

RESPUESTA DE CÉLULAS HOS SOBRE SUPERFICIES
NANOESTRUCTURADAS DE TiO_2 CRECIDAS MEDIANTE ANODIZACIÓN
ELECTROQUÍMICA CON DIFERENTES ELECTROLITOS

JESSICA JULIETH FERREIRA OSPINA
JUAN CAMILO MORENO SEGOVIA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍA FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA

2019

RESPUESTA DE CÉLULAS HOS SOBRE SUPERFICIES
NANOESTRUCTURADAS DE TiO₂ CRECIDAS MEDIANTE ANODIZACIÓN
ELECTROQUÍMICA CON DIFERENTES ELECTROLITOS.

JESSICA JULIETH FERREIRA OSPINA
JUAN CAMILO MORENO SEGOVIA

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de
INGENIERO QUÍMICO

DIRECTOR
DARIO YESID PEÑA BALLESTEROS
Doctor en Corrosión

CODIRECTOR
ANDERSON ANDRES SANDOVAL AMADOR
Magister en Ingeniería de Materiales

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍA FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA

2019

Al todopoderoso porque todas las cosas proceden de él,
y existen por él y para él.

¡A él sea la gloria por siempre!

Amén

Romanos 11:36

A la memoria de Napoleón Ospina Torrecilla
porque su sonrisa siempre será mi mejor motivación,
por brindarme tanto amor, apoyo y dedicación,
porque sus enseñanzas perdurarán por siempre.

A Rosa Narcisa Ospino Velásquez
por enseñarme el amor de Dios, por sus oraciones
y ser el mejor ejemplo de mujer luchadora.

A mis padres Javier Ferreira y Jasmine Ospina
por acompañarme en este proceso y brindarme todo el apoyo y
comprensión.

A mis hermanos Jennifer y Jonathan
por la complicidad y el apoyo de familia.

Jessica Julieth Ferreira Ospina

A Dios, por darme a diario los motivos suficientes para seguir adelante y permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida.

A mis padres, William y Alexandra, quienes son la fuente de inspiración en cada paso de mi vida, con sus valores y apoyo incondicional han hecho de mí una mejor persona, gracias por todo el amor que me han brindado.

A mis hermanos, Jorge y Mayra, quienes me enseñaron que todo es posible con esfuerzo y dedicación.

Juan Camilo Moreno Segovia.

AGRADECIMIENTO

A la **Universidad Industrial de Santander**, por contribuir con nuestra formación integral.

Al profesor **Darío Yesid Peña Ballesteros**, por el apoyo y compromiso en la realización de este proyecto.

A **Anderson Sandoval**, por su acompañamiento, conocimiento y paciencia en el desarrollo de este trabajo.

Al **Grupo de Investigación en Corrosión (GIC)**, por habernos acogido y brindarnos el apoyo a lo largo del proyecto.

Al **Laboratorio de Microscopía**, al **Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CINTROP)** y al **Grupo de Investigación en Desarrollo y Tecnología de Nuevos Materiales (GIMAT)** por su colaboración para la realización del proyecto.

A **Katherine López Jaime** y **Andrey Caballero**, por su disposición y apoyo en el laboratorio.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. OBJETIVOS	19
1.1 OBJETIVO GENERAL	19
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
2. MARCO TEÓRICO	20
2.1 ANODIZACIÓN	20
2.2 TEJIDO ÓSEO	20
2.3 CÉLULA HOS	22
2.4 BIOMATERIALES	23
2.5 CITOTOXICIDAD	23
2.6 BIOFUNCIONALIZACIÓN	23
2.7 ADHESIÓN CELULAR	24
2.8 EFECTO DE LA RUGOSIDAD	24
3. METODOLOGÍA	26
3.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	27
3.1.1 Preparación de la superficie de TiO_2	27
3.1.3 Caracterización de la morfología de los nanotubos de TiO_2	28
3.2 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR DE LAS SUPERFICIES	29
3.2.1 Esterilización de las muestras	29
3.2.2 Cultivo celular.	29
3.2.3 Preparación de los sobrenadantes.	29
3.2.4 Ensayos de toxicidad celular	29
3.2.5 Observación por microscopía de epifluorescencia	30
3.2.6 Observación de las células HOS mediante SEM.	30

