

USO DEL POLIPÉPTIDO
ANTIMICROBIANO KR-12, PARA
LA BIOFUNCIONALIZACIÓN DE
PRÓTESIS ÓSEAS COMPUESTAS
POR LA ALEACIÓN METÁLICA
TI6AL7NB

Autor: Gilda Barreiro Meran
Tutor: Lluís Banyeras Vives
Cotutor: Javier Fernández González


**Universitat
de Girona**


Grado en Biotecnología
Universidad de Girona
Curso 2018/2019

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dedicar este trabajo y agradecer a todas las personas que me han ayudado y apoyado durante la realización de este proyecto.

En primer lugar, agradezco a mi cotutor Javier Fernández, darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, la ayuda y todo el material que me ha proporcionado y el interés que ha mostrado porque todo haya podido llevarse a cabo de la manera que se ha hecho y en el tiempo establecido.

También quiero dar las gracias a las trabajadoras del departamento Raisha Lorena García y Noemi Gavieiro, por facilitarme el trabajo durante todo el proceso, y haber estado dispuestas a ayudarme en todo lo que he necesitado, tanto de manera física en los experimentos como mental pensando ideas para mejorar el proyecto. Agradecer también la ayuda proporcionada a Francesc Rabanal, Roser Segovia, Natalia García Giralt y Julia Lorenzo.

Por último, a mi familia, especialmente a mis padres por haber confiado en mí y haberme animado cuando he tenido etapas de estrés y preocupación durante el proceso.

RESUMEN

Actualmente, son muchos los esfuerzos por encontrar implantes óseos y prótesis que se adapten bien a cada persona y no ocasionen problemas, sobretodo en cuanto a infecciones de los mismos. El objetivo principal de este trabajo es hallar un material con bioactividad, que, a parte de inhibir el crecimiento de cepas bacterianas causantes de infecciones, sea biocompatible con las células que recubren el implante y, por tanto, no afecten a su tasa de proliferación, adhesión o provoquen citotoxicidad a las mismas. Para ello, en este estudio se ha biofuncionalizado la superficie de lo que sería el material que compone un implante, en este caso la aleación metálica Ti6Al7Nb. El proceso de biofuncionalización ha consistido en el anclaje del péptido antimicrobiano KR-12 a dicha superficie, gracias a un método sencillo como es el uso de un silano como agente acoplador, que en este estudio fueron APTES y CPTES.

Se realizó la síntesis del péptido KR-12 mediante la técnica estándar de síntesis en fase sólida (SPPS) basada en Fmoc/tBu, y se obtuvo una pureza del péptido superior al 98 %. Se llevó a cabo la caracterización de las superficies obtenidas, antes y después del anclaje del péptido, para comprobar la unión del KR-12. Esta caracterización se obtuvo mediante el análisis por espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS), la tinción fluorescente del KR-12 y la medición del ángulo de contacto con el agua, que demostró el éxito del anclaje del KR-12 sobre la superficie. Se realizaron pruebas para evaluar la citocompatibilidad del material con células osteoblasticas humanas (hOB), obteniendo unos buenos resultados de viabilidad celular y proliferación. Además, se demostró la actividad antimicrobiana del KR-12 a una concentración de 0,5 mg/ml contra *Staphylococcus aureus*, la cepa bacteriana presente con más frecuencia en las infecciones de los implantes y prótesis óseas. Por tanto, la citocompatibilidad con células osteoblásticas humanas y la actividad antimicrobiana del Ti6Al7Nb recubierto con KR-12, lo convierten en un candidato para mejorar la eficacia clínica de los implantes óseos.

RESUM

Actualment, són molts els esforços per trobar implants ossis i pròtesis que s'adaptin bé a cada persona i no ocasionin problemes, sobretot pel que fa a infeccions dels mateixos. L'objectiu principal d'aquest treball és trobar un material amb bioactivitat, que, a banda d'inhibir el creixement de soques bacterianes causants d'infeccions, sigui biocompatible amb les cèl·lules que recobreixen l'implant i, per tant, no afectin la seva taxa de proliferació, adhesió o provoquin citotoxicitat a les mateixes. Per a això, en aquest estudi s'ha biofuncionalitzat la superfície del que seria el material que compon un implant, en aquest cas l'aliatge metàl·lic Ti6Al7Nb. El procés de biofuncionalització ha consistit en l'ancoratge del pèptid antimicrobià KR-12 a aquesta superfície, gràcies a un mètode senzill com és l'ús d'un silà com a agent acoblador, que en aquest estudi van ser APTES i CPTES.

Es va realitzar la síntesi del pèptid KR-12 mitjançant la tècnica estàndard de síntesi en fase sòlida (SPPS) basada en Fmoc / tBu, i es va obtenir una pureza del pèptid superior al 98%. Es va dur a terme la caracterització de les superfícies obtingudes, abans i després de l'ancoratge del pèptid, per comprovar la unió del KR-12. Aquesta caracterització es va obtenir mitjançant l'anàlisi per espectroscòpia fotoelectrònica de raigs X (XPS), la tinció fluorescent del KR-12 i el mesurament de l'angle de contacte amb l'aigua, que va demostrar l'èxit del ancoratge del KR12 sobre la superfície. Es van realitzar proves per avaluar la citocompatibilitat del material amb cèl·lules osteoblàstiques humanes (Hob), obtenint uns bons resultats de viabilitat cel·lular i proliferació. A més, es va demostrar l'activitat antimicrobiana del KR-12 a una concentració de 0,5 mg / ml contra *Staphylococcus aureus*, la soca bacteriana present amb més freqüència en

les infeccions d'implants i pròtesis òssies. Per tant, la citocompatibilitat amb cèl·lules osteoblàstiques humanes i l'activitat antimicrobiana del Ti6Al7Nb recobert amb KR-12, el converteixen en un candidat per millorar l'eficàcia clínica dels implants ossis.

ABSTRACT

Currently, there are many efforts to find bone implants and prostheses that adapt well to each person and do not cause problems, especially in terms of infections of the same. The main objective of this work is to find a material with bioactivity, which, besides inhibiting the growth of bacterial strains that cause infections, is biocompatible with the cells that cover the implant and, therefore, does not affect its rate of proliferation, adhesion or cause cytotoxicity to them. For this, in this study the surface of what would be the material that makes up an implant, in this case the Ti6Al7Nb metallic alloy, has been biofunctionalized. The process of biofunctionalization consisted of anchoring the antimicrobial peptide KR-12 to the surface, thanks to a simple method such as the use of a silane as coupling agent, which in this study were APTES and CPTES.

Synthesis of the KR-12 peptide was performed by the standard solid phase synthesis technique (SPPS) based on Fmoc / tBu, and a purity of the peptide higher than 98% was obtained. The characterization of the surfaces obtained before and after the anchoring of the peptide was carried out to verify the binding of KR-12. This characterization was obtained by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analysis, fluorescent staining of KR-12 and water contact angle measurement, which demonstrated the success of KR-12 anchoring on the surface. Tests were performed to evaluate the cytocompatibility of the material with human osteoblastic cells (hOB), obtaining good results of cell viability and proliferation. In addition, the antimicrobial activity of KR-12 at a concentration of 0.5 mg / ml was demonstrated against *Staphylococcus aureus*, the bacterial strain most frequently present in infections of implants and bone prostheses. Therefore, the cytocompatibility with human osteoblastic cells and the antimicrobial activity of Ti6Al7Nb coated with KR-12, make it a candidate to improve the clinical efficacy of bone implants.

INTRODUCCIÓN

En 1790 se descubrió el Titanio y se usó por primera vez en pintura, pero a partir de la segunda mitad del siglo XX, el titanio y sus aleaciones comenzaron a utilizarse en la industria de la biomedicina, especialmente en prótesis para sustituciones y fijaciones óseas. (Chourifa et al., 2019). Esto ha sido posible, gracias a sus propiedades químicas y mecánicas, resistencia a la corrosión, y biocompatibilidad atribuida a la estabilidad del recubrimiento de TiO_2 que cubre el metal. Aunque el Ti es un material inerte que no posee propiedades bioactivas, se puede biofuncionalizar su superficie para mejorarla. (Dubruel et al., 2006). Los componentes de las prótesis están formados por metales inertes, y formarán una unión con un hueso vivo, por eso es muy importante que dichos componentes se unan al hueso de forma estable, es lo que llamamos osteointegración, (Atallah et al., 2018), ya que ello será un factor importante para el éxito de la implantación y así la mejora de la calidad de vida de la persona que la lleva.

La aleación más utilizada hoy en día es Ti6Al4V, pero en este estudio se ha optado por el uso de la aleación Ti6Al7Nb, ya que, presenta mejores propiedades, tiene una mayor resistencia a la corrosión a pH fisiológico, a la colonización bacteriana, (Walkowiak-Przybyło et al., 2017) y además presenta menor citotoxicidad, ya que, la liberación iónica de niobio a los tejidos circundantes es similar a la de aluminio y titanio, pero 1000 veces menor que los iones de vanadio. (Yamamoto et al., 1998).

Actualmente en el siglo XXI, los procedimientos de implantes quirúrgicos se han vuelto muy comunes, con el fin de sustituir segmentos óseos fracturados, extremidades deterioradas y desgastadas, y articulaciones funcionalmente afectadas (Davide Campoccia et al., 2006). Pero muchos de estos implantes fracasan debido a infección bacteriana, traumatismo quirúrgico, diseño defectuoso de la prótesis, colocación inadecuada, mala osteointegración y propiedades de los biomateriales. La mayoría de estos problemas se están solucionando, (Godoy-Gallardo et al., 2014), sin embargo, aunque el riesgo de infección bacteriana se estima en 0,5 - 5 %, se considera la causa de fracaso de mayor importancia, debido a sus graves consecuencias. (Davide Campoccia et al., 2006). Aproximadamente, 4 de cada 5 pacientes con infecciones en prótesis, son causadas por especies de *Staphylococcus*, concretamente *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, con una incidencia del 66 %, respecto a otros organismos como *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Escherichia*, con una incidencia de 8%, 5%, 2%, y 2% respectivamente. Por ello, es importante el estudio para combatir la especie *Staphylococcus* en los implantes, además, cabe destacar una mayor importancia de *Staphylococcus aureus* debido a sus altos niveles de resistencia a antibióticos. (D. Campoccia et al., 2018). Se conocen varias estrategias para combatir las infecciones, como son los procedimientos de eliminación del tejido muerto o dañado, pero esta estrategia a parte de no ser siempre efectiva, tiene duras consecuencias para el paciente en cuanto a trauma generado, hospitalización y costes de salud, por ello sólo debería utilizarse cuando no hay otra manera de eliminar la infección. (Davide Campoccia et al., 2006). Es por eso, que es mejor optar por medidas preventivas, como la biofuncionalización de superficies de los materiales biomédicos. Una medida preventiva prometedora es el desarrollo de superficies antimicrobianas pasivas,

que inhiben la adhesión bacteriana y/o matan las bacterias por contacto, como es el caso de los péptidos antimicrobianos (AMP). (Godoy-Gallardo et al., 2014).

