

# Una revisión del uso del $\text{TiO}_2$ en terapias e ingeniería tisular

B. MORENO<sup>1\*</sup>, M. CARBALLO<sup>2</sup>, J.R. JURADO<sup>1</sup>, E. CHINARRO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Cerámica y Vidrio, CSIC, Camino de Valdelatas, s/n, Campus de la Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Cantoblanco, Madrid, España

<sup>2</sup>Hospital Nacional de Parapléjicos de Toledo, SESCAM, Finca La Peraleda s/n, 45071, Toledo, España

El óxido de titanio es considerado un biomaterial multifuncional con una experimentada aplicación en el reemplazo óseo. Sin embargo, gracias a sus propiedades, en los últimos años se ha demostrado la viabilidad de este óxido en nuevas áreas de la biomedicina, como es la ingeniería de tejidos. En esta revisión se pretenden exponer nuevas aportaciones del  $\text{TiO}_{2-x}$  en su interacción con diferentes tipos celulares, revisando aquellas características físico-químicas del material que pueden explicar la naturaleza de su elevada biocompatibilidad. Se demuestra la idoneidad del  $\text{TiO}_{2-x}$  como sustrato para el crecimiento de células hepáticas, endoteliales vasculares o neuronales.

*Palabras Clave:* Óxido de Titanio, Cultivos celulares, Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), Biocompatibilidad, Ingeniería de Tejidos

## Applications of $\text{TiO}_2$ in celular therapies and tissue engineering: a review

Titanium dioxide is considered a multifunctional biomaterial with long established application on bone replacement. Nevertheless, this oxide, due to its unique properties, has shown a potential use in new areas of biomedicine as tissue engineering. This review shows new applications of  $\text{TiO}_{2-x}$  based on the study of its interaction with different cell types. Those physico-chemical properties that can explain the nature of its exceptional biocompatibility are studied, demonstrating the suitability of the  $\text{TiO}_{2-x}$  substrata for the adhesion, growth and development of hepatic, endothelial and neural cells.

*Keywords:* Titanium oxide, Cell culture, Reactive Oxygen Species (ROS), Biocompatibility, Tissue engineering

## 1. INTRODUCCIÓN

Biomaterial es aquel material diseñado, fabricado o modificado por el hombre, puesto en contacto con un sistema biológico para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo<sup>1</sup>. La evolución de los biomateriales durante el pasado siglo ha sido recientemente organizada y subdividida en cuatro generaciones diferentes de biomateriales<sup>2</sup>: (a) la primera de ellas surgió del empleo de materiales de uso estandarizado, basados principalmente en metales, aceros, o polímeros como el poliestireno. Estos materiales estaban diseñados originariamente para ser usados en otro tipo de aplicaciones, pero en un momento dado terminaron en el campo de la biomedicina sin ser modificados específicamente para esta aplicación. (b) En los años cincuenta se comenzó a producir una segunda generación de materiales basada principalmente en titanio y sus aleaciones, ya específicamente diseñados para aplicaciones biomédicas concretas. Estos materiales, junto con otros, como los polímeros termoplásticos dominan hoy en día el nicho de comercialización de prótesis óseas y dispositivos implantables. (c) Durante la década de los noventa surgió la tercera generación de biomateriales al acuñarse el término de bioactividad<sup>3</sup>, definido como aquella propiedad de un material implantado responsable de su interacción con el

tejido vivo. Estos nuevos materiales bioactivos presentaban características e incluso composiciones semejantes a aquellas encontradas en los sistemas biológicos. El ejemplo más claro de este tipo de materiales fue el desarrollo de los biovidrios<sup>4</sup>, o el uso de la hidroxiapatita o la wollastonita en la reparación ósea. (d) La cuarta generación de biomateriales es aquella, que hoy en día se encuentra en fase de desarrollo y no ha sido todavía extrapolada a la aplicación clínica. Está constituida por los llamados materiales inteligentes: aquellos que una vez implantados modifican sus propiedades en función de un estímulo, o que presentan propiedades como sensor para monitorizar una función concreta e interactuar con el sistema biológico.

De la misma forma que los biomateriales han seguido una evolución de acuerdo a las necesidades surgidas y al desarrollo conjunto de la ciencia de materiales junto con la biomedicina; las biocerámicas, en concreto, han seguido una trayectoria similar, llegándose actualmente a proponer su uso en diversas aplicaciones alejadas de su campo más clásico. Las biocerámicas más comúnmente usadas son la alúmina, circona, fosfatos cálcicos, vidrios bioactivos, vitrocerámicos y el carbón<sup>5</sup>. La aplicación directa de las biocerámicas se inició como una alternativa a los materiales metálicos en implantes

dentales y en prótesis óseas<sup>6</sup>, debido principalmente a su alta inercia química y elevada resistencia mecánica. Hoy día, las cerámicas son un grupo específico de biomateriales en uso con aplicaciones que van más allá, de su uso más convencional en el reemplazo de óseo.

En esta revisión se pretende describir aquellas aplicaciones más avanzadas del óxido de titanio, uno de los materiales cerámicos más estudiados y con mayor número de aplicaciones en otras áreas del conocimiento, como es la catálisis y fotocatalisis. Este material no aparece, generalmente, en las clasificaciones que describen las biocerámicas<sup>5,7</sup> aunque indirectamente se ha utilizado en ingeniería biomédica desde los años ochenta<sup>8,9</sup>. Por lo tanto, antes de comenzar a describir en detalle las características y aplicaciones del TiO<sub>2</sub> es obligado mencionar la importancia que ha tenido el Ti metálico en biomedicina como material para la fabricación de implantes, fundamentalmente en odontología y ortopedia.

Es ampliamente conocido que la buena respuesta célula-material del Titanio metálico o de algunas de sus aleaciones es debida a que en presencia de fluidos biológicos el Ti metálico se pasiva, es decir, forma espontáneamente una delgada capa de óxido en su superficie (3-6 nm)<sup>10</sup>. Hoy en día se sabe que esta capa nanométrica de TiO<sub>2</sub> es la responsable de la elevada biocompatibilidad de los implantes de Ti<sup>11</sup>. Entendiendo por biocompatibilidad, la habilidad de un material para no desencadenar un rechazo del organismo huésped en una aplicación concreta, es decir, que un material implantado sea capaz de no inducir o incluso inhibir la respuesta inflamatoria producida cuando el implante es introducido en el organismo<sup>17</sup>.

Cuando el titanio metálico es implantado en un hueso, esta capa bioactiva de TiO<sub>2</sub> de carácter amorfo facilita la oseointegración del implante mediante una serie de reacciones superficiales con el medio. En estas reacciones se produce, entre otras cosas, la formación de una capa de hidroxiapatita amorfa, que termina cristalizando y favoreciendo la reacción del tejido con el material<sup>8</sup>.