3.2.7 Adhesión cuantitativa por conteo.	31
3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
4. ANÁLISIS Y RESULTADOS	32
4.1 ANÁLISIS SEM PARA LOS NANOTUBOS DE TiO_2	32
4.2 PRUEBAS DE TOXICIDAD CELULAR	34
4.3 ADHESIÓN CUANTITATIVA SOBRE LA SUPERFICIE DE LAS PROBETAS	35
4.4 ADHESIÓN CUALITATIVA POR FLUORESCENCIA	37
4.5 MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS HOS	39
4.6 ANÁLISIS DE LA RUGOSIDAD DE LA SUPERFICIE	40
5. CONCLUSIONES	45
6. RECOMENDACIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	47

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representación esquemática de la relación existente de un osteoclasto, osteoblasto vecino, la matriz ósea y un osteocito.	22
Figura 2. Diagrama de flujo metodología.	26
Figura 3. Montaje de anodizado electroquímico.	28
Figura 4. Imágenes SEM, vista superior y transversal de la morfología de las generaciones G1, G2 y G3.	32
Figura 5. Porcentaje de viabilidad celular para las diferentes superficies (G1, G2, G3, blanco y control).	35
Figura 6. Las probetas fueron colocadas en el interior de placas de 24 pozos. probetas sin anodizar y pozos sin probetas fueron utilizados como control.	36
Figura 7. Células HOS adheridas a la superficie de las probetas después de 72 horas de incubación. A. Probetas G1 (A), probetas G2 (B), probetas G3 (C) y probetas blanco (D).	38
Figura 8. Imágenes SEM de las células HOS presentes en las diferentes superficies. a) solución G1. b) solución G2. c) Solución G3. d) Probeta en blanco.	39
Figura 9. Reconstrucción 3D probeta anodizada con G1.	41
Figura 10. Reconstrucción 3D probeta anodizada con G2.	41
Figura 11. Reconstrucción 3D probeta anodizada con G3.	42
Figura 12. Reconstrucción 3D probeta sin anodizar.	42

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Condiciones de anodización.	28
Tabla 2. Valores de diámetro, longitud grosor y espacio intercolumnar para cada probeta con recubrimiento.	33
Tabla 3. Valores promedios de altura del perfil de rugosidad para cada superficie (Ra).	43

ABREVIATURAS

G1: Muestras anodizadas con el electrolito 1M H_3PO_4 +0,2 v/v HF+ agua

G2: Muestras anodizadas con el electrolito 0,3%M NH_4F + 1M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + agua

G3: Muestras anodizadas con el electrolito 0,3%w NH_4F +2%v H_2O + etilenglicol

BLANCO: Probeta lijada sin recubrimiento

RESUMEN

Título: RESPUESTA DE CÉLULAS HOS SOBRE SUPERFICIES NANOESTRUCTURADAS DE TiO_2 CRECIDAS MEDIANTE ANODIZACIÓN ELECTROQUÍMICA CON DIFERENTES ELECTROLITOS. *

Autores: Jessica Julieth Ferreira Ospina. Juan Camilo Moreno Segovia**

Palabras clave: Citotoxicidad, rugosidad, electrolito, adherencia celular.

Descripción:

La fabricación de implantes ortopédicos usando superficies biofuncionalizadas, como el titanio grado 5, facilitan la interfaz material-célula permitiendo tener un mayor grado de adherencia y proliferación celular, generando así, una mejor calidad de vida en los pacientes. Para que la adhesión celular ocurra, se debe tener en cuenta, principalmente, las características químicas y superficiales del material base. En este trabajo se evaluó la interacción entre las células de osteosarcoma humano (HOS) y superficies biofuncionalizadas mediante anodización electroquímica de aleación de Ti6Al4V . Las superficies fueron anodizadas con 3 electrolitos diferentes (ácidos, sales de fluoruro y orgánicos), además se utilizó una superficie de control sin recubrimiento. Para el análisis morfológico de los nanotubos de TiO_2 , se observó en el microscopio electrónico de barrido. La respuesta biológica del material se llevó a cabo usando células HOS en medio RPMI-1640, con suero fetal bovino al 10%v y 1%v de antibióticos. Además, se realizaron pruebas cuantitativas de adherencia celular, citotoxicidad y cualitativas de epifluorescencia. Sin embargo, los resultados muestran que las superficies recubiertas no superan en adherencia la superficie de control, por lo que finalmente, se hizo una reconstrucción 3D de las superficies analizadas con el fin de determinar el perfil de rugosidad de las muestras, ya que la rugosidad de la superficie es un factor determinante que favorece la adhesión.

Se determinó que a las condiciones de anodización realizadas (20V y 1 hora) no se generan superficies con un grado de rugosidad óptimo que favorezca la adhesión de las células a la superficie de aleación, y que la superficie anodizada con el electrolito orgánico genera una citotoxicidad no apta para ser implantada en el cuerpo humano, ya que esta presenta un alto porcentaje de inhibición celular.

*Proyecto de grado

**Facultad de Ingeniería Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Darío Yesid Peña Ballesteros, Doctor en Corrosión. Codirector: Anderson Andrés Sandoval Amador, Magíster en Ingeniería de Materiales.

ABSTRACT

Title: HOS CELLS RESPONSE ON NANO-STRUCTURED SURFACES OF TiO₂ GROWTH THROUGH ELECTROCHEMICAL ANODIZATION WITH DIFFERENT ELECTROLYTES.*

Keywords: Cytotoxicity, roughness, electrolyte, cell adhesion.

Authors: Jessica Julieth Ferreira Ospina. Juan Camilo Moreno Segovia **

Description:

The manufacture of orthopedic implants using biofunctionalized surfaces, such as grade 5 titanium, facilitates the material-cell interface allowing a greater degree of adhesion and cell proliferation, thus generating a better quality of life in patients. For the cell adhesion to occur, the chemical and surface characteristics of the base material must be taken into account. In this work, the interaction between human osteosarcoma cells (HOS) and biofunctionalized surfaces was evaluated by electrochemical anodization of Ti6Al4V alloy. The surfaces were anodized with 3 different electrolytes (acids, fluoride salts and organic), besides, an uncoated control surface was used. For the morphological analysis of the TiO₂ nanotubes, it was observed in the scanning electron microscope. The biological response of the material was carried out using HOS cells in RPMI-1640 medium, with 10% v fetal bovine serum and 1% v antibiotics. Also, quantitative tests of cell adhesion, cytotoxicity, and qualitative epifluorescence were made. However, the results show that the coated surfaces do not exceed in adhesion the control surface, consequently, a 3D reconstruction of the analyzed surfaces was made in order to determine the roughness profile of the samples, since the roughness of the surface is a determining factor that favors adhesion.

It was determined that at the anodizing conditions performed (20V and 1 hour) do not generate surfaces with an optimum degree of roughness that favors the cells adhesion to the alloy surface and that the anodized surface with the organic electrolyte generates an unsuitable cytotoxicity to be implanted in the human body, because this presents a high percentage of cellular inhibition.

*Graduation project

** Faculty of Physicochemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director: Darío Yesid Peña Ballesteros, Doctor in Corrosion. Co-director: Anderson Andrés Sandoval Amador, Master in Materials Engineering.

INTRODUCCIÓN

La ortopedia es una de las principales ramas de la medicina, la cual busca mejorar la calidad de vida dando solución a los problemas óseos que pueden presentar las personas. Uno de los principales inconvenientes que se obtiene a la hora de usar implantes ortopédicos es que el cuerpo humano puede repelerlos, incrementando los riesgos post operatorios y comprometiendo la vida de los pacientes. Por tal motivo es indispensable desarrollar materiales que ayuden a dar solución a dicha problemática.

En 2016, D. Khudhair et al, dieron a conocer la importancia de los nanotubos de TiO_2 en el campo de la medicina debido a sus propiedades mecánicas como lo son la alta resistencia a la corrosión, baja gravedad específica; así como la biocompatibilidad inherente que permite una gran proliferación celular, adhesión y mineralización¹.

En los últimos años, se han realizado diversos trabajos de investigación relacionados con los materiales biofuncionalizados, los cuales son materiales con superficies capaces de generar una respuesta/función biológica específica. Para que estos biomateriales se adapten a las necesidades humanas es necesario ajustar ciertos parámetros como la morfología de la superficie, la microestructura, la composición y las propiedades, garantizando que una vez implantados creen interacciones positivas con el tejido vivo.

Awad et al, en 2017, realizaron una revisión bibliográfica para conocer el desarrollo de los implantes ortopédicos en los últimos tiempos, analizaron tres tipos de materiales: metales, cerámicos y polímeros que son predominantes a la hora de la

¹ KHUDHAIR, D., BHATTI, A., LI, Y., AMANI, H., GARMESTANI, H., HODGSON, P., & NAHAVANDI, S. Anodization parameters influencing the morphology and electrical properties of TiO_2 nanotubes for living cell interfacing and investigations. *Materials Science and Engineering: C*, 2016, vol. 59, pp. 1125 - 1142.

fabricación de implantes, concluyendo que los nanotubos de TiO_2 son la mejor opción en la actualidad ya que han demostrado una gran mejora en la adsorción, proliferación y diