utilizadas fueron rectangulares con unas dimensiones medias de 10x4x2 mm (largo x ancho x espesor). La rampa de calentamiento fue de 5 °C/min desde 30°C a 250°C con una frecuencia de 1Hz. La técnica DMA esta basada en la aplicación sobre las muestras de una pequeña deformación cíclica, obteniendo los cambios en la rigidez que vienen dados por los módulos, y la amortiguación (tan delta, relación entre el modulo de perdida y el de almacenamiento)

Estudios de hinchamiento y degradación.

El hinchamiento de los especímenes se llevó a cabo en PBS a pH 7,4. Se utilizaron para ello muestras de un peso de 0.1 g.

Se introdujeron las muestras en cestas de aluminio y se anotó su peso exacto. Se introdujo muestra y cesta en recipiente, se añadieron 10 ml de medio y se incubó a 37 °C. A intervalos de tiempo predeterminados la muestra-cesta se extrajo y, de forma rápida y cuidadosa, se secó ligeramente sobre un papel de filtro para eliminar el exceso de líquido, se pesó y se volvió a introducir en el recipiente. Cada uno de los experimentos se realizaron con tres muestras independientes, la desviación en todos los casos fue menor del 2% [2]. El ratio de hinchamiento se definió como el incremento de peso (w-w₀) dividido por peso inicial (w₀), expresado en tanto por ciento [3].

Estudios de la porosidad

La porosidad puede ser calculada, determinando la densidad real, mediante picnómetro de Helio y la densidad aparente, por el método de Arquímedes. La Porosidad se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Porosidad (\%)} = \left(1 - \frac{\rho_a}{\rho_b} \right) 100$$

Siendo ρ_a la densidad real y la ρ_b la densidad aparente. El dato obtenido hace referencia al Espacio Poroso.

La densidad real se obtiene mediante el picnómetro de Helio. El equipo utilizado es Micromeritis, AccuPyc 1330, Gas Pycnometer, las muestras fueron molidas durante 20 minutos y tras pesarlas se introducen en la celda de medida. Se llevaron a cabo 10 mediciones de cada muestra entre muestras de cada material estudiado.

El método de Arquímedes, se llevó a cabo en una balanza Sartorius, con dispositivo YDK01, YDK01-0D para la medición de la densidad, utilizando como líquido etanol absoluto. Se midieron tres muestras de cada uno de los materiales.

Técnicas microscópicas

- Para el análisis de la morfología de los sistemas en estudio se empleó un microscopio electrónico de barrido ambiental, SEM (Scanning Electron Microscope) Philips XL30, con una aceleración de voltaje de 15 o 25 KeV. Las muestras se metalizaron con una aleación oro paladio previamente a su observación bajo el microscopio.

Estudios de Potencial Z

Potencial Z puede describirse como el potencial eléctrico que se produce entre el medio y una capa de fluido estacionario (capa de Stern) que se forma alrededor de la partícula en suspensión debido a sus propiedades iónicas. La importancia de dicho valor, esta relacionada con la estabilidad de la dispersión y la magnitud de carga eléctrica de la partícula en suspensión. Su valor indica el grado de repulsión entre partículas adyacentes. Un valor alto, indicaría que las partículas son fuertemente repelidas entre si, impidiendo su agregación y precipitación.

Se utilizo un PBS pH 7 (Merck), mediante la adición de distintas cantidades de soluciones HCl 0.5M y NaOH 0.5M. Se obtuvieron soluciones de PBS a distintos pH: 4, 5, 6 y 8. Utilizando dichas soluciones preparadas, se dispersaron las distintas muestras de hidroxiapatitas sintetizadas (0.01mg/ml). Se introdujeron en el ultrasonidos durante 5 minutos y se procedio a medir el portencial Z en el equipo. Cada muestra fue medida por triplicado, con 3 mediciones cada una.

Referencias

1. Mendes LC, Rodrigues. RC, Silva EP. Thermal, structural and morphological assessment of PVP/HA composites. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2008;101(3):899-905.
2. Ritger PL, Peppas NA. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release* 1987;5(1):37-42.
3. Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J, Hu X, et al. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials* 2003;24(26):4833-4841.