Como se ha indicado anteriormente, esta revisión pretende mostrar aquellas aplicaciones menos conocidas del TiO<sub>2</sub> en el área de la ingeniería tisular y las terapias celulares, sin centrarlo en el elevado número de trabajos publicados en los últimos años referentes a la influencia del TiO<sub>2</sub> en el buen comportamiento de las prótesis metálicas para la reconstrucción ósea. Este material gracias a la biocompatibilidad antes mencionada y a otras propiedades físico-químicas ha sido propuesto en aplicaciones que a priori serían aparentemente más adecuadas para otro tipo de biomateriales, como por ejemplo los polímeros, debido a que es cada vez más significativo el peso de aquellas aplicaciones en las que se pretende la interacción de este óxido con tejido blando, tomando ventaja de la elevada supervivencia celular, y la facilidad para la diferenciación que tiene lugar en su superficie. De esta manera podríamos encontrarnos con un biomaterial de cuarta generación, un material inteligente, como se demostrará a continuación, capaz de modular su superficie para interactuar con el tejido y permitir el crecimiento celular con un campo de aplicación cada vez mayor en ingeniería tisular.

## 2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL TiO<sub>2</sub>.

El TiO<sub>2</sub> adopta tres formas cristalográficas fundamentales: brookita (romboédrica, Pbc<sub>a</sub>, a = 5,436 Å, b = 9,166 Å, c = 5,135 Å), anatasa (tetragonal, I4<sub>1</sub>/amd a = b = 3,782 Å, c = 9,502 Å) y rutilo (tetragonal, P4<sub>2</sub>/mnm, a = b = 4,584 Å, c = 9,502 Å)<sup>12</sup>. La transformación de fase entre anatasa y rutilo suele tener lugar entre 475 y 484 °C, según se muestra en el diagrama de fase Ti-TiO<sub>2</sub><sup>13</sup>, figura 1. En la actualidad, el TiO<sub>2</sub> también es el material semiconductor foto-catalítico más utilizado (p.e. para depurar agua), debido a su elevada estabilidad y a su banda favorable de energías prohibidas en torno a 3.0 eV. El TiO<sub>2</sub>, tanto en forma de películas delgadas como en su forma monolítica, presenta propiedades eléctricas explotables para el diseño y producción de materiales electroactivos. Quizás, la fundamental es que el TiO<sub>2</sub> es intrínsecamente un semiconductor tipo n que, inmerso en un fluido electrolítico, puede regular su concentración de defectos electrónicos<sup>14</sup>, por ejemplo, mediante la aplicación de un campo eléctrico, el dopado con aceptores o donadores y/o la introducción de iones capaces de modificar su estructura cristaloquímica<sup>15</sup>. Cuando el TiO<sub>2</sub> está dopado con cationes pentavalentes (ej. Nb<sup>5+</sup>, V<sup>5+</sup>) aumenta la concentración de electrones<sup>16</sup>, sin embargo, cuando está dopado con iones trivalentes (ej. Fe<sup>3+</sup>) se generan huecos electrónicos dando lugar a semiconductores tipo p<sup>17</sup>. De esta manera puede controlarse la aniquilación de cargas móviles por recombinación y adecuar la estructura para el movimiento apropiado de iones y electrones. Según los conceptos expuestos anteriormente cada partícula o superficie de TiO<sub>2</sub> puede ser considerada como una celda electroquímica a escala atómica, propiedad que puede ser explotada en el campo de la biomedicina.

La interacción del TiO<sub>2</sub> con el medio biológico ha sido siempre explicada a partir de los estudios realizados en las prótesis de Ti metálico. Considerando la superficie de este Ti compuesta, a priori, por dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>), ya sea por oxidación directa al exponer la superficie metálica al ambiente, o bien mediante la pasivación de la misma de forma controlada<sup>9</sup>. Cuando esta capa de TiO<sub>2</sub> formada sobre la superficie de Ti metálico, está en contacto con un medio acuoso similar al

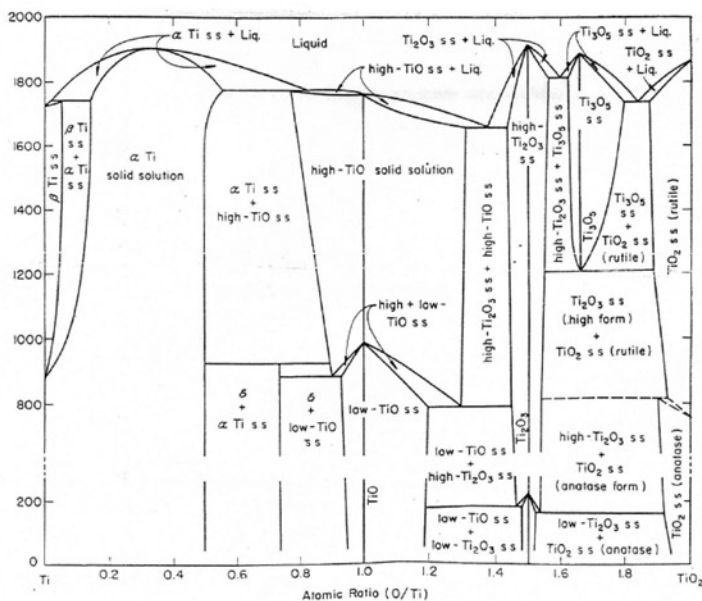


Figura 1. Diagrama binario de fases del Ti-TiO<sub>2</sub> (13).

biológico se observan diferentes fenómenos que tienen lugar en la interfase líquido/óxido. Primero, cuando la hidratación de la capa de óxido tiene lugar, se produce la formación de hidróxidos en su superficie. Estos grupos OH sufren reacciones de tipo ácido-base con el medio, responsables de que existan cargas eléctricas en la interfase, y además poseen un carácter ácido o básico<sup>18,19</sup> según el tipo de átomo de Ti al que se unan, figura 2. Los OH ácidos, se encuentran unidos a dos átomos de Ti (coordinación tipo puente), mientras que los básicos se coordinan a un único Ti. En contacto con el agua, pH = 7, existe una ligera carga negativa debido a la desprotonación de grupos OH unidos a puntos ácidos. Esta carga superficial de la interfaz es la responsable de la interacción primero con los iones inorgánicos que se encuentran en los fluidos y después con macromoléculas como proteínas, lípidos y polisacáridos. La interacción del calcio y el fosfato con la superficie es de particular relevancia para el uso de este material en implantes óseos, la unión de iones Ca<sup>2+</sup> tiene lugar, probablemente debido a la interacción electrostática con la carga superficial negativa<sup>20</sup>, y no requiere de la presencia de fosfato para ser absorbido en la superficie. Por otra parte, es sabido que el fosfato se absorbe en la superficie del TiO<sub>2</sub> como H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> o HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> reemplazando a los grupos OH básicos<sup>21</sup>.