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son bacteriocinas de pequeño tamaño (10-50 aminoácidos) con un amplio espectro de actividad contra bacterias y otros patógenos. Los AMPs tienen carga catiónica (+2 - +9) e hidrofóbica, y se encuentran codificados por genes con expresión constitutiva, o inducible a través de señales recibidas por agentes infecciosos (Hale et al., 2007). Además, los AMPs tienen la característica de poder modular la respuesta inmune, lo que es importante para reducir la respuesta inflamatoria en el paciente. Esto es posible gracias a que el AMP se une directamente a los lipopolisacáridos (LPS) de la pared bacteriana o bien impide la unión entre el LPS y el receptor de la célula huésped, neutralizando así el potencial inflamatorio (Kim et al., 2017). Hoy en día existen dos clases de AMPs, los disruptivos, que actúan sobre la membrana bacteriana provocando una fuga celular, y los no disruptivos, que afectan a diferentes mecanismos como pueden ser la inhibición de la división celular, inhibición de la síntesis de proteínas, ... entre otros. El mecanismo de acción general de los AMPs consiste en una primera atracción electrostática entre el AMP catiónico y la superficie polianiónica de la bacteria, gracias al ácido teicoico y lipoteicoico en bacterias gram + y a los lipopolisacáridos en bacterias gram -. Seguidamente, los AMPs adoptan una estructura anfipática que promueve la unión de los residuos catiónicos con los fosfolípidos de la membrana, provocando una disrupción en la integridad de la membrana bacteriana (Hale et al., 2007). Esta disrupción de la integridad de la membrana se da por la formación de un cambio de potencial electroquímico, que resulta en la activación de enzimas autolíticas. (Gorr et al., 2013). El LL-37, es el único péptido antimicrobiano catiónico humano conocido con un amplio espectro de actividad antibacteriana, que reduce la respuesta inflamatoria y está implicado en la reparación de tejidos (Nie et al., 2017), sin embargo, tiene el problema de tener una baja selectividad celular (Kim et al., 2017). Por ello, en este estudio se opta por el uso de un derivado de LL-37, el polipéptido KR-12, que posee actividad antimicrobiana y no es tóxico para las células de mamíferos, por lo que es una buena opción para recubrir la superficie de los implantes. (Nie et al., 2017). El polipéptido KR-12 corresponde a los residuos 18-29 de LL-37 (KRIVQRIKDFLR-NH₂).

Interesa crear un enlace covalente fuerte y estable a largo plazo, entre el material (Ti6Al7Nb) y las biomoléculas (AMP KR-12), capaz de resistir las fuerzas ejercidas durante la operación de implantación. También es importante tener en cuenta que los micromovimientos de las prótesis y la liberación de restos de desgaste, pueden dañar los tejidos que rodean el implante. (Davide Campoccia et al., 2006). Por todo esto una buena opción es la silanización, que consiste en una reacción química entre moléculas de silano y los grupos hidroxilo presentes en la superficie del material. (Chouirfa et al., 2019). Los silanos pueden interactuar con compuestos orgánicos e inorgánicos, permitiendo la unión de materiales tan distintos como son un metal y una biomolécula, además el enlace covalente generado es suficientemente fuerte para evitar que se liberen componentes hacia el organismo, catalogando así el material como un dispositivo médico de grado 2.

En este estudio la superficie de Ti6Al7Nb se funcionaliza con dos silanos diferentes CPTES y APTES.



Figura 1. Esquema de la unión entre la superficie del metal Ti6Al7Nb con el silano y el polipéptido KR-12

La estructura del silano es la siguiente: $X - [CH_2]_n - Si - R$, donde X es el grupo organofuncional por el que se une a la biomolécula, y R es el grupo silicofuncional que se une al metal. Las etapas del proceso son las siguientes:

1. Hidrólisis del silano: El silano es hidrolizado dando silanoles, por vía acuosa o hidroalcohólica.

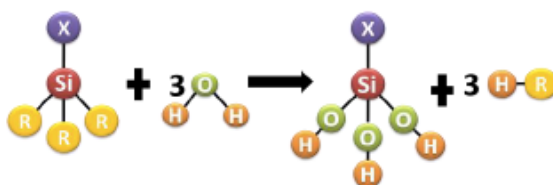


Figura 2. Primera etapa de la silanización. El grupo representado por una X corresponde al grupo organofuncional y a los carbonos no reactivos.

2. Adhesión a la superficie inorgánica.

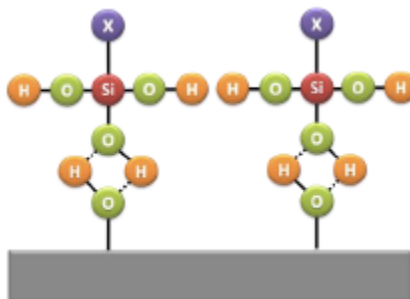


Figura 3. Segunda etapa de la silanización

3. Condensación.

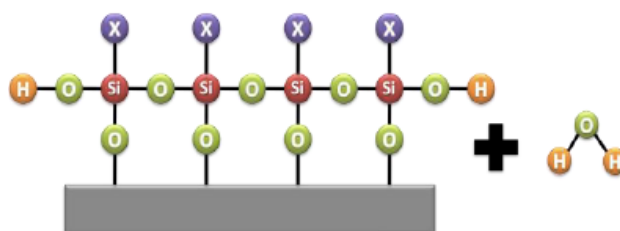


Figura 4. Tercera etapa de la silanización.

4. Unión del silano a la molécula orgánica.

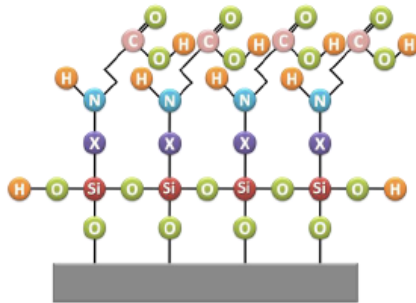


Figura 5. Unión del silano a la molécula orgánica una vez finalizada la silanización.

OBJECTIVES

Objective 1. To determine the anchoring percentage of the KR-12 peptide on the surface of Ti6Al7Nb material, using different activation conditions of the material surface and different silanes.

Objective 2. To evaluate the cytocompatibility of Ti6Al7Nb material with bone-forming cells, human osteoblastic cells (hOB).

Objective 3. To estimate the inhibitory capacity of the KR12 peptide on the bacterial strain *Staphylococcus aureus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. MATERIALES

Anhydrous toluene, (3-aminopropyl)-triethoxysilane (APTES), (3-chloropropyl)-triethoxysilane (CPTES), diisopropylethylamine (DIEA), Acetone, sodium hydroxide (NaOH), sodium carbonate (NaCO₃), Phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate, TRITON® X-100 al 0,1%, 4',6-diamidino phenylindole (DAPI) (0,2 mg/mL), alizarin red staining solution 40 mM/l, Fluorenylmethyloxycarbonyl protecting group (Fmoc), grupo tert-butyl group (tBu), Hidroxibenzotriazole (HOBt), N,N-dimethylformamide (DMF), Dichloromethane, N-hexane isopropanol, Phosphate buffered saline (PBS), β -glycerophosphate disodium salt hydrate, formamide 10%, trypsin-EDTA (0.5%), cetylpyridinium chloride solution (CPC), 3-(Maleimido) propionic acid N-hydroxysuccinimide ester, Dimethyl sulfoxide (DMSO), Fluorescein isothiocyanate (FITC), fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Quimica SL (Madrid, España). Rink amide 4-methylbenzhydrylamine (MBHA) fue obtenido de Bachem (Bubendorf, Suiza). N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIC), Piperidine, N,N-dimethylformamide (DMF), Ninhydrin fueron obtenidos de Iris biotech. Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) supplemented with Fetal bovine serum (FBS) 10%, penicillin (100 UI/mL), streptomycin (100 UI/mL), ascorbic acid (100 mg/mL), Viability/Cytotoxicity assay kit for animal live & dead cells fueron obtenidos de Invitrogen (Barcelona, España). Fungizone (0,4%) fue obtenido de Gibco (Barcelona, España). CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell proliferation assay fue obtenido de Promega (Madrid, España), *Staphylococcus aureus* fue obtenido de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (Valencia, España). Lysogeny broth (LB) (with 10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 10 g/L sodium chloride, formaldehyde 3,7%, fueron obtenidos de Fisher scientific (Madrid, España). Células humanas osteoblásticas (hOB) fueron obtenidas de hueso trabecular de rodilla.

1.2. MÉTODOS

1.2.1. Síntesis del polipéptido KR-12

La síntesis del polipéptido KR-12 se preparó mediante la técnica estándar de síntesis en fase sólida (SPPS) basada en Fmoc/tBu, utilizando una resina metilbenzhidrilamina (MBHA). Se usa el grupo Fmoc, que es lábil en medio básico, para la protección temporal del grupo α -amino y el grupo tBu, lábil en medio ácido, como protector de las cadenas laterales. Se trata de un sistema de protección ortogonal, es decir, los grupos N-terminal pueden desprotegerse sin afectar la protección de las cadenas laterales, y viceversa. Como reactivos de acoplamiento se utilizan la N,N'-diclohexilcarbodiimida (DIC) y Hidroxibenzotriazole (HOBt) para minimizar la tendencia a la racemización de la O-acilisourea. Las condiciones de reacción son 1h a 90°C. Después de la reacción de anclaje de cada aminoácido se realiza una limpieza con N,N-dimetilformamida (DMF) y Clorometano para eliminar el exceso de aminoácidos. Para desproteger el Fmoc para anclar el siguiente aminoácido se usa Piperidina. Después de cada adición de un aminoácido se hace una reacción con Ninhydrin, que es un test que permite la evaluación cualitativa del acoplamiento del aminoácido a la cadena peptídica. Ninhydrin

reacciona con las aminas primarias del N-terminal dando un color lila, de manera que si al añadirla se vuelve lila quiere decir que el acoplamiento no ha sido completo, no ha reaccionado todo el aminoácido. Después de la síntesis del polipéptido, con el fin de favorecer la posterior reacción de unión entre el polipéptido y el silano, así como la estabilidad mecánica y química, se añadió un espaciador de dos glicinas, seguidas por una cisteína con una amina libre en el extremo N-terminal que reaccionará con el silano. Finalmente, el polipéptido se purificó por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa semipreparativa (RP-HPLC) en una columna Kinetex® 5µm C18 100 Å, 250 x 4,6 mm, utilizando un gradiente de 20 a 35% de A a B en 30 minutos (A: H₂O + 0.045%TFA (ácido trifluoroacético) y B: ACN (Acetonitrilo) + 0.036%TFA). La caracterización del polipéptido con una pureza >98 %, se evaluó mediante el análisis por espectrometría de masas por electropulverización (ESI-MS) utilizando un zQ-micromass (Waters).

