

**BIOFUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIES DE Ti6Al4V MEDIANTE
GRABADO LASER.**

Físico. ANDERSON ANDRES SANDOVAL AMADOR

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA METALÚRGICA Y CIENCIA DE MATERIALES
MAESTRÍA EN INGENIERIA DE MATERIALES
GRUPO DE INVESTIGACIONES EN CORROSION
BUCARAMANGA**

2015

**BIOFUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIES DE Ti6Al4V MEDIANTE
GRABADO LASER.**

Físico. ANDERSON ANDRES SANDOVAL AMADOR.

Trabajo de grado para optar al título de:
MAGISTER EN INGENIERÍA DE MATERIALES

Directores:

Ph. D. DARIO YESID PEÑA BALLESTEROS

Dr. HUGO ARMANDO ESTUPIÑAN DURAN

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOQUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA METALÚRGICA Y CIENCIA DE MATERIALES
MAESTRÍA EN INGENIERÍA DE MATERIALES
GRUPO DE INVESTIGACIONES EN CORROSION
BUCARAMANGA
2015**

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar este espacio para dejar huella de mi gratitud infinita, pues el desarrollo de este proyecto me permitió crecer enormemente tanto profesional como personalmente y fue un proceso que sin su colaboración, compañía o apoyo no habría podido ser.

Primero que todo, a mis padres, como siempre gracias por su apoyo incondicional, sin ustedes no habría logrado llegar a esto.

Ph. D. Darío Yesid Peña Ballesteros, muchas gracias por haberme abierto las puertas del GIC y haberme brindado su confianza, ha sido una experiencia muy enriquecedora trabajar bajo su guía.

M. Ing. Custodio Vázquez Quintero, solo puedo decir mil gracias, sus consejos y colaboración me permitieron cumplir con todos los objetivos que me propuse durante el posgrado.

Dra. Patricia Escobar Rivero, gracias porque sus palabras de apoyo siempre llegaron en el momento indicado, sus consejos fueron supremamente valiosos e indispensables para lograr la culminación de este proyecto.

Al microbiólogo Heyder Carreño García, compañero gracias por su invaluable colaboración en la realización de los ensayos biológicos que tantos dolores de cabeza nos causaron.

A mis colegas, Jhon Torres, Carlos Mejía, Diego Muñoz, Adán León y demás compañeros del grupo de investigación, por sus largas horas de conversación y discusión sobre los diferentes temas de nuestros trabajos y de la vida, aprendí mucho de ustedes.

A mis pupilos, gracias por haber asumido el reto de trabajar a mi lado y aprender a superar obstáculos en esta aventura llamada investigación.

A la bacterióloga Natalia Gómez R. Gracias por correr el riesgo, por llegar y quedarte en mi vida, gracias porque tu presencia llena de colores mis días, gracias por tu compañía, amor y apoyo incondicional.

Never give up!

RESUMEN

TITULO: BIOBIOFUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIES DE Ti6Al4V MEDIANTE GRABADO LASER*

AUTOR: Físico. Anderson Andrés Sandoval Amador**

Palabras clave: Biofuncionalización, Ti6Al4V, Ablación láser, Adhesión celular, Osteoblastos.

Descripción:

En este trabajo se evaluó la interacción entre las células de osteosarcoma humano (HOS) y superficies biofuncionalizadas mediante grabado láser de la aleación Ti6Al4V. Las superficies de la aleación Ti6Al4V fueron grabadas usando un láser de CO₂ con el fin de obtener patrones circulares (spots) sobre las superficies. Se emplearon tres tipos de superficie, una superficie lisa que se utiliza como superficie de control, y dos superficies con spots, para así determinar el efecto de la geometría telectroquímica y curvas de polarización potenciodinámica. La respuesta biológica del material se llevó a cabo empleando células HOS, las cuales se cultivaron en medio RPMI-1640 con suero fetal bovino al 10% y 1% de antibióticos y se realizaron pruebas de citotoxicidad, adherencia por recuento en cámara de Neubauer y microscopia de epifluorescencia.

Se encontró, que el grabado láser no produce cambios en la resistencia a la degradación y la citotoxicidad la de la superficie de la aleación Ti6Al4V, lo cual indica que las superficies mantienen su biocompatibilidad. Además, las tres superficies de estudio presentaron buena adherencia celular, sin embargo no se pudo determinar si la biofuncionalización mediante grabado láser produce una mejor respuesta celular. Por último, se logró monitorear y modelar el comportamiento electroquímico de la interface material – medio biológico mediante tres modelos de circuito equivalente, logrando con esto explicar el comportamiento de la superficie de la aleación Ti6Al4V al interactuar con las células HOS.

*Trabajo de Investigación.

**Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniera Metalúrgica y Ciencia de Materiales. Maestría en ingeniería de Materiales.

Directores: Ph. D. Darío Yesid Peña B. y Hugo A. Estupiñan Duran.

ABSTRACT

TITLE: BIOFUNCTIONALIZATION OF Ti6Al4V ALLOY SURFACES BY LASER ENGRAVING*.

AUTHOR: Physics. Anderson Andrés Sandoval Amador**

KEYWORDS: Biofunctionalization. Ti6Al4V, laser ablation, cell Adhesion, Osteoblast.

Description:

In this paper the interaction between cells of human osteosarcoma (HOS) and biofunctionalized surfaces by laser engraving Ti6Al4V alloy was evaluated. The Ti6Al4V alloy surfaces were recorded using a CO2 laser in order to obtain circular patterns (spots) on the surfaces. Three types of surfaces, were used as follows, a smooth surface used as a control surface, and two surfaces with sports, to determine the effect of the geometry of the pattern in the response of the biomaterial employed. All surfaces were characterized by SEM-EDS, XRD, contact angle, electrochemical impedance spectroscopy and potentiodynamic polarization curves. The biological response of the material was carried out using HOS cells, which were cultured in RPMI-1640 medium with fetal bovine serum 10% and 1% antibiotics to performance tests as, cytotoxicity, adherence using cell counting in the Neubauer chamber and microscopy epifluorescence.

It was found that the laser engraving produces no change in the resistance to degradation and cytotoxicity of the surface of the alloy Ti6Al4V, indicating that surfaces maintain their biocompatibility. Furthermore, the three study surfaces showed good cell adhesion, however could not be determined if the laser engraved biofunctionalization produces a better cellular response. Finally, it was possible to monitor and model the electrochemical behavior of the interface materials - biological environment through three equivalent circuit models, achieving this explain the behavior of Ti6Al4V alloy surface to interact with the HOS cells.

*Research Work.

**Physicochemical Engineering Faculty. School of Metallurgical Engineering and Materials Science.
Master in Materials Engineering.
Tutors: Ph. D. Darío Yesid Peña B. y Hugo A. Estupiñán Duran.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	18
1. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	18
1.1. ORIGEN DEL PROYECTO.....	18
1.2. MOTIVACIÓN	19
1.3. HIPÓTESIS.....	20
1.4. OBJETIVOS.....	20
1.4.1. Objetivo generalaluar	20
1.4.2. Objetivos específicos.	20
2. ANTECEDENTES.	22
2.1. ESTADO DEL ARTE.....	22
2.2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	28
2.2.1. Biomateriales.	28
2.2.1. Biomateriales metálicos.	28
2.2.2. Aleación de Ti6Al4V.	29
2.2.3. Biodegradación de biomateriales metálicos.	29
2.3. GENERALIDADEES DEL TEJIDO ÓSEO	32
2.4. HUESO Y TEJIDO ÓSEO.....	34

2.4.1.	Matriz ósea.	34
2.4.2.	Células del hueso.....	35
3.	METODOLOGIA.....	37
3.1.	BIOFUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIES DE LA ALEACIÓN Ti6Al4V	38
3.1.1.	Preparación de las muestras Las muestras.	38
3.1.2.	Patronamiento de las superficies de la aleación Ti6Al4V mediante grabado láser.	39
3.2.	CARACTERIZACIÓN DE LAS SUPERFICIES BIOFUNCIONALIZADAS	41
3.2.1.	Caracterización de propiedades superficiales. er.....	41
3.2.2.	Análisis del mecanismo de biodegradación.	41
3.3.	EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR DE LAS SUPERFICIES BIOFUNCIONALIZADAS	42
3.3.1.	Esterilización de las muestras.....	42
3.3.2.	Cultivo celular de osteoblastos de la línea HOS.	43
3.3.3.	Evaluación de la citotoxicidad..	43
3.3.4.	Adhesión y proliferación de osteoblastos.....	44
3.3.5.	Respuesta electroquímica de osteoblastos sobre superficies biofuncionalizadas..	45
4.	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	46
4.1.	CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LA ALEACIÓN Ti6Al4V ..	46
4.2.	BIOFUNCIONALIZACIÓN DE LA ALEACIÓN Ti6Al4V.....	50
4.3.	Caracterización de las superficies biofuncionalizadas de la aleación Ti6Al4V	52
4.4.	Degradación de la superficie biofuncionalizada de la aleación Ti6Al4V ...	56

4.5.	Evaluación de la respuesta celular de las superficies biofuncionalizadas de la aleación Ti6Al4V	61
4.5.1.	Citotoxicidad de las superficies biofuncionalizadas de la aleación Ti6Al4V.	61
4.5.2.	Adhesión celular de las superficies biofuncionalizadas de la aleación Ti6Al4V.	62
4.5.3.	Respuesta electroquímica de las superficies biofuncionalizadas de la aleación Ti6Al4V después de los tres diferentes tiempos de cultivo.....	64
5.	DISCUSIÓN	74
6.	CONCLUSIONES.....	77
7.	RECOMENDACIONES	79
	REFERENCIAS	80
	BIBLIOGRAFIA.....	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático de los procesos que toman lugar durante la interacción de la interfase metal (óxido) / ambiente fisiológico.	30
Figura 2. Estructura del tejido óseo [56].	33
Figura 3. Representación esquemática de la relación existente entre un osteoclasto, osteoblasto vecino, la matriz ósea y un osteocito [61].	36
Figura 4. Diagrama esquemático del diseño metodológico del proyecto.	38
Figura 5. Diagrama esquemático de las dimensiones de las muestras de la aleación de Ti6Al4V	39
Figura 6. Diagrama esquemático de las dimensiones de los patrones empleados en [62] para evaluar el efecto del diámetro en la degradación de la aleación de Ti6Al4V.	39
Figura 7. Diagrama esquemático de los patrones diseñados para grabado láser	40
Figura 8. Micrografía SEM de la superficie de la aleación Ti6Al4V.....	47
Figura 9. Espectro de energía dispersiva de la superficie de la aleación Ti6Al4V.	47
Figura 10. Micrografía óptica de la microestructura de la superficie de la aleación Ti6Al4V.	49
Figura 11. Difractograma de la superficie de la aleación Ti6Al4V.....	50
Figura 12. Patrones grabados con láser sobre las superficies de la aleación Ti6Al4V.	50

Figura 13. Micrografía SEM y espectro de energía dispersiva de la superficie de Ti6Al4V recubierta con Cermark™	51
Figura 14. Difractograma del recubrimiento de Cermark™ aplicado sobre la superficie de la aleación Ti6Al4V.....	52
Figura 15. Micrografías SEM de las superficies biofuncionalizadas de la aleación Ti6Al4V, a) C1, b) C2 y c) C3.....	53
Figura 16. Micrografías SEM de los spots grabados por láser a) patrón 1 – muestra C2 y b) patrón 2 – muestra C3.....	54
Figura 17. Espectro de energía dispersiva obtenido de uno de los sptos.....	55
Figura 18. Ángulo de contacto obtenido de las muestras de la aleación Ti6Al4V biofuncionalizadas mediante grabado láser.....	56
Figura 19. Diagrama esquemático de la interfase de la superficie de la aleación Ti6Al4V biofuncionalizado - medio de cultivo RPMI 1640	57
Figura 20. Curvas potenciodinámicas para las superficies de la aleación Ti6Al4V biofuncionalizadas en contacto con medio RPMI 1640.....	58
Figura 21. Espectros de Impedancia de las superficies de la aleación de Ti6Al4V biofuncionalizadas en contacto con medio RPMI 1640.....	59
Figura 22. Diagrama esquemático del circuito equivalente al cual se ajustan los espectros de impedancia de la superficie de la aleación Ti6Al4V en contacto con medio RPMI 1640.	60
Figura 23. Citotoxicidad de superficies biofuncionalizadas de la aleación Ti6Al4V.	62
Figura 24 Adhesión celular de superficies biofuncionalizadas de la aleación Ti6Al4V a 1, 3 y 5 días de cultivo.....	63
Figura 25. Diagrama comparativo de las micrografías de fluorescencia obtenidas sobre la superficie de la aleación Ti6Al4V biofuncionalizada a 1, 3 y 5 días de cultivo.....	64

Figura 26. Diagrama esquemático de la interfase de la superficie de la aleación Ti6Al4V biofuncionalizado - medio de cultivo RPMI 1640Interfase Ti6Al4V - células HOS - Medio RPMI	65
Figura 27. Espectros de Impedancia de las superficies de la aleación de Ti6Al4V biofuncionalizadas en contacto con medio RPMI 1640 después de 1 día de cultivo.	66
Figura 28 Espectros de Impedancia de las superficies de la aleación de Ti6Al4V biofuncionalizadas en contacto con medio RPMI 1640 después de 3 días de cultivo.....	67
Figura 29 Espectros de Impedancia de las superficies de la aleación de Ti6Al4V biofuncionalizadas en contacto con medio RPMI 1640 después de 5 días de cultivo.....	68
Figura 30. Diagrama esquemático del circuito equivalente al cual se ajustan los espectros de impedancia de la superficie de la aleación Ti6Al4V en contacto con medio RPMI 1640 después de 3 días de cultivo	70
Figura 31. Diagrama esquemático del circuito equivalente al cual se ajustan los espectros de impedancia de la superficie de la aleación Ti6Al4V en contacto con medio RPMI 1640 después de cinco días de cultivo.....	72

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de la aleación Ti6Al4V [48]	29
Tabla 2. Parámetros de las diferentes técnicas electroquímicas empleadas para estudiar el mecanismo de biodegradación.....	42
Tabla 3. Nomenclatura de las muestras estudiadas.	46
Tabla 4. Composición de la muestra de Ti6Al4V obtenida mediante espectroscopia de emisión óptica y proporcionada por la empresa Quirúrgicos Especializados S.A.	48
Tabla 5. Parámetros obtenidos de las curvas potenciodinámicas de las superficies biofuncionalizadas de Ti6Al4V en contacto con medio RPMI 1640.	58
Tabla 6. Parámetro de los elementos del circuito equivalente empleado para simular los espectros de impedancia de la superficie de la aleación Ti6Al4V en contacto con medio RPMI 1640.....	61
Tabla 7. Parámetro de los elementos del circuito equivalente empleado para simular los espectros de impedancia de la superficie de la aleación Ti6Al4V en contacto con medio RPMI 1640 después de 1 día de cultivo.	70
Tabla 8. Parámetro de los elementos del circuito equivalente empleado para simular los espectros de impedancia de la superficie de la aleación Ti6Al4V en contacto con medio RPMI 1640. Después de tres días de cultivo	71
Tabla 9. Parámetro de los elementos del circuito equivalente empleado para simular los espectros de impedancia de la superficie de la aleación Ti6Al4V en contacto con medio RPMI 1640 después de 5 días de cultivo.....	73

ESPECIFICACIONES DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Título	BIOFUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIES DE Ti6Al4V MEDIANTE GRABADO LASER
Autor	Anderson Andrés Sandoval Amador
Director	Ph.D. Darío Yesid Peña Ballesteros
Facultad	Ingenierías Fisicoquímicas
Escuela	Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de Materiales
Entidades interesadas	COLCIENCIAS Grupo de Investigaciones en Corrosión GIC Quirúrgicos Especializados S.A.
Modalidad	Trabajo de investigación
Proyecto enmarcado en el macro proyecto COLCIENCIAS: “DESARROLLO DE NANOESTRUCTURAS MEDIANTE PATRONAMIENTO SOBRE SUSTRATOS DE OSEOINTEGRACIÓN COMO PRODUCTO DE INNOVACIÓN DE LA EMPRESAS QUIRURGICOS ESPECIALIZADOS S.A.” Responsable del proyecto en la entidad ejecutora: Ph. D. Darío Yesid Peña Ballesteros	

INTRODUCCIÓN

1. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

1.1. ORIGEN DEL PROYECTO

El aumento de las perspectivas de vida en la población mundial ha hecho que las patologías relacionadas con los remplazos articulares y enfermedades degenerativas óseas en general vaya en aumento, ya que éstas son de una alta prevalencia en la población mayor de 50 años. Por tal motivo es claro que en nuestra sociedad existe la necesidad de desarrollar materiales de implante ortopédico y a su vez tener el conocimiento de las complicaciones que pueden generar una vez implantados.

Para ello, se han venido desarrollando diversos trabajos de investigación que buscan modificar las propiedades superficiales de los diferentes materiales empleados para la fabricación de prótesis óseas con el objetivo mejorar la respuesta del tejido vivo que la circunda al ser implantada. Estos trabajos han permitido desarrollar diversas técnicas de modificación superficial especialmente

enfocadas a mejorar la superficie de la aleación Ti6Al4V ya que esta aleación es el material de mayor consumo dentro del mercado de prótesis ortopédicas.

Pero desde el punto de vista macroscópico las características superficiales incorporadas a estos materiales son producidas aleatoria e improvisadamente gracias al tipo de tratamiento superficial, lo cual dificulta la obtención de modelos que permitan controlar la topografía y las características químicas de las superficies y a su vez convierten la respuesta celular en un proceso no controlado. Esta dificultad ha tenido consecuencias adversas bien documentadas, reflejadas en bajos grados de biocompatibilidad y consecuente rechazo del implante, lo cual ha causado mayores y muchas veces, traumas irreversibles en pacientes con problemas óseos, convirtiéndose en un problema de calidad de vida.

1.2. MOTIVACIÓN

Las técnicas de modificación superficial han permitido mejorar la interacción entre el material de implante ortopédico y el medio biológico. Esto se ha logrado al generar cambios en la composición, variaciones en la rugosidad, o sencillamente cambios en la morfología de la superficie. En algunos casos estas modificaciones superficiales logran mejorar las propiedades de la superficie del material de forma controlada a través de la obtención de micro y nanoestructuras las cuales generan sitios activos sobre la superficie del material lo que permite poder controlar la respuesta biológica del mismo.

Además de lo mencionado anteriormente, la respuesta biológica está íntimamente ligada a los procesos bioelectroquímicos que toman lugar en la interface tejido – material de implante. Estos procesos proporcionan información relacionada a la biocompatibilidad, la adherencia y proliferación celular y la capacidad de formación de nuevo tejido por parte del material biofuncionalizado.

Por tal motivo, en este trabajo de investigación se evalúa la respuesta biológica de superficie de la aleación Ti6Al4V lisa y patronada por grabado laser empleando un equipo de uso comercial. El estudio del efecto de los micropatrones sobre las superficies de la aleación Ti6Al4V en contacto con medio biológico y células óseas permite lograr un aporte significativo en el estudio de la biodegradación y la respuesta biológica de materiales biofuncionalizados. Además permite generar una alternativa tecnológica viable a nivel industrial para la mejora de los materiales de implante ortopédico por parte de la empresa Quirúrgicos Especializados S.A.

1.3. HIPÓTESIS

Las superficies de la aleación Ti6Al4V biofuncionalizadas mediante patronamiento por grabado láser permite mejorar los procesos de adhesión y proliferación de osteoblastos cultivados en un medio biológico simulado.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo general: Evaluar la respuesta celular de superficies biofuncionalizadas de la aleación Ti6Al4V obtenidas por patronamiento mediante grabado laser.

1.4.2. Objetivos específicos.

- Desarrollar superficies de la aleación Ti6Al4V micrograbadas y bioactivas mediante patronamiento por grabado laser.

- Caracterizar fisicoquímicamente las superficies biofuncionalizadas mediante SEM-EDS, DRX, medición de ángulo de contacto y espectroscopia de impedancia electroquímica.
- Evaluar la respuesta biológica de las superficies desarrolladas, mediante pruebas fisiológicas en ambiente corporal simulado con osteoblastos de la línea HOS.

2. ANTECEDENTES.

2.1. ESTADO DEL ARTE

El daño en el tejido musculo-esquelético es un problema cada vez mayor a causa del incremento de la perspectiva de vida y las enfermedades ósea degenerativas. El injerto óseo es una alternativa terapéutica representada por un procedimiento quirúrgico que, en caso de ser autólogo, requiere un procedimiento adicional, lo que genera un sitio donante y aumenta la morbilidad posoperatoria en el paciente. A esta desventaja se le suman los problemas inmunitarios y el riesgo de transmisión de enfermedades cuando el injerto proviene de un banco óseo. Estas limitaciones han motivado la investigación y el desarrollo de materiales seguros y eficaces, capaces de rellenar defectos óseos, ser reemplazados por el tejido anfitrión e, incluso, estimular los procesos de autoreparación [1]. Así los biomateriales se perfilan como plataformas de imitación extracelular diseñadas para proporcionar señales instructivas para controlar el comportamiento celular y, finalmente, aplicarlas como terapias para reparar, mejorar o mantener la función de los tejidos [2].

A raíz de esto en el último medio siglo se ha experimentado un crecimiento explosivo en el uso de los implantes médicos. Ortopedistas, cardiólogos, cirujanos maxilofaciales y cirujanos plásticos son ejemplos de algunos especialistas médicos que tratan a millones de pacientes cada año por la implantación de

dispositivos que varían desde marcapasos, articulaciones artificiales de cadera, implantes mamarios y dentales, a los audífonos implantables. Todos estos implantes médicos hacen uso de materiales especiales, conocido como biomateriales, que se definen como "materiales destinados a interactuar con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del cuerpo" [3].

Se sabe que una serie de interacciones se producen entre la superficie de los biomateriales y el entorno biológico después de haber sido implantado en el cuerpo humano. Por lo tanto, la superficie de biomateriales juega un papel extremadamente importante en la respuesta de los dispositivos médicos artificiales frente al entorno biológico. La eficacia de los implantes artificiales se determina principalmente por las características de su superficie, tales como la morfología, la microestructura y la composición. Estas propiedades alteran la adsorción de las proteínas que median la adhesión de las células deseadas y no deseadas [4], [5], [6].

Si bien la prioridad de los biomateriales de primera generación fue la inercia con los tejidos vivos, esto ha ido cambiando hacia sistemas biológicamente activos con el fin de mejorar su rendimiento y ampliar su uso. Los biomateriales se pueden combinar como andamios con células, factores de crecimiento o material genético con el fin de desencadenar la regeneración de tejidos [3]. A esta combinación se le ha denominado ingeniería tisular [7], cuyo objetivo no es más que es obtener tejidos vivos que puedan reemplazar estructuras o funciones perdidas. En esencia, consiste en fabricar nuevo tejido vivo funcional mediante un soporte natural, sintético o mezcla de ambos [8].

La falta de eficiencia en la aplicación de los biomateriales se ha notado debido a la poca capacidad de respuesta que estos materiales generan en comparación a la flexibilidad y la reactividad de los tejidos naturales y órganos. Actualmente, la estrategia para diseñar biomateriales inteligentes reside en la capacidad para

instruir entidades biológicas para regenerar completamente los tejidos, en otras palabras, para crear un tejido doble sintético u órgano que puede funcionar como su tejido natural, original.