### 3. NATURALEZA DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DEL TiO<sub>2</sub>.

Las reacciones de oxidación y reducción forman parte de numerosas vías bioquímicas y procesos celulares. En los sistemas biológicos existen varios compuestos pro-oxidantes y antioxidantes cuyo balance, extremadamente importante para mantener las funciones vitales<sup>22</sup>, es regulado con precisión. Las desviaciones del balance en una u otra dirección pueden ser deletéreas para la célula y el organismo<sup>23</sup>, así, los cambios en el balance hacia un incremento en la capacidad pro-oxidante se denominan estrés oxidativo y pueden causar daños en diversas dianas biológicas, incluyendo los lípidos, el ADN, las proteínas y los mecanismos de defensa celular, que están formados por enzimas y equivalentes reductores. Por otro lado, los cambios en el balance hacia un incremento del poder reductor, o antioxidante, se definen como estrés reductor y pueden llevar

a distintos tipos de alteraciones moleculares y celulares graves para el organismo. Los principales pro-oxidantes presentes en los mamíferos se generan a partir del oxígeno y el nitrógeno y se clasifican en radicales y no radicales. El grupo de compuestos no radicales lo forman numerosas sustancias, algunas de las cuales son extremadamente reactivas, aunque no radicales por definición. Los compuestos no radicales producidos en las células eucariotas en mayores cantidades son: el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el ácido hipocloroso (HClO). Por otro lado, los compuestos más relevantes que constituyen el grupo de radicales son; el radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), el radical óxido nitroso (NO), el radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>) y el peroxinitrito (OONO<sup>•</sup>). Estas especies son radicales porque contienen por lo menos un electrón no apareado y, a pesar de ello, son capaces de existir independientemente<sup>24</sup>. Ese electrón no apareado les confiere gran reactividad, caracterizada por la fuerte tendencia a obtener o donar un electrón y así estabilizarse. Las células tienen sistemas que contrarrestan el estrés oxidativo actuando en diferentes niveles. La familia de enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) cataliza muy eficientemente la transformación del O<sub>2</sub><sup>-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que las catalasas y las peroxidases reducen el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a agua y oxígeno. Otro mecanismo importante de defensa lo constituyen los antioxidantes de bajo peso molecular, cuya principal fuente es la dieta. Numerosas condiciones patológicas se producen por alteración del balance redox produciendo generalmente una inflamación y, en aquellos casos más extremos, la muerte celular. Una reacción inflamatoria del organismo es una respuesta habitual a una lesión o a la presencia de objetos extraños en el cuerpo. La duración y magnitud de dicha reacción tiene una influencia clara en la estabilidad y biocompatibilidad de los materiales implantados, afectando a la eficacia de los dispositivos biomédicos<sup>25</sup>. Las células inflamatorias que aparecen en una primera etapa de inflamación en la interfase de un implante son los neutrófilos polimorfonucleares, estas células son responsables de la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS), la cual puede ser regulada mediante la interacción de los neutrófilos con el biomaterial, ya que los diferentes materiales pueden afectar la función y viabilidad de dichas células. Si la implantación de un material desencadena la activación de dichos neutrófilos mediante la elevación de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular,

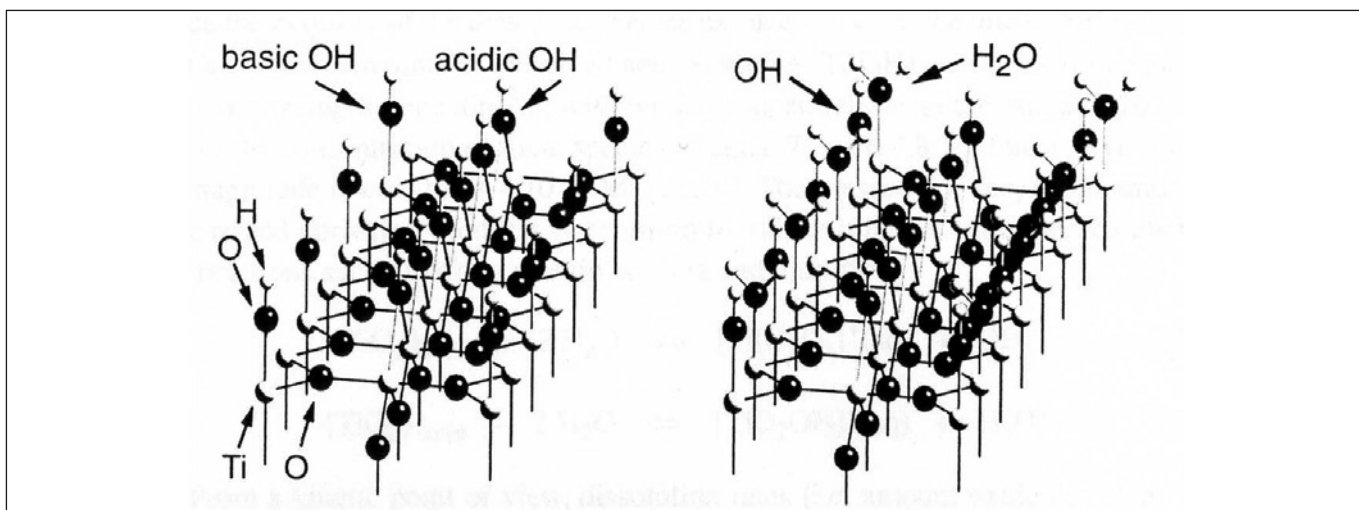
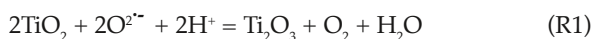


Figura 2. Esquema representativo de una superficie de titanio asumiendo un ordenamiento de átomos semejante al del rutilo (110). Los grupos hidroxilos básicos se encuentran coordinados con un catión Ti, mientras que los hidroxilos ácidos están simultáneamente coordinados a dos Ti (8).

el incremento de la expresión de determinadas integrinas (CD11b)<sup>26</sup>, provoca una combustión respiratoria y ello contribuirá al proceso de degradación del biomaterial y a la pérdida de las características superficiales del implante<sup>27</sup>. Por este motivo es crucial regular el tiempo de vida de dichos neutrófilos activados. La muerte celular regulada por la apoptosis o muerte celular programada y la posterior ingestión de estas células apoptóticas mediante fagocitosis resultan los mecanismos adecuados para la resolución de la inflamación, mientras que si la muerte de dichas células se produce por necrosis, esto provocará la liberación de una mayor concentración de mediadores pro-inflamatorios<sup>28</sup>.