1.2.2. Preparación de las muestras de Ti6Al7Nb

Las muestras de Ti6Al7Nb se obtuvieron a partir de una barra de 1m de largo x 2mm de diámetro. Se cortaron muestras de 2mm de alto y 2mm de diámetro, con una cortadora de precisión de baja velocidad IsoMet™ de Buehler. Posteriormente, las superficies de las muestras fueron desbastadas con un papel de carburo de silicio, de un tamaño de partícula decreciente y finalmente fueron pulidas con partículas de diamante en suspensión de 6 µm y 1 µm, y finalmente con una suspensión de silicio coloidal de 0,5 µm. Las muestras de Ti6Al7Nb se limpiaron para eliminar posibles contaminantes y optimizar así las reacciones, ya que, según estudios como el realizado por Dubruel et al., 2006, se afirma que la no limpieza de las muestras altera drásticamente la composición atómica. La limpieza se realizó en 2 etapas, primero se lavaron con N-hexano isopropanol y después con acetona. Se realizaron 3 ciclos periódicos con cada compuesto, en lavados de 15 minutos con sonicación con un limpiador ultrasónico Branson 3510-DTH de Nist.

Activación de la superficie de las muestras de Ti6Al7Nb

Las muestras de Ti6Al7Nb limpias se activaron mediante dos técnicas diferentes. Por un lado, se realizó una activación con NaOH, en la cual las muestras se sumergieron en NaOH 5M a 60°C durante 3, 5 y 24 horas con agitación suave. Se activaron muestras con NaOH a diferentes tiempos para poder elegir la más adecuada para los posteriores ensayos. Por otro lado, se realizó una activación con plasma, en la que las muestras fueron introducidas en el Plasma cleaner Harrick PDC-002-CE, se realizó una limpieza de las muestras y la posterior activación en modo bajo durante 20 minutos bajo un vacío de 0,2-0,3 Torr.

Caracterización de la superficie activada

La superficie de las diferentes muestras activadas se caracterizó utilizando dos microscopios diferentes, por un lado el microscopio electrónico de rastreo FSEM JEOL-7100, utilizando el software Inca Analyzer, que proporciona imágenes gracias a la emisión de electrones, y por otro

lado, el microscopio confocal Leica DCM3D de Leica Microsystems utilizando el software LeicaScan 3.2.3.5, que proporciona una imagen gracias al uso de un láser.

Silanización de la superficie activada

La silanización de las muestras activadas con NaOH se realizó introduciendo las muestras en una solución con Tolueno anhídrido + Silano (APTES o CPTES), en atmósfera de argón y en agitación suave durante 1 hora. La solución para el silano CPTES también contenía DIEA (1% volumen de tolueno). La silanización de las muestras de plasma se realizó en una cámara de vacío introduciendo las muestras con el silano durante 1 hora. El silano APTES no puede reaccionar por sí solo con el KR-12, por tanto para favorecer esta reacción, al finalizar la silanización, las muestras silanizadas con APTES se funcionalizaron con 3-(Maleimido) propionic acid N-hydroxysuccinimide ester en PBS durante 1h a temperatura ambiente.

1.2.3 Anclaje del polipéptido KR-12 a la superficie del Ti6Al7Nb

El polipéptido se disolvió en PBS hasta adquirir una concentración de 0,5 mg/ml KR-12. EL anclaje del KR-12 al silano consistió en la introducción de las muestras en una solución 0,5 mg/ml de KR-12, en atmósfera de argón y durante toda la noche en agitación suave. Para el anclaje del KR-12 en las muestras silanizadas con CPTES, se añadió NaCO₃ (0,5 mg/ml) a la solución del KR-12, para conseguir un ambiente básico y neutralizar así el ácido clorhídrico que genera la reacción de unión entre CPTES y KR-12. La unión entre KR-12 y CPTES se da gracias a una sustitución nucleofílica entre el grupo amina nucleófilo de KR-12 y el átomo de cloro electrófilo de CPTES, en cambio, la unión entre KR-12 y APTES se da mediante la formación de un enlace amida.

Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS)

La composición atómica de las superficies silanizadas y biofuncionalizadas, se midió mediante Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS). Los experimentos de XPS se realizaron en un sistema multitécnico PHI 5500 de Physical Electronics, con una fuente de rayos X monocromática (línea de aluminio Kalfa de 1486.6 eV de energía y 350 W), colocados perpendiculares al eje del analizador y calibrados usando la línea 3d_{5/2} Ag con un ancho total a la mitad máximo (FWHM) de 0,8 eV. El área analizada fue un círculo de 0.8 mm de diámetro y la resolución seleccionada para los espectros fue 187.85 eV de Pass Energy y 0.8 eV / step para los espectros generales y 23.5 eV de Pass Energy y 0.1 eV / step para los espectros de los diferentes elementos. Las mediciones en profundidad de los perfiles de profundidad de la composición se obtuvieron rociando la superficie con una fuente de iones Ar⁺ (4 keV de energía). Se usó un cañón de electrones de baja energía (menos de 10 eV) para descargar la superficie cuando fue necesario. Todas las mediciones se realizaron en una presión de la cámara de alto vacío (UHV) entre 5x10⁻⁹ y 2x10⁻⁸ torr.

Evaluación del anclaje del polipéptido KR-12 a la superficie de Ti6Al7Nb silanizada

1. Evaluación cualitativa del anclaje del polipéptido KR-12 a la superficie de Ti6Al7Nb

La evaluación cualitativa se llevó a cabo de dos formas diferentes, por un lado, mediante la unión de Fluorescein isothiocyanate (FITC) al KR-12. El FITC se disolvió en DMSO anhídrido a una concentración de 1 mg/ml en viales de baja adhesión, y en condiciones de oscuridad. Después se añadieron 100 μ L de la solución a la muestra de Ti6Al7Nb con el KR-12 anclado en su superficie, y se dejó incubar 12h a 4°C. Después se realizó un lavado de las muestras con agua mili-Q, y finalmente, la superficie de la muestra se observó con un microcopio TCS SP5 vertical de Leica Microsystems.

Por otro lado, se midió el ángulo de contacto de la superficie con el fin de observar la diferencia en la hidrofobicidad/hidrofilicidad antes y después de la adhesión del KR-12. Para la medida se utilizó el modelo OCA15Pro (DATAPHYSICS) con una cámara USB-CCIR, una cámara de temperatura TFC-100Pro, un triple difusor TDI 100, un volumen de dosis de 1 μ L y una tasa de dosificación 1 μ L/s. Se utilizó una jeringa Hamilton de 500 μ L con H₂O, y finalmente se leyeron los resultados mediante el software SCA20_U.

2. Evaluación cuantitativa de la adhesión del KR-12 a la superficie de Ti6Al7Nb

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo midiendo la absorbancia del enlace peptídico presente en las diferentes muestras. Después de la reacción de anclaje del KR-12 la disolución que contenía cada muestra se analizó mediante High Performance Liquid Chromatography (HPLC), en una columna hidrofóbica Nova-Pak C_{18} , 3,9 x 150 mm, Part No. WAT036975 (Waters) utilizando un gradiente de 90 a 10 % de A a B en 60 minutos (A: H₂O + 0.1%TFA (ácido trifluoroacético) y B: ACN (Acetonitrilo) + 0.1%TFA). Las muestras analizadas fueron, una disolución del KR-12 solo a una concentración de 0,5 mg/ml, un control negativo que contenía PBS, disolución de las muestras de Ti-Plasma-APTES, Ti-Plasma-CPTES, Ti-NaOH-APTES, Ti-NaOH-CPTES, todas ellas con el KR-12 adherido. De manera que para ver el anclaje del KR-12 a las diferentes muestras se restará el valor de absorbancia de la disolución de KR-12 solo, al valor de absorbancia de la disolución de cada muestra de Ti con las diferentes activaciones y con el KR-12.

1.2.4 Ensayos de citocompatibilidad

Cultivo celular

Las células osteoblásticas humanas (hOB) utilizadas en el estudio, se han obtenido a partir de hueso trabecular de rodilla, gracias a la sustitución de una prótesis. El hueso trabecular se diseccionó en piezas de 1-2mm con una pinza metálica estéril, y posteriormente las piezas fueron lavadas 3 veces en una solución tamponada con fosfato (PBS). Dichas muestras de hueso se colocaron en una placa de Petri de 15 cm de diámetro y se añadió un volumen hasta cubrir

las muestras por completo, de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 UI/mL), ácido ascórbico (100 mg/mL) (Invitrogen) y Fungizone (0,4%) (Gibco). Las muestras se incubaron durante 4 semanas hasta obtener la confluencia celular, a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%, y se realizó cambio del medio de cultivo 3 veces a la semana. Después de este tiempo, las células se traspasaron a frascos de cultivo celular Nunc™ EasYFlask™ 75 cm² (Thermo Scientific) hasta alcanzar la confluencia celular; una vez alcanzada esta confluencia se hizo el recuento celular utilizando la cámara de recuento de Neubauer mejorado de BRAND® BLAUBRAND®. Se han realizado un máximo de 2 subcultivos para llevar a cabo los experimentos. Para llevar a cabo los ensayos de materiales, las muestras de Ti6Al7Nb se esterilizaron durante 24 horas en un gradiente de etanol (70% → 80% → 90% → 96% → 100%), se lavaron 3 veces con PBS y se traspasaron a una nueva placa de cultivo de poliestireno de 96 pocillos (NUNC A/S). Sobre la superficie de cada muestra de Ti6Al7Nb se sembraron 20000 células, y para fijarlas se incubaron 15 minutos a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%, posteriormente se añadió DMEM suplementado con FBS al 10% y ácido ascórbico. Para el ensayo de mineralización se agregó también β-glicerofosfato (5mM). Cabe destacar que antes de cada ensayo, las muestras de Ti6Al7Nb sembradas fueron extraídas del pozo inicial y se colocaron en un pozo nuevo, para asegurar que los resultados obtenidos sólo se deban a las células adheridas a la superficie del material. Cada ensayo se realizó a 1, 7 y 14 días de cultivo celular, a excepción del ensayo de mineralización que se realizó a los 28 días de cultivo celular.

Ensayo de proliferación y viabilidad celular

Para evaluar la viabilidad celular de forma cuantitativa, se ha utilizado el ensayo de proliferación celular CellTiter 96® Aqueous One Solution (Promega) de MTS siguiendo el protocolo especificado por el fabricante. En cada muestra cultivada se agregaron 25 µL de MTS y 75 µL de DMEM suplementado con FBS al 10%, se incubaron durante 4 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%, y finalmente se leyó la absorbancia a 490 nm.

Para evaluar la viabilidad, el anclaje y la distribución de las células de forma cualitativa, se utilizó el kit de ensayo LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity para células de mamífero. Este ensayo nos permite distinguir entre células vivas y células muertas, gracias a la tinción simultánea con Calcein-AM con fluorescencia verde (células vivas) y Etidi homodímero-1 con fluorescencia roja (células muertas). El experimento se realizó añadiendo a cada muestra de Ti6Al7Nb sembrada, 150 µL de una solución a 4 µM de EthD-1 y 2 µM de calcein-AM en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las muestras se incubaron 45 minutos a temperatura ambiente y finalmente se observó la superficie con microscopio TCS SP5 vertical de Leica Microsystems y las imágenes se procesaron con el software Fiji.

Morfología celular

Para estudiar la estructura del citoesqueleto de las células en la superficie del Ti6Al7Nb, se utilizó el ensayo Phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate (Sigma-Aldrich). Las

muestras se limpiaron 3 veces con PBS, y se fijaron las células en una solución de formaldehído (Probus) al 3,7% en PBS durante 10 minutos. Después, las células se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con TRITON® X-100 al 0,1% (Sigma-Aldrich) en PBS durante 5 minutos y se enjuagaron con PBS. Las células se tiñeron con 50 mg/mL de faloidina fluorescente y 4',6-diamidino fenilindol (DAPI) (0,2 mg/mL) (Sigma-Aldrich) en PBS, durante 40 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Finalmente las células se observaron con microscopio TCS SP5 vertical de Leica Microsystems.

Ensayo de mineralización

El ensayo de tinción roja con alizarina permite evaluar la mineralización. Las muestras de Ti6Al7Nb sembradas se lavaron 3 veces con PBS y se realizó la fijación de las células incubando las muestras con formamida al 10% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se eliminó la formamida, se lavaron las muestras 3 veces con PBS y se tiñeron con 150 μ L de solución de rojo de alizarina 40 mM/l, a pH 4,1-4,2 (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos a temperatura ambiente en agitación suave. Las muestras fueron lavadas con PBS para eliminar el exceso de alizarina. Para cuantificar la mineralización, se disolvió el rojo de alizarina precipitado con una solución de cloruro de cetilpiridinio al 10%, durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave. Se transfirió 100 μ L de cada pocillo a una nueva placa de cultivo de 96 pocillos de fondo redondo y se leyó la absorbancia a 550 nm.

1.2.5 Ensayo del efecto del polipéptido KR-12 sobre *S. aureus*

Cultivo bacteriano

La cepa bacteriana utilizada en este estudio ha sido *Staphylococcus aureus* (SAU), que se obtuvo de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). El *S. aureus* se cultivó en caldo de cultivo LB con 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de cloruro sódico, a 37 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo se midió la absorbancia del cultivo con un espectrofotómetro GeneQuant 1300 (Biochrom) y se ajustó hasta la medida necesaria para usar en los experimentos, que en este caso fue 1 OD.

Concentración inhibitoria mínima (MIC)

Cuando hablamos de concentración inhibitoria mínima (MIC) nos referimos a la concentración mínima necesaria para inhibir el crecimiento del microorganismo en cuestión. La MIC del polipéptido KR-12 respecto a *S. aureus* se determinó por absorbancia. En una placa de cultivo se inoculó 200 μ L de la bacteria SAU a una concentración de 1 OD, y sobre esta se añadieron 100 μ L de KR-12 a diferentes concentraciones, 0, 8, 16, 32, 64, 125, 250, 500 μ g/ μ L. La placa de cultivo se incubó a 37 °C durante 24h y se leyó la absorbancia a 600 nm utilizando un lector automático de microplacas Victor³V 1420 multilabel counter (PerkinElmer).

Efecto inhibitorio del KR-12 sobre el crecimiento de *S. Aureus* en función de la diferente activación y silano utilizado

El efecto inhibitorio del KR-12 sobre el crecimiento de *S. aureus* se determinó midiendo la absorbancia. En una placa de cultivo de 96 pocillos, se cultivaron las diferentes muestras (Plasma + APTES, Plasma + CPTES, NaOH + APTES, NaOH + CPTES) todas ellas con y sin KR-12 y con *S. aureus* a una concentración de 1 OD, además se cultivaron controles que contenían *S. aureus* con y sin KR-12. Se eligió una concentración de KR-12 de 0,5 mg/ml porque fue la obtenida en el ensayo de la MIC. Se incubó la placa con las muestras a 37 °C durante 24h y se leyó la absorbancia a 600 nm utilizando un lector automático de microplacas Victor³V 1420 multilabel counter (PerkinElmer).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Síntesis del polipéptido KR-12

Como se puede observar en el **grafico 1**, el cronograma solo presenta un pico que corresponde al polipéptido KR-12, con un tiempo de retención de 16.034 minutos y con un área de 12670753. Por otro lado, el **gráfico 2** muestra tres señales de pico, que se corresponden a las masas de diferentes protonaciones del polipéptido, se observan los picos $(M+2H+2)=895.1$ Da, $(M+3H+3)=597.1$ Da y $(M+4H+4)=448.0$ Da. Teniendo en cuenta estos resultados, se comprueba la pureza del polipéptido. Se obtuvo una pureza del KR-12 superior al 98 %, con un peso molecular $M=1787.0$ Da.

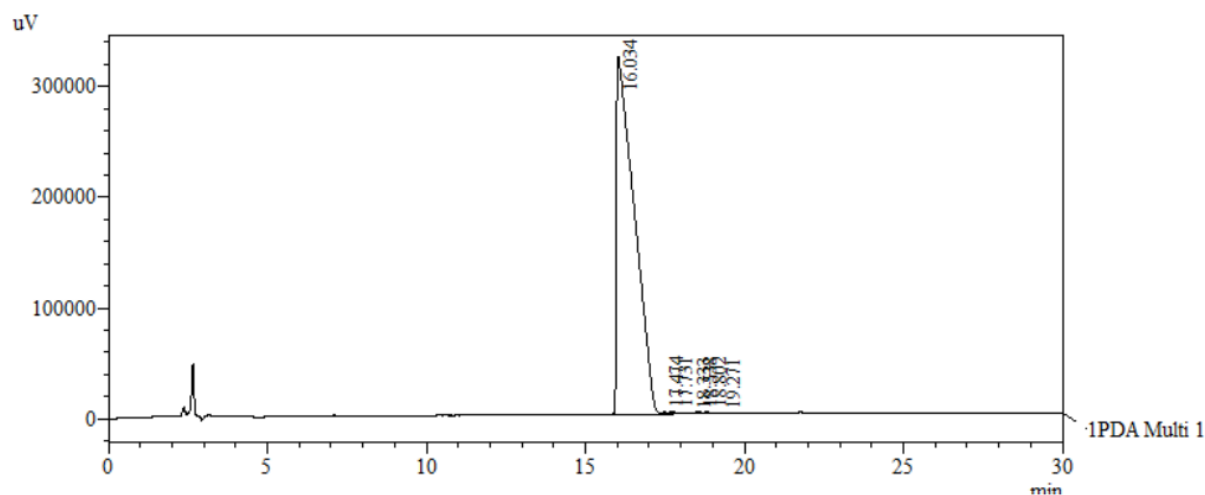


Gráfico 1. Cromatograma de la purificación del polipéptido KR-12

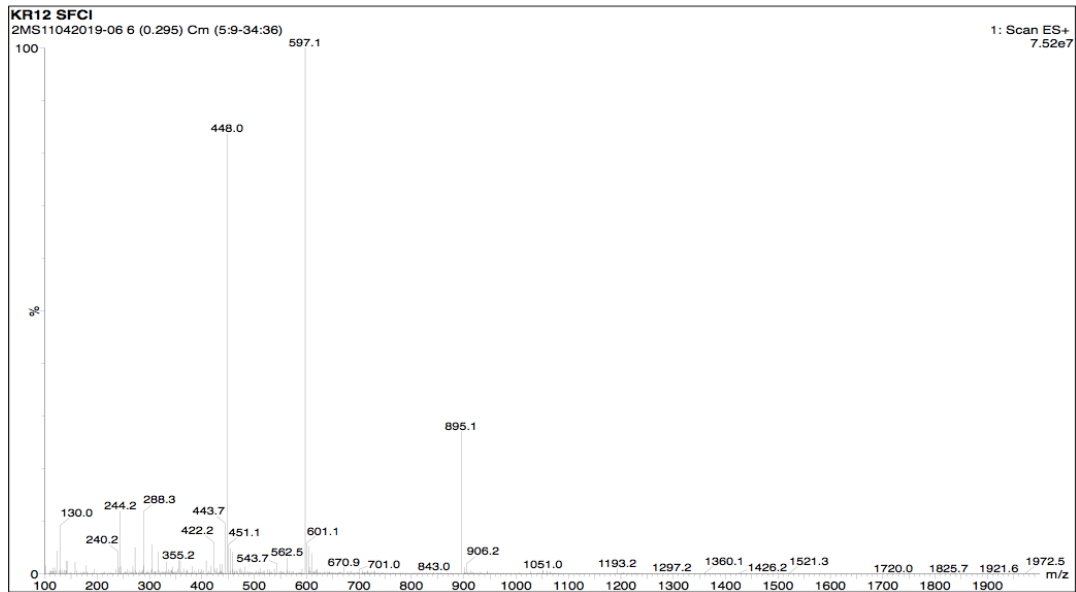


Gráfico 2. Relación masa/carga generada por ESI-MS del polipéptido KR-12

2. Caracterización de la superficie activada

Se llevaron a cabo diferentes activaciones de la superficie de Ti6Al7Nb, para ver el efecto de cada una y poder elegir las condiciones óptimas para realizar los siguientes ensayos. Lo que se busca con la activación, es la generación de rugosidad en la superficie del material, cuya importancia radica en que esta superficie rugosa es más favorable para las células. Se ha demostrado en diferentes estudios como el de Ravelingien et al., 2010, que al generar rugosidad, se obtienen mejores resultados en las diferentes pruebas in vitro. En el estudio de Ravelingien et al., 2010, se investigó el efecto de la topografía superficial de placas de titanio, con rugosidades superficiales (R_a) de $0,13 \mu\text{m}$, $0,56 \mu\text{m}$, $0,83 \mu\text{m}$ y $3,63 \mu\text{m}$, donde se observó que las superficies con una rugosidad de $0,56 \mu\text{m}$, se cubrieron de células completamente tras 7 días de cultivo, en cambio, las superficies con otros valores de rugosidad demasiado pequeños o altos mostraron superficies incompletas.

Sabiendo esto, se pueden observar claras diferencias entre las diferentes activaciones con respecto a la topografía de la superficie. Por un lado, los resultados de la caracterización con FSEM se observan en la **figura 6**, donde se ve que la muestra activada con plasma de O_2 no muestra rugosidad alguna de la superficie, en cambio, en las muestras activadas con NaOH sí se observa esta rugosidad en la superficie. La muestra activada durante 24 horas con NaOH muestra una corrosión tan elevada que ocasiona microrroturas irregulares en la superficie, en cambio, esto no pasa en las muestras de 3 y 5 h de activación con NaOH, en las que se forma una película rugosa de manera regular por toda la superficie. Por otro lado, la caracterización con el microscopio confocal se muestran en la **figura 7**, donde se observa como a medida que aumenta el tiempo de activación, aumenta la rugosidad de la superficie obteniendo unos valores de rugosidad media (R_a) de $0,011 \mu\text{m}$ para la activación con NaOH 3h, $0,024 \mu\text{m}$ para la activación con NaOH 5h y $0,036 \mu\text{m}$ para la activación con NaOH 24h. Las superficies activadas con plasma no se pudieron observar con el microscopio confocal ya que, la baja estabilidad de esta activación no es suficientemente estable en el tiempo para realizar la medida.

Teniendo en cuenta el análisis de los diferentes resultados, a pesar de no observar una topografía rugosa en las muestras de plasma de O_2 , se decidió continuar los ensayos con la activación de NaOH 5 h y plasma cleaning de O_2 para evaluar las diferencias entre ambas.

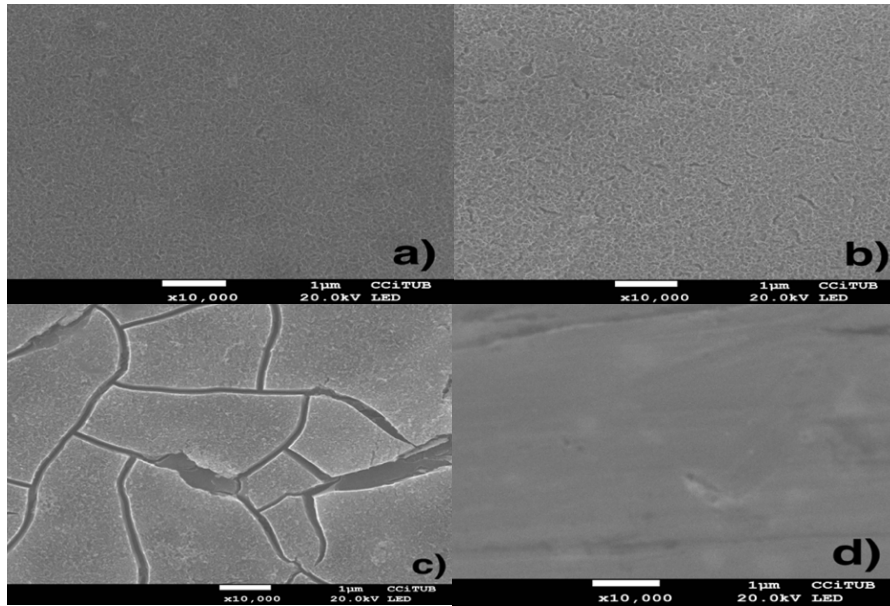


Figura 6. Imágenes obtenidas con FSEM JEOL-7100 de las diferentes activaciones de las superficies de Ti6Al7Nb. A) Muestra activada con NaOH 5M durante 3h, b) Muestra activada con NaOH 5M durante 5h, c) Muestra activada con NaOH 5M durante 24h, d) Muestra activada con Plasma de O₂.

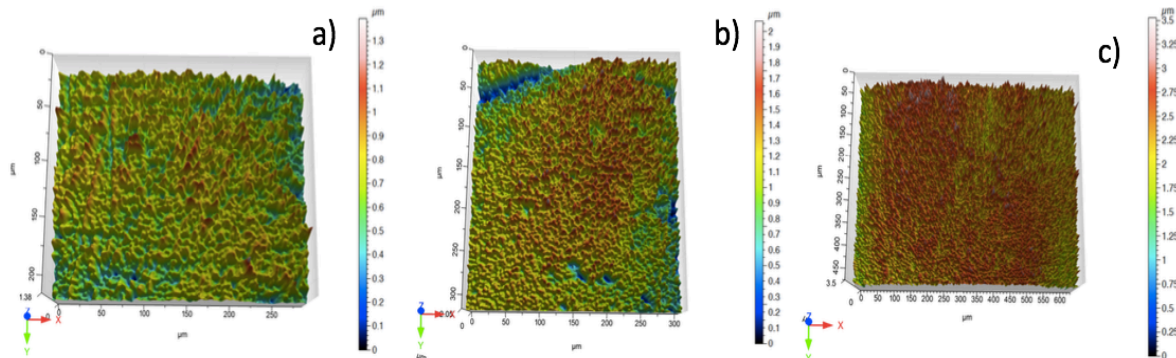


Figura 7. Imágenes obtenidas con microscopio confocal Leica DCM3D de las diferentes activaciones de las superficies de Ti6Al7Nb. A) Muestra activada con NaOH 5M durante 3h, b) Muestra activada con NaOH 5M durante 5h, c) Muestra activada con NaOH 5M durante 24h.

3. Anclaje del KR-12 a la superficie de la muestra

Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X

La biofuncionalización de las superficies de Ti6Al7Nb con polipéptidos se obtuvo mediante diferentes pasos. Primero se realizó una activación de la superficie a través de dos métodos diferentes, por un lado se realizó una activación con NaOH y, por otro lado con plasma de O₂. Finalmente se ancló el polipéptido utilizando APTES y CPTES como agentes acopladores.

En los **gráficos 3 y 4**, se muestra la composición cuantitativa de cada elemento presente en las superficies activadas, antes y después de dicha activación y del anclaje del KR-12. Como se puede observar en dichos gráficos, el porcentaje de silicio aumenta después de la silanización, confirmando así la presencia del silano, sin embargo, después del anclaje de KR-12 esta

proporción de Si disminuye. Esta reducción en las superficies recubiertas con los polipéptidos, del nivel de Si junto con el de Ti y Nb, se podría explicar por la formación de una capa de polipéptidos que cubre la capa inferior de silanos. Por otro lado, después de la silanización se observa un gran aumento del porcentaje de C y N, sobretodo en las superficies recubiertas de polipéptidos, esto se debe a parte de los átomos de C y N aportados por los silanos, al aporte extra de los mismos por parte de cada aminoácido que constituye el polipéptido. Además, se observa como el porcentaje de O disminuye después de todos los tratamientos, sobretodo al añadir los polipéptidos, ya que al generar el recubrimiento se cubre el oxígeno. Los resultados obtenidos mediante XPS confirman la presencia tanto de silano (APTES o CPTES) como del KR-12 en las diferentes superficies, lo que confirma, una exitosa silanización de las superficies de titanio y un exitoso anclaje de KR-12.

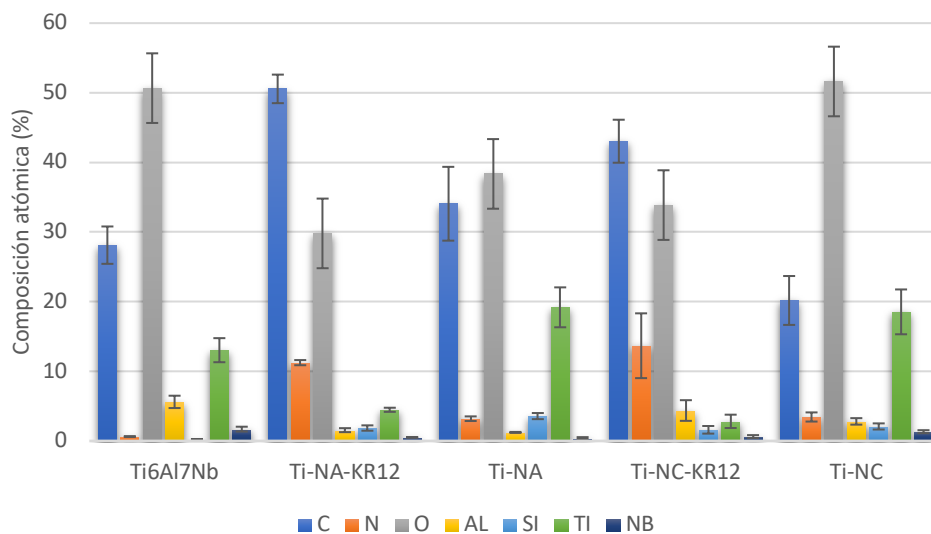


Gráfico 3. Composición química de la superficie de Ti6Al7Nb sin tratar, y de las superficies silanizadas antes y después del anclaje del KR-12 para la activación con NaOH. Las letras N corresponden a activación con NaOH, las letras C a silanización con CPTES y las letras A a silanización con APTES.

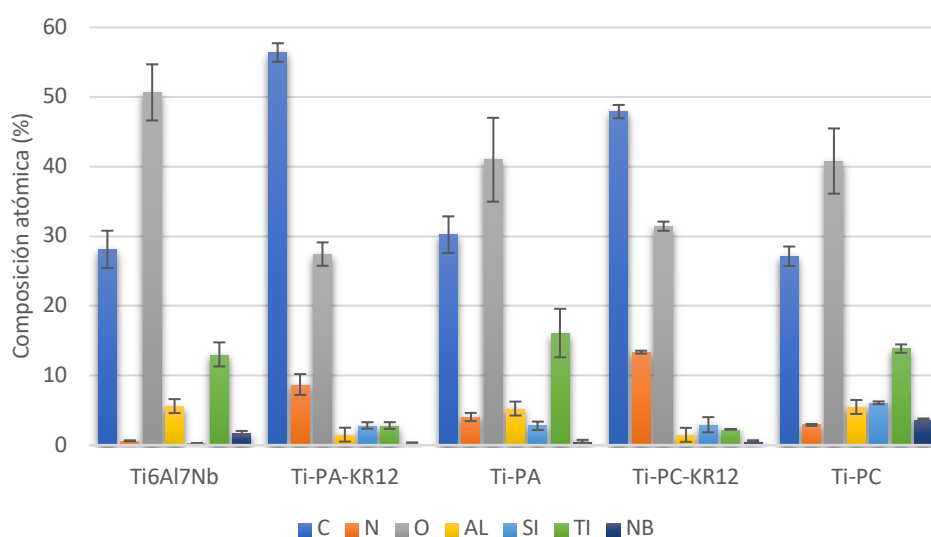


Gráfico 4. Composición química de la superficie de Ti6Al7Nb sin tratar, y de las superficies silanizadas antes y después del anclaje del KR-12 para la activación con Plasma de O₂. Las letras P corresponden a activación con Plasma de O₂, las letras C a silanización con CPTES y las letras A a silanización con APTES.

Evaluación cualitativa de la adhesión del KR-12 a la superficie de Ti6Al7Nb

Para evaluar de forma cualitativa el anclaje covalente del KR-12 a las diferentes superficies, se realizó un marcado fluorescente del KR-12 a través de FITC, y se midió el ángulo de contacto con el agua. En la **figura 8**, se muestran las imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia, donde se observa el KR-12 anclado de color verde. También se ve como las superficies activadas con NaOH 5M presentan una mayor cantidad de KR-12 que las superficies activadas con Plasma de O₂. Las medidas del ángulo de contacto del agua en las diferentes superficies, se puede observar en los resultados de la **figura 9** y la **tabla 1**. La presencia de los polipéptidos confieren una alta polaridad en la superficie, provocando una disminución del ángulo de contacto con el agua, esta es la causa del aumento de hidroflicidad en las superficies con el KR-12 adherido, en comparación con las superficies silanizadas. Las muestras silanizadas con CPTES para ambas activaciones, son las que presentan una mayor disminución del ángulo de contacto con el agua, y por tanto, un mayor anclaje del péptido, esto es posible que se deba a una mayor cantidad de recubrimiento de la superficie por parte del KR-12. En cambio, en las muestras silanizadas con APTES para ambas activaciones, no hubo una disminución tan significativa del ángulo, pero sí que se observa un ligero descenso, por lo que se podría afirmar la presencia del KR-12 en la superficie. Así, dichas medidas sugieren que el recubrimiento de las superficies con el polipéptido ha sido exitosa.

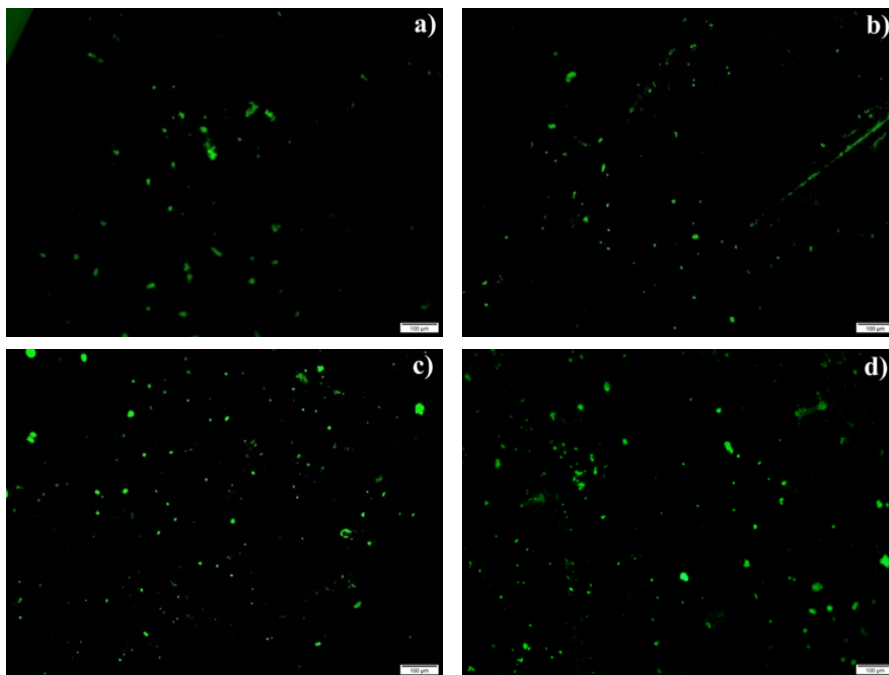


Figura 8. Imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia de las diferentes superficies con el KR-12 anclado. A) Muestra activada con plasma de O₂ y silanizada con APTES, b) Muestra activada con plasma de O₂ y silanizada con CPTES, c) Muestra activada con NaOH y silanizada con APTES, d) Muestra activada con NaOH y silanizada con CPTES

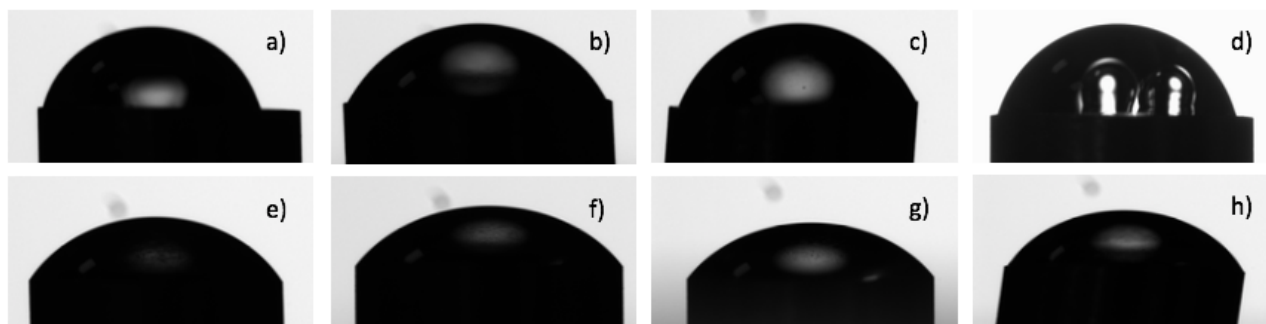


Figura 9. Imágenes del ángulo de contacto del agua de las diferentes superficies antes y después del anclaje del KR-12. Las imágenes superiores corresponden al ángulo sin KR-12 para una condición de activación y silanización determinada, y las imágenes inferiores al ángulo con KR-12 anclado para la mismas condiciones, así, a) y e) corresponden a activación con NaOH y silanización con APTES, b) y f) a activación con NaOH y silanización con CPTES, c) y g) a activación con plasma de O₂ y silanización con APTES, d) y h) a activación con plasma de O₂ y silanización con CPTES.

Tabla 1. Valores de ángulo de contacto del agua de las diferentes superficies antes y después del anclaje del KR-12. Las letras N corresponden a activación con NaOH, las letras P a activación con plasma de O₂, las letras C a silanización con CPTES y las letras A a silanización con APTES.

	Ti-NC	Ti-NC-KR12	Ti-NA	Ti-NA-KR12	Ti-PA	Ti-PA-KR12	Ti-PC	Ti-PC-KR12
Ángulo ± SD	72,85 ± 2,61	59 ± 0,07	58,25 ± 2,05	56 ± 0,14	63,35 ± 1,9	55,15 ± 0,35	74,57 ± 1,9	57,5 ± 2,68

Evaluación cuantitativa de la adhesión del KR-12 a la superficie de Ti6Al7Nb

En el **gráfico 5**, se observan los resultados del anclaje del KR-12 evaluados de forma cuantitativa. La superficie activada con NaOH y silanizada con CPTES fue la que presentó mayor adhesión del KR-12 obteniendo un 25 % de anclaje, y la superficie activada con plasma y silanizada con CPTES fue la que presentó menor anclaje del KR-12 obteniendo un 12,3 % de anclaje.

Los diferentes resultados en cuanto a la evaluación del anclaje del KR-12, sugieren que los polipéptidos se anclaron con éxito en todas las superficies, presentando una mayor adhesión en las superficies activadas con NaOH y silanizadas con CPTES. Esto indica que es una buena opción la utilización de silanos para la obtención de recubrimientos peptídicos. Además, cabe destacar que en las activaciones con plasma, en general no se han obtenido resultados tan destacados como en las activaciones con NaOH.

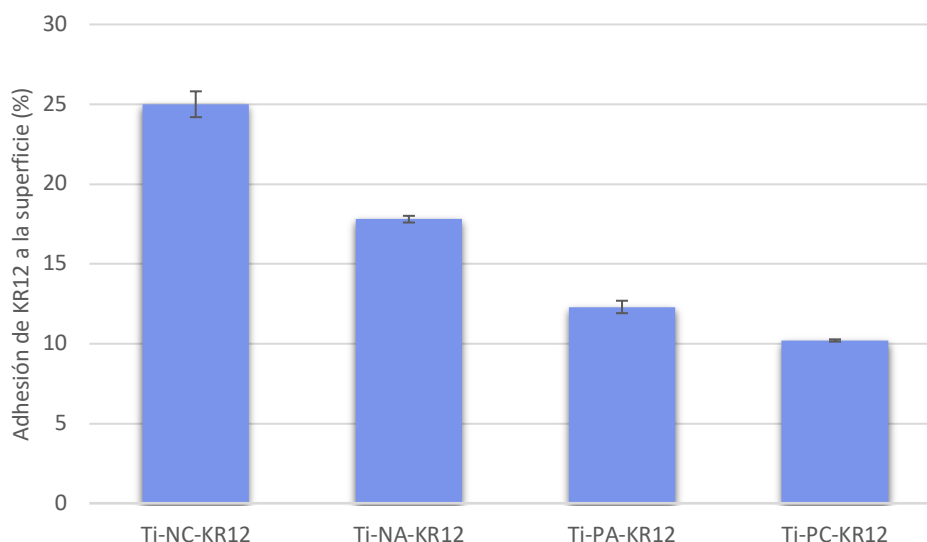


Gráfico 5. Porcentaje de adhesión del KR-12 a las diferentes superficies. Las letras N corresponden a activación con NaOH, las letras P a activación con plasma de O_2 , las letras C a silanización con CPTES y las letras A a silanización con APTES.

4. Pruebas citocompatibilidad

Muchos implantes y prótesis fallan porque el material que lo compone es desfavorable para el crecimiento de las células óseas, por ello, es importante asegurar que el material es biocompatible con las células. En los ensayos de citocompatibilidad se evaluó la proliferación y viabilidad, la adhesión y la mineralización de las células humanas osteoblásticas, en superficies de Ti6Al7Nb con diferentes activaciones y silanizaciones, recubiertas con polipéptidos antimicrobianos.

Los resultados del ensayo Live/Dead se observan en la **figura 10**. Las células vivas se ven de color verde, gracias a la tinción con Calcein-AM y las células muertas de color rojo gracias a la tinción con Etidi homodímero-1. Este ensayo mostró una buena proliferación celular con un aumento significativo de células vivas del día 1 al día 7 de cultivo, confirmando así la proliferación celular. En cambio, a día 14 de cultivo en general se observa una disminución de la cantidad de células vivas, es posible que en este momento las células no tuvieran suficiente espacio sobre el material para crecer ni suficiente medio de cultivo, ya que, a día 7 de cultivo se observó una confluencia celular casi del 100 % que cubría toda la superficie del material. Los resultados respecto a la viabilidad celular en las diferentes superficies se muestran en el **gráfico 6**. Las células mostraron un aumento de la actividad de MTS a medida que pasaron los días, aunque cabe destacar que no hay una diferencia demasiado grande entre los días 7 y 14 de cultivo, además tampoco se observa una clara diferencia entre la viabilidad obtenida en las diferentes superficies. En el inicio del experimento, las superficies fueron cubiertas con 20.000 células osteoblásticas humanas, pero los resultados obtenidos llevan a pensar que en estudios posteriores se debería probar a cultivar una menor cantidad de células, con el fin de comprobar si realmente el ligero descenso de células vivas a los 14 días de cultivo y el no aumento exponencial de la viabilidad ha sido provocado por la falta de espacio sobre el material. También, hay que destacar que otra posible explicación son errores durante la siembra de las células, ya que, al tener un material tan pequeño en determinadas muestras las gota que contenía las células no se sostuvo encima del material, provocando que la siembra inicial fuera menor de 20.000 células, así también se tendría que valorar el uso de una superficie de mayores dimensiones.

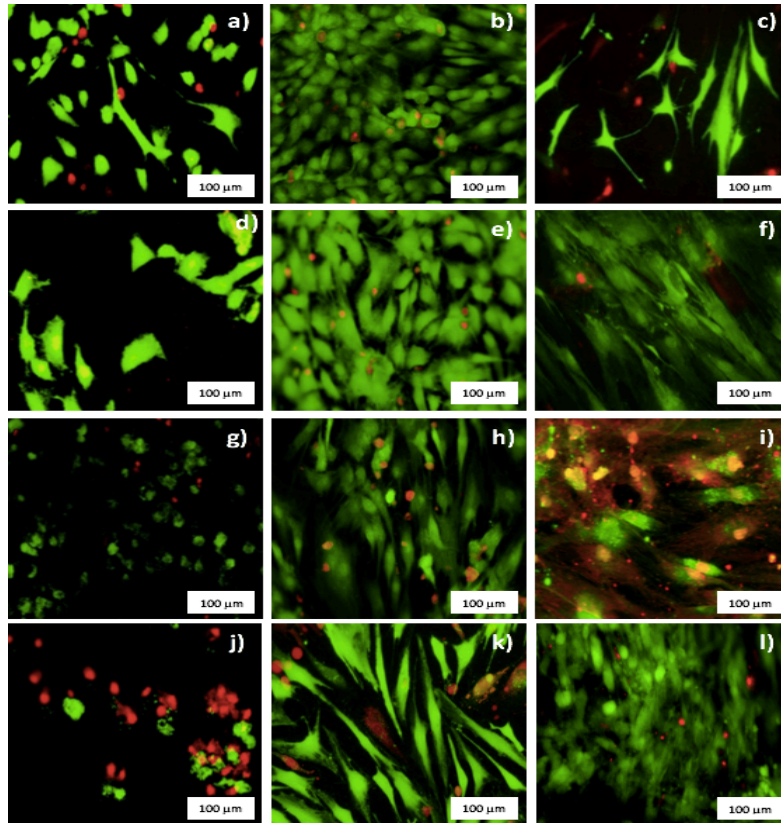


Figura 10. Imágenes a 1, 7 y 14 días cultivo , del ensayo de proliferación celular (Ensayo Live/Dead) obtenidas con el microscopio de fluorescencia. A, b y c corresponden a la superficie activada con NaOH y silanizada con APTES, d, e y f, corresponden a la superficie activada con NaOH y silanizada con CPTES, g, h e i corresponden a la superficie activada con plasma de O₂ y silanizada con APTES, j, k y l corresponden a la superficie activada con plasma de O₂ y silanizada con APTES.

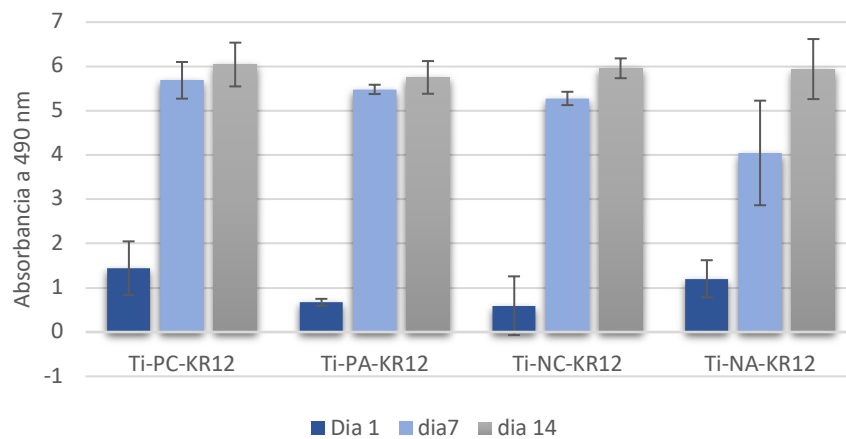


Gráfico 6. Ensayo de viabilidad celular (MTS) a 1, 7 y 14 días de cultivo. Las letras N corresponden a activación con NaOH, las letras P a activación con plasma de O₂, las letras C a silanización con CPTES y las letras A a silanización con APTES.

En la **figura 11**, se muestran los resultados del ensayo de morfología celular. El citoesqueleto se ve de color verde, gracias a la tinción con Phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate y el núcleo de color rojo gracias a la tinción con 6-diamidino fenilindol. Las células cultivadas en las diferentes superficies mostraron una morfología con citoesqueletos bien definidos y extendidos por las extensiones citoplasmáticas largas, lo que confirma que las células son capaces de crecer correctamente sobre el material. Por otro lado, en el **gráfico 7**, se muestran los resultados del ensayo de mineralización. Se observa como después de los 28 días de cultivo, las superficies activadas con NaOH son las que presentan un mayor nivel de mineralización,

pero aún así no hay una diferencia significativa entre las diferentes superficies. Este resultado concuerda con los demás ensayos de citocompatibilidad obtenidos, donde se observa que ninguna de las superficies causa daño a los osteoblastos.

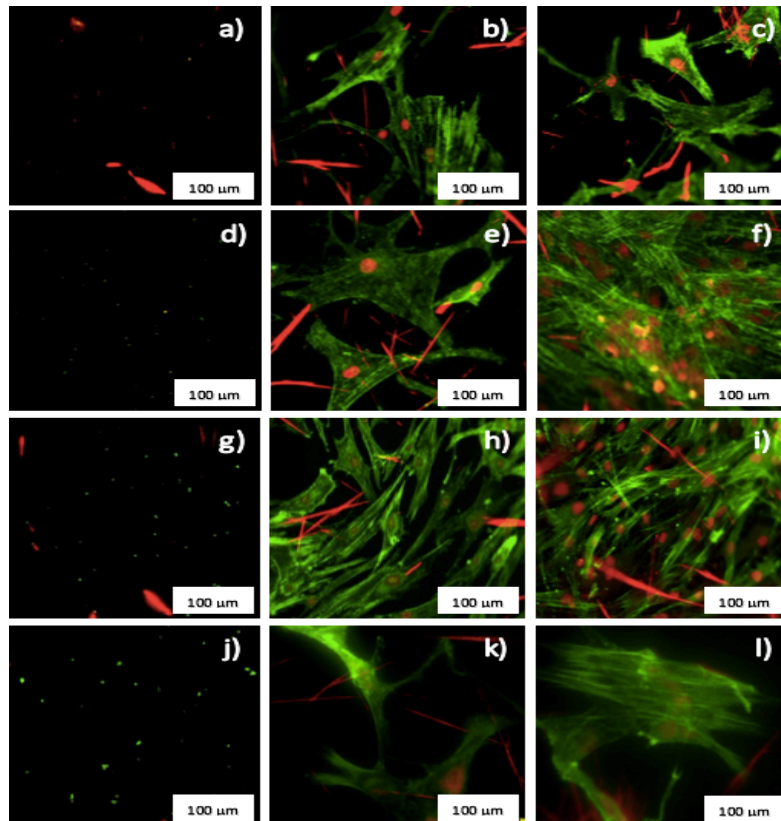


Figura 11. Imágenes a 1, 7 y 14 días cultivo, de la morfología celular (Ensayo Phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate) obtenidas con el microscopio de fluorescencia. A, b y c corresponden a la superficie activada con NaOH y silanizada con APTES, d, e y f, corresponden a la superficie activada con NaOH y silanizada con CPTES, g, h e i corresponden a la superficie activada con plasma de O₂ y silanizada con APTES, j, k y l corresponden a la superficie activada con plasma de O₂ y silanizada con APTES.

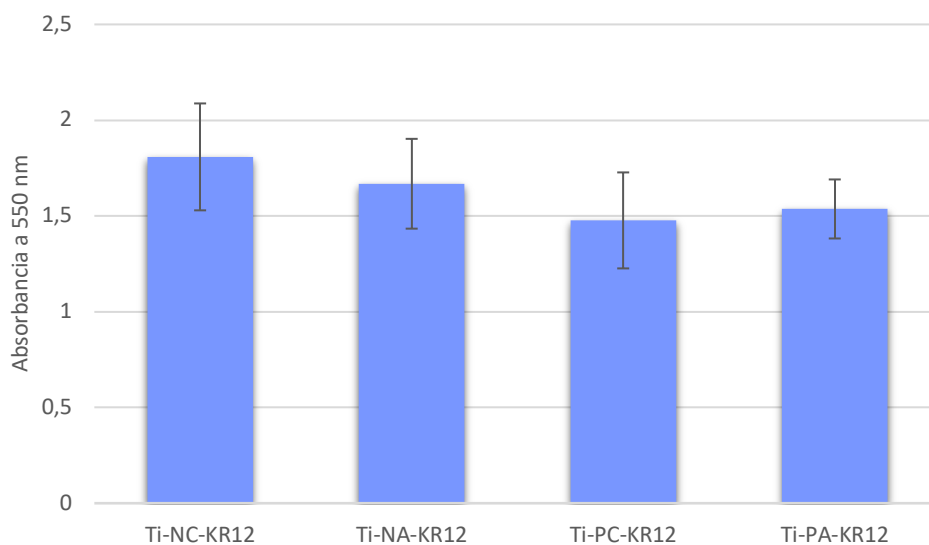


Gráfico 7. Ensayo de mineralización celular (Alizarin) a 28 días de cultivo. Las letras N corresponden a activación con NaOH, las letras P a activación con plasma de O₂, las letras C a silanización con CPTES y las letras A a silanización con APTES.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, se afirma que las diferentes superficies son biocompatibles con las células osteoblásticas humanas (hOB), ya que, dichos osteoblastos mantienen su viabilidad, proliferación, morfología y mineralización.

5. Efecto antimicrobiano de KR-12 contra *Staphylococcus aureus*

Es importante comprobar el efecto antimicrobiano del KR-12, ya que, las infecciones provocan un alto porcentaje de fallo en los implantes. Para ello, se evaluó dicho efecto sobre *S. aureus* por ser el principal causante de infecciones. Primero se determinó la concentración mínima necesaria para inhibir el crecimiento (MIC) de dicha bacteria y finalmente se evaluó a dicha concentración la inhibición de las diferentes superficies. En el **gráfico 8**, se muestran los resultados con respecto a la MIC, se observa como al llegar a los 0,064 mg/ml KR-12 comienza a reducirse drásticamente la viabilidad de *S. aureus*, alcanzando el máximo de inhibición bacteriana a una concentración de 0,5 mg/ml con un 19 % de crecimiento bacteriano. Por otro lado, los resultados en el **gráfico 9**, muestran que el KR-12 de por sí inhibe el crecimiento hasta un 25 %, aunque la inhibición se ve aumentada cuando se ancla a la superficie de titanio, como es el caso de las superficies activadas con NaOH, especialmente la superficie silanizada con CPTES, que son las que presentan un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento de *S. aureus*. Las muestras activadas con plasma no presentan una diferencia considerable en cuanto a la disminución de crecimiento bacteriano.

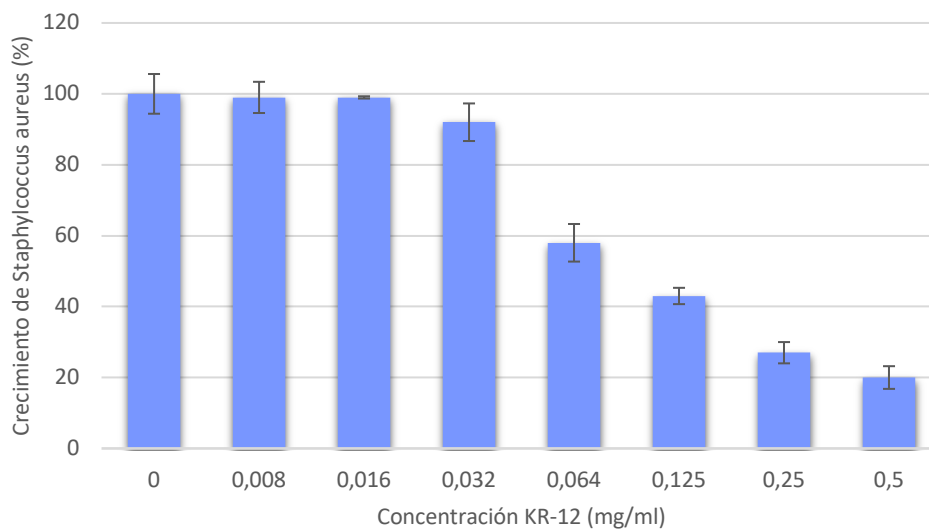


Gráfico 8. Inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* a diferentes concentraciones de KR-12, pasadas 24 horas de incubación.

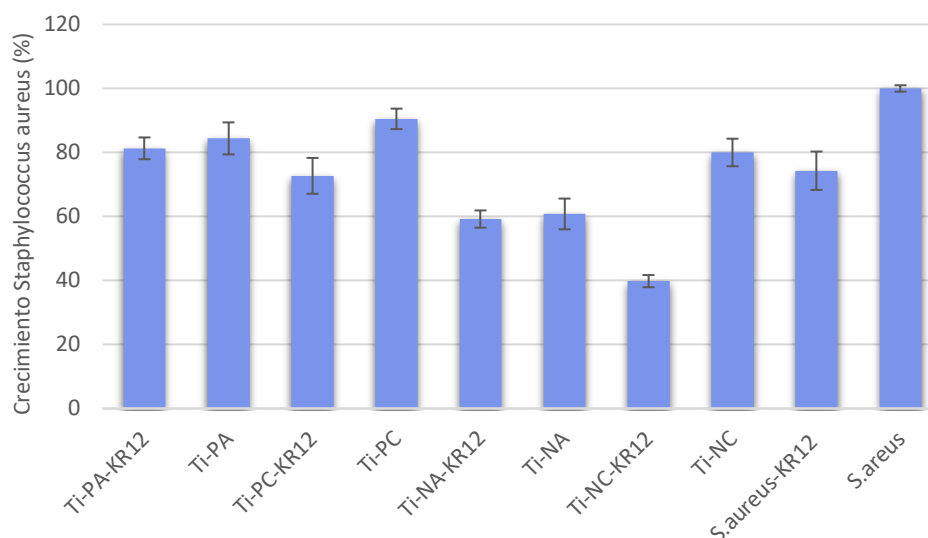


Gráfico 9. Inhibición del crecimiento de las diferentes superficies con y sin KR-12 0,5 mg/ml anclada sobre *Staphylococcus aureus* pasadas 24 horas de incubación. Las letras N corresponden a activación con NaOH, las letras P a activación con plasma de O₂, las letras C a silanización con CPTES y las letras A a silanización con APTES.

Criterios éticos y de sostenibilidad del trabajo

Todo lo realizado en este trabajo se llevó a cabo según principios éticos correctos, y centrándose siempre en la investigación para la mejora de la calidad de vida de los futuros pacientes, que en un futuro podrían ser candidatos para usar una prótesis con el material estudiado. No ha habido ningún tipo de plagio, ya que, toda la información aportada por artículos científicos ha sido referenciada correctamente. Además, los procedimientos y resultados obtenidos no se han manipulado para facilitar la discusión del trabajo, por lo que son fiables. Con respecto a la sostenibilidad del trabajo, se ha considerado el cuidado del medio ambiente, ya que, todos los residuos generados en los experimentos, tanto químicos como biológicos, se desecharon de manera correcta en los recipientes destinados para ello. Se tuvo especial cuidado durante el uso de *Staphylococcus aureus* debido a su facilidad de contagio, todos los recipientes que estuvieron en contacto con la bacteria estuvieron sellados y bien guardados, y finalmente se desecharon en un recipiente que se esterilizó mediante el uso de la autoclave.

CONCLUSION

The adhesion of the polypeptide KR-12 with a silane is a reliable method for the immobilization of biomolecules on the surface of the metallic alloy Ti6Al7Nb. Better adhesion of the oligopeptide KR-12 has been found using the CPTES activation route compared with the APTES silanization process.

The synthesized oligopeptide KR-12 exhibits growth inhibitory activity for the bacterium *Staphylococcus aureus*. However, there is no difference of cytotoxicity between the CPTES and APTES silanization process.

Despite the good biocompatibility of the different surfaces with human osteoblasts, surfaces activated with 5M NaOH and silanized with CPTES seems to be the best option for biofunctionalization, since it has the highest percentage of adhesion of the oligopeptide KR -12 and greater growth inhibitory activity of *Staphylococcus aureus*. More work is needed to corroborate this conclusion.

REFERENCIAS

- Atallah, R., Leijendekkers, R. A., Hoozeboom, T. J., & Frölke, J. P. (2018). Complications of bone-anchored prostheses for individuals with an extremity amputation: A systematic review. *PLoS ONE*, *13*(8), 0–3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201821>
- Campoccia, D., Donati, M. E., Arciola, C. R., Montanaro, L., & An, Y. H. (2018). Etiology of Implant Orthopedic Infections: A Survey on 1027 Clinical Isolates. *The International Journal of Artificial Organs*, *28*(11), 1091–1100. <https://doi.org/10.1177/039139880502801106>
- Campoccia, Davide, Montanaro, L., & Arciola, C. R. (2006). The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials*, *27*(11), 2331–2339. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.11.044>
- Chouirfa, H., Bouloussa, H., Migonney, V., & Falentin-Daudré, C. (2019). Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications. *Acta Biomaterialia*, *83*, 37–54. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.10.036>
- Dubruel, P., Vanderleyden, E., Bergada, M., De Paepe, I., Chen, H., Kuypers, S., ... Schacht, E. (2006). Comparative study of silanisation reactions for the biofunctionalisation of Ti-surfaces. *Surface Science*, *600*(12), 2562–2571. <https://doi.org/10.1016/j.susc.2006.04.021>
- Godoy-Gallardo, M., Mas-Moruno, C., Fernández-Calderón, M. C., Pérez-Giraldo, C., Manero, J. M., Albericio, F., ... Rodríguez, D. (2014). Covalent immobilization of hLf1-11 peptide on a titanium surface reduces bacterial adhesion and biofilm formation. *Acta Biomaterialia*, *10*(8), 3522–3534. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.03.026>
- Gorr, S.-U., Chen, X., Li, Y., Abdolhosseini, M., Aparicio, C., & Holmberg, K. V. (2013). Bio-inspired stable antimicrobial peptide coatings for dental applications. *Acta Biomaterialia*, *9*(9), 8224–8231. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.017>
- Hale, J. D. F., & Hancock, R. E. W. (2007). Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *5*(6), 951–959. <https://doi.org/10.1586/14787210.5.6.951>
- Kim, E. Y., Rajasekaran, G., & Shin, S. Y. (2017). LL-37-derived short antimicrobial peptide KR-12-a5 and its D-amino acid substituted analogs with cell selectivity, anti-biofilm activity, synergistic effect with conventional antibiotics, and anti-inflammatory activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *136*, 428–441. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.05.028>
- Matlakhova, L. A., Matlakhov, A. N., Monteiro, S. N., Fedotov, S. G., & Goncharenko, B. A. (2005). Properties and structural characteristics of Ti-Nb-Al alloys. *Materials Science and Engineering A*, *393*(1–2), 320–326. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2004.11.021>
- Nie, B., Long, T., Li, H., Wang, X., & Yue, B. (2017). A comparative analysis of antibacterial properties and inflammatory responses for the KR-12 peptide on titanium and PEGylated titanium surfaces. *RSC Advances*, *7*(55), 34321–34330.

<https://doi.org/10.1039/c7ra05538b>

- Ravelingien, M., Hervent, A. S., Mullens, S., Luyten, J., Vervaet, C., & Remon, J. P. (2010). Influence of surface topography and pore architecture of alkali-treated titanium on in vitro apatite deposition. *Applied Surface Science*, 256(11), 3693–3697. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.01.008>
- Walkowiak-Przybyło, Komorowski, W. (2017). Differences in the expression of cell cycle genes in osteoblasts and endothelial cells cultured on the surfaces of Ti6Al4V and Ti6Al7Nb alloys. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105(6), 1607–1617.
- Yamamoto, A., Honma, R., & Sumita, M. (1998). Cytotoxicity evaluation of 43 metal salts using murine fibroblasts and osteoblastic cells. *Journal of Biomedical Materials Research*, 39(2), 331–340. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199802\)39:2<331::AID-JBM22>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199802)39:2<331::AID-JBM22>3.0.CO;2-E)