Esta estrategia se inició a finales de 1960 por Larry Hench, quien planteó la hipótesis de que un material con contenido de calcio y fosfato en proporciones similares al hueso no sería rechazado por el cuerpo. De hecho, se observó una unión fisicoquímica entre los biomateriales diseñados por Hench (Bioglass®) y el hueso de alojamiento [3]. Hasta la fecha, a pesar de biomateriales de fosfato de calcio son relativamente "viejos", su capacidad para desencadenar la formación de hueso es incomparable con otros biomateriales [9]. Sin embargo, estos sustitutos óseos en minerales no pueden sustituir la función mecánica de los huesos, lo que ilustra la necesidad médica aún no satisfecha que es el motor detrás del objetivo final de desarrollar materiales sintéticos con la capacidad de una respuesta adecuada en el medio biológico, es decir, Biomateriales inteligentes [10].

Por esta razón continuamente se investigan los mecanismos biológicos que ocurren en los tejidos y órganos, y en las interfaces de biomateriales a nivel molecular, celular y macroscópico, con el fin de identificar los fenómenos críticos que pueden ayudar a comprender los procesos fundamentales que ocurren en estos sistemas [11].

En algunos estudios se ha manifestado que los procesos de adhesión, extensión, proliferación y diferenciación celular dependen fuertemente de las propiedades fisicoquímicas de la superficie, la carga eléctrica, la conductividad del material, la rugosidad, la rigidez y capacidad de deformación de la superficie. Por ejemplo la composición química de la superficie determina la energía superficial, la polaridad, humectabilidad y potencial zeta, y consecuentemente las características de la interacción célula – material [12], [13], [14], [15], [16], [17], [18].

La carga eléctrica y la conductividad de la superficie del material son factores también importantes para la colonización celular. Se ha demostrado en repetidas

ocasiones que las células se adhieren mejor a las superficies con carga positiva que a las superficies cargadas negativamente. La razón es que la adhesión celular que median las moléculas de la matriz extracelular MEC están cargadas negativamente, por lo que se adsorben preferiblemente en superficies con carga positiva [6], [12], [19], [20].

Por otra parte la rugosidad presente en la superficie de un material de implante tiene una influencia específica sobre el comportamiento del implante y también en la adhesión celular. Los diferentes grados de rugosidad se pueden distinguir de acuerdo a la escalas de las irregularidades, macrorugosidad (irregularidades a partir de 100 micras a unos milímetros), pueden aumentar el anclaje del implante en el tejido óseo circundante, a su vez mejoran la adhesión y difusión celular. La microrugosidad (son las irregularidades de 1 a 100 micras), presenta un comportamiento controversial ya que existen trabajos donde se han mostrado tanto efectos positivos como negativos sobre la colonización celular, este doble efecto sigue siendo poco claro. Según varios autores esto se debe a la falta de un estudio sistémico del efecto de la microrugosidad [12], [21], [22], [23]. El parámetro más ampliamente usado para caracterizar microrugosidad es el R_a (promedio de altura pico a valle), sin embargo esta medida no brinda información sobre las demás características de la topografía (forma, crestas, ranuras, poros, agudeza de los picos, curvatura de los valles, etc.) que podrían obstaculizar la adhesión y propagación celular. Rugosidades submicrométricas (rugosidad de la superficie de 100 nm a 1 micras), al igual que la rugosidad micrométrica presenta un efecto dual en la adhesión celular. Nanorugosidad (son las irregularidades de menos de 100 nm) ha sido inequívocamente considerado como un factor deseable que tiene una influencia positiva en la adhesión, el crecimiento y la maduración de las células. La razón es que las nanoestructuras le dan al material una nanoarquitectura similar a la de la MEC [12], [24], [25], [26], [27].

Todas estas modificaciones se pueden lograr a través del patronamiento de superficies el cual consiste en crear dominios con diferentes propiedades químicas

y físicas, por ejemplo, composición química, humectabilidad, topografía, carga eléctrica. Estas superficies que se pueden desarrollar a escala micro y nano son una herramienta adecuada para todas las aplicaciones en las que se requiere de adhesión celular selectiva, migración y el crecimiento dirigido, la organización espacial específica de las células, la inducción de la diferenciación y funcionamiento, la adherencia preferencial y el crecimiento de ciertos tipos de células, la interacción y la cooperación de diversos tipos de células. Estas aplicaciones implican la ingeniería de tejidos [4], [12], [28], [29], [30].

Dentro de las técnicas de funcionalización se tienen algunas técnicas de patronamiento las cuales se pueden dividir en dos grupos, patronamiento topográfico y patronamiento químico. Dentro de las técnicas del primer grupo tenemos fotolitografía, transferencia de patrones desde películas poliméricas auto ensambladas, desmezclado de polímeros, litografía coloidal, litografía de nanoimpresión, corrugación de superficies, oxidación metálica, gradientes, nanofase, electrohilado y litografía por haz de electrones. Mientras que en el grupo de patronamiento químico tenemos, impresión por microcontacto, transferencia de topografía, nanoestampado supramolecular, películas LB y nano litografía por dip-pen. Todas estas técnicas buscan modificar las propiedades fisicoquímicas de la superficie para así inducir una mejor respuesta frente a la adhesión de proteínas, células y bacterias [11], [31].

Además se tienen técnicas de funcionalización mediante deposición, y técnicas de modificación in situ. Estas son usualmente usadas de forma conjunta para lograr conseguir superficies funcionales nanoestructuradas. Las técnicas de deposición más usuales son: plasma spraying, plasma inmersión, implantación y deposición iónica, sol – gel, deposición física de vapor PVD, deposición química de vapor CVD, cold spraying, entre otras. Las técnicas de modificación in situ incluyen laser etching, shotblasting, tratamientos ácidos y alcalinos, oxidación anódica, micro-arco oxidación, etc [4], [31], [32].

De las técnicas mencionadas es de particular interés la técnica de laser etching o grabado láser. Esta técnica de modificación superficial permite cambiar las propiedades fisicoquímicas de la superficie del material de implante ortopédico bien sea mediante la irradiación total de la superficie [33] o la creación de patrones [34], [35], [36] que logran inducir cambios en la bioactividad, la adherencia de células osteoblasticas y la orientación de las mismas sobre la superficie de estos materiales modificados [37], [35], [38]. Los laser comúnmente usados para modificar estas superficies incluyen el de rubi, Nd:YAG, argón, y CO₂ [33]. Los dispositivos para tallado de superficies equipados con esta clase de laser permiten la posibilidad de generar patrones con diferentes geometrías sobre la superficie lo que a su vez implica una amplia gama de opciones para generar diversos patrones para inducir un posible mejoramiento en la respuesta biológica de los materiales de implante ortopédico [39].

Por último cabe resaltar que se da gran importancia la técnica de grabado láser ya que la empresa Quirúrgicos Especializados S.A. cuenta con un equipo de grabado láser en su planta de producción y actualmente este equipo está siendo empleado para marcar las piezas de implante ortopédico producidas. Lo que quiere decir que se puede potenciar el uso que se está dando al equipo, para así producir materiales de implante con valor agregado, mediante la biofuncionalización de la superficie por grabado laser. En este estudio en particular se analizó el efecto que genera grabar patrones de spots de 100 µm de diámetro sobre superficies de la aleación Ti6Al4V y el efecto de la distancia de separación de dichos spots en la respuesta celular del material.

2.2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.2.1. Biomateriales. Se considera que un biomaterial es un material viable para ser usado en dispositivos médicos destinado a interactuar con los sistemas biológicos. Los biomateriales se distinguen de otros materiales porque poseen una combinación de propiedades químicas, mecánicas, físicas y biológicas que los hacen adecuados para un uso seguro, eficaz y fiable dentro de un entorno fisiológico. Sin embargo, para 1999, un biomaterial se definió como un material o combinación de materiales destinados a formar una interfaz con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, reparar o sustituir cualquier tejido, órgano o función del cuerpo. Esto muestra que hay una creciente tendencia para cambiar de un material bioinerte tradicional a una material bioactivo [40], [41], [42].

La respuesta del biomaterial al ser implantado depende de las características químicas, físicas y morfológicas de las superficies [43] y los medios fisiológicos, tales como la sangre, fluido sinovial y la saliva entre otros [44]. De acuerdo al tipo de respuesta que se presente se puede decir que existe un tipo de biomateriales denominados bioactivos, los cuales estimulan la unión del implante al tejido circundante [42]. Estos materiales, se caracterizan por presentar una reactividad química controlada que cambia con el tiempo, produciéndose reacciones químicas en la superficie que favorecen algún proceso biológico.

2.2.1. Biomateriales metálicos. Los biomateriales metálicos se utilizan ampliamente en implantes dentales y ortopédicos ya que en esta aplicaciones se requiere de materiales con buena resistencia mecánica. Dentro de este grupo de biomateriales los más ampliamente usados son el acero inoxidable 316L, la aleación cobalto - cromo – molibdeno y el titanio puro y sus aleaciones. Las principales consideraciones a la hora de seleccionar un metal o sus aleaciones para aplicaciones biomédicas son la biocompatibilidad, las propiedades mecánicas, la resistencia a la corrosión y su costo [45].

2.2.2. Aleación de Ti6Al4V. La aleación Ti6Al4V cuya composición se especifica bajo la norma ASTM F136 (tabla 1) es la aleación de titanio más ampliamente usada a nivel industrial, adicionalmente es la aleación con mayor aceptación en el mercado de las prótesis ortopédicas y dentales [46]. Es una aleación del tipo alfa-beta (α - β), el aluminio presente en la aleación genera un incremento en la temperatura de la transformación entre las fases y el vanadio presente en la aleación permite la presencia bifásica (α - β) mejorando de manera significativa las propiedades mecánicas de la aleación [47].

Tabla 1. Composición química de la aleación Ti6Al4V [48]

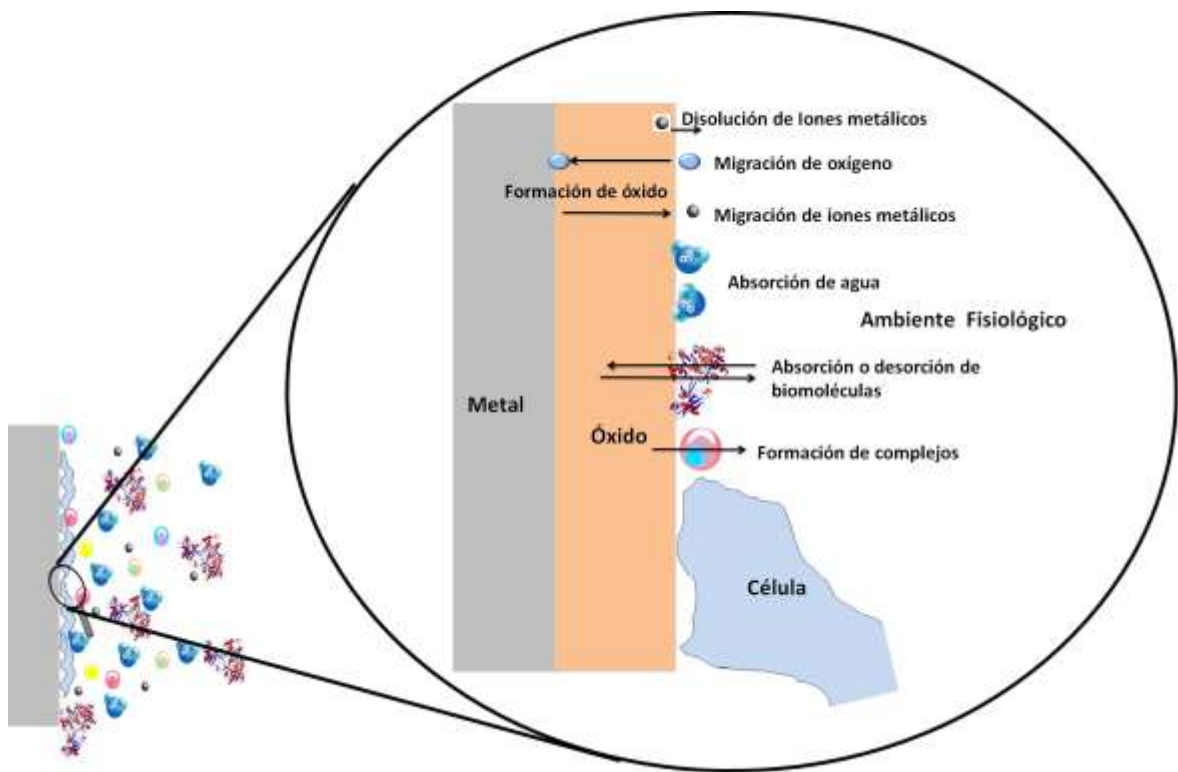
Elemento	Composición, % en peso
Nitrógeno, máx.	0,05
Carbono, máx.	0,08
Hidrógeno, máx.	0,012
Hierro, máx.	0,25
Oxígeno, máx.	0,13
Aluminio	5,5 – 6,5
Vanadio	3,5 – 4,5
Titanio	Balance

Las múltiples aplicaciones dadas a esta aleación se deben principalmente a la buena resistencia a la corrosión, alta tenacidad, buen comportamiento a altas temperaturas, la capacidad de modificar sus propiedades mediante tratamientos superficiales, el bajo módulo de elasticidad y la baja densidad [49], [50]. Además, debido a su alto grado de biocompatibilidad, su bajo módulo de elasticidad (110 GPa), el cual en comparación a los demás materiales es más cercano al módulo elástico del hueso (20 GPa) y su estado bioinerte proporcionan a esta aleación mayor compatibilidad elástica y mayor capacidad de osteointegración [48], [51].

2.2.3. Biodegradación de biomateriales metálicos. La biodegradación de los metales en un entorno biológico comprende varios procesos que pueden

resumirse bajo los títulos de corrosión y desgaste. En muchos de los casos, estos fenómenos están acompañados por una degradación del medio ambiente biológico. Esta interacción entre el biomaterial metálico y el tejido circundante se resumen esquemáticamente en la figura 1 [52].

Figura 1. Diagrama esquemático de los procesos que toman lugar durante la interacción de la interfase metal (óxido) / ambiente fisiológico.



Los fenómenos que ocurren como resultado de las interacciones de los biomateriales metálicos con el medio biológico pueden ser subdivididos en dos grupos según su origen:

- **Desde el implante hacia el tejido.** La liberación de iones metálicos debido a los procesos de corrosión, así como la emisión de óxido o partículas metálicas causadas por efectos mecánicos. Por ejemplo,

para algunos metales, se produce hidrólisis de sus productos de corrosión, lo que resulta en una disminución del pH.

Por otra parte se pueden producir alteraciones del ambiente biológico como consecuencia de las reacciones locales del proceso de corrosión en la superficie del biomaterial (por ejemplo, aumento o disminución de pH a causa de la corrosión localizada, genera una reducción de la presión parcial de oxígeno debido al dominio parcial de la reacción catódica).

Además puede haber variaciones en las fuerzas de interacción y los campos eléctricos en la superficie del biomaterial a causa de las biomoléculas adsorbidas por productos de corrosión (iniciales o finales) y finalmente, puede haber un efecto en los campos eléctricos o las corrientes de la superficie causadas por la corrosión galvánica debido a la presencia de células [52].

- **Desde el entorno biológico hacia el implante.** Se puede provocar una disminución del pH debido al proceso de inflamación local o por daño del tejido circundante. También puede haber lugar a procesos de disolución causada por la influencia de los fluidos corporales que actúan como electrolitos complejos, por ejemplo, la formación de complejos entre las biomoléculas (proteínas) y los iones metálicos en las capas pasivas. Es de resaltar que muchos de los metales utilizados en biomateriales metálicos (cromo, cobalto, cobre, manganeso, molibdeno, níquel y vanadio) son elementos de traza. La liberación de estos iones de los implantes no necesariamente conducen a fenómenos tóxicos, aunque pueden ocurrir tales efectos.

Además, los iones metálicos que constituyen los productos de corrosión iniciales pueden ser hidrolizados por el agua para formar hidróxidos u óxidos (Acompañado por una disminución en el pH). Por

último, cabe mencionar que los mecanismos exactos de la interacción entre el tejido circundante y las capas superficiales del implante aún no se conocen con exactitud y son un tema de investigación básica [52].

2.3. GENERALIDADES DEL TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo es una forma especializada de tejido conjuntivo que, como otros tejidos conjuntivos, está compuesto por células y matriz extracelular. La característica que distingue al tejido óseo de los otros tejidos conjuntivos es la mineralización de su matriz, que produce un tejido muy duro capaz de proveer sostén y protección. La fase mineral de la matriz extracelular está compuesta por fosfato de calcio en la forma de cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) [53].

Las funciones del tejido óseo son las de dar soporte para el sistema musculoesquelético, servir de protección para los órganos vitales (cerebro, corazón, pulmones) y con una función secundaria que es la de servir como depósito de calcio, el cual puede ser movilizado a través de la sangre para así mantener las concentraciones adecuadas de este en todo el organismo.

En la figura 2, se puede observar la estructura del tejido óseo. En la parte interna del hueso se tiene el hueso esponjoso, en la parte intermedia tenemos los conductos de Havers, vasos sanguíneos, matriz extracelular y finalmente en la parte más externa del hueso tenemos un hueso compacto [54], [55].

Figura 2. Estructura del tejido óseo [56].



La matriz ósea esta principalmente conformada por colágeno tipo I y en menor proporción por colágenos tipo V, aunque cabe desatacar que se han encontrado otros tipos de colágeno. Todas las moléculas de colágeno constituyen el 90% del peso total de las proteínas de la matriz ósea. El 10% restante del peso de la matriz ósea está conformado por moléculas no colágenas que conforman la sustancia fundamental (es una sustancia amorfa tipo gel que contiene fibras lo que le brinda la capacidad de soportar esfuerzos de compresión y tensión) del tejido óseo y son necesarias para el crecimiento, el remodelado y la reparación del mismo [53], [55].

En el tejido óseo hay cuatro tipos de células. Las células osteoprogenitoras, son células derivadas de células madres mesenquimales; que dan origen a los osteoblastos. Los osteoblastos son las responsables de secretar la matriz extracelular del tejido óseo; una vez que la célula queda rodeada por la matriz secretada pasa a llamarse osteocito. Las células de revestimiento óseo son células que permanecen en la superficie ósea cuando no hay crecimiento activo. Derivan de los osteoblastos que quedan después del cese de depósito óseo. Los osteoclastos son células de resorción presentes en la superficie ósea donde el hueso se está eliminando o remodelando (reorganizando) o donde el hueso se ha

lesionado. Las células osteoprogenitoras y los osteoblastos son precursoras del desarrollo de los osteocitos [53], [57].

2.4. HUESO Y TEJIDO ÓSEO

El hueso es una de las sustancias más duras del cuerpo, es un material dinámico que cambia de forma constantemente en relación con las fuerzas que soporta (lesiones dan lugar a la resorción del hueso y las tensiones aplicadas sobre el dan paso a la formación de hueso nuevo).

2.4.1. Matriz ósea. Es el componente intercelular del tejido óseo. Constituye la mayor parte del hueso y en su composición se distingue una matriz orgánica y otra inorgánica o mineral [58].

- **Componente inorgánico.** La porción inorgánica del hueso, que constituye alrededor del 65% de su peso seco, está compuesto principalmente por cristales de hidroxiapatita y otros elementos como el bicarbonato, citrato, magnesio sodio, potasio y fosfato de calcio amorfo [58].
- **Componente orgánico.** Este componente constituye el 35% del peso seco del hueso, incluye fibras que son casi de modo exclusivo de colágeno tipo I (entre el 80 y el 90% del componente orgánico). Además en la matriz ósea se encuentran varias glucoproteínas, como lo son la osteocalcina, la cual se une a la hidroxiapatita y la osteopontina, que también se une a ella pero tiene sitios de unión adicionales para otros componentes y también para las integrinas que se hallan en osteoblastos y osteoclastos. La vitamina D estimula la

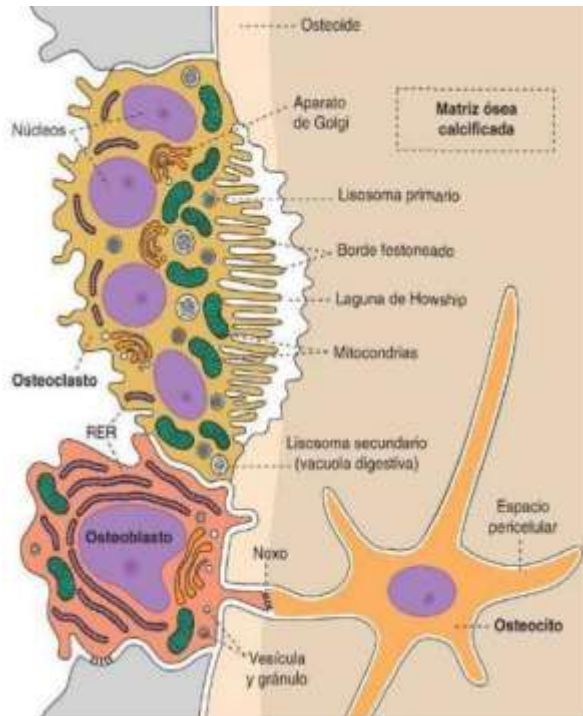
síntesis de estas glucoproteínas. La sialoproteína ósea, otra proteína de la matriz, tiene sitios de unión para componentes de la matriz e integrinas de osteoblastos y osteocitos, lo que sugiere su participación en la adherencia de estas células a la matriz ósea [58].

2.4.2. Células del hueso. Las células del hueso son células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos.

- **Células osteoprogenitoras.** Son células que derivan de células madre mesenquimáticas de la médula ósea y conservan su capacidad para dividirse por mitosis. Estas células se encuentran en la superficie externa e interna del hueso y también en la microvasculatura que irriga el tejido óseo. En los huesos en crecimiento las células osteoprogenitoras aparecen aplanadas o contienen un núcleo alargado u ovoide pálido y un citoplasma acidófilo o ligeramente basófilo poco visible. La morfología de esta célula concuerda con el hecho de que su estimulación la transforma en una célula secretora más activa, el osteoblasto [59], [60].
- **Osteoblastos.** Son células osteoformadoras diferenciadas responsables de sintetizar los elementos proteicos orgánicos de la matriz ósea, incluyendo la colágena tipo I, proteoglucanos y sus aglomeraciones; glucoproteínas multiadhesivas como la sialoproteínas óseas I y II; la osteopontina, la trombospondina, además de proteínas como la osteocalcina y osteonectina (fijadoras de calcio) y fosfatasa alcalina (ALP). Las concentraciones de ALP y osteocalcina circulantes se usan en clínica como indicadores de actividad osteoblastica [59], [60].
- **Osteocitos.** Son células óseas maduras derivadas de osteoblastos que quedan atrapadas en la matriz ósea que secretó como osteoblasto [59], [60].

- **Osteoclastos.** Son células multinucleadas que se originan en progenitores granulocito-macrófago y tienen una función de resorción ósea [59], [60]. En la figura 3 se puede observar una representación esquemática de la relación existente entre las células óseas anteriormente descritas.

Figura 3. Representación esquemática de la relación existente entre un osteoclasto, osteoblasto vecino, la matriz ósea y un osteocito [61].

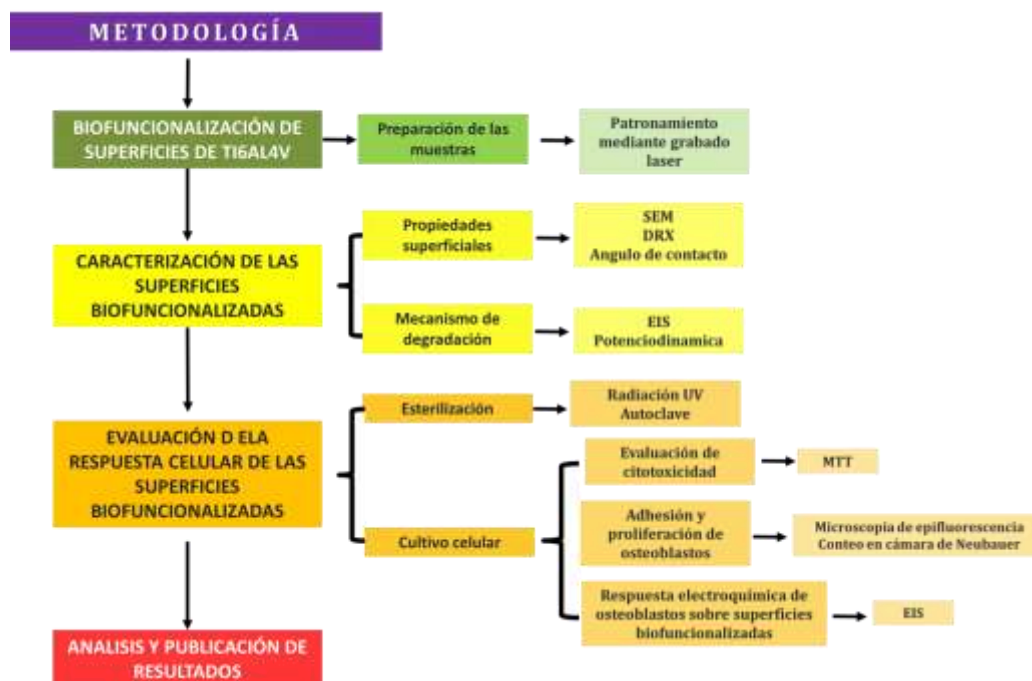


3. METODOLOGIA

En este capítulo se da una descripción de las actividades desarrolladas en el presente trabajo de investigación. Inicialmente se llevó a cabo la verificación de la composición de las muestras de la aleación Ti6Al4V, posteriormente se realizó el grabado láser y se caracterizó el material con el fin de evaluar los cambios que el patronamiento genera en las propiedades fisicoquímicas de la superficie. Por último se evaluó el comportamiento de células de osteosarcoma humano (HOS) sobre las superficies de la aleación Ti6Al4V biofuncionalizadas a diferentes tiempos de cultivo.

El diseño metodológico implementado en este proyecto se puede observar en la figura 4 y las actividades serán descritas en los siguientes numerales.

Figura 4. Diagrama esquemático del diseño metodológico del proyecto.

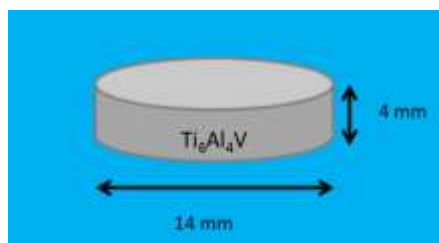


3.1. BIOFUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIES DE LA ALEACIÓN Ti6Al4V

3.1.1. Preparación de las muestras Las muestras se prepararon teniendo en cuenta la norma ASTM E3-11. Para esto se cortaron muestras de la aleación Ti6Al4V con diámetros de 14 mm con un espesor de 4 mm (figura 5), estas muestras se maquinaron, en las instalaciones de la empresa Quirúrgicos Especializados S.A. por lo que la preparación superficial se llevó a cabo con papeles de desbaste de carburo de silicio 3M (180, 220, 360, 400, 600, 1000 y 1200), para obtener una superficie lisa, se continuó con un pulido por paños utilizando alúmina (Böhler de 3 μm y 0,05 μm). Al finalizar fue tomada una muestra de forma aleatoria y se atacó con una solución ácida, cuya composición fue 5% v/v de HNO_3 , 10% v/v de HF y agua destilada, durante 30 segundos de acuerdo con la norma ASTM E-407, para hacer análisis

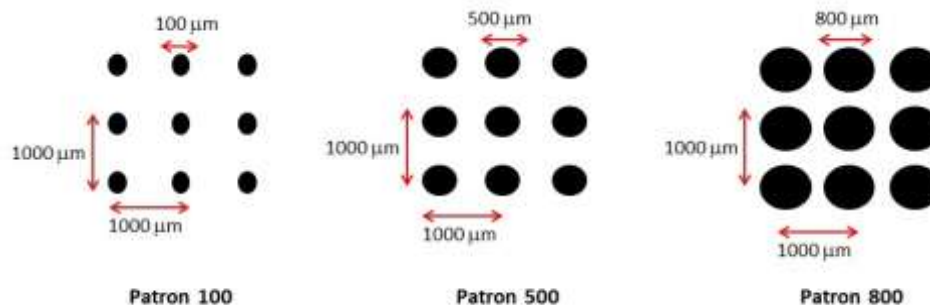
microestructural mediante el Microscopio Óptico (Olympus BX41) a un aumento de 2000X.

Figura 5. Diagrama esquemático de las dimensiones de las muestras de la aleación de Ti6Al4V



3.1.2. Patronamiento de las superficies de la aleación Ti6Al4V mediante grabado láser. Inicialmente, con el fin de evaluar el efecto del diámetro del spot se diseñaron patrones con diámetros de 800, 500 y 100 μm , separados horizontal y verticalmente 1000 μm medias de centro a centro (figura 6). Se evaluó el efecto de estos patrones en la humectabilidad mediante medidas de ángulo de contacto y la degradación mediante pruebas de resistencia a la polarización y curvas potenciodinámicas realizadas en solución Hank [62].

Figura 6. Diagrama esquemático de las dimensiones de los patrones empleados en [62] para evaluar el efecto del diámetro en la degradación de la aleación de Ti6Al4V.



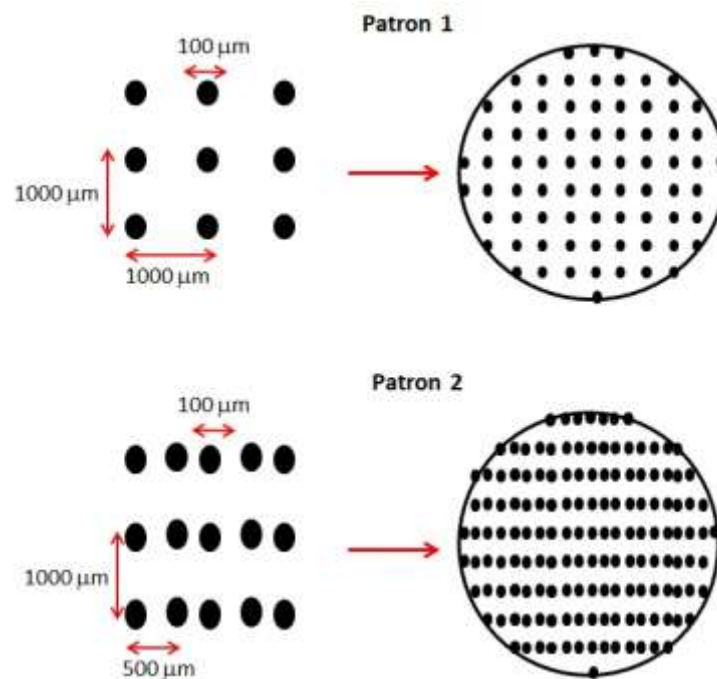
En este trabajo se encontró que el patronamiento por grabado láser produce cambios significativos en la resistencia a la corrosión de las superficies con diámetro de spot mayor a 100 μm , de modo que la

implementación de spots con diámetro superior a $100\ \mu\text{m}$ es inviable desde el punto de vista de la degradación de la superficie.

Por otra parte, se encontró que el diámetro del spot afecta notablemente la humectabilidad de la superficie, produciendo hasta un incremento en la humectabilidad del 50% en la superficie con spot de $800\ \mu\text{m}$ (ángulo de contacto medido = 28.8) respecto a la superficie de la aleación sin patronar (ángulo de contacto medido = 60.8) [62].

Partiendo de estos resultados obtenidos previamente, se diseñaron dos patrones de spots usando Corel Draw en las instalaciones de la empresa Creamos Publicidad de la ciudad de Tunja. Las dimensiones de los patrones diseñados se muestran en la figura 7.

Figura 7. Diagrama esquemático de los patrones diseñados para grabado láser



Para grabar estos patrones sobre la superficie de la aleación Ti6Al4V se empleó un equipo Laserpro X380-RX que se encuentra en las instalaciones de la empresa Láser-Mac SAS, ubicada en la ciudad de Bucaramanga. Este

equipo de grabado láser cuenta con un tubo láser de CO₂ de vidrio sellado, con una longitud de onda es de 10.6 μm y una potencia máxima de 100 W.

Los patrones diseñados permiten evaluar el efecto de la geometría del patrón en la respuesta celular de la superficie de la aleación Ti6Al4V.

3.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS SUPERFICIES BIOFUNCIONALIZADAS

3.2.1. Caracterización de propiedades superficiales. La morfología de las superficies de la aleación de Ti6Al4V lisa y biofuncionalizada mediante grabado láser se observaron mediante microscopía electrónica de barrido SEM, un análisis puntual de la composición de las superficies antes y después del proceso de grabado láser se llevó a cabo mediante espectroscopia de energía EDS y difracción de rayos x, por último la humectabilidad de las superficies de estudio fue evaluada mediante tensiometría de gota. Estas mediciones se llevaron a cabo en las instalaciones del edificio de investigaciones de la Universidad Industrial de Santander.

3.2.2. Análisis del mecanismo de biodegradación. Para comprender el mecanismo de biodegradación de la aleación Ti6Al4V se llevaron a cabo pruebas de potencial a circuito abierto, espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) y curvas de polarización potenciodinámica. Estos ensayos se realizaron empleando un potenciostato/galvanostato Gamry 600, conectado a una celda plana de tres electrodos, donde se emplea grafito y Ag/AgCl como contra electrodo y electrodo de referencia respectivamente.

Los parámetros de operación de los ensayos electroquímicos mencionados se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Parámetros de las diferentes técnicas electroquímicas empleadas para estudiar el mecanismo de biodegradación.

Potencial a circuito abierto	
Tiempo de interacción sin registro	1800 s
Tiempo de registro de datos	1800 s
Velocidad de muestreo	1 dato/s
Espectroscopia de impedancia electroquímica	
Voltaje AC	10 mV
Frecuencia inicial	0.01 Hz
Frecuencia final	100000 Hz
Polarización potenciodinámica	
Voltaje mínimo	-500 mV
Voltaje máximo	2500 mV
Velocidad de barrido	1 mV/s

Para llevar acabo los ensayos electroquímicos las muestras de la aleación Ti6Al4V lisas y biofuncionalizadas se sumergieron en medio de cultivo RPMI 1640 enriquecido con 10% se suero fetal bovino. Además, estos ensayos se realizaron a una temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 95% de humedad y 5% de CO_2 con el fin de simular las condiciones biológicas a las que estaría el material al ser implantado.

3.3. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR DE LAS SUPERFICIES BIOFUNCIONALIZADAS

3.3.1. Esterilización de las muestras. Las muestras lisas y biofuncionalizadas de la aleación Ti6Al4V fueron esterilizadas mediante radiación de luz UV durante 30 minutos por ambas caras y posteriormente en autoclave (All American

modelo no 25X) a 120 °C durante 30 minutos, esto con el fin de eliminar todo tipo de microorganismos.

3.3.2. Cultivo celular de osteoblastos de la línea HOS. Se emplearon células de osteosarcoma humano provenientes de la línea celular HOS (ATCC, CRL-1543) obtenida de American Type Culture Collection. Las células fueron mantenidas en placas de cultivo Falcon de 25 ml, con medio RPMI-1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SBF Hyclone laboratories) y una solución de antibiótico de 1% de antibiótico de Penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml, sin rojo fenol, pH= 7.2 a 37°C ± 0.5°C, 95% de humedad y 5% de CO₂. Para garantizar el suministro adecuado de nutrientes en las placas de cultivo el medio de cultivo se renovó cada tres días y a su vez se realizaba un pasé a otra placa.

Para realizar el pasé, al tener una monocapa en el fondo de la placa de cultivo, se extrajo el medio y se lavó cuidadosamente con PBS, para así realizar la remoción enzimática de las células, para ello se adicionó 1 a 2 ml de 0.25% (p/v) Tripsina - 0.53 mM EDTA, hasta observar el desprendimiento de las células del fondo de la placa. En ese momento se detuvo el ataque enzimático agregando de 6 a 8 ml del medio de cultivo y se extrajo mediante pipeta esta solución, para llevarla a frascos para centrifuga Falcon de 15 ml. Finalmente se hizo estimación de la densidad celular extrayendo una muestra de 100 µl para realizar recuento microscópico utilizando cámara de Neubauer y así cuantificar el número de células vivas y células muertas.

3.3.3. Evaluación de la citotoxicidad. Con el fin de determinar el posible desprendimiento de compuestos tóxicos de las superficies de la aleación Ti6Al4V lisa y biofuncionalizada se sumergieron en 1 ml de medio de cultivo RPMI 1640 al 10% de suero fetal bovino y se incubaron durante 30 días a 37°C ± 0.5°C, 95% de humedad y 5% de CO₂. Como control fue incubado

medio suplementado sin probetas, posteriormente se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a 4°C hasta la realización del ensayo.

Para evaluar la toxicidad de los sobrenadantes, las células HOS en fase exponencial a una concentración de 5.0×10^4 células/ml fueron colocadas en placas de 96 pozos e incubadas durante 72 horas a 37°C, 5% CO₂ y 95% humedad con diluciones seriadas por triplicado de cada uno de los sobrenadantes obtenidos de las probetas incubadas con medio de cultivo. Como control negativo células fueron dejadas sin tratamiento. Después del tratamiento la viabilidad celular fue medida mediante la prueba colorimétrica de reducción del MTT, en la cual mitocondrias de células viables son capaces de reducir el MTT a cristales coloreados insolubles de formazan los cuales posteriormente son solubilizados por acción del Dimetil sulfoxido DMSO. La medida de la densidad óptica fue realizada a 580 nm en un lector de microplacas. El porcentaje de citotoxicidad fue calculado mediante la fórmula:

$$\% \text{ citotoxicidad} = 100 * (\text{DO grupo control} - \text{DO grupo tratado}) / \text{DO grupo control}.$$

3.3.4. Adhesión y proliferación de osteoblastos. Para evaluar la adhesión de osteoblastos sobre las superficies biofuncionalizadas se realizaron dos experimentos por duplicado, en cada uno de estos experimentos se emplearon dos muestras de cada uno de los 3 tipos de superficies, las cuales previamente se ubicaron en el interior de placas de cultivo de 24 pozos para allí cultivar en cada uno de ellos número aproximado de 5×10^4 células/ml durante 1, 3 y 5 días.

La adherencia celular se evaluó de forma cualitativa mediante ensayos de microscopia de epifluorescencia en un microscopio Nikon Eclipse E400 utilizando filtro UV2A y cuantitativamente mediante recuento microscópico en cámara de Neubauer.

3.3.5. Respuesta electroquímica de osteoblastos sobre superficies biofuncionalizadas. Con el fin de determinar la influencia de los osteoblastos en el comportamiento electroquímico de las superficies biofuncionalizadas se realizaron medidas de espectroscopia de impedancia electroquímica. Para estos ensayos fue necesario adherir células de osteoblastos a las superficies biofuncionalizadas como se describió previamente a tiempos de cultivo de 1, 3 y 5 días. Las pruebas se realizaron en medio de cultivo dentro de incubadora a 37°C y atmósfera con 5% de CO₂, Para obtener los espectros de impedancia electroquímica se empleó el montaje y la metodología previamente descrita en la sección 3.2.2.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

En la tabla 3, se puede apreciar el nombre que se dio a cada una de las superficies estudiadas en este trabajo.

Tabla 3. Nomenclatura de las muestras estudiadas.

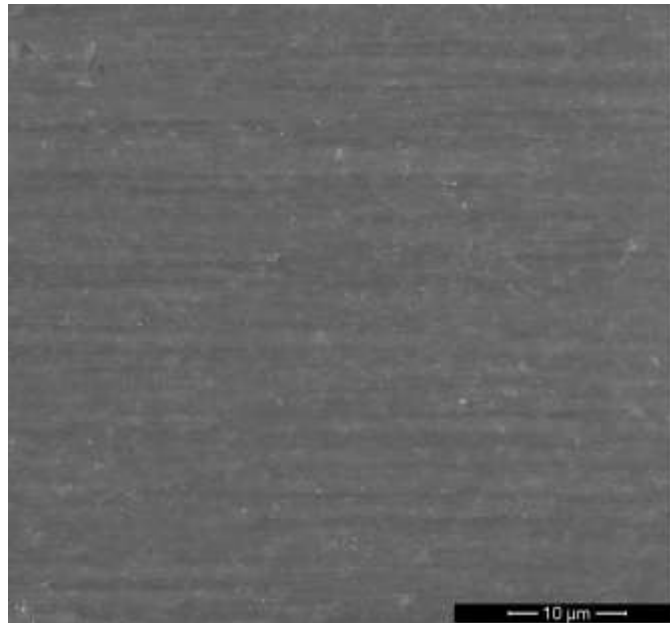
Descripción			Nombre
Ti6Al4V	Lisa	-	C1
	Biofuncionalizada	Patrón 1	C2
		Patrón 2	C3

La muestra denominada C1 es una superficie de la aleación Ti6Al4V pulida con alúmina de 0.05 μm , las muestras C2 y C3 son superficies de la aleación previamente pulidas con alúmina y grabadas con láser, sobre las cuales se generaron patrones con las características especificadas en la figura 6.

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LA ALEACIÓN Ti6Al4V

Como se puede observar en la figura 7, la superficie de la aleación Ti6Al4V presentó un acabado superficial liso y homogéneo.

Figura 8. Micrografía SEM de la superficie de la aleación Ti6Al4V



Además, la superficie presento el espectro de energía dispersiva típico de esta aleación (figura 8) y su composición, la cual fue obtenida mediante espectroscopia de emisión óptica está acorde a los rangos requeridos según la norma ASTM para la utilización de esta aleación como material de implante ortopédico (tabla 4).

Figura 9. Espectro de energía dispersiva de la superficie de la aleación Ti6Al4V.

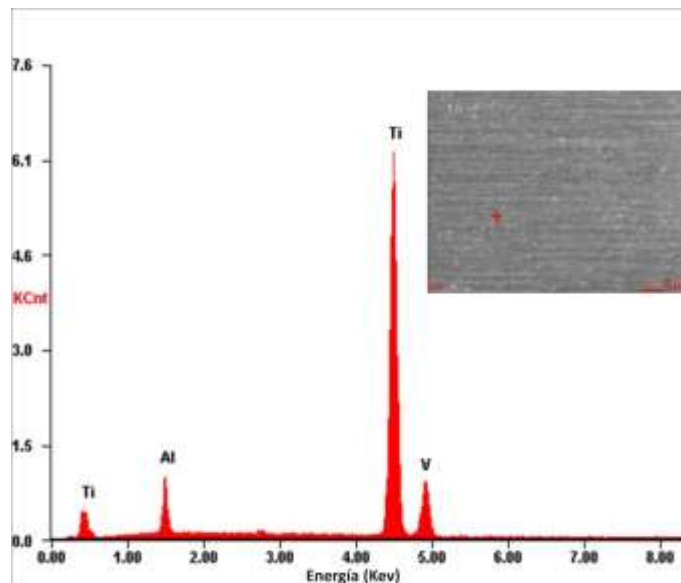
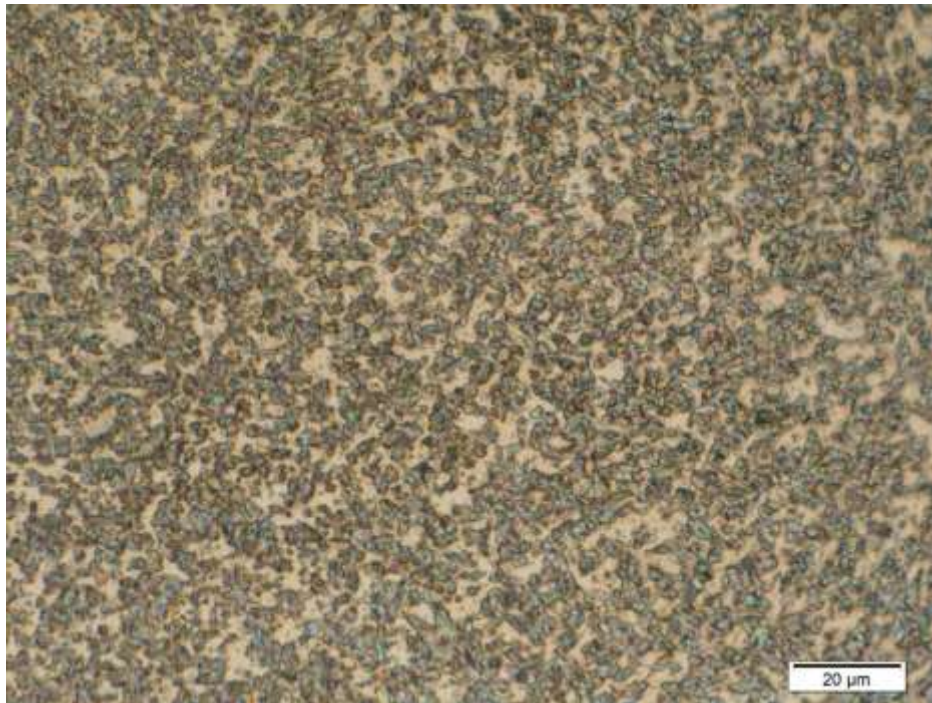


Tabla 4. Composición de la muestra de Ti6Al4V obtenida mediante espectroscopia de emisión óptica y proporcionada por la empresa Quirúrgicos Especializados S.A.