Al final de los años 80 aparecieron diferentes trabajos entre los que se afirmaba que el titanio metálico era un excelente biomaterial con una respuesta favorable al tejido biológico debido a una interacción con el plasma sanguíneo, las células inflamatorias y los mediadores inflamatorios, probablemente distinta a la que tenía lugar en otros materiales. De esta manera, Tengvall y col.<sup>29</sup> publicaron la formación de un complejo Ti-OOH en la superficie de los implantes de Ti metálico, proponiendo esa interfase como la responsable de la biocompatibilidad del mismo. Los grupos Ti-OH superficiales al reaccionar con diferentes especies como  $O_2^-$  y  $OONO^\bullet$  forman  $H_2O_2$  y un peroxigel de Ti, que evoluciona hacia la formación de un hidróxido de Ti o un dióxido de titanio hidratado<sup>30</sup>. Sin embargo, fue casi veinte años después, cuando Suzuki y col.<sup>31</sup> comprobaron experimentalmente la hipótesis formulada por Tengvall, demostrando por primera vez la actividad antiinflamatoria del  $TiO_2$ . Los mismos autores han comparado y demostrado la superioridad del  $TiO_2$  (en forma de polvo) en la eliminación del radical peroxinitrito frente a otros materiales también oxídicos, como el  $Al_2O_3$ , o poliméricos como el poliestireno o la silicona<sup>32</sup>. En este trabajo, estos autores proponen un mecanismo de reacción modificado con respecto a lo publicado por Tengvall y col.<sup>29</sup>, basado a su vez en el modelo catalítico de dos electrones propuesto por Haber<sup>33</sup>, que queda expresado mediante las siguientes reacciones:



Según este mecanismo el  $Ti_2O_3$  puede reaccionar con el peroxinitrito (o con el  $H_2O_2$ ), regenerando el catalizador original, el  $TiO_2$ . Este modelo de reacción requiere, por lo tanto, la formación de  $Ti^{3+}$  en el óxido, coexistiendo con el titanio de valencia +4. Hay alguna evidencia fisiológica de la formación de titanio en un estado de valencia reducida, generándose *in vivo* algún exceso de  $Ti^{3+}$  capaz de ser liberado del material<sup>32</sup>. Varios autores coinciden en que, a pesar de las reacciones arriba formuladas, el mecanismo de eliminación de ROS por el  $TiO_2$  ha de ser más complejo. Unos años más tarde Contreras y col.<sup>34</sup> evaluaron la actividad antioxidante de titanatos de Sr y Ba (dopados y no dopados) comparándolos con muestras de  $TiO_2$  y de  $TiO_2$  dopado con Nb. Estos autores demostraron que los materiales con mayor capacidad para la eliminación de ROS eran aquellos dopados con Nb ( $TiO_2$  y  $SrTiO_3$ ), concluyendo que las propiedades antioxidantes de dichos materiales dependían directamente de la concentración de  $Ti^{3+}$  de la muestra. Se ha demostrado que esta actividad se conserva a pH fisiológico y en presencia de suero, fibrinógeno

y bicarbonato, siendo estas ventajas sustanciales respecto a otras intervenciones antioxidantes como por ejemplo, la introducción de enzimas de la familia SOD que si bien disminuyen la concentración de superóxido, aumentan la formación de  $H_2O_2$ .

Por tanto para la optimización de las propiedades antioxidantes del  $TiO_2$  resulta fundamental generar formas modificadas de este óxido que contengan directamente cantidades apropiadas de los dos estados de valencia (+3 y +4) y que presenten las propiedades catalíticas necesarias para la supervivencia celular.

Podría ser muy conveniente activar los procesos de generación de portadores de carga adecuados mediante la estimulación eléctrica. Normalmente existen impurezas donadoras o aceptoras de electrones en las superficies de  $TiO_2$ . Las impurezas donadoras producen un aumento de la densidad de electrones en la banda de conducción, lo que le confiere al material una alta conductividad eléctrica. Análogamente, las impurezas aceptoras de electrones generan niveles vacíos con energía próxima a la banda de valencia. Estos aceptores pueden reducirse tomando electrones de la banda de valencia y aumentando la densidad de huecos. El efecto final es también un aumento de conductividad. La conductividad electrónica aumentada en la superficie del  $TiO_2$  puede favorecer la adsorción de especies químicas. Así, ambos tipos de defectos ayudan a la adsorción de agua, electrolitos y moléculas orgánicas, especialmente proteínas, al parecer por interacciones electrostáticas<sup>35</sup>. La adsorción de proteínas es también regulable por la micro estructura superficial del  $TiO_2$ <sup>36</sup>. Además de los defectos electrónicos, existen otros defectos tales como las vacantes de oxígeno, así el  $TiO_2$  formalmente debería formularse como  $TiO_{2-x}$  siendo las

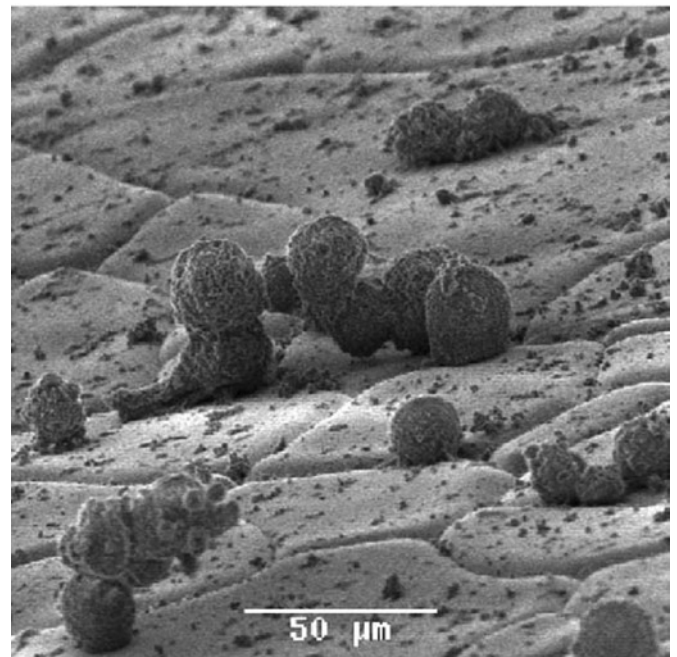


Figura 3. Micrografía de MEB que muestran hepatocitos aislados junto con pequeños agregados celulares cultivados sobre superficies de rutilo. Los hepatocitos fueron aislados del hígado de ratas Sprague-Dawley, sembrados sobre las superficies policristalinas de rutilo a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/ml, se mantuvieron hasta 3 días en cultivo antes de fijarlos para su observación en el microscopio (42).

vacantes de oxígeno compensadas por la adopción del estado de oxidación Ti(+3) por un número equivalente de átomos de titanio; estas vacantes de oxígeno pueden funcionar como sumideros de radicales.

#### 4. APLICACIONES DEL TiO<sub>2</sub>: INTERACCIÓN CÉLULA-MATERIAL

Como se ha comentado anteriormente el éxito del titanio metálico como material para la fabricación de implantes<sup>37</sup> radica en sus propiedades superficiales, principalmente determinadas por la formación de una fina capa de TiO<sub>2</sub><sup>38</sup> esencial para la oseointegración de estas prótesis. La interacción de los *osteoblastos* con los materiales implantados ha sido objeto de gran cantidad de estudios, particularmente en el caso de materiales metálicos, como el Ti y sus aleaciones (TiAlV, etc.)<sup>39,8</sup>. También se han empleado para esta aplicación sustratos basados en materiales cerámicos, considerados como una alternativa para estas aplicaciones en base a sus propiedades<sup>5</sup>. Como ya se ha explicado, el grueso de los estudios encaminados a elucidar la interacción del TiO<sub>2</sub> con

las células y el tejido vivo están realizados en capas finas generadas a partir de la oxidación superficial del titanio metálico, para su uso en implantes óseos<sup>40,8</sup>. Sin embargo, en esta revisión se pretende dar otra perspectiva, resumiendo algunas aplicaciones diferentes y novedosas de este material tanto en ingeniería biomédica como en terapias celulares.

Los fenómenos de adhesión de las células a los materiales se encuentran regidos por la interacción de las proteínas de la membrana celular con las superficies de dichos implantes. Diferencias en el ordenamiento atómico superficial pueden inducir conformaciones diferentes de dichas proteínas y por lo tanto condicionar la adhesión celular.

Existen aplicaciones en las que la morfología celular condiciona la viabilidad de las células y su metabolismo, un ejemplo claro es la preparación de sistemas artificiales hepáticos extracorpóreos para realizar reemplazos metabólicos<sup>41</sup>. Recientemente se ha propuesto el uso de superficies de TiO<sub>2</sub> como un material candidato para el cultivo *in vitro* de hepatocitos. Los estudios realizados incluyen geles de TiO<sub>2</sub><sup>42</sup>, monocristales con diferentes orientaciones, muestras de TiO<sub>2</sub> policristalinas<sup>43</sup>, figura 3, o incluso andamiajes tridimensionales microporosos<sup>41</sup>. Se ha demostrado que las superficies estudiadas

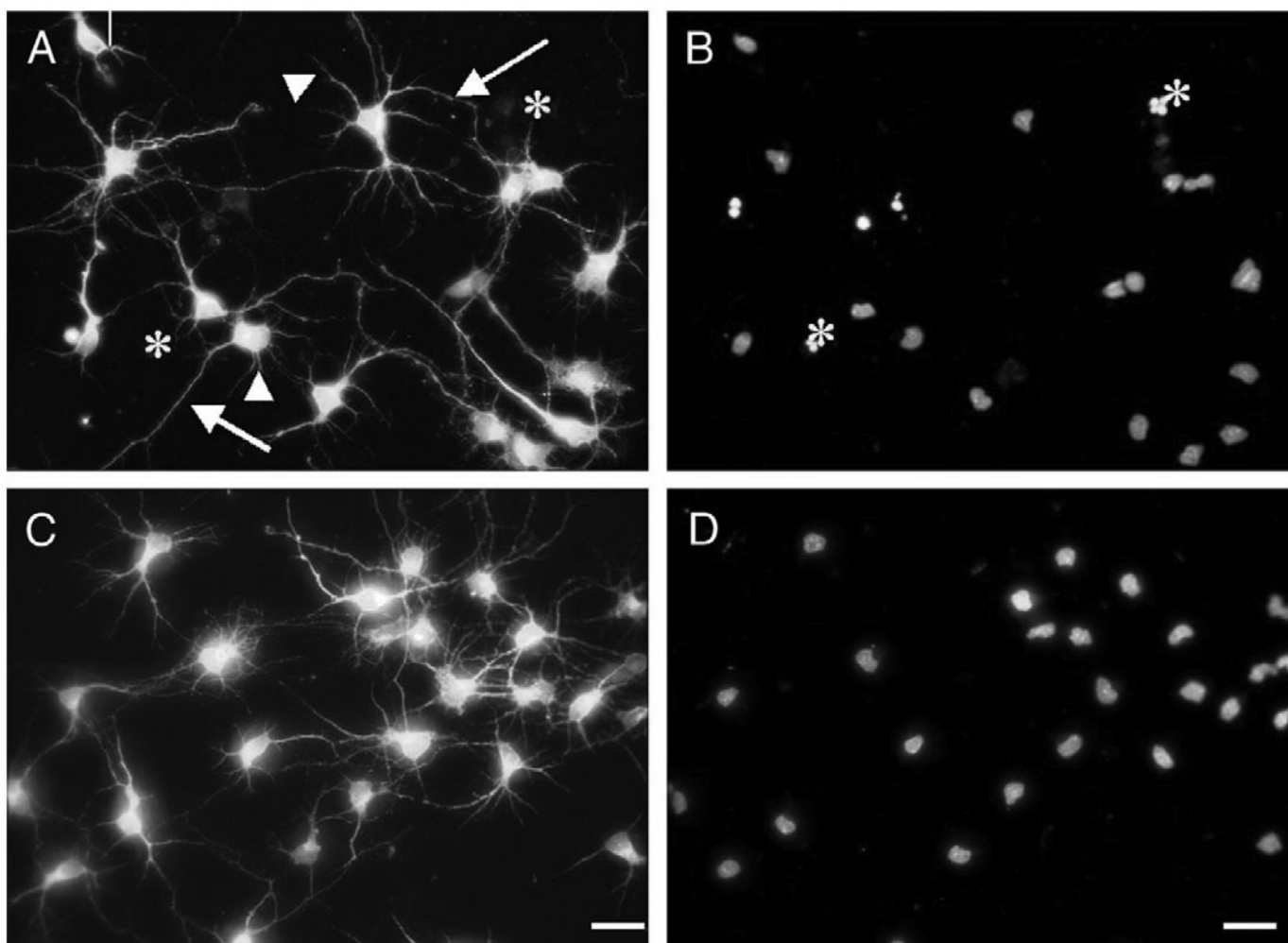


Figura 4. Microfotografías de neuronas obtenidas de córtex cerebral sembradas a una densidad de  $2,5 \cdot 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y cultivadas durante 4 días *in vitro*, en (A y B) vidrio de borosilicato y (C y D) capas de TiO<sub>2</sub> tratadas a 350°C durante 2 h. Tinción inmunocitoquímica con Tau (A y C). La tinción con Hoescht se empleó para identificar los núcleos de las células (B y D). Los asteriscos en A señalan la posición de dos células muertas y en B los núcleos fragmentados y condensados, pertenecientes a dichas células. Las flechas indican procesos largos (axones) y los triángulos las dendritas. Escala: 15 μm. (51).

inducen la agregación celular sin la necesidad de recurrir a recubrimientos proteicos, generalmente empleados para favorecer la adhesión de la célula al sustrato. La formación de estos agregados celulares es necesaria para el mantenimiento prolongado de la diferenciación celular, y son un indicativo de la idoneidad del sustrato para el cultivo de estas células, si bien es cierto que la formación de grandes agregados puede causar

problemas de malnutrición o necrosis<sup>44</sup>. Se ha comprobado como la orientación cristalográfica de las muestras no parece ser un factor condicionante de la actividad metabólica de los hepatocitos, ni tiene una influencia clara en la adhesión de las células<sup>43</sup>, en contra de lo observado en relación a otros tipos celulares, como condrocitos<sup>45</sup>, osteoblastos<sup>46</sup> o células epiteliales<sup>47</sup>. Sin embargo, si que se han encontrado menores viabilidades de las células cultivadas sobre muestras policristalinas de  $\text{TiO}_2$  en comparación con los monocristales. Nakazawa y col.<sup>42</sup> estudiaron la morfología celular sobre la superficie de  $\text{TiO}_2$  como un indicativo de la expresión de las funciones diferenciadas de cultivos primarios de hepatocitos. Este estudio llevado a cabo sobre un recubrimiento amorfo de  $\text{TiO}_2$  obtenido sobre poliestireno corroboró que la cristalinidad de las muestras no resulta significativa para promover la forma esférica en los hepatocitos. Se han detectado algunas discrepancias en estos resultados, Zhao y col.<sup>48</sup> publicaron que la proliferación celular está afectada por el estado cristalino y la fase del  $\text{TiO}_2$  (rutilo-anatasa), hallando que en algunos casos las superficies de rutilo densas con un alto estado cristalino fueron el mejor sustrato para el desarrollo de hepatocitos de todas las superficies evaluadas.

También se ha descrito la utilización del  $\text{TiO}_2$  en aplicaciones vasculares con el objetivo de integrar y evitar el fallo de prótesis coronarias como "stents" o válvulas. En este tipo de implantes la colonización de la superficie por células endoteliales vasculares va a ser fundamental para disminuir el riesgo de trombosis y favorecer la recuperación de la función. El ajuste geométrico de la superficie del  $\text{TiO}_2$  a nivel nanoestructural es un parámetro esencial para el control del crecimiento y diferenciación de células endoteliales y de células de tejido liso muscular. Peng y colaboradores<sup>49</sup> han empleado nanotubos de  $\text{TiO}_2$  para recubrir las superficies de este tipo de implantes, estos autores han encontrado que estas nanoestructuras favorecen significativamente la proliferación de células endoteliales, mientras que restringen el crecimiento de células de tejido muscular liso. Esta selectividad ejercida por el material en el desarrollo celular se explica gracias a la limitación que ejercen los nanotubos de  $\text{TiO}_2$  en el crecimiento del tamaño celular, inhibiendo el desarrollo de las células de tejido muscular liso. Bramer y col.<sup>50</sup> han observado un aumento de la movilidad celular guiada mediante la implantación de superficies de nanotubos de  $\text{TiO}_2$ . Se ha llevado a cabo la diferenciación celular sobre la superficie de los nanotubos de  $\text{TiO}_2$ ; determinando la existencia de una fuerte estimulación celular sobre las superficies de dichos nanotubos alineados verticalmente, considerando muy importante la influencia de su geometría y cristalinidad en el crecimiento celular. Estos hechos indican que un ajuste geométrico adecuado de las superficies del  $\text{TiO}_2$  a nivel nanoestructural será un parámetro esencial para el crecimiento y diferenciación de células endoteliales y células de tejido liso muscular empleadas fundamentalmente en los implantes vasculares.

Gracias a la elevada biocompatibilidad del  $\text{TiO}_2$  y a sus particulares propiedades electroquímicas, recientemente se ha propuesto el uso de este material en neuro-prótesis implantables. El uso del óxido de titanio en el sistema nervioso se ha propuesto gracias a la posibilidad de electroestimular, y a la vez de eliminar la respuesta inflamatoria desencadenada, generalmente, al implantar un material evitando la formación de una capa proteica, fibroblastos, glia, etc., en torno al mismo.

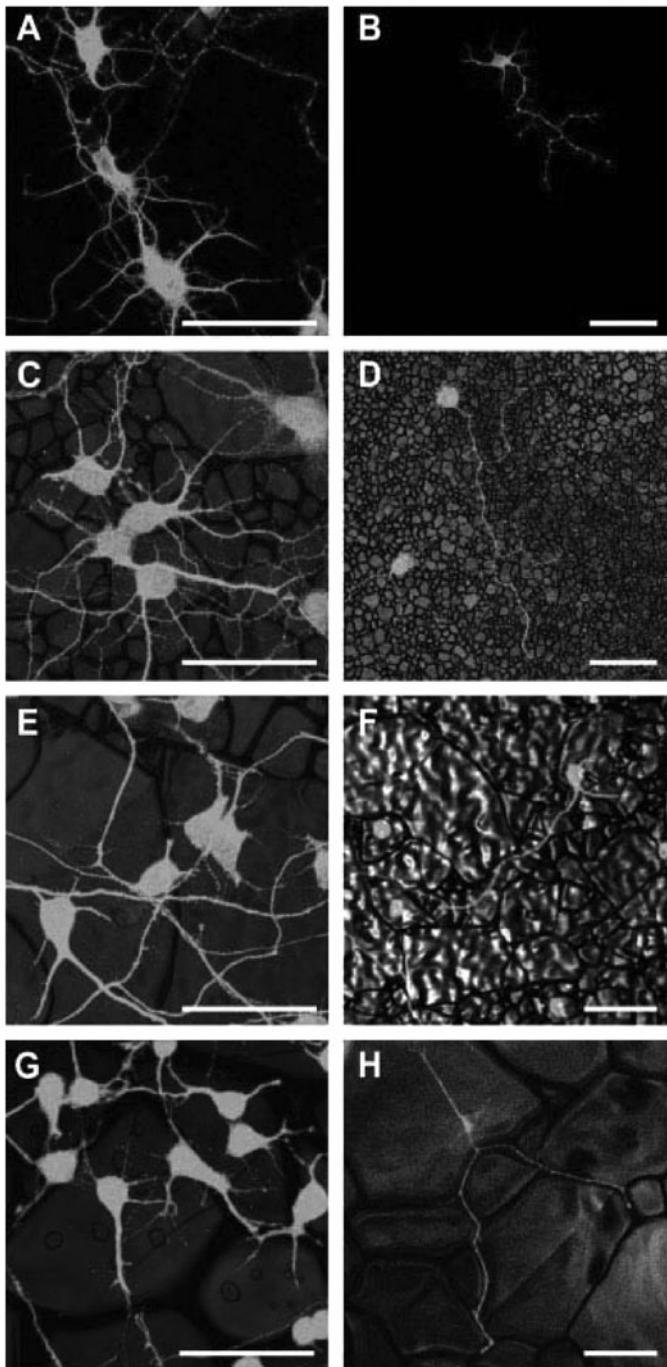


Figura 5. Micrografía confocal que muestra el crecimiento de procesos neurales sobre diferentes sustratos. A y B: neuronas sobre vidrio de borosilicato, C y D: neuronas sobre muestra de rutilo P-I (Sint. 1400°C/4h); E y F: neuronas sobre muestra P-II (1400°C/8h); G y H: neuronas sobre muestra P-IV (1600°C/8h). (A, C, E, G) se tomaron de cultivos de alta densidad. (B, D, F, H) se tomaron de cultivos de baja densidad. Escala: 15 µm. (52)

Collazos-Castro y col.<sup>52</sup> han propuesto el uso de TiO<sub>2</sub> conformado como capas delgadas depositadas sobre sustratos aislantes (vidrios de borosilicato) y otros sustratos conductores, las capas sintetizadas están formadas por TiO<sub>2</sub> amorfo o cristalizado como fase anatasa, dependiendo del tratamiento térmico llevado a cabo. Estos autores han llevado a cabo cultivos celulares de neuronas E14, evaluando su supervivencia a 4 y 10 DIV (*Días in vitro*), figura 4. Así, han demostrado que los materiales sintetizados resultan sustratos adecuados para el crecimiento neuronal al permitir la supervivencia y adhesión de las células cultivadas. Sin embargo, estos autores han encontrado un crecimiento anormal de los procesos emitidos por la célula en su desarrollo. Las células analizadas muestran un número inferior de neuritas en relación al sustrato control (vidrio de borosilicato). De la misma manera, Carballo-Vila y col.<sup>53</sup> han evaluado en el desarrollo de células neuronales E14 tras 4 y 10 DIV, sobre la superficie de discos densos de TiO<sub>2</sub> constituidos por rutilo como fase cristalina y obtenidos con diferentes tratamientos térmicos (figura 5). Estos autores han demostrado como diferencias en el procesamiento cerámico de los discos influyen en la supervivencia y adhesión de las células en la superficie de los sustratos. Así, se ha comprobado como las muestras con un menor tamaño de grano presentan una mayor supervivencia neuronal, en este sentido estos autores han encontrado un desarrollo celular semejante al descrito anteriormente por Collazos-Castro y col.<sup>52</sup>, observando un número inferior de neuritas primarias en comparación al control incluso en los cultivos realizados a 10 DIV. Se ha concluido que las características superficiales de estos materiales son determinantes en la evolución y desarrollo de las células cultivadas "*in vitro*".

## 5. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha pretendido mostrar algunas de las aplicaciones más novedosas del TiO<sub>2-x</sub> como biomaterial, susceptible de ser aplicado en ingeniería tisular. Redefiniendo el óxido de titanio como un biomaterial de cuarta generación, en cuanto a que presenta unas especiales características físico-químicas que le permiten modificar su superficie frente a determinados estímulos. Son estas propiedades las responsables de la elevada biocompatibilidad de este óxido, motivo por el cual se está estudiando con mayor interés la respuesta célula - TiO<sub>2</sub> ampliando cada vez más el campo de aplicación de este óxido.

## BIBLIOGRAFÍA

- D.F. Williams, On the nature of biomaterials, *Biomaterials* 30 (30) 5897-5909 (2009).
- L.L. Hench, J.M. Polak, Third-Generation Biomedical Materials, *Science* 295 (5557) 1014-1017 (2002).
- L.L. Hench, Bioactive ceramics, in *Bioceramics: Materials Characteristics Versus In Vivo Behaviour*, Eds. P. Ducheyne and J.E. Lemons, *Annals of New York Academy of Science*, New York, Vol. 523, 54 (1998).
- L.L. Hench, R.J. Splinter, W.C. Allen and T.K. Greenlee, Bonding Mechanism at the interface of ceramic prosthetic materials, *J. Biomed. Mat. Res. Symp.* 2 (1) 117-41 (1971).
- P.N. de Aza, A.H. de Aza, S. De Aza, Crystalline bioceramic materials, *Bol. Soc. Esp. Ceram.* V. 44 (3) 135-145 (2005).
- M. Vallet-Regi., Ceramics for medical applications, *J. Chem. Soc. Dalton*, 2 97-108 (2001).
- R. Sastre, S. de Aza, J. San Román (Eds), *Biomateriales*, Cytel (2004).
- D.M. Brunette, P. Tengvall, M. Textor, P. Thomsen, *Titanium in medicine*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany (2001).
- P.I. Branemark, R. Adell, T. Albrektsson, U. Lekholm, S. Lundkvist, B. Rockler, Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of endentulousness, *Biomaterials* 4 25 (1983).
- H. Sibum, V. Gunther, O. Roidl, H. Wolf, Titanium and titanium alloys, In *Elvers B. Jawkings S (eds). Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. New York, VCH Publishers 95-121, 1985.
- E. Healy, P. Ducheyne, Hydration and preferential molecular adsorption on titanium invitro. *Biomaterials* 13 (8) 553-561 (1992).
- F.A. Grant, Properties of Rutile (Titanium Dioxide). *Rev. Mod. Phys.* 31, 646 (1959).
- E.M. Levin, C.R. Robbins, H.F. McMurdie, *Phase Diagrams for Ceramists*. (Ed.) M.K. Reser, The American Ceramic Society, Columbia, Ohio, Pág. 41 (1964).
- J.R. Jurado, E. Chinarro, M.T. Colomer, Ceramic conductors for electrochemical cell applications: new perspectives in materials and synthesis, *Solid State Ionics* 135, 365-372 (2000).
- M.T. Colomer, J.R. Jurado, Structural, microstructural, and electrical transport properties of TiO<sub>2</sub>-RuO<sub>2</sub> ceramic materials obtained by polymeric sol-gel route. *Chem. Mater.* 12: 923 - 930 (2000).
- J.C.C. Abrantes, A. Feighery, A.A.L. Ferreira, J.A. Labrincha, J.R. Frade, Impedance spectroscopy study of niobium-doped strontium titanate ceramics, *J. Am. Ceram. Soc.* 85 (11) 2745-2752 (2002).
- J.R. Jurado, M.T. Colomer, J.R. Frade, Impedance spectroscopy of Sr<sub>0.99</sub>Ti<sub>1-x</sub>Fe<sub>x</sub>O<sub>3-δ</sub> materials with moderate Fe-contents. *Solid State Ionics* 143, 251 - 257 (2001).
- H.P. Boehm, Acidic and basic properties of hydroxylated metal oxide surfaces. *Discuss. Faraday Soc.* 52, 264-277 (1971).
- G.D. Parfitt, The surface of Titanium Oxides. In: *Progress in Surface and Membrane Science*, vol 11, Academic Press, New York, 181-226 (1979).
- J.E. Ellingsen, A study on the mechanism of protein adsorption to TiO<sub>2</sub>, *Biomaterials* 12(6), 593-596 (1991).
- T. Hatanawa, P. Ducheyne, G.H. Nancollas, R.z. Legros, J.E. Lemons, B. Kasemo, Titanium and its oxide film, a substrate for formation of apatite, *Workshop on bone-biomaterial interface*, Dec 03-04, 1990 Toronto, Canada, *Bone-biomaterial interface*, 49-61 (1991).
- G. Guizar-Sahagun, I. Grijalva, I. Madrazo, R. Franco-Bourland, H. Salgado, A. Ibarra, A. Zepeda, Development of post-traumatic cysts in the spinal cord rats subjected to severe spinal cord contusion. *Surg. Neurol.* 41, 241 - 249 (1994).
- M. Bunge, N. Kleitman (1999) Neurotrophins and Neuroprotection Improve Axonal Regeneration into Schwann Cell Transplants Placed in Transected Adult Rat Spinal Cord. En: *CNS Regeneration, Basic Science and Clinical Advances*. Tuszynski y Kordower (Eds), Academic Press, San Diego, CA, 55 - 88.
- R. Kohen, A. Nyska, Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for their Quantification. *Toxicologic Pathology*, 2002, 30 (6) 620-650.
- J.M. Anderson, Mechanism of inflammation and infection with implanted devices. *Card. Pathol.* 1993, 2, 33-41
- M.B. Gorbet, E.L. Yeo, M.V. Sefton, Flow cytometric study of in vitro neutrophil activation by biomaterials, *J. Biomed. Mat. Res.* 30, 67-75 (1996).
- R.S. Labow, E. Meek, J.P. Santerre, Neutrophil-mediated biodegradation of medical implant materials. *J. Cell Physiol.* 186, 95-103 (2001).
- C. Haslett, Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes. *Clin. Sci.* 83, 639-648 (1992).
- P. Tengvall, I. Lundstöm, L. Sjöqvist, H. Elwing, L.M. Bjursten, Titanium-hydrogen peroxide interaction: model studies of the influence of the inflammatory response on titanium implants. *Biomaterials* 10, 166-175 (1989).
- J. Larsson, C. Persson, P. Tengvall, H. Lundqvist-Gustafsson, Anti-inflammatory effects of a titanium-peroxy gel: Role of oxygen metabolites and apoptosis. *J. Bio. Med. Mat. Res. A.* 68, 448-457 (2004).
- R. Suzuki, J.A. Frangos, Inhibition of inflammatory Species by Titanium surfaces. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 372, 280-289 (2000).
- R. Suzuki, J. Muiyco, J. McKittrick, J.A. Frangos, Reactive Oxygen Species inhibited by Titanium oxide coatings. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 66, 396-402 (2003).
- F. Haber, Über die autooxydation und ihren Zusammenhang mit die Theorie der Ionen und galvanischen Elemente. *Z. Physik. Chem.* 34 513 (1900).
- R. Contreras, H. Sahlin, J.A. Frangos, Titanate biomaterials with enhanced anti-inflammatory properties. *J. Biomed. Mat. Res. A.* 80 (2) 480-485 (2007)
- A. Klinger, D. Steinberg, D. Kohavi, M. Sela, Mechanism of adsorption of human albumin to Titanium in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* 234, 387 - 392 (1997).
- E. Topoglidis, T. Lutz, R.L. Willis, C.J. Barnett, A.E.G. Cass, J.R. Durrant, Protein Adsorption in Nanopore TiO<sub>2</sub> Films. *Faraday Discuss* 116, 35 - 4 (2000).

- 37 H. Güleriyüz, H. Cimenoglu, Effect of thermal oxidation on corrosion and corrosion-wear behaviour of a Ti6Al4V alloy. *Biomaterials* 25, 3325-3333 (2004).
- 38 J.L. Ong, L.C. Lucas, G.N. Raikar, R. Connatser, J.C. Gregory, Spectroscopic characterization of passivated titanium in a physiologic solution. *J. Mater. Sci. Mater Med* 6, 113-119 (1995).
- 39 L. Saldaña, N. Villaboa, G. Vallés, J. Gonzalez-Cabrero, L. Munuera, Osteoblast response to thermally oxidized Ti-6Al-4V alloy. *J. Biomed. Mat. Res. A*, 73, 97-107 (2005).
- 40 D.F. Williams, Titanium and titanium alloys. (Eds) D.F. Williams, *Biocompatibility of Clinical Implant materials*. CRC Press, Boca Raton, USA (1981).
- 41 S. Petronis, K.L. Eckert, J. Gold, E. Wintermantel, Microstructuring ceramic scaffolds for hepatocyte cell culture. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 12, 523-528 (2001).
- 42 - K. Nakazawa, S.W. Lee, J. Fukuda, D.H. Yang, T. Kunitake, Hepatocyte spheroid formation on a titanium dioxide gel surface and hepatocyte long-term culture. *J. Mater Sci: Mater Med* 17, 356-364 (2006).
- 43 S. Buchloh, B. Stieger, P.J. Meier, L. Gauckler, Hepatocyte performance on different crystallographic faces of rutile. *Biomaterials* 24, 2605-2610 (2003).
- 44 K.L. Eckert, S. Petronis, B. Stieger, P. Meier-Abt, in *Abstracts of the 2nd International Conference of Biomaterials BIOSURF-II*, Lausanne, October 1988. Ed. M. Hoffmann, G. Schmid, J.A. Hubbell. M. Textor, H. Hoffman. pB19.
- 45 B.D. Boyan, T.W. Hummert, D.D. Dean, Z. Schwartz, Role of material surface in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*, 17 (2) 137-146 (1996).
- 46 F. Mante, G.R. Baran, B. Lucas, Nanoindentation studies of titanium single crystals *Biomaterials* 20(11) 1051-1055 (1999).
- 47 D. Hanein, B. Geiger, L. Addadi, Differential adhesion of cells to enantiomorphous crystal surfaces, *Science* 263 (5152) 1413-1416 (1994).
- 48 L. Zhao, J. Chang, W. Zhai, Effect of crystallographic phases of TiO<sub>2</sub> on hepatocyte attachment, proliferation and morphology *J. Biomater. Appl.* 19 (3) 237-252 (2005).
- 49 L. Peng, M.L. Eltgroth, T.J. LaTempa, C.A. Grimes, T.A. Desai, The effect of TiO<sub>2</sub> nanotubes on endothelial function and smooth muscle proliferation, *Biomaterials*, 30 (7) 1268-72 (2009).
- 50 K.S Bramer, S. Oh, J.O. Gallagher, S. Jin, Enhanced cellular mobility guided by TiO<sub>2</sub> nanotube surfaces, *Nano Lett*, 8(3) 786-93 (2008).
- 51 J. Park, S. Bauer, P. Schmuki, K. Von der Mark, Narrow window in nanoscale dependent activation of endothelial cell growth differentiation on TiO<sub>2</sub> nanotube surfaces, *Nano Lett.* 9(9):3157-64, (2009).
- 52 J.E. Collazos-Castro, A.M. Cruz, M. Carballo-Vila, M. Lira-Cantú, L. Abad, A. Pérez del Pino, J. Fraxedas, A. San Juan, C. Fonseca, A.P. Pêgo, N. Casañ-Pastor. *Thin Solid Films* 518 (2009) 160-170.
- 53 M. Carballo-Vila, B. Moreno-Burriel, E. Chinarro, J.R. Jurado, N. Casañ-Pastor, J.E. Collazos-Castro, Titanium oxide as substrate for neural cell growth, *J. Bio. Mat. Res. Part A*: 90 (1), 94-105 (2009).

Recibido: 15-11-09  
Aceptado: 28-12-09