Composición (%)	C máx.	Fe máx.	N máx.	H máx.	S máx.	O máx.	Al	V	Ti
Aleación de estudio	-	0.183	-	-	0.342	-	6.102	4.119	88.66
ASTM F-136	0.08	0.25	0.05	0.012	-	0.13	5.5– 6.5	3.5 – 4.5	Balance

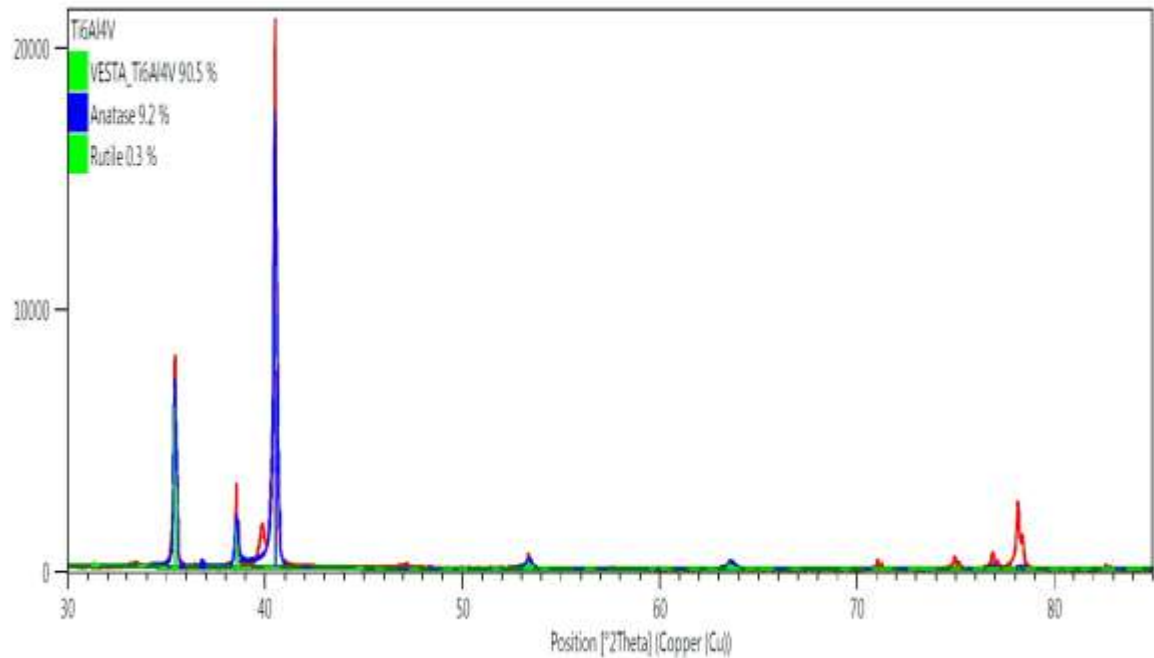
Por otra parte, se analizó la microestructura de la muestra. Para ello se atacó con solución ácida según la norma ASTM E-407. La microestructura revelada se puede observar en la micrografía de la figura 9, donde se pueden apreciar dos fases, una fase primaria α con granos equiaxiales (zonas claras, rica en aluminio) y una fase β (zonas oscuras, rica en vanadio) ubicadas a lo largo de los límites de grano de la fase α [63]. Esta estructura se denomina mill-annealed y según lo reportado en [64] es posible obtener esta microestructura al trabajar el material mecánicamente en un intervalo de temperaturas correspondiente al campo $\alpha+\beta$ y posteriormente realizar un proceso de recocido que se debe llevar a cabo a una temperatura inferior a la temperatura de inicio de la martensita. Esta microestructura presenta una buena combinación de tenacidad, ductilidad y resistencia a la fatiga, razón por la cual es la más frecuentemente usada en la aleación Ti6Al4V [65], [66], [67].

Figura 10. Micrografía óptica de la microestructura de la superficie de la aleación Ti6Al4V.



Por último se realizó un ensayo de difracción de rayos X a la muestra de la aleación de Ti6Al4V. Los datos de difracción fueron analizados empleando el software X'pert HighScore Plus y la base de datos pdf2. Los resultados obtenidos permiten apreciar un difractograma típico de la aleación (figura 10). En el análisis comparativo del difractograma con los patrones de la aleación de Ti6Al4V (cod. ref. Vesta_Ti6Al4V), anatasa (cod.ref. 96-900-8215) y rutilo (cod.ref.96-900-7433) se encontró que la composición de la aleación coincide con lo reportado en la base de datos y además se detectó la presencia de estas dos fases de óxido titanio, el cual posiblemente se formó de manera natural sobre la superficie de la muestra. Además, en este difractograma se observan las reflexiones correspondientes a la familia de planos de cada una de las fases de la aleación así como su respectivo ángulo de Bragg. Teniendo la mayor intensidad de reflexión a un ángulo de 40.42° correspondiente al plano (100) de la fase α y a un ángulo de 39.4° correspondiente al plano (110) de la fase β [64] .

Figura 11. Difractograma de la superficie de la aleación Ti6Al4V.



4.2. BIOFUNCIONALIZACIÓN DE LA ALEACIÓN Ti6Al4V

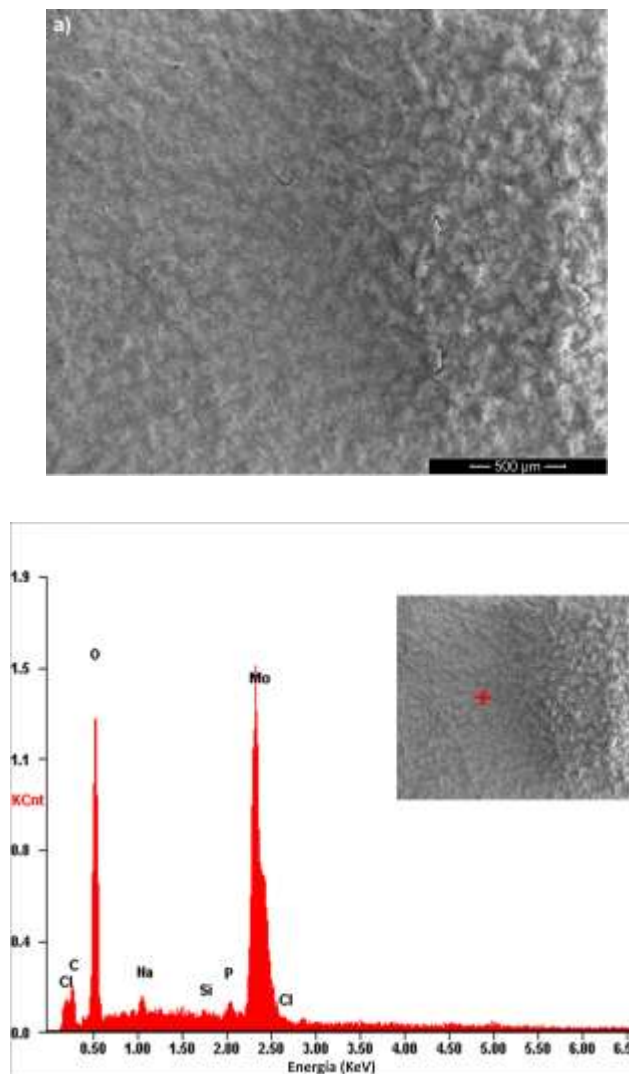
Las superficies de la aleación Ti6Al4V luego del proceso de grabado láser aún conservan una superficie lisa y el acabado especular que se obtuvo tras el procesos de preparación de las muestras, además presentan puntos de color negro en su superficie, lo cual se atribuye al proceso de grabado láser (figura 11).

Figura 12. Patrones grabados con láser sobre las superficies de la aleación Ti6Al4V.



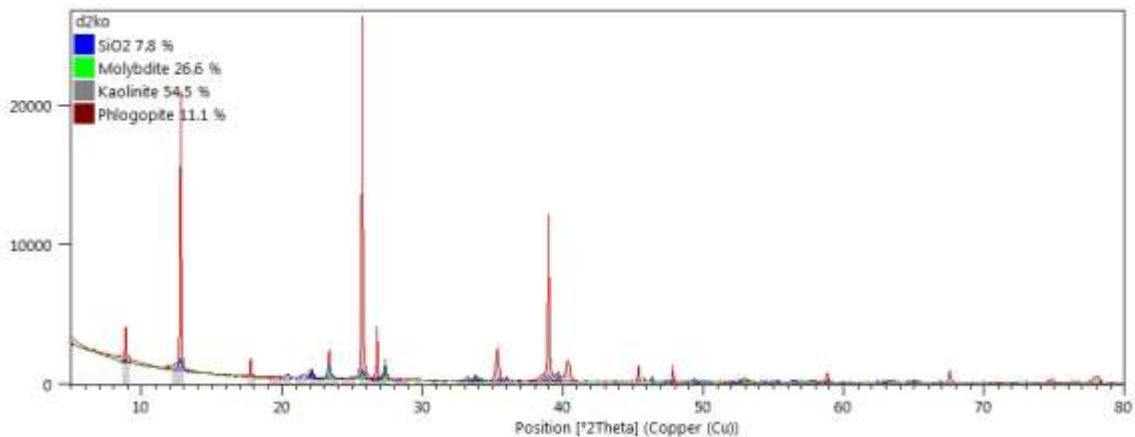
Para el proceso de grabado láser las muestras de la aleación Ti6Al4V fueron recubiertas con una solución denominada comercialmente como Cermark™. Esta solución causa que los patrones adquieran una coloración negra tras el proceso de grabado láser. En la figura 12 se puede observar la superficie de la aleación Ti6Al4V recubierta y el espectro de energía dispersiva del recubrimiento aplicado, previo al proceso de grabado. Como se puede observar el recubrimiento es rico en molibdeno y oxígeno, además presenta pequeñas cantidades de sodio, fosforo silicio, cloro y carbono.

Figura 13. Micrografía SEM y espectro de energía dispersiva de la superficie de Ti6Al4V recubierta con Cermark™.



Adicionalmente se realizó difracción de rayos X a este recubrimiento con el fin de determinar los compuestos cristalinos presentes en su superficie (figura 13) y se encontró que el recubrimiento de la solución Cermark™ contienen óxido de silicio (cod.ref. 96-900-6286), molibdenita (tríoóxido de molibdeno (cod.ref. 96-101-1074)), caolinita (cod.ref. 96-900-9235) y flogopita (cod.ref. 96-900-3879).

Figura 14. Difractograma del recubrimiento de Cermark™ aplicado sobre la superficie de la aleación Ti6Al4V.

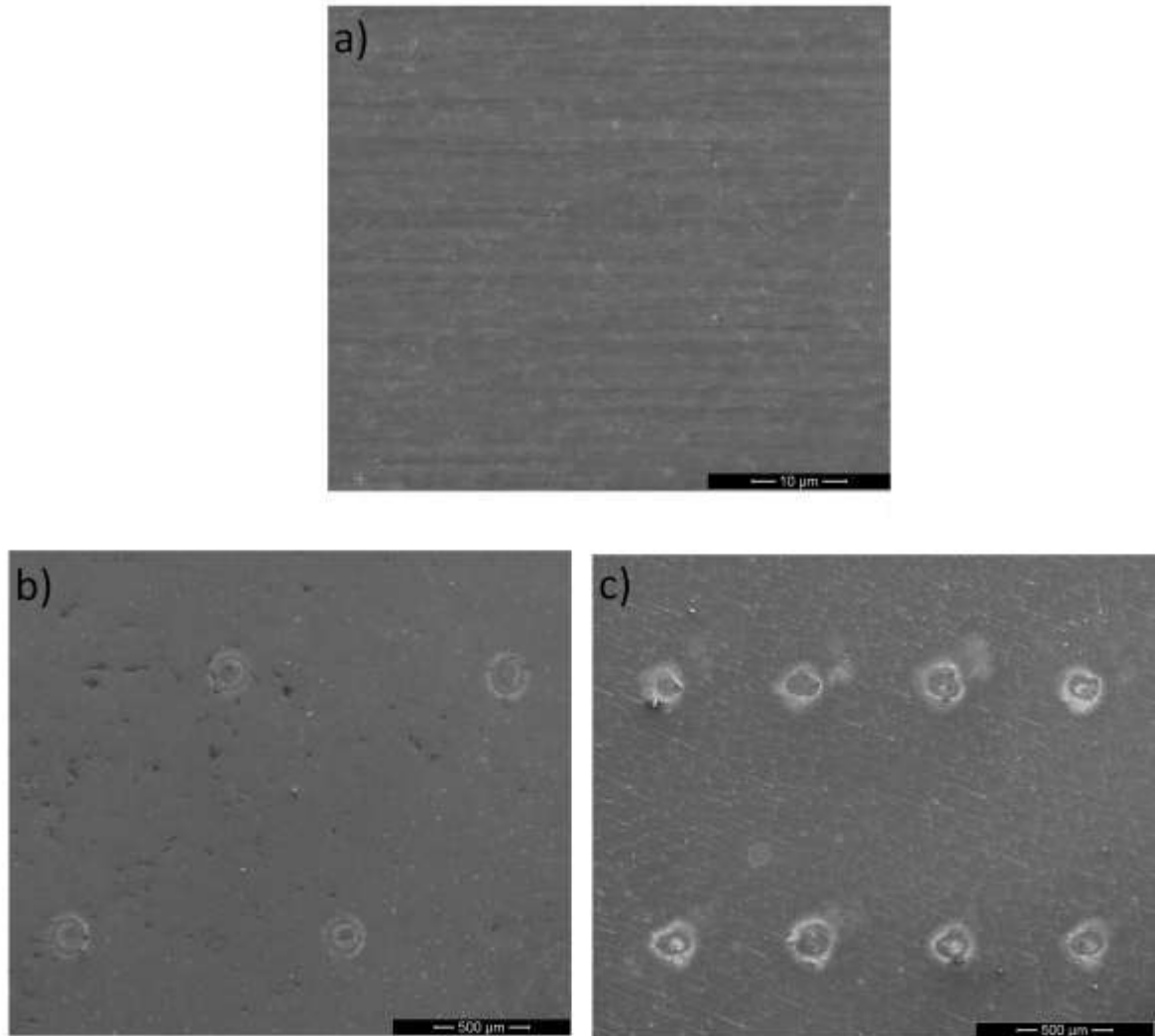


4.3. Caracterización de las superficies biofuncionalizadas de la aleación Ti6Al4V

En la figura 14 (a), (b) y (c) se presenta la morfología de la superficie de las muestras C1, C2 y C3 respectivamente. Como se puede observar la muestra C1 presenta un acabado superficial liso y homogéneo, propio de una superficie con acabado especular. Por otra parte en la figura 19 (b) y (c) se puede observar que los patrones obtenidos tienen una morfología cuasi circular, lo cual se atribuye al barrido que debe realizar el haz láser sobre la superficie para generar los spots en la superficie de las muestras. El diámetro de los spots es de aproximadamente 150 μm , la distancia de separación medidas de centro a centro entre los spots en el eje vertical es de aproximadamente de 1370 μm y la separación horizontal es de 1475 μm para C2 y 730 μm para C3. Estos parámetros difieren de los valores con

que se diseñaron los patrones (figura 11) y se puede asociar a que al momento de diseñar el patrón el software no permite crear gráficos de alta resolución (escala micrométrica).

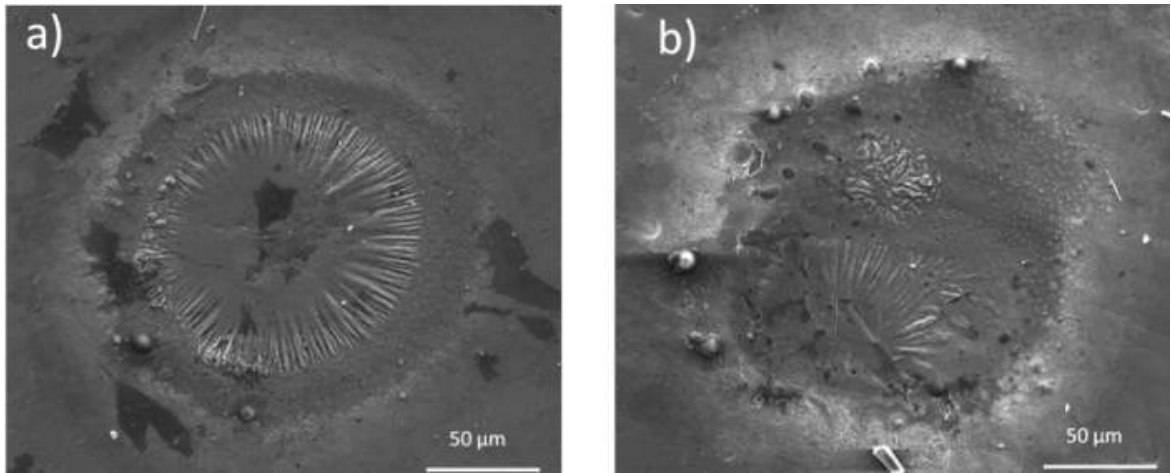
Figura 15. Micrografías SEM de las superficies biofuncionalizadas de la aleación Ti6Al4V, a) C1, b) C2 y c) C3.



Como se puede observar en la figura 15, los spots de los patrones tienen una estructura dendrítica desde el centro hacia el borde. Esto puede deberse al rápido ciclo de calentamiento y enfriamiento del proceso de grabado láser. La alta temperatura puede ser causada por la absorción de un gran número de fotones en

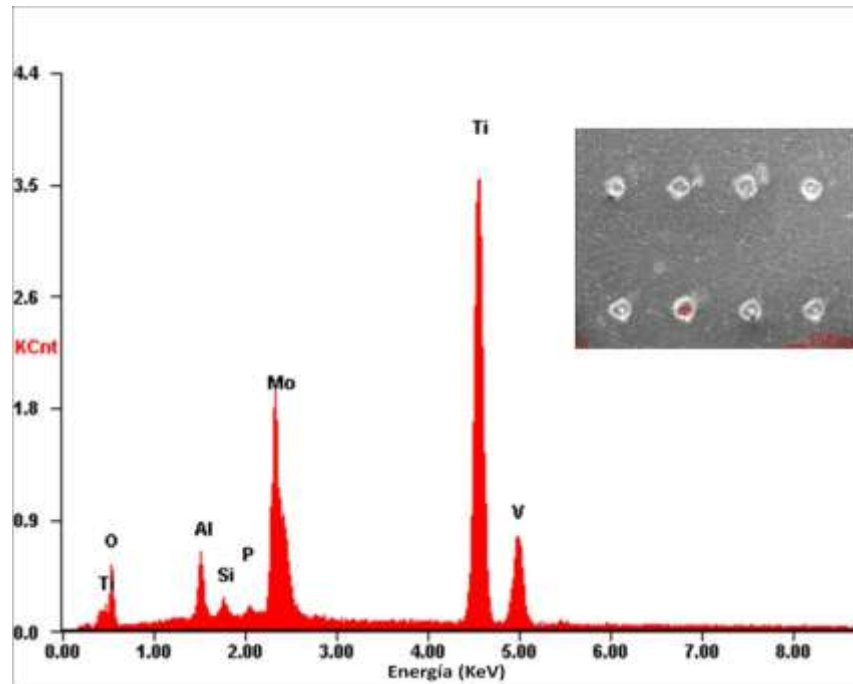
la pequeña área del spot. Produciendo así combustión del material y removiendo este a la vecindad de los spots. Estos resultados están relacionados con lo reportado anteriormente por M.E. Khososhahi [68].

Figura 16. Micrografías SEM de los spots grabados por láser a) patrón 1 – muestra C2 y b) patrón 2 – muestra C3.



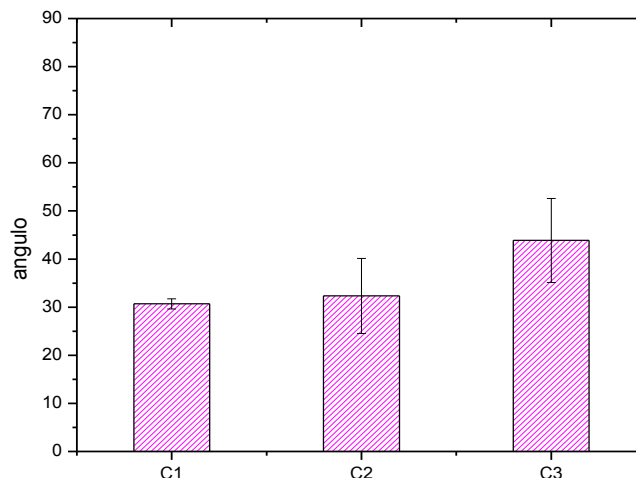
Como se observa en el espectro de energía dispersiva de la figura 16, los spots generados mediante grabado láser son ricos en molibdeno y oxígeno, esta ligera variación en la composición de la superficie en los spots se debe al recubrimiento de Cermark que se aplicó inicialmente a la superficie para realizar el grabado laser.

Figura 17. Espectro de energía dispersiva obtenido de uno de los sptos.



Los resultados de ángulo de contacto muestran que las superficies de las muestras C1, C2 y C3 tienen un comportamiento hidrofílico, dado los ángulos menores a 90° . Como se puede observar en la figura 17, el patronamiento por grabado láser logra generar un cambio en la humectabilidad de la superficie, para el caso de C2 la variación es de 5,2% mientras que para C3 el cambio es más significativo, logrando una variación de 42.7% respecto a la superficie de C1. Estos cambios en la humectabilidad se asocian a los cambios producidos en la topografía del material debido al grabado láser y pueden ser comprendidos por medio del modelo de Casie-Baxter [37], [69], [70]. En este modelo se asocia el incremento en el ángulo de contacto a pequeñas cantidades de aire atrapadas bajo la gota de líquido, que para nuestro caso en particular se pueden atribuir al aire atrapado entre los spots y la gota.

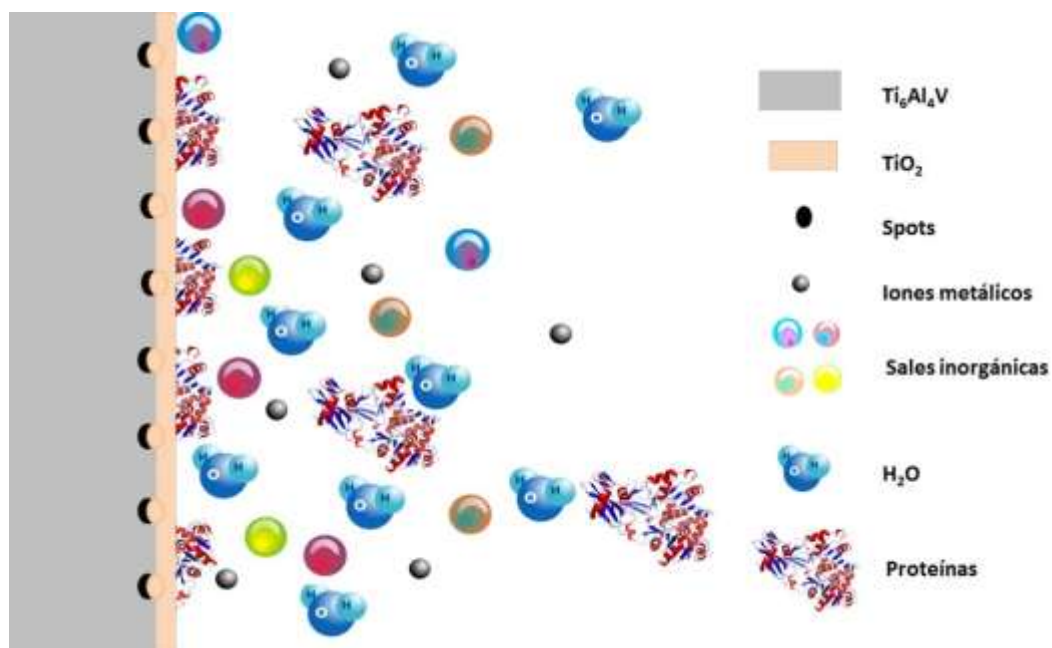
Figura 18. Ángulo de contacto obtenido de las muestras de la aleación Ti6Al4V biofuncionalizadas mediante grabado láser.



4.4. Degradación de la superficie biofuncionalizada de la aleación Ti6Al4V

En la figura 18 se representa un diagrama esquemático de la interfase de la superficie de la aleación Ti6Al4V biofuncionalizado - medio de cultivo RPMI 1640. Como se puede observar es una interfase que involucra una gran cantidad de compuestos interactuando simultáneamente. Por una parte se tiene el material de estudio, el cual forma fácilmente una capa de óxido de titanio - aluminio al ser expuesta al ambiente fisiológico. Además se cuenta con la presencia de sales orgánicas ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , NaHCO_3 , Na_2HPO_4), aminoácidos (por ejemplo: L-arginina HCL, L-glutamina, L-cistina, L-isoleucina), vitaminas (por ejemplo: cloruro de colina, ácido fólico, inositol), y glucosa entre otros [71]. Todos estos compuestos pueden reaccionar con el material de implante favoreciendo o no la formación de compuestos que protejan o promuevan la degradación del biomaterial.

Figura 19. Diagrama esquemático de la interfase de la superficie de la aleación Ti6Al4V biofuncionalizado - medio de cultivo RPMI 1640



Las curvas potenciodinámicas de la figura 19 muestran que el patronamiento por grabado láser genera un corrimiento en los potenciales de corrosión hacia regiones de potencial más pasivo [72], haciendo que las superficies C2 y C3 sean más estables termodinámicamente en presencia de medio fisiológico simulado. Por otra parte también se induce una variación las densidades de corriente; para la superficie C2 la corriente de corrosión disminuye en un 61% mientras que para C3, la corriente de corrosión aumenta en un 47% respecto a la corriente de la superficie C1 (tabla 5).

Figura 20. Curvas potenciodinámicas para las superficies de la aleación Ti6Al4V biofuncionalizadas en contacto con medio RPMI 1640

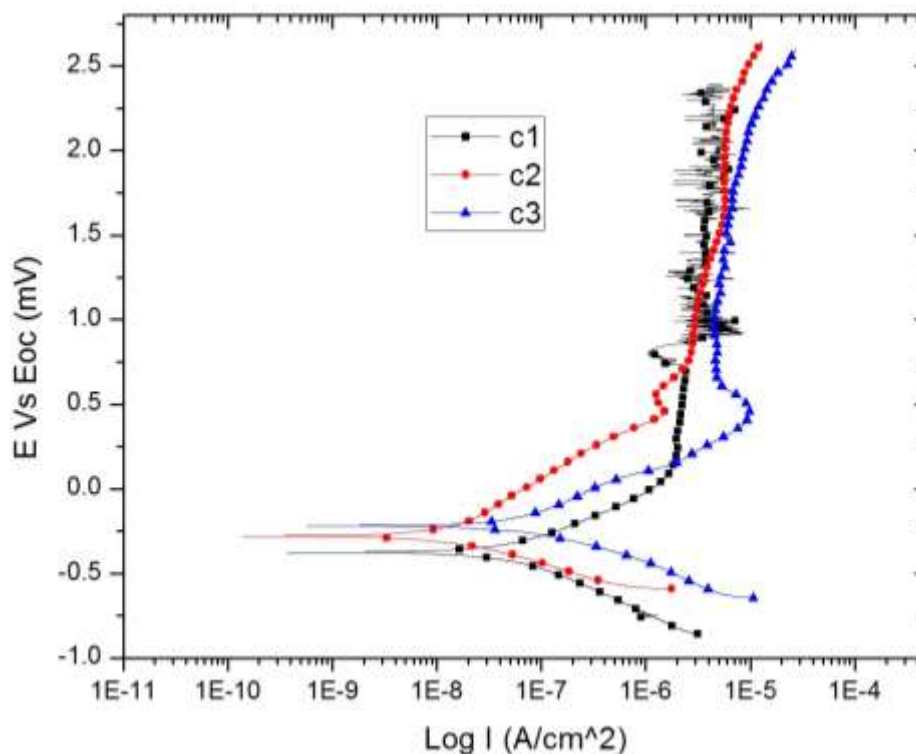
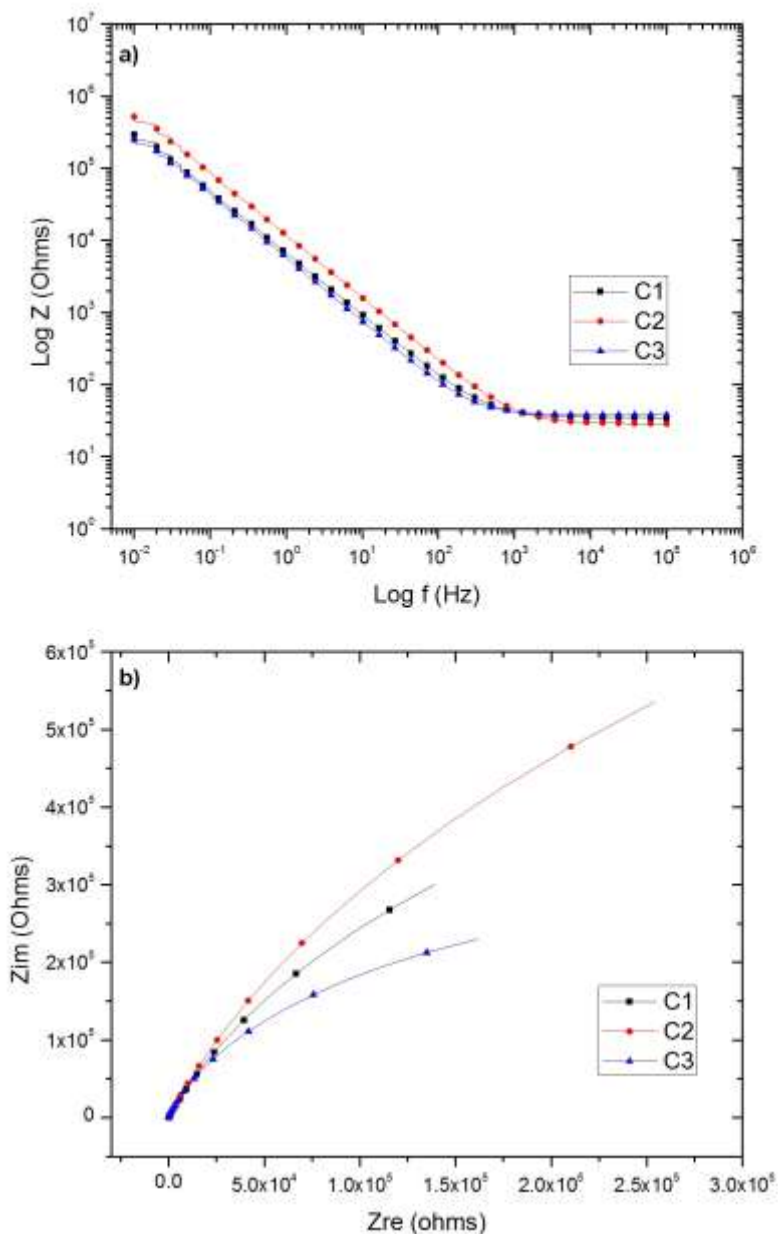


Tabla 5. Parámetros obtenidos de las curvas potenciodinámicas de las superficies biofuncionalizadas de Ti6Al4V en contacto con medio RPMI 1640.

Muestra	Ecorr (mV)	Icorr (nA)
C1	-375	40.6
C2	-280	15.8
C3	-219	59.9

En el diagrama de Bode (figura 20a) se puede observar dentro del rango de medias a altas frecuencias ($10^3 - 10^5$ Hz), la presencia de una meseta, la cual está asociada a la resistencia de la solución. El cambio de pendiente de las curvas para C1, C2 y C3 que se da en el rango de media a bajas frecuencias ($10^3 - 10^{-2}$ Hz) se asocian a la formación de una capa de óxido de titanio aluminio y a la adsorción de proteínas por la superficie [73].

Figura 21. Espectros de Impedancia de las superficies de la aleación de Ti6Al4V biofuncionalizadas en contacto con medio RPMI 1640.

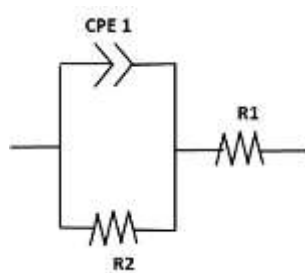


En el diagrama de Nyquist (figura 20b) se puede observar que la mayor impedancia se presenta para la superficie C2. La mayor altura que muestra el domo de C2 está asociado a efectos capacitivos en la superficie, esto puede indicar que la superficie forma una película de óxido de titanio - aluminio más homogénea

y estable o que la absorción de proteínas se ve favorecida por la topografía de la superficie, lo cual se traduce en una disminución de los efectos de las reacciones de transferencia de carga.

La respuesta de impedancia de esta interfase ha sido ajustada al circuito de la figura 21, el cual incluye, R1, que representa la resistencia del medio RPMI, CPE1, es un elemento de fase constante, que permite simular el comportamiento capacitivo no ideal debido a la capa pasiva de óxido de titanio y aluminio y a la adsorción de proteínas, y R2, que es la resistencia asociada a esta película y el sustrato.

Figura 22. Diagrama esquemático del circuito equivalente al cual se ajustan los espectros de impedancia de la superficie de la aleación Ti6Al4V en contacto con medio RPMI 1640.



Al realizar el ajuste de los espectros de impedancia al circuito de la figura 21 se obtuvieron los datos plasmados en la tabla 6. Estos datos muestran que la resistencia del medio RPMI está en un rango de (28 -38) Ω . Las constantes de tiempo asociadas a cada elemento de fase constante indican que el comportamiento del material es altamente capacitivo ya que el valor medio de los CPE-P es de 0.87, lo cual indica que la capa de óxido de titanio-aluminio que se forma junto con las proteínas que posiblemente son adsorbidas por la superficie generan una capa bastante homogénea y estable. Por último cabe resaltar que los valores de R2, en el caso de las superficies C2 presentaron un incremento, mientras que en el caso de C3 se vio una pequeña disminución respecto a C1. Teniendo en cuenta que el máximo valor de impedancia se presenta cuando la frecuencia tiende a cero y que este valor puede ser asociado al valor de

resistencia a la polarización era de esperarse que la muestra C3 tuviera la menor resistencia a la transferencia de carga en la superficie ya que esta es la muestra que presenta mayor susceptibilidad al deterioro en el medio RPMI según lo que se encontró en las curvas potenciodinámicas.

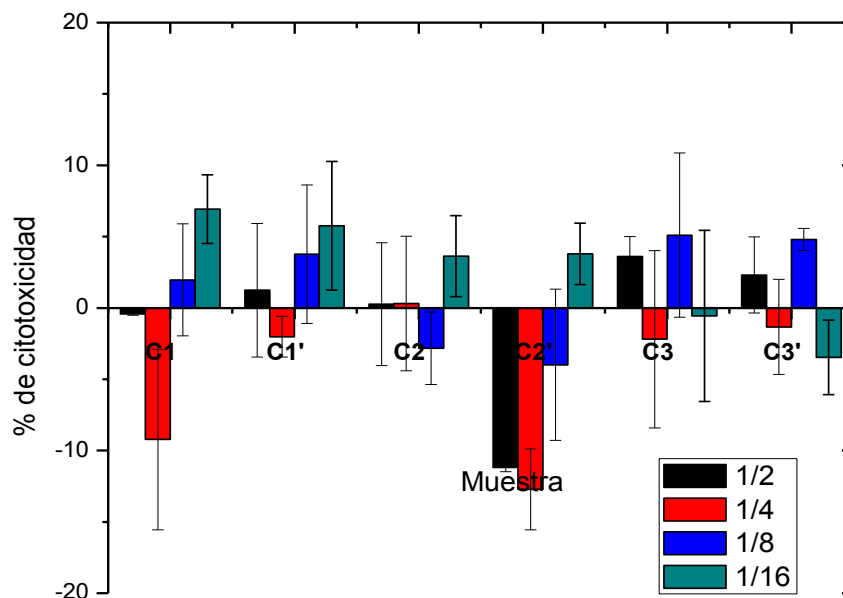
Tabla 6. Parámetro de los elementos del circuito equivalente empleado para simular los espectros de impedancia de la superficie de la aleación Ti6Al4V en contacto con medio RPMI 1640.

Elemento	C1	C2	C3
R1 (Ω)	34.67	28.54	37.47
CPE1-T	3.05E-05	1.71E-05	3.41E-05
CPE1-P	0.86	0.87	0.88
R2 (Ω)	1.51E+06	2.49E+06	6.66E+05
χ^2	1.01E-03	3.13E-03	2.87E-03

4.5. Evaluación de la respuesta celular de las superficies biofuncionalizadas de la aleación Ti6Al4V

4.5.1. Citotoxicidad de las superficies biofuncionalizadas de la aleación Ti6Al4V. Como se puede observar en la figura 22, el porcentaje de citotoxicidad es inferior al 15%. Demostrando así que las superficies de la aleación Ti6Al4V biofuncionalizadas mediante grabado láser al igual que la superficie lisa no resultaron ser tóxicas para las células HOS en ninguna de las concentraciones evaluadas [36], [39], [74], [75]. Además, esto indica que los compuestos de óxido de silicio, molibdenita, caolinita y flogopita que se adhirieron a la superficie producto del grabado láser no generan cambios en la toxicidad del material.

Figura 23. Citotoxicidad de superficies biofuncionalizadas de la aleación Ti6Al4V.

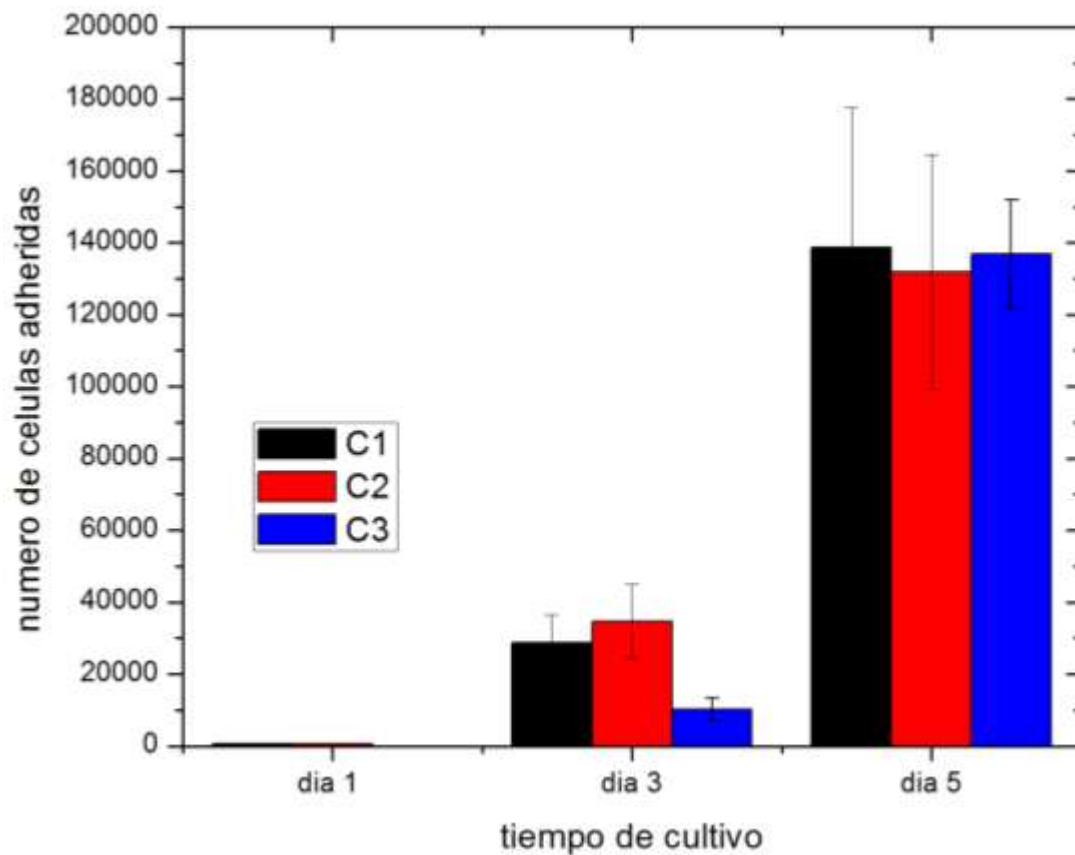


4.5.2. Adhesión celular de las superficies biofuncionalizadas de la aleación

Ti6Al4V. Los resultados obtenidos de adhesión celular mediante conteo en cámara de Neubauer se muestran en la figura 23. Durante el primer día de incubación, la cantidad de células adheridas a las superficies estudiadas no es significativo, (aproximadamente 500 células/cm²). Se debe tener presente que la adhesión de las células a las superficies de los materiales de implante es un proceso que se da en varios pasos, primero, las membranas de los osteoblastos hacen un contacto no específico sobre la superficie debido a interacciones electrostáticas seguido por una unión específica que implica un conjunto de contactos focales con integrinas (grupo de glicoproteínas) [76]. De tal manera que es posible que en este corto periodo de tiempo no se haya logrado una buena adhesión de proteínas a la superficie. Por otra parte, se puede observar existe un crecimiento con tendencia exponencial de las

células HOS sobre las tres superficies de estudio. Al tercer día de cultivo, la superficie C3 presentó una baja adherencia respecto a las otras superficies y aunque en el quinto día de incubación no se logra obtener una diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de células adheridas a las superficies, se puede observar que hay una muy buena adherencia de las células HOS a las tres superficies de estudio.

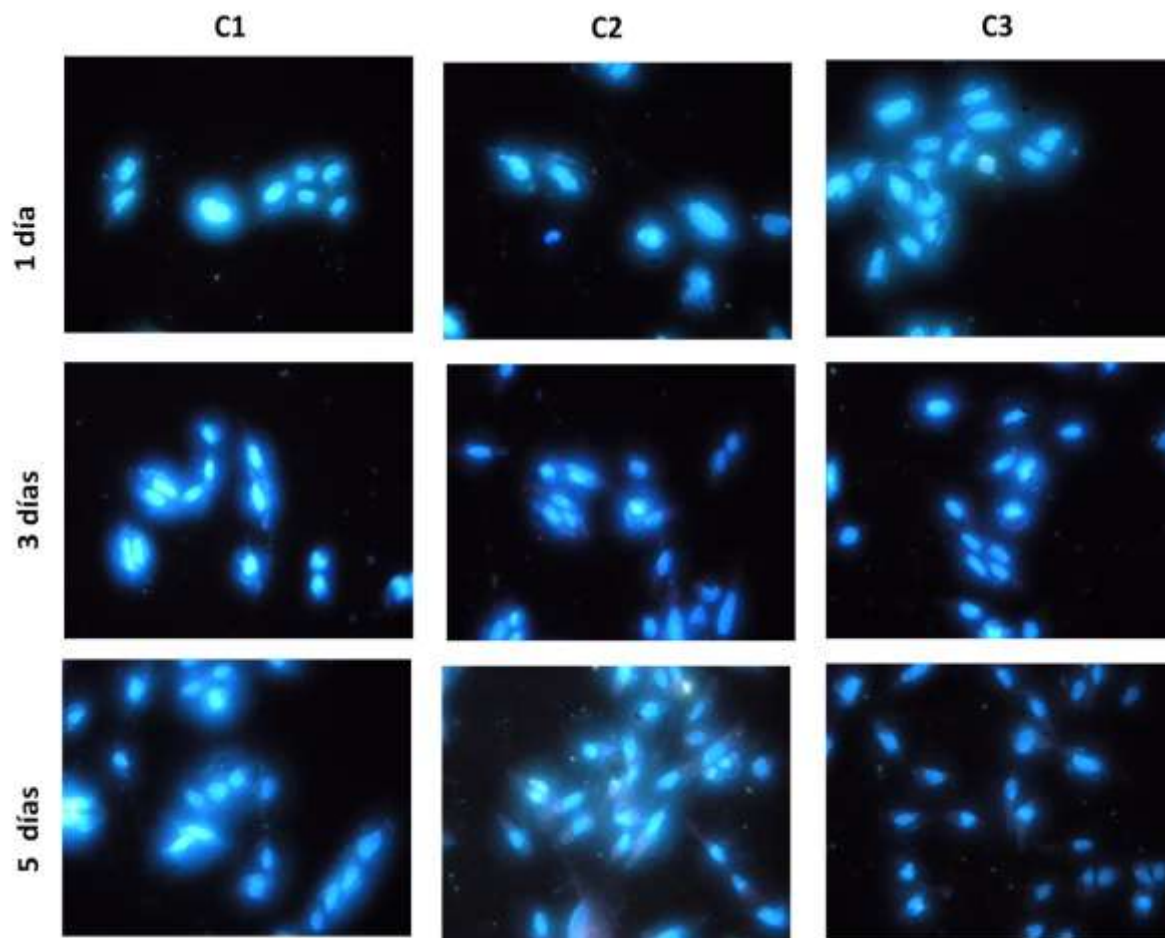
Figura 24 Adhesión celular de superficies biofuncionalizadas de la aleación Ti6Al4V a 1, 3 y 5 días de cultivo.



En las micrografías de epifluorescencia de la figura 24 se logra observar que las células HOS en el primer día de ensayo presentan núcleos alargados, esto es propio de células en fase mitótica. Por otra parte como se puede apreciar en las micrografías del tercer y el quinto día el número de

células sobre las tres superficies se ha incrementado lo cual corrobora los resultados del ensayo de conteo celular en cámara de Neubauer.

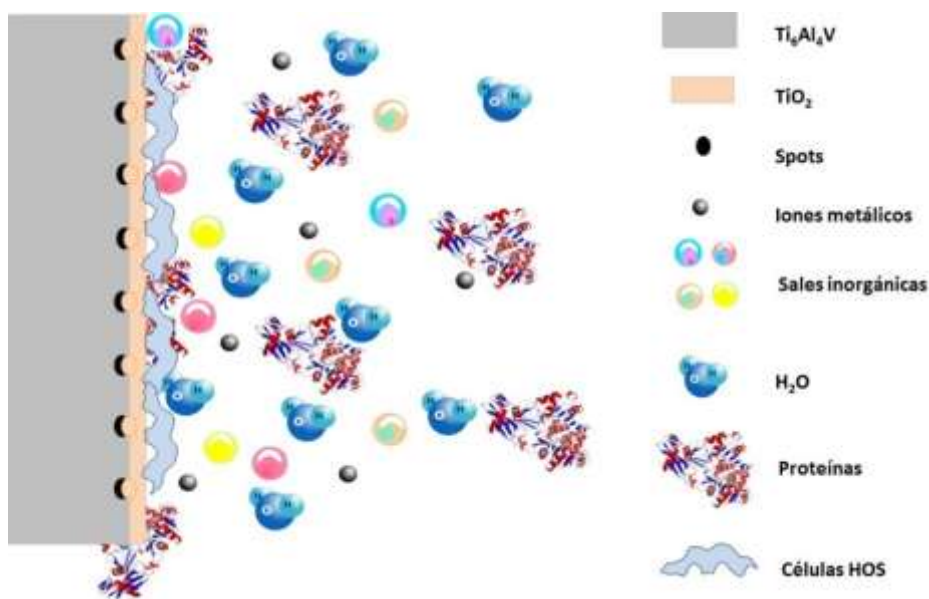
Figura 25. Diagrama comparativo de las micrografías de fluorescencia obtenidas sobre la superficie de la aleación Ti6Al4V biofuncionalizada a 1, 3 y 5 días de cultivo.



4.5.3. Respuesta electroquímica de las superficies biofuncionalizadas de la aleación Ti6Al4V después de los tres diferentes tiempos de cultivo. En la figura 25 se representa un diagrama esquemático de la interfase de la superficie de la aleación Ti6Al4V biofuncionalizado - medio de cultivo RPMI 1640 enriquecido con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibióticos. Como se puede observar es una interfase muy similar a la descrita anteriormente en

la figura 18. Pero en este caso se tendrá en cuenta la presencia de células adheridas a la superficie y su efecto en el comportamiento electroquímico a los diferentes tiempos de cultivo evaluados.

Figura 26. Diagrama esquemático de la interfase de la superficie de la aleación Ti6Al4V biofuncionalizado - medio de cultivo RPMI 1640
Interfase Ti6Al4V - células HOS - Medio RPMI



En la figura 26 a 28 se presentan los espectros de impedancia registrados al evaluar la respuesta electroquímica de las muestras C1, C2 y C3 en los tres tiempos de cultivo evaluados. En el primer día (figura 26), se observa un comportamiento similar al del material sin células adheridas a su superficie, lo cual ya se describió previamente en la sección 4.2.2. Esta respuesta se debe a que en este corto tiempo de cultivo, la superficie de la aleación Ti6Al4V no logra adsorber especies biomoleculares (proteínas) que medien en la adhesión de las células HOS [77]. Además, puede que los efectos eléctricos asociados a la presencia de proteínas en la superficie se solapen con los efectos producidos por la capa de TiO2 que se forma debido a la interacción de las muestras con el medio biológico simulado, esto se puede corroborar en los resultados reportados por M.C. García et al [73]. Ellos compararon el comportamiento electroquímico de muestras de Ti

y Ti6Al4V en presencia de solución Hank y en medio de cultivo RPMI y no encontraron diferencias significativas en el comportamiento del material asociada a la presencia de proteínas y otras sustancias orgánicas propias del medio de cultivo.

Figura 27. Espectros de Impedancia de las superficies de la aleación de Ti6Al4V biofuncionalizadas en contacto con medio RPMI 1640 después de 1 día de cultivo.

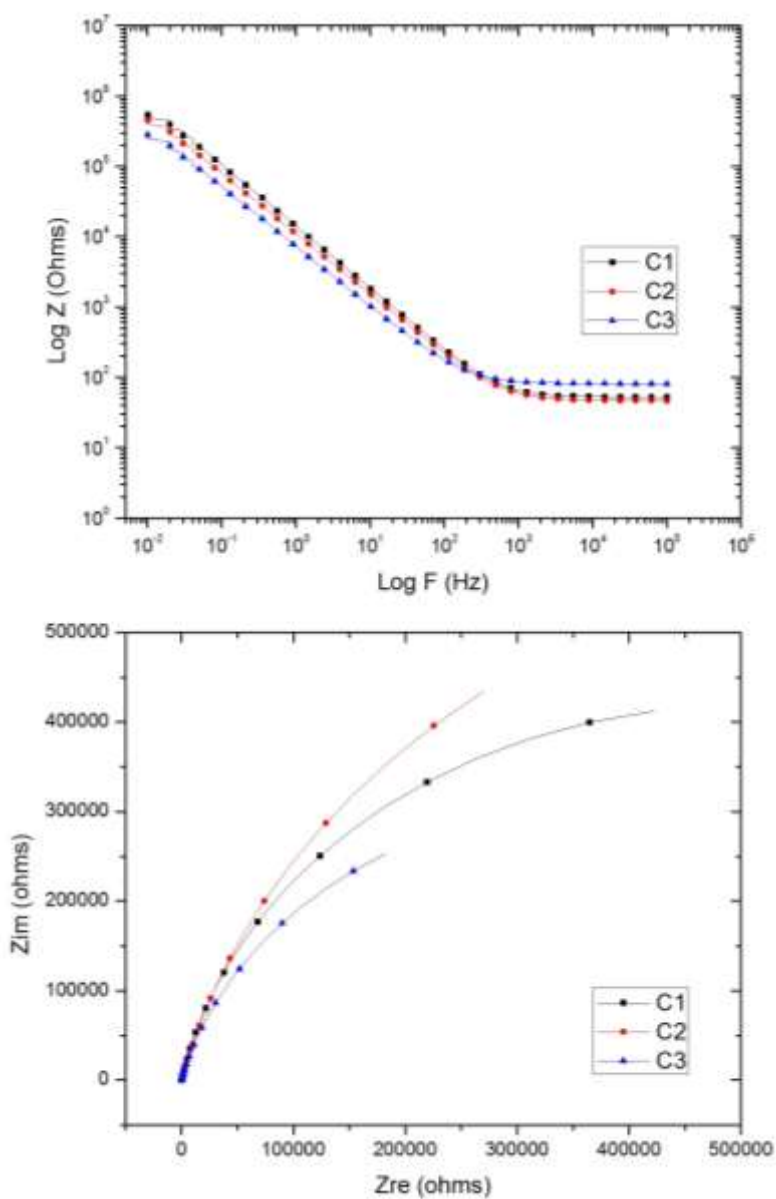
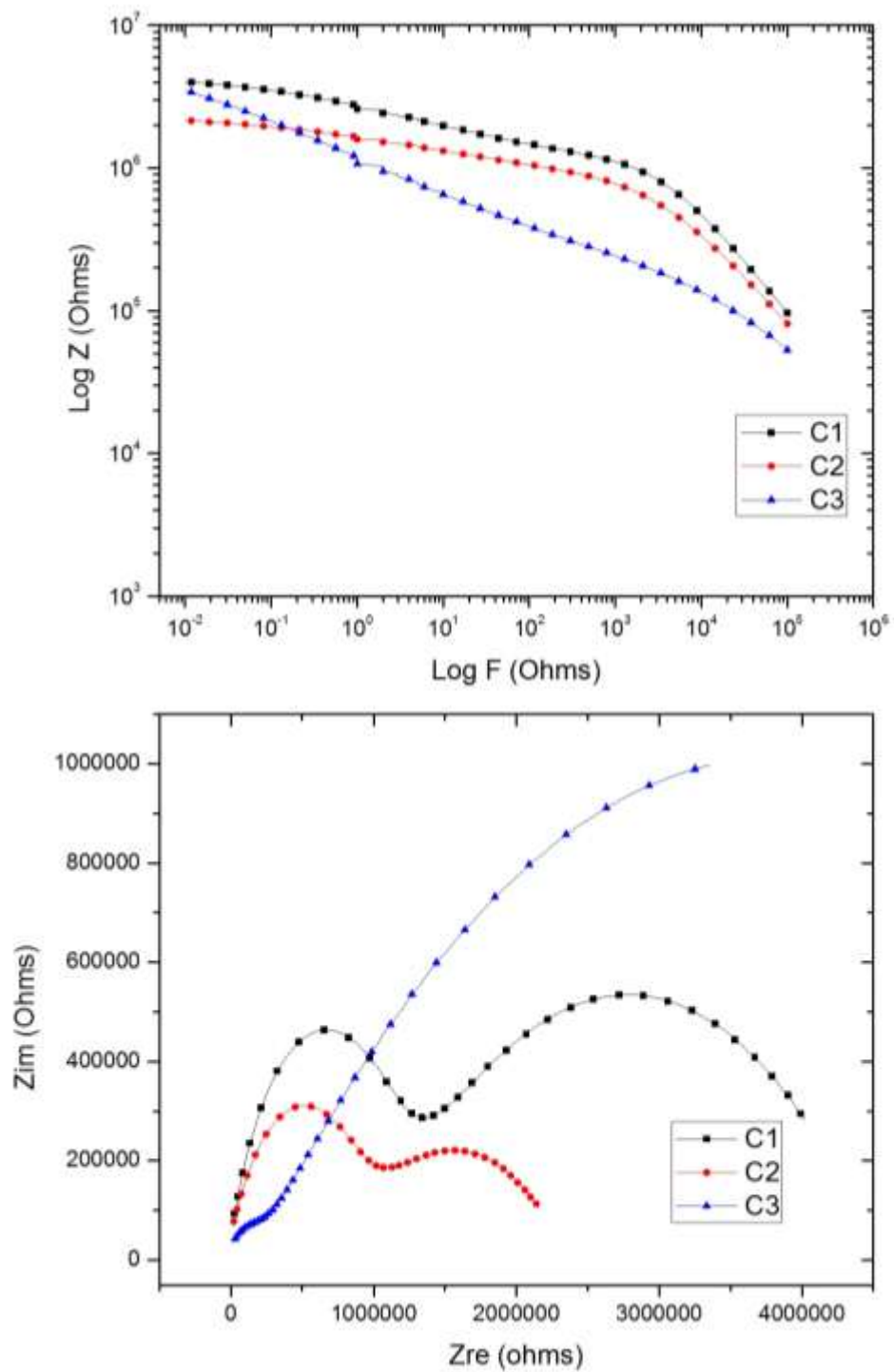
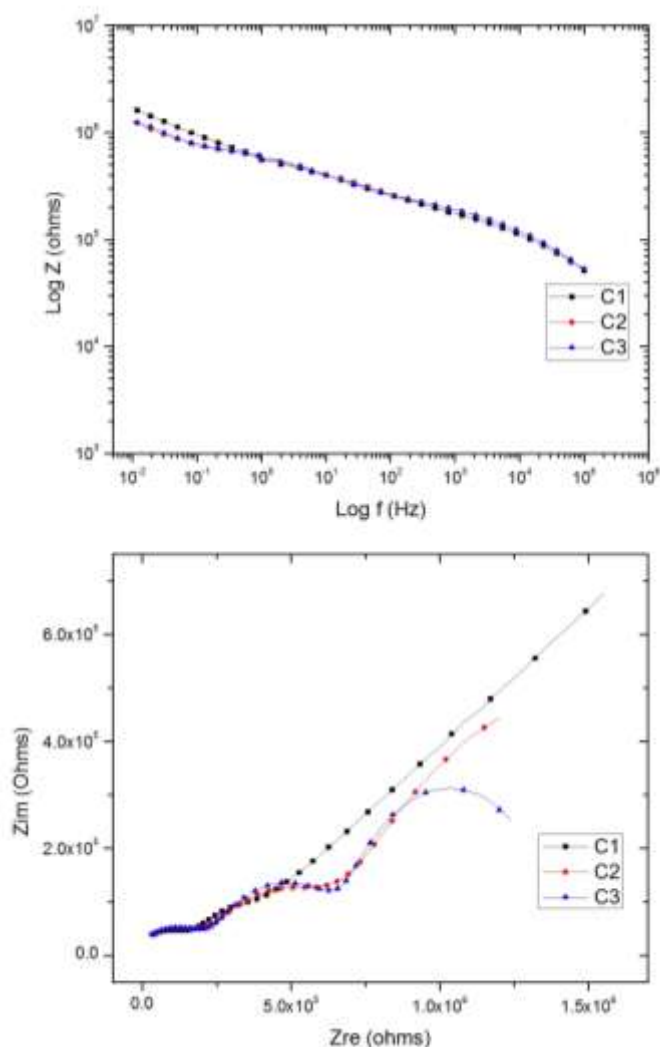


Figura 28 Espectros de Impedancia de las superficies de la aleación de Ti6Al4V biofuncionalizadas en contacto con medio RPMI 1640 después de 3 días de cultivo.



También se puede observar que con el incremento del tiempo la resistencia del electrolito (medio de cultivo RPMI enriquecido) se ve afectada y cambia, tomando valores más altos, lo que se atribuye a cambios en la composición del electrolito, estos cambios se asocian a procesos como la precipitación de sales sobre el sustrato y la adsorción de proteínas en la superficie. Esto ha sido reportado anteriormente por M.C García et al, que también encontró variaciones en la resistencia de la solución al incrementar los tiempos de cultivo.

Figura 29 Espectros de Impedancia de las superficies de la aleación de Ti6Al4V biofuncionalizadas en contacto con medio RPMI 1640 después de 5 días de cultivo.



Por otra parte, el incremento del tiempo de cultivo también produce un incremento en el módulo de la impedancia a muy bajas frecuencias, como lo reporto anteriormente H-H Huang et al, en [78]. Este incremento en la impedancia está relacionado con un incremento en la cantidad de proteínas absorbidas (principalmente albumina soluble en el medio), al número de células adheridas a la superficie y a la matriz extra celular generada durante el crecimiento celular.

Al tercer día de cultivo se observa que las muestras presentan un doble bucle, los cuales se asocian a dos constantes de fase presentes en el sistema. La primer constante de fase se atribuye al comportamiento altamente capacitivo de la interfase células/proteínas – óxido de titanio y la segunda al efecto pseudocapacitivo de la interfase oxido – metal, la cual es más resistiva. Por último, al final del experimento (quinto día) se observan tres domos, estos se deben al incremento en el número de células en la superficie (primer contante de fase), incremento en la cantidad de proteínas adsorbidas por la superficie del material (constante de fase número dos) y a un posible incremento en el espesor de la capa de óxido de titanio (tercer constante).

La interface descrita en la figura 25 junto a los datos de los espectros de impedancia electroquímica obtenidos se ajustaron a los circuitos eléctricos mostrados en las figuras 21, 29 y 30 empleando el programa Zview. Estos circuitos se escogieron para modelar el sistemas ya que han sido previamente reportados en la literatura [77], [73] y además presentaron valores de χ^2 entre 1×10^{-3} y 7×10^{-4} lo cual indica que hay una muy buena correlación entre los resultados experimentales y los simulados.

Los datos de impedancia correspondientes al primer día de cultivo se ajustaron al circuito de la figura 21. Arrojando los parámetros reportados en la tabla 7.

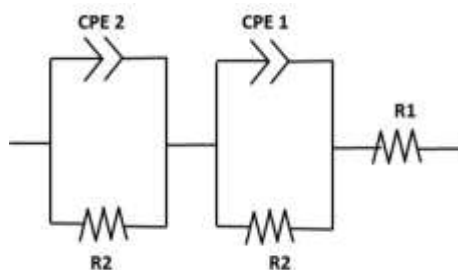
Tabla 7. Parámetro de los elementos del circuito equivalente empleado para simular los espectros de impedancia de la superficie de la aleación Ti6Al4V en contacto con medio RPMI 1640 después de 1 día de cultivo.

Elemento	C1	C2	C3
R1	52.02	46.19	80.95
CPE1-T	1.39E-05	1.85E-05	2.85E-05
CPE1-P	0.88	0.86	0.86
R2	1.00E+06	1.50E+06	7.83E+05
χ^2	4.05E-04	6.91E-04	1.21E-03

Como se puede observar los valores de CPE1-P para las tres superficies indican que el comportamiento del sistema es altamente capacitivo, esto se atribuye a que el efecto capacitivo que se genera debido a la distribución de carga en la interface metal – electrolito es mucho mayor que la reacción de transferencia de carga en dicha interfase. Los altos valores de R2 indican que el material presenta una muy buena resistencia a la corrosión.

En la figura 29, R1 representa la resistencia del medio de cultivo, R2 es la resistencia de la interfase células/proteínas – óxido de titanio y CPE1 es a su vez pseudocapacitancia de esta interfase. R3 es la resistencia a la transferencia de carga de la interfase óxido – sustrato y CPE2 es su pseudocapacitancia.

Figura 30. Diagrama esquemático del circuito equivalente al cual se ajustan los espectros de impedancia de la superficie de la aleación Ti6Al4V en contacto con medio RPMI 1640 después de 3 días de cultivo



La tabla 8, muestra los datos del ajuste de los espectros de impedancia obtenidos después de tres días de cultivo que se modelaron con el circuito equivalente representado en la figura 29.

Tabla 8. Parámetro de los elementos del circuito equivalente empleado para simular los espectros de impedancia de la superficie de la aleación Ti6Al4V en contacto con medio RPMI 1640. Después de tres días de cultivo

Elemento	C1	C2	C3
R1	36669.00	41632.00	37178.00
CPE1-T	3.03E-10	1.18E-09	2.10E-08
CPE1-P	0.80	0.70	0.48
R2	1.07E+06	8.59E+05	2.13E+05
CPE2-T	1.60E-07	3.08E+07	4.55E-07
CPE2-P	0.38	0.35	0.03
R3	3.51E+06	1.55E+06	7.31E+06
χ^2	1.71E-03	1.68E-03	3.79E-04

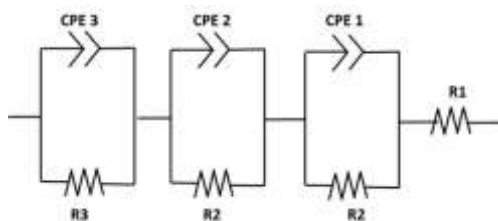
Los valores de CPE1-P de la tabla 8 indican que la interface células/proteínas – óxido de titanio es altamente capacitiva y según lo descrito por E. Gongadze [76] esto se asocia a la carga eléctrica de las proteínas (carga positiva) que median la adhesión celular y a la carga de los osteoblastos (carga negativa). Como se pudo observar en los ensayos de adherencia celular al tercer día de cultivo se encontró una mayor cantidad de células HOS adheridas a la superficie respecto al primer día, de modo que este efecto altamente capacitivo era de esperarse, debido a la interacción que se da entre las células y las proteínas adsorbidas por la superficie.

Dado que los valores de CPE2-P indican un comportamiento altamente resistivo y además los valores de R3 entran entre 1,5 y 7,3 M Ω se puede decir que esto se debe la secreción de matriz extracelular por parte de las células HOS, debido a los procesos de adhesión y proliferación celular a

que hay lugar en la superficie. Esto está de acuerdo a lo reportado por M. C. García et al.

En el circuito de la figura 30, aparecen tres bloques de resistencia y elementos de fase constante en serie, cada uno de estos bloques está relacionado con una interfase del sistema. R1 representa la resistencia de la solución como en los casos anteriores, R2 y CPE1 se atribuyen al biofilm de células adheridas al material, R3 y CPE2 corresponden a la interfase óxido – proteínas y R4 junto a CPE3 se relacionan con la interfase óxido – sustrato.

Figura 31. Diagrama esquemático del circuito equivalente al cual se ajustan los espectros de impedancia de la superficie de la aleación Ti6Al4V en contacto con medio RPMI 1640 después de cinco días de cultivo



Por último, en la tabla 9 se muestran los datos de los parámetros de ajuste a circuito equivalente de los espectros de impedancia obtenidos a 5 días de cultivo con células HOS. Los valores arrojados por el ajuste a circuito equivalente indican que se dio un incremento en la impedancia total del sistema, esto como ya se ha venido mencionando se asocia al incremento en la cantidad de proteínas adsorbidas por la superficie, al incremento en el número de células adheridas a la superficie y a la secreción de matriz extracelular.

Tabla 9. Parámetro de los elementos del circuito equivalente empleado para simular los espectros de impedancia de la superficie de la aleación Ti6Al4V en contacto con medio RPMI 1640 después de 5 días de cultivo

Elemento	C1	C2	C3
R1	44504.00	31541.00	35675.00
CPE1-T	2.31E-08	2.21E-08	2.72E-08
CPE1-P	0.45	0.46	0.44
R2	2.03E+05	2.44E+05	2.67E+05
CPE2-T	1.52E-07	3.61E-07	3.20E-07
CPE2-P	0.76	0.53	0.58
R3	8.87E+04	4.81E+05	4.81E+05
CPE3-T	1.58E-06	6.86E-06	8.48E-06
CPE3-P	0.30	0.66	0.89
R4	4.70E+12	1.71E+06	6.93E+05
χ^2	6.53E-04	2.04E-03	1.50E-03

5. DISCUSIÓN

El titanio y sus aleaciones prevalecen como el principal material de implante dental y ortopédico, lo cual se atribuye a su excelente biocompatibilidad y propiedades mecánicas [79]. Desafortunadamente, este material cuenta con poca capacidad para integrarse al tejido circúndate [80]. En este trabajo se desarrollaron dos patrones de spots con el fin de evaluar la relación de la distancia de separación de los patrones con la capacidad de osteointegración del material de implante. Para ello, se analizó la interacción de células de osteosarcoma humano HOS con las superficies de la aleación Ti6Al4V lisa y biofuncionalizada mediante grabado láser.

Según lo reportado en la literatura poros con diámetros en un rango de 100 a 400 μm de diámetro pueden mejorar la interacción de la interfase hueso implante [81]. Este trabajo de investigación se muestra que producir poros en este rango de diámetros es posible al implementar un equipo comercial como lo es el Laserpro X380-RX, el cual permitió obtener patrones de spots con diámetros de 150 μm .

Las micrográficas SEM de las superficies biofuncionalizadas permiten observar que el proceso de grabado laser produce combustión y remoción del material hacia la vecindad de los spots [82], esto se asocia al rápido ciclo de calentamiento y enfriamiento al que es sometida la superficie de la aleación Ti6Al4V durante el proceso de grabado láser [83]. La alta temperatura que hace posible la combustión

del material se debe a la gran cantidad de fotones que la superficie absorbe en el área del spot [68].

Los valores de ángulo de contacto medidos indican que las superficies biofuncionalizadas son hidrofílicas y biocompatibles [36]. Esto prueba que el grabado láser produjo el incremento de la energía superficial de los sustratos y a su vez permitió mejorar la humectabilidad.

Como se pudo observar la degradación de las superficies biofuncionalizadas no se vio alterada tras el proceso de grabado láser lo cual demuestra que realizar este tipo de modificación sobre la superficie de la aleación Ti6Al4V es viable desde el punto de vista de la degradación del material de implante.

Los resultados de este trabajo en cuanto a la citotoxicidad del material están de acuerdo a estudios previos [36], [39], [74] [75]. Mostrando que las superficies biofuncionalizadas mediante grabado laser no son toxicas para las células HOS.

Estudio previos indican que superficies modificadas con láser mejoraron la adhesión celular de osteoblastos humanos, lo cual muestran el potencial que tiene el grabado láser para mejorar la respuesta de células óseas [33], [34], [35], [36], [38], [39], [82], [84].

En este estudio, como se puede observar en la figura 24, el grabado láser permitió una buena adherencia celular. Al quinto día del experimento el recuento celular obtenido en cámara de Neubauer no muestra una diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de células adheridas a las tres superficies de estudio. Esto puede deberse a que entre el tercer y quinto día de cultivo las superficies logran formar una monocapa de células induciendo así a las células a entrar en un procesos de apoptotico [85].

Por otra parte, puede que las superficies de la aleación Ti6Al4V biofuncionalizadas no logran producir un cambio en la morfología de la superficie que genere un aumento en la capacidad de adsorción de proteínas, para así inducir un

incremento en la adhesión celular. Según E. Gongadze [76] la adhesión de proteínas se ve favorecida cuando existen nanoestructuras sobre la superficie.

De tal manera que concluir cual es el efecto de la geometría del patrón grabado en la respuesta biológica de las superficies estudiadas no es posible debido a que los tiempos de cultivo escogidos para este estudio no permitieron que los resultados obtenidos sean concluyentes.

Además, en este estudio fue posible aplicar la técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica para monitorear el proceso de crecimiento celular sobre las superficies de Ti6Al4V lisas y biofuncionalizadas; permitiendo la comprensión de los fenómenos que ocurren en la interface material de implante y medio fisiológico desde la respuesta electroquímica, la cual es consecuencia de procesos como la formación de una capa de óxido de titanio nativa, adsorción de proteínas y adhesión celular [73]. Como se puede observar en los espectros de impedancia de las figuras 27, 28 y 29 existe una variación del comportamiento electroquímico con los tiempos de cultivos, que se traducen principalmente en cambios de la resistencia de la solución debido a la adsorción de proteínas, incremento en la impedancia total del sistema causado por el posible crecimiento de la capa de óxido de titanio y al incremento de células adheridas a la superficie [77].

Por último, la caracterización de la interface material de implante - medio fisiológico se logró ajustar a tres modelos de circuitos eléctricos. Los espectros de impedancia obtenidos después de 1 y 3 días de cultivo se ajustaron a modelos previamente reportados por M.C. García Alonso et al [73] y Her- Hsiung Huang [77], mientras que para el ajuste de los espectros obtenidos al quinto día de cultivo se ajustaron a un nuevo modelo propuesto por el autor.

6. CONCLUSIONES

Se desarrollaron superficies de Ti6Al4V patronadas mediante grabado láser empleando un equipo de uso a escala industrial. Se encontró que la geometría del patrón grabado variaba ligeramente del diseño debido al barrido que realiza el láser para tallar la superficie. Además este proceso generó que sobre la superficie de los spots se adhirieran compuestos de óxido de silicio, molibdenita, caolinita y flogopita provenientes del recubrimiento de Cermark que se aplicó a las muestras antes del grabado y estos compuestos no afectaron la bioactividad ni la degradación de la aleación.

La variación en la humectabilidad que se produjo por los *spots* en las superficies de la aleación de Ti6Al4V no alteró el comportamiento electroquímico del material ni la adherencia celular a las superficies, esto se justifica en las bajas corrientes de corrosión obtenidas (en el orden 1×10^{-9} A/cm²) y en los datos obtenidos en los ensayos de conteo celular y microscopia de epifluorescencia donde al final del experimento se obtuvo un buen número de células ($\sim 140\,000$ células/cm²) sobre las tres superficies analizadas.

Se emplearon tres modelos de circuito equivalente para hacer el ajuste del comportamiento electroquímico de las superficies biofuncionalizadas en contacto con medio RPMI 1640 enriquecido a tres diferentes tiempos de cultivo celular y se encontró que la variación en los parámetros electroquímicos de la interface metal/óxido - Células HOS/proteínas – medio biológico se asocian al incremento

de proteínas adsorbidas por la superficie, al incremento de células adheridas sobre la superficie y a la producción de matriz extracelular segregada por las células HOS.

Aunque no se observó una variación significativa en la respuesta celular de las superficies patronadas se encontró que la implementación de un equipo de grabado láser comercial permite la obtención rápida y eficiente de patrones sobre la superficie de la aleación de Ti6Al4V haciendo que este tipo de modificación sea viable para aplicar en procesos de fabricación de material de implante ortopédico.

7. RECOMENDACIONES

Estudiar el efecto que tienen otras geometrías grabadas sobre la superficie de la aleación Ti6Al4V, teniendo presente que se debe evaluar la toxicidad y la degradación de la superficies a largo plazo. Además, los tiempos de cultivo deben modificarse para así observar mejor el efecto de los patrones en la adhesión celular a corto y largo plazo. Por último se recomienda emplear células HFOB y evaluar formación de fosfatasa alcalina.

REFERENCIAS

- [1] C. A. Martinez y A. Ozols, «Biomateriales utilizados en cirugía ortopédica como sustitutos del tejido óseo.,» *Revista de la asociación Argentina de ortopeédia y traumatología*, vol. 77, pp. 140-146, 2012.
- [2] K. Chawla, «biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine: treatment of musculoskeletal injury and disease,» *Materials Science and Engineering: A*, vol. 557, pp. 45-53, 2012.
- [3] F. Barrere, T. A. Mahmood, K. de Groot y C. A. Van Blitterswijk, «Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: instructive and smart functions,» *Materials Science and Engineering R: Reports*, vol. 59, nº Issue 1, pp. 38-71, 2008.
- [4] X. Lui, P. K. Chu y C. Ding, «Surface nanofunctionalization of biomaterials,» *Materials Science and Engineering R: Reports*, vol. 70, nº Issue 3-6, pp. 275-302, 2010.
- [5] K. G. Neoh, X. Hu, D. Zheng y E. T. Kang, «Balancing osteoblast functions and bacterial adhesion on functionalized titanium surface,» *Biomaterials*, vol. 33, pp. 2813-2822, 2012.
- [6] K. Anselmwe, «Osteoblast adhesion on biomaterials,» *Biomaterials*, vol. 21,

pp. 667-681, 2000.

- [7] F. Forriol y R. Esparza, «Ingeniería tisular: aplicación de las células troncales pluripotenciales en cirugía ortopédica y traumatológica,» *Trauma*, vol. 19, nº 2, pp. 88-101, 2008.
- [8] A. Abarrategui López, «Estudio del quitosano como biomaterial portador de rhBMP-2: Desarrollo, caracterización y aplicabilidad en regeneración del tejido óseo,» Madrid, 2008.
- [9] S. V. Dorozhkin, «Bioceramics of calcium orthophosphates,» *Biomaterials*, vol. 31, pp. 1465-1485, 2010.
- [10] R. A. Pérez, J. E. Won, J. C. Knowles y H.-W. Kim, «Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration,» *Advanced drug delivery reviews*, vol. 65, nº Issue 4, pp. 471-496, 2013.
- [11] K. Anselme, P. Davidson, A. M. Popa, M. Giazson, M. Liley y L. Ploux, «The interaction of the cells and bacteria with surfaces structured at the nanometer scale,» *Acta biomaterialia*, vol. 6, pp. 3824-3846, 2010.
- [12] L. Bacakova, E. Filova , M. Parizek, T. Rumi y V. Svorcik, «Modulation of cell adhesion , proliferation and differentiation on materials designed for body implants,» *Biotechnology Advances*, vol. 29, nº Issue 6, pp. 739-767, November - december 2011.
- [13] W.-K. Lee, S.-M. Lee y H.-M. Kim, «Effect of surface morphology of calcium phosphate on osteoblast - like HOS cell responses,» *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, vol. 15, pp. 677-682, 2009.
- [14] Y. Hibata, D. Suzuki, S. Omori, R. Tanaka, A. Murakami, Y. Kataoka, K. Baba y R. Kamijo, «The Characteristics of in vitro biological activity of titanium

surface anodically oxidized in chloride solutions,» *Biomaterials*, vol. 31, pp. 8546-8555, 2010.

- [15] H. Aita, N. Hori, M. Takeuchi, T. Suzuki, . M. Yamada, M. Anpo y T. Ogawa, «The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone,» *Biomaterials*, vol. 30, pp. 1015-1025, 2009.
- [16] P. Bartolo, J. P. Kruth , j. Silva , G. Levy, A. Malshe, K. Rajurkar, M. Mitsuishi, J. Ciurana y M. Leu, «Biomedical production of implants by additive electro chemical and physical processes,» *CIRP Annals -Manufacturing Technology*, vol. 61, nº Issue 2, pp. 635-655, 2012.
- [17] R. G. C., J. Scougall V., R. Contreras B., K. Adachi, H. Sakagami, Y. Hibino, H. Nakajima y J. Shimada, «Efectos de la luz UV sobre placas de titanio para la adhesión osteoblástica,» *Revista de la asociación dental Mexicana*, vol. 68, nº 4, pp. 175-182, 2011.
- [18] A. Lopez, A. E. hernandez Salinas, K. N. Alvarado Estrada, J. Morales Corona, Y. Teran Figueroa y E. Pérez , «Superficies biomiméticas: efectos del agente osteoinductor fosfatasa alcalina y calcitonina,» *Superficies y Vacío*, vol. 23, pp. 166-171, 2010.
- [19] L. Richert, F. Variola, F. Rosei, J. J. Wuest y A. Nanci, «Adsorption of proteins on proteins on nonoporus Ti surfaces,» *Surface Science*, vol. 604, pp. 1445-1451, 2012.
- [20] S. M. Van-Putten, D. T. A. Ploeder, E. R. Popa y R. A. Bank, «Macrophage phenotypes in the collagen induced foering body reaction in rats,» *Acta Biomaterialia*, vol. 9, pp. 6502-6510, 2013.
- [21] G. Zhao, o. Zinger, Z. Schwartz, M. Wieland, D. Landolt y B. D. Boyan, «Osteoblast like cells are sensitive to submicron scale surface structure,»

Clinical Oral Implants Research, vol. 17, pp. 258-264, 2006.

- [22] M. Stevens y J. George, «Exploring and engineering the cell surface interface,» *Science*, vol. 310, nº 5751, pp. 1135-1138, 2005.
- [23] L. Bacakova, E. Filova, F. Rypacek, V. Svorcik y V. Stary, «Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering,» *Physiological Research*, vol. 53, pp. 35-45, 2004.
- [24] G. Mendoca, D. B. S. Mendoca, F. . J. L. Aragao y L. F. Cooper, «Advancing dental implat surface technology - from micro to nanotopography,» *Biomaterials*, vol. 29, pp. 3822-3835, 2008.
- [25] M. Lai, K. Cai, Y. Hu, X. Yang y Q. Liu, «Regulation of the behaviors of mesenchymal stem bysurface nanoestructured titanium,» *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, vol. 97, pp. 211-220, 2012.
- [26] R. A. Gittens, R. Olivares-Navarrete, T. Mclachlan, Y. Cai, S. L. Hysy, J. M. Schneider, Z. Schwartz, K. H. Sandhage y B. D. Boyan, «Differential responses of osteoblast lineage cells to nanotopography modified microroughned titanium aluminium canadiun alloy surfaces,» *Biomaterials*, vol. 31, pp. 8986-8994, 2012.
- [27] G. Mendocca, D. B. S. Mendocca, L. G. Pagotto-Simoes, A. L. Araujo, E. R. Leite, A. L. Golin, F. J. L. Aragao y L. F. Cooper, «Nanoestructured implants surface effect on osteoblast gene expression and bone to imaplant contact in vivo,» *Material Science and Engineering C*, vol. 31, pp. 1809-1818, 2011.
- [28] M. G. Holthaus, J. Stolle, K. Rezwan y L. Treccani, «Orientation of human osteoblast on hydroxiapatite based microchannels,» *Acta Biomaterialia*, vol. 8, pp. 2580-2589, 2010.

- [29] Z. Pan, C. Yan, R. Peng, Y. Zhao, Y. He y J. Ding, «Control of cell nucleus shapes via micropillar patterns.,» *Biomaterials*, vol. 33, pp. 1730-1735, 2012.
- [30] A. Sherkaran y A. J. Garcia, «Nanoscale engineering of extracellular matrix mimetic bioadhesive surfaces and implants fot tissue engineering,» *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1810, nº 3, pp. 350-360, 2011.
- [31] R. T. Hill y A. Chilkoti, «Chapter I.2.13. Surface Patterning,» de *Biomaterial Science*, Academic Press, 2013, pp. 276-301.
- [32] P. M. Mendez, C. L. Yeung y J. A. Preece, «Bio-nanopatterning of surfaces,» *Nanoscale Research Letters*, vol. 2, pp. 373-384, 2007].
- [33] A. Györgyey, k. Ungvári, G. Kecskeméti, J. Kopniczky, B. hopp, A. Oszkó, I. Pelsoczi, Z. Rakonczay, K. Nagy y k. Turzo , «Attachment and proliferation of human osteoblast like cells (MG-63) on laser ablated titanium implant material,» *Materials Science and Engineering C*, vol. 33, pp. 4251-4259, 2013.
- [34] J. Lawrence, L. Hao y H. R. Chew, «On the correlation between Nd:YAG laser induced wettability characteristics modification and osteoblas cell bioactivity on titanium alloy,» *Surface Coatings & Technology*, vol. 200, pp. 5581-5589, 2006.
- [35] L. N. Meng, A. H. Wang, Y. Wu, X. Wang, H. B. Xia y Y. N. Wang, «Blind micro-hole array Ti6Al4V templates for carrying biomaterials fabricated by fiber laser drilling,» *Journal of Materials Processing Technology*, vol. 222, pp. 335-343, 2015.
- [36] N. Mirhosseini, P. L. Crouse, M. J. Schmidh, L. Li y D. Garrod, «Laser surface micro texturing of Ti6Al4V substrates for improved cell integration,» *Applied Surface Science*, vol. 253, pp. 7738-7743, 2007.

- [37] P. Bizi-Bandoki, S. Benayoun, S. Valette, B. Beaugiraud y E. Audouard, «Modifications of roughness and wettability properties of metals induced by femtosecond laser treatment,» *Applied Surface Science*, vol. 257, pp. 5213-5218, 2011.
- [38] J. Chen, J. P. Ulerich, E. Abelev, A. Fasasi, C. B. Arnold y W. O. Soboyejo, «An investigation of the initial attachment and orientation of osteoblast like cells on laser grooved Ti&Al4V surfaces,» *Material Science and Engineering C*, vol. 29, pp. 1442-1452, 2009.
- [39] D. Baltriukienė, V. Sabaliauskas, E. Balciunas, A. Melninkaitis, E. Liutkevicius, V. Bukelskienė y V. Rutkunas, «The effect of laser treated titanium surface on human gingival fibroblast behavior,» *Journal of Biomedical Materials Research: Part A.*, vol. 102, nº 3, pp. 713-720, 2014.
- [40] X. Zhao, J. M. Courtney y H. Quian, *Bioactive materials in medicine design and applications*, Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2011.
- [41] J. D. Bumgardner, M. Vasquez-Lee, K. Fulzele, D. H. Smith, K. D. Branch, S. I. Christian y D. L. Williams, «Biocompatibility Testing,» de *Encyclopedia of Biomaterials and medical engineering*, G. E. Wnek y G. L. Bowlin, Edits., New York, Informa Healthcare, 2008, p. 169.
- [42] S. E. Rodil, «Modificación superficial de biomateriales Metálicos,» *Revista latinoamericana de metalurgia y materiales*, vol. 29, nº 2, pp. 67-83, 2009.
- [43] J. M. Anderson, A. Rodríguez y D. T. Chang, «Foreign body reaction to biomaterials,» *Seminars in immunology*, vol. 20, pp. 86-100, 2008.
- [44] A. Balfe, S. Barry, O. Blake, D. Cannon, M. Healy, M. Kibane, P. McGing, R. O'Kelly y P. O'Shea, *The biochemistry of body fluids*, 1 ed., Peadar McGing y R. O'Kelly, Edits., ACBI Scientific Committee Guidelines, 2009.

- [45] K. C. Dee, D. A. Puleo y R. Bizios , An introduction to Tissue Biomaterial Interactions, New Jersey: John Wiley & Sons, 2002.
- [46] T. R. Rautray, R. Narayanan y k.-H. Kim, «Ion implantation of titanium based biomaterials,» *Progress in Materials Science*, vol. 56, nº Issue 8, pp. 1137-1177, October 2011.
- [47] S. C. J. ricardo, D. Y. Peña Ballesteros y N. D. Montañez Supelano, «Estudio metalografico del efecto de la velocidad de corte en la microestructiradel Ti6Al4V ELI para la empresa quirurgicos especializados,» *Iteckne*, vol. 11, nº 1, pp. 71-75, junio 2014.
- [48] American Society for testing and materials., *Standard specification for wrought Titanium 6 Aluminium 4 Vanadium Eli (Extra low interstitial) alloy for surgical implant applications. ASTM F136-12a*, 2012.
- [49] M. A. Kerrzo, G. Kenneth G, A. M. Fenelson, f. Sinead T y B. Carmel B, «Electrochemical studies on the stability and corrsoion resistance od titanium -based implant materials,» *Biomaterials*, vol. 22, pp. 1531-1539, 2001.
- [50] C. W., J. Szewczenko, J. Tyrlik Held, J. Marciniak y J. Zak, «Influence of the anodic oxidation on the physiochemical properties of the Ti6Al4V ELI alloy,» *Journal of materials Processing Technology*, Vols. %1 de %2162-163, pp. 163-168, 2005.
- [51] C. G. N. Dino, L. Lopez Melendez, R. G. Bautista Margulis, M. A. Neri Flores, J. G. Chacon Nava, S. D. de la Torre , J. G. Gonzalez Rodriguez y A. Martinez Villafañe, «Corrosion behavior of Ti6Al4V alloys,» *International journal of Electrochemical Science*, vol. 7, pp. 2389-2402, march 2012.
- [52] D. Scharnweber, «Biodegradation of metals,» de *Encyclopedia of materials: Science and Technology* , Oxford, Elseiver Science Ltda., 2001, pp. 555-560.

- [53] R. M. H. y P. Wojciech, *Histologia: Texto atlas color con biología celular y molecular*, Buenos Aires: Medicina Panamericana, 2008.
- [54] C. D. C. Alberto. [En línea]. Available: <http://www.encolombia.com/medicina/revistas-medicas/menopausia/vm-81/meno8102-contrifisio>.
- [55] D. B. Burr y O. Akkus, «Chapter 1. Bone Morphology and Organization,» de *Basic and applied bone biology*, D. B. y B. R. Allen, Edits., San Diego, Academic press, 2014, pp. 3-25.
- [56] M. Hernandez. [En línea]. Available: <http://las-hormonas.blogspot.com/2014/09/el-calcio-y-los-huesos.html>.
- [57] B. K. Hall, «Chapter 2. Bone,» de *Bones and Cartilage*, B. K. Hall, Ed., San Diego, Academic Press, 2015, pp. 17-42.
- [58] L. P. Garther y J. L. Hiatt, *Texto Atlas de Histología*, 3a ed., Mexico D.F.: McGrawHill, 2008.
- [59] T. Bellido, L. I. Plotkin y A. Bruzzanitti, «Chapter 2. Bone Cells,» de *Basic applied bone Biology*, D. B. M. R., Ed., San Diego, Academic Press, 2014, pp. 27-45.
- [60] H. Nakamura, «Morphology, Function, and differentiation of bone cells,» *Journal of Hard Tissue Biology*, vol. 16, nº 1, pp. 15-22, 2007.
- [61] Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina. Departamento de Biología Celular y Tisular, agosto 2015. [En línea]. Available: http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/tejido_oseo_2010.pdf.

- [62] L. M. Traslaviña y O. A. Nova, «Evaluación del comportamiento electroquímico de superficies de Ti6Al4V patronadas por ablación láser inmersa en solución Hank,» Bucaramanga, 2015.
- [63] G. Kang, Y. Dong , Y. Liu y H. Jiang , «Macroscopic and microscopic investigations on uniaxial ratchetting of two phase Ti 6Al 4V Alloy,» *Materials Characterization*, vol. 92, pp. 26-35, March 2014.
- [64] L. C. C. Roman, «Relación entre microestructura y resistencia a corrosión de la aleación biocompatible Ti6Al4V deformada en caliente,» Medellin, 2009.
- [65] C. R. L. C., «Relación entre microestructura y resistencia a corrosión de la aleación biocompatible Ti6Al4V deformada en caliente,» Medellín, 2009.
- [66] F. J. Gil, P. Ginebra y J. A. Planell, «Metales y aleaciones para la substitución de tejidos duros,» *Biomechanica*, vol. VII, nº 13, pp. 73-78, 1999.
- [67] D. M. J., «Understanding the metallurgy of titanium,» de *Titanium A technical Guide* , Materials Park OH, ASM International, 2000, p. 15.
- [68] M. E. Khosroshahi, M. Mahmodi y J. Tavakoli, «Characterization on Ti6Al4V implant surface treated by Nd: YAG laser and emery paper for orthopedic applications,» *Applied Surface Science*, vol. 253, pp. 8772-8781, 2007.
- [69] W. Choi, A. Tuteja, J. M. Mabry, R. E. Cohen y G. H. McKinley, «A modified Cassie-Baxter relationship to explain contac angle hysteresis and anisotropy on non-wetting textured surfaces,» *Journal of Colloidal and Inteface Science*, vol. 339, pp. 208-216, 2009.
- [70] E. Bormashenko, «Why does the Cassie- Baxter equation apply?,» *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 324, pp. 47-50, 2008.

- [71] Vitrocell Embriolife, 2009. [En línea]. Available: http://www.vitrocell.com.br/esp/vitrocell_esp_bularpmi.html.
- [72] V. A. Alves, R. Q. Reis, I. C. B. Santos, D. G. Souza, T. d. F. Goncalves, M. A. Pereira da Silva, A. Rossi y L. A. da Silva, «In situ impedance spectroscopy study of the electrochemical corrosion of Ti and Ti-6Al-4V in simulated fluid at 25°C and 37°C,» *Corrosión Science*, vol. 51, pp. 2473-2482, 2009.
- [73] M. C. García-Alonso, L. Saldaña, C. Alonso y V. Barranco, «In situ cell culture monitoring on a Ti-6Al-4V surface by electrochemical techniques,» *Acta Biomaterialia*, vol. 5, pp. 1374-1384, 2009.
- [74] P. Sevilla, M. Godoy, E. Salvagni, D. Rodriguez y F. J. Gil, «Biofunctionalization of titanium surface for osseointegration improvement,» *Journal of Physics: Conferences Series*, vol. 252, nº 1, 2010.
- [75] J. E. Gomez, L. E. Forero, P. Escobar-Rivero y W. Valdivieso, «Estudio de la citotoxicidad y adhesión de células humanas de osteosarcoma en Ti6Al4V superficialmente modificado,» *Scientia et Technica*, vol. 13, nº 36, pp. 85-89, 2007.
- [76] E. Gongadze, D. Kabaso, S. Bauer, T. Slivnik, P. Schmuki, U. Van Rienen y A. Iglic, «Adhesion of osteoblast to a nanorough titanium implant surface,» *International Journal of Nanomedicine*, vol. 6, pp. 1801-1816, 2011.
- [77] H.-H. Huang, «In situ surface electrochemical characterization of Ti and Ti6Al4V alloy cultured with osteoblast like cells,» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 314, pp. 787-792, 2004.
- [78] H.-H. Huang, S.-J. Pan y F.-H. LU, «Surface electrochemical impedance in situ monitoring of cell cultured titanium with a nanonetwork surface layer,»

Scripta Materialia, vol. 53, pp. 1037-1042, 2005.

- [79] D. Brunette, Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications, Springer Science and Business Media, 2001.
- [80] A. Gristina, «biomaterial- centered infection: microbial adhesion versus tissue integration,» *Science*, vol. 4822, pp. 1588-1595, 1987.
- [81] A. Vorobyev y C. Guo, «Femtosecond laser structuring of titanium implants,» *Applied Surface Science*, vol. 253, pp. 7272-7280, 2007.
- [82] M. Trtica, B. Gakovic, D. Batani, T. Desai, P. Panjan y B. Radak, «Surface modifications of titanium implant by a picosecond Nd:YAG laser operating at 1064 and 532 nm,» *Applied Surface Science*, vol. 253, pp. 2551-2556, 2006.
- [83] E. Akman, A. Demir, T. Canel y T. Sinmazcelik, «Laser Welding of Ti6Al4V titanium alloys,» *Journal of materials processing technology*, vol. 209, pp. 3705-3713, 2009.
- [84] L. Hao, J. Lawrence y L. Li, «Manipulation of the osteoblast response to a Ti6Al4V titanium alloy using a high power diode laser,» *Applied Surface Science*, vol. 247, pp. 602-606, 2005.
- [85] R. Myria, E. Champion, P. Hardouin y K. Anselme, «Quantitative kinetic analysis of gene expression during human osteoblastic adhesion on orthopaedic materials,» *Biomaterials*, vol. 27, nº 14, pp. 2829-2844, 2006.
- [86] O. Seunghab, C. Daraio, L.-H. Chen , P. Thomas R , R. R. Fiñones y S. Jin , «Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO₂ nanotubes,» *journal of biomedical materials research*, vol. 78A, nº Issue 1, pp. 97-103, July 2006.

- [87] T. Hiroaki, J. M. Macak, L. Müller, J. Kunze, F. Müller, P. Greil, S. Virtanen y P. Schmuncki, «Hydroxyapatite growth on anodic TiO₂ nanotubes,» *Journal of biomedical materials research*, vol. 77A, n° Issue 3, pp. 534-541, June 2006.
- [88] A. S. P, A. Ghicov, S. Aldabergenova, P. Drechsei, D. LeClere, G. E. Thompson, J. M. Macak y P. Schmuki, «Formation of double walled TiO₂ nanotubes and robust anatase membranes,» *Advanced materials*, vol. 20, n° Issue 21, pp. 4135-4139, November 2008.
- [89] Y. L. Pank, S. Lim, H. Ong Chyuan y W. Tong Chong, «A critical review in the recent progress of synthesizing techniques and fabrication of TiO₂ nanotubes photocatalysts,» *Applied Catalysis A: General*, vol. 481, pp. 127-142, 2014.
- [90] R. D., C. R. Bowen, A. Jaroenworalluck y R. Stevens, «A review of growth mechanism, structure and crystallinity of anodized TiO₂ nanotubes,» *Materials Science and Engineering R*, vol. 74, pp. 377-406, 2013.
- [91] U. C. d. Chile. [En línea]. Available: <http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/segundo/histologia/histologiaweb/IndiceConectivo.html>.
- [92] Universidad Católica de Chile, [En línea]. Available: <http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/segundo/histologia/histologiaweb/IndiceConectivo.html>.
- [93] T. Clavijo. [En línea]. Available: <http://biologia-segundo-nocturno.blogspot.com/2011/07/los-huesos-son-organos.html>.

BIBLIOGRAFIA

- A. Abarrategui López, «Estudio del quitosano como biomaterial portador de rhBMP-2: Desarrollo, caracterización y aplicabilidad en regeneración del tejido óseo,» Madrid, 2008.
- A. Balfe, S. Barry, O. Blake, D. Cannon, M. Healy, M. Kibane, P. McGing, R. O'Kelly y P. O'Shea, The biochemistry of body fluids, 1 ed., Peadar McGing y R. O'Kelly , Edits., ACBI Scientific Committe Guidelines, 2009.
- A. Gristina, «biomaterual- centered infection: microbial adhesion versus tissue integration,» Science, vol. 4822, pp. 1588-1595, 1987.
- A. Györgyey, k. Ungvári, G. Kecskeméti, J. Kopniczky, B. hopp, A. Oszkó, I. Pelsoczi, Z. Rakonczay, K. Nagy y k. Turzo , «Attachment and proliferation of human osteoblast like cells (MG-63) on laser ablated titanium implant material,» Materials Science and Engineering C, vol. 33, pp. 4251-4259, 2013.
- A. Lopez, A. E. hernandez Salinas, K. N. Alvarado Estrada, J. Morales Corona, Y. Teran Figueroa y E. Pérez , «Superficies biomimeticas: efectos del agente osteoinductor fosfatasa alcalina y calcitonina,» Superficies y Vacio, vol. 23, pp. 166-171, 2010.
- A. S. P, A. Ghicov, S. Aldabergenova, P. Drechsei, D. LeClere, G. E. Thompson , J. M. Macak y p. Schmuki, «Formation of double walled TiO₂ nanotubes and

robust anatase membranes,» *Advanced materials*, vol. 20, nº Issue 21, pp. 4135-4139, november 2008.

A. Sherkaran y A. J. Garcia, «Nanoscale engineering of extracellular matrix mimetic bioadhesive surfaces and implants for tissue engineering,» *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1810, nº 3, pp. 350-360, 2011.

A. Vorobyev y C. Guo, «Femtosecond laser structuring of titanium implants,» *Applied Surface Science*, vol. 253, pp. 7272-7280, 2007.

American Society for testing and materials., Standard specification for wrought Titanium 6 Aluminium 4 Vanadium ELI (Extra low interstitial) alloy for surgical implant applications. ASTM F136-12a, 2012.

B. K. Hall, «Chapter 2. Bone,» de *Bones and Cartilage*, B. K. Hall, Ed., San Diego, Academic Press, 2015, pp. 17-42.

C. A. Martinez y A. Ozols, «Biomateriales utilizados en cirugía ortopédica como sustitutos del tejido óseo,» *Revista de la asociación Argentina de ortopedia y traumatología*, vol. 77, pp. 140-146, 2012.

C. D. C. Alberto. [En línea]. Available: <http://www.encolombia.com/medicina/revistas-medicas/menopausia/vm-81/meno8102-contrifisio>.

C. G. N. Dino, L. Lopez Melendez, R. G. Bautista Margulis, M. A. Neri Flores, J. G. Chacon Nava, S. D. de la Torre, J. G. Gonzalez Rodriguez y A. Martinez Villafañe, «Corrosion behavior of Ti6Al4V alloys,» *International journal of Electrochemical Science*, vol. 7, pp. 2389-2402, march 2012.

C. R. L. C., «Relación entre microestructura y resistencia a corrosión de la aleación biocompatible Ti6Al4V deformada en caliente,» Medellín, 2009.

C. W., J. Szewczenko, J. Tyrlik Held, J. Marciniak y J. Zak, «Influence of the anodic oxidation on the physiochemical properties of the Ti6Al4V ELI alloy,»

Journal of materials Processing Technology, Vols. 162-163, pp. 163-168, 2005.

D. B. Burr y O. Akkus, «Chapter 1. Bone Morphology and Organization,» de Basic and applied bone biology , D. B. y B. R. Allen, Edits., San Diego, Academic press, 2014, pp. 3-25.

D. Baltriukiene, V. Sabaliauskas, E. Balciunas, A. Melninkaitis, E. Liutkevicius, V. Bukelskiene y V. Rutkunas, «The effect of laser treated titanium surface on human gingival fibroblast behavior,» Journal of Biomedical Materials Research: Part A., vol. 102, nº 3, pp. 713-720, 2014.

D. Brunette, Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications, Springer Science and Business Media, 2001.

D. M. J., «Understanding the metallurgy of titanium,» de Titanium A technical Guide , Materials Park OH, ASM International, 2000, p. 15.

D. Scharnweber, «Biodegradation of metals,» de Encyclopedia of materials: Science and Technology , Oxford, Elsevier Science Ltda., 2001, pp. 555-560.

E. Akman, A. Demir, T. Canel y T. Sinmazcelik, «Laser Welding of Ti6Al4V titanium alloys,» Journal of materialsprocessing technology, vol. 209, pp. 3705-3713, 2009.

E. Bormashenko, «Why does the Cassie- Baxter equation apply?,» Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, vol. 324, pp. 47-50, 2008.

E. Gongadze, D. Kabaso, S. Bauer, T. Slivnik, P. Schmuki, U. Van Rienen y A. Iglic, «Adhesion of osteoblast to a nanorough titanium implant surface,» International Journal of Nanomedicine, vol. 6, pp. 1801-1816, 2011.

F. Barrere, T. A. Mahmood, K. de Groot y C. A. Van Blitterswijk, «Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: instructive and smart functions,»

Materials Science and Engineering R: Reports, vol. 59, nº Issue 1, pp. 38-71, 2008.

F. Forriol y R. Esparza, «Ingeniería tisular: aplicación de las células troncales pluripotenciales en cirugía ortopédica y traumatológica,» Trauma, vol. 19, nº 2, pp. 88-101, 2008.

F. J. Gil, P. Ginebra y J. A. Planell, «Metales y aleaciones para la sustitución de tejidos duros,» Biomechanica, vol. VII, nº 13, pp. 73-78, 1999.

G. Kang, Y. Dong , Y. Liu y H. Jiang , «Macroscopic and microscopic investigations on uniaxial ratchetting of two phase Ti 6Al 4V Alloy,» Materials Characterization, vol. 92, pp. 26-35, March 2014.

G. Mendoca, D. B. S. Mendoca, F. . J. L. Aragao y L. F. Cooper, «Advancing dental implat surface technology - from micro to nanotopography,» Biomaterials, vol. 29, pp. 3822-3835, 2008.

G. Mendocca, D. B. S. Mendocca, L. G. Pagotto-Simoes, A. L. Araujo, E. R. Leite, A. L. Golin, F. J. L. Aragao y L. F. Cooper, «Nanostructured implants surface effect on osteoblast gene expression and bone to imaplant contact in vivo,» Material Science and Engineering C, vol. 31, pp. 1809-1818, 2011.

G. Zhao, o. Zinger, Z. Schwartz, M. Wieland, D. Landolt y B. D. Boyan, «Osteoblast like cells are sensitive to submicron scale surface structure,» Clinical Oral Implants Research, vol. 17, pp. 258-264, 2006.

H. Aita, N. Hori, M. Takeuchi, T. Suzuki, . M. Yamada, M. Anpo y T. Ogawa, «The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone,» Biomaterials, vol. 30, pp. 1015-1025, 2009.

H. nakamura, «Morphology, Function, and differentiation of bone cells,» Journal of Hard Tissue Biology, vol. 16, nº 1, pp. 15-22, 2007.

H.-H. Huang, «In situ surface electrochemical characterization of Ti and T6Al4V alloy cultured with osteoblast like cells,» Biochemical and Biophysical Research Communicatios, vol. 314, pp. 787-792, 2004.

H.-H. Huang, S.-J. Pan y F.-H. LU, «Surface electrochemical impedance in situ monitoring of cell cultured titanium with a nanonetwork surface layer,» Scripta Materialia, vol. 53, pp. 1037-1042, 2005.

J. Chen, J. P. Ulerich, E. Abelev, A. Fasasi, C. B. Arnold y W. O. Soboyejo, «An investigation of the initial attachment and orientation of osteoblast like cells on laser grooved Ti&Al4V surfaces,» Material Science and Engineering C, vol. 29, pp. 1442-1452, 2009.

J. D. Bumgardner, M. Vasquez-Lee, K. Fulzele, D. H. Smith, K. D. Branch, S. I. Christian y D. L. Williams, «Biocompatibility Testing,» de Encyclopedia of Biomateriaks and medical engineering, G. E. Wnerk y G. L. Bowlin, Edits., New York, Informa Healthcare , 2008, p. 169.

J. E. Gomez, L. E. Forero, P. Escobar-Rivero y W. Valdivieso, «Estudio de la citotoxicidad y adhesión de celulas humanas de osteosarcoma en Ti6Al4V superficialmente modificado,» Scientia et Teechnica, vol. 13, nº 36, pp. 85-89, 2007.

J. Lawrence, L. Hao y H. R. Chew, «On the correlation between Nd:YAG laser induced wettability characteristics modification and osteoblas cell bioactivity on titanium alloy,» Surface Coatings & Technology, vol. 200, pp. 5581-5589, 2006.

J. M. Anderson, A. Rodriguez y D. T. Chang, «Foreign body reaction to biomaterials,» Seminars in immunology, vol. 20, pp. 86-100, 2008.

K. Anselme, P. Davidson, A. M. Popa, M. Giazzon, M. Liley y L. Ploux, «The interaction of the cells and bacteria with surfaces structured at the nanometer scale,» Acta biomaterialia, vol. 6, pp. 3824-3846, 2010.

K. Anselmwe, «Osteoblast adhesion on biomaterials,» *Biomaterials*, vol. 21, pp. 667-681, 2000.

K. C. Dee, D. A. Puleo y R. Bizios , *An introduction to Tissue Biomaterial Interactions*, New Jersey: John Wiley & Sons, 2002.

K. Chawla, «biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine: treatment of musculoskeletal injury and disease,» *Materials Science and Engineering: A*, vol. 557, pp. 45-53, 2012.

K. G. Neoh, X. Hu, D. Zheng y E. T. Kang, «Balancing osteoblast functions and bacterial adhesion on functionalized titanium surface,» *Biomaterials*, vol. 33, pp. 2813-2822, 2012.

L. Bacakova, E. Filova , M. Parizek, T. Rumi y V. Svorcik, «Modulation of cell adhesion , proliferation and differentiation on materials designed for body implants,» *Biotechnology Advances*, vol. 29, nº Issue 6, pp. 739-767, November - december 2011.

L. Bacakova, E. Filova, F. Rypacek, V. Svorcik y V. Stary, «Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering,» *Physiological Research*, vol. 53, pp. 35-45, 2004.

L. C. C. Roman, «Relación entre microestructura y resistencia a corrosión de la aleación biocompatible Ti6Al4V deformada en caliente,» *Medellin*, 2009.

L. Hao, J. Lawrence y L. Li, «Manipulation of the osteoblast response to a Ti6Al4V titanium alloy using a high power diode laser,» *Applied Surface Science*, vol. 247, pp. 602-606, 2005.

L. M. Traslaviña y O. A. Nova, «Evaluación del comportamiento electroquímico de superficies de Ti6Al4V patronadas por ablación láser inmersa en solución Hank,» *Bucaramanga*, 2015.

L. N. Meng, A. H. Wang, Y. Wu, X. Wang, H. B. Xia y Y. N. Wang, «Blind micro-hole array Ti6Al4V templates for carrying biomaterials fabricated by fiber laser drilling,» *Journal of Materials Processing Technology*, vol. 222, pp. 335-343, 2015.

L. P. Garther y J. L. Hiatt, *Texto Atlas de Histología*, 3a ed., Mexico D.F.: McGrawHill, 2008.

L. Richert, F. Variola, F. Rosei, J. J. Wuest y A. Nanci, «Adsorption of proteins on proteins on nonoporus Ti surfaces,» *Surface Science*, vol. 604, pp. 1445-1451, 2012.

M. A. Kerrzo, G. Kenneth G, A. M. Fenelson, f. Sinead T y B. Carmel B, «Electrochemical studies on the stability and corrsion resistance od titanium - based implant materials,» *Biomaterials*, vol. 22, pp. 1531-1539, 2001.

M. C. García-Alonso, L. Saldaña, C. Alonso y V. Barranco , «In situ cell culture monitoring on a Ti-6Al-4V surface by electrochemical techniques,» *Acta Biomaterialia*, vol. 5, pp. 1374-1384, 2009.

M. E. Khosroshahi, M. Mahmodi y J. Tavakoli, «Characterization on Ti6Al4V implant surface treated by Nd: YAG laser and emery paper for orthopedic applications,» *Applied Surface Science*, vol. 253, pp. 8772-8781, 2007.

M. G. Holthaus, J. Stolle, K. Rezwan y L. Treccani, «Orientation of human osteoblast on hydroxiapatite based microchannels,» *Acta Biomaterialia*, vol. 8, pp. 2580-2589, 2010.

M. Hernandez. [En línea]. Available: <http://las-hormonas.blogspot.com/2014/09/el-calcio-y-los-huesos.html>.

M. Lai, K. Cai, Y. Hu, X. Yang y Q. Liu, «Regulation of the behaviors of mesenchymal stem bysurface nanoestructured titanium,» *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, vol. 97, pp. 211-220, 2012.

M. Stevens y J. George, «Exploring and engineering the cell surface interface,» Science, vol. 310, nº 5751, pp. 1135-1138, 2005.

M. Trtica, B. Gakovic, D. Batani, T. Desai, P. Panjan y B. Radak, «Surface modifications of titanium implant by a picosecond Nd:YAG laser operating at 1064 and 532 nm,» Applied Surface Science, vol. 253, pp. 2551-2556, 2006.

N. Mirhosseini, P. L. Crouse, M. J. Schmidh, L. Li y D. Garrod, «Laser surface micro texturing of Ti6Al4V substrates for improved cell integration,» Applied Surface Science, vol. 253, pp. 7738-7743, 2007.

O. Seunghab, C. Daraio, L.-H. Chen , P. Thomas R , R. R. Fiñones y S. Jin , «Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO₂ nanotubes,» journal of biomedical materials reseach, vol. 78A, nº Issue 1, pp. 97-103, July 2006.

P. Bartolo, J. P. Kruth , j. Silva , G. Levy, A. Malshe, K. Rajurkar, M. Mitsuishi, J. Ciurana y M. Leu, «Biomedical production of implants by additive electro chemical and physical processes,» CIRP Annals -Manufacturing Technology, vol. 61, nº Issue 2, pp. 635-655, 2012.

P. Bizi-Bandoki, S. Benayoun, S. Valette, B. Beaugiraud y E. Audouard, «Modifications of reoughness and wettability properties of metals inducec by femtosecond laser treatment,» Applied Surface Science, vol. 257, pp. 5213-5218, 2011.

P. M. Mendez, C. L. Yeung y J. A. Preece, «Bio-nanopatterning of surfaces,» Nanoescale Research Letters, vol. 2, pp. 373-384, 2007|.

P. Sevilla, M. Godoy, E. Salvagni, D. Rodriguez y F. J. Gil, «Biofunctionalization of titanium surface for osseointegration improvement,» Journal of Physcics: Conferences Series, vol. 252, nº 1, 2010.

R. A. Gittens, R. Olivares-Navarrete, T. Mclachlan, Y. Cai, S. L. Hysy, J. M. Schneider, Z. Schwartz, K. H. Sandhage y B. D. Boyan, «Differential responses of osteoblast lineage cells to nanotopography modified microroughened titanium aluminium canadiun alloy surfaces,» *Biomaterials*, vol. 31, pp. 8986-8994, 2012.

R. A. Pérez, J. E. Won, J. C. Knowles y H.-W. Kim, «Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration,» *Advanced drug delivery reviews*, vol. 65, nº Issue 4, pp. 471-496, 2013.

R. D., C. R. Bowen, A. Jaroenworalluck y R. Stevens, «A review of growth mechanism, structure and crystallinity of anodized TiO₂ nanotubes,» *Materials Science and engineering R*, vol. 74, pp. 377-406, 2013.

R. G. C., J. Scougall V., R. Contreras B., K. Adachi, H. Sakagami, Y. Hibino, H. Nakajima y J. Shimada, «Efectos de la luz UV sobre placas de titanio para la adhesión osteoblástica,» *Revista de la asociación dental Mexicana*, vol. 68, nº 4, pp. 175-182, 2011.

R. M. H. y P. Wojciech, *Histología: Texto atlas color con biología celular y molecular*, Buenos Aires: Medicina Panamericana, 2008.

R. Myria, E. Champion, P. Hardouin y K. Anselme, «Quantitative kinetic analysis of gene expression during human osteoblastic adhesion on orthopaedic materials,» *Biomaterials*, vol. 27, nº 14, pp. 2829-2844, 2006.

R. T. Hill y A. Chilkoti, «Chapter 1.2.13. Surface Patterning,» de *Biomaterial Science*, Academic Press, 2013, pp. 276-301.

S. C. J. Ricardo, D. Y. Peña Ballesteros y N. D. Montañez Supelano, «Estudio metalográfico del efecto de la velocidad de corte en la microestructura del Ti6Al4V ELI para la empresa quirúrgicos especializados,» *Iteckne*, vol. 11, nº 1, pp. 71-75, junio 2014.

S. E. Rodil, «Modificación superficial de biomateriales Metalicos,» Revista latinoamericana de metalurgia y materiales, vol. 29, nº 2, pp. 67-83, 2009.

S. M. Van-Putten, D. T. A. Ploeder, E. R. Popa y R. A. Bank, «Macrophage phenotypes in the collagen induced foering body reaction in rats,» Acta Biomaterialia, vol. 9, pp. 6502-6510, 2013.

S. V. Dorozhkin, «Bioceramics of calcium orthophosphates,» Biomaterials, vol. 31, pp. 1465-1485, 2010.

T. Bellido, L. I. Plotkin y A. Bruzzanitti, «Chapter 2. Bone Cells,» de Basic applied bone Biology , D. B. M. R., Ed., San Diego, Academic Press, 2014, pp. 27-45.

T. Clavijo. [En línea]. Available: <http://biologia-segundo-nocturno.blogspot.com/2011/07/los-huesos-son-organos.html>.

T. Hiroaki, J. M. Macak, L. Müller, J. kunze, F. Müller, P. Greil, S. Virtanen y P. Schmuncki, «Hydroxyapatite growth on anodic TiO2 nanotubes,» Journal of biomedical materials research , vol. 77A , nº Issue 3, pp. 534-541, June 2006.

T. R. Rautray, R. Narayanan y k.-H. Kim, «lon implantation of titanium based biomaterials,» Progress in Materials Science, vol. 56, nº Issue 8, pp. 1137-1177, October 2011.

U. C. d. Chile. [En línea]. Available: <http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/segundo/histologia/histologiaweb/IndiceConectivo.html>.

Universidad Catolica de Chile, [En línea]. Available: <http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/segundo/histologia/histologiaweb/IndiceConectivo.html>.

Universidad Nacional Autonoma de Mexico. Facultad de Medicina. Departamento de Biologia Celular y Tisular, agosto 2015. [En línea]. Available:

http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/tejido_oseo_2010.pdf.

V. A. Alves, R. Q. Reis, I. C. B. Santos, D. G. Souza , T. d. F. Goncalves, M. A. Pereira da Silva, A. Rossi y L. A. da Silva, «In situ impedance spectroscopy study of the electrochemical corrosion of Ti and Ti-6Al-4V in simulated fluid at 25°C and 37°C,» Corrosión Science, vol. 51, pp. 2473-2482, 2009.

Vitrocell Embriolife, 2009. [En línea]. Available: http://www.vitrocell.com.br/esp/vitrocell_esp_bularpmi.html.

W. Choi, A. Tuteja, J. M. Mabry, R. E. Cohen y G. H. McKinley, «A modified Cassie-Baxter relationship to explain contact angle hysteresis and anisotropy on non-wetting textured surfaces,» Journal of Colloidal and Interface Science, vol. 339, pp. 208-216, 2009.

W.-K. Lee, S.-M. Lee y H.-M. Kim, «Effect of surface morphology of calcium phosphate on osteoblast - like HOS cell responses,» Journal of Industrial and Engineering Chemistry, vol. 15, pp. 677-682, 2009.

X. Lui, P. K. Chu y C. Ding, «Surface nanofunctionalization of biomaterials,» Materials Science and Engineering R: Reports, vol. 70, nº Issue 3-6, pp. 275-302, 2010.

X. Zhao, J. M. Courtney y H. Quian, Bioactive materials in medicine design and applications, Cambridge: woodhead Publishing Limited, 2011.

Y. Hibata, D. Suzuki, S. Omori, R. Tanaka, A. Murakami, Y. Kataoka, K. Baba y R. Kamijo, «The Characteristics of in vitro biological activity of titanium surface anodically oxidized in chloride solutions,» Biomaterials, vol. 31, pp. 8546-8555, 2010.

Y. L. Pank, S. Lim, H. Ong Chyuan y W. Tong Chong, «A critical review in the recent progress of sysntesizing techniques and fabrication of TiO₂ nanotubes photocatalysts,» *Applied Catalysis A: General*, vol. 481, pp. 127-142, 2014.

Z. Pan, C. Yan, R. Peng, Y. Zhao, Y. He y J. Ding, «Control of cell nucleus shapes via micropillar patterns.,» *Biomaterials*, vol. 33, pp. 1730-1735, 2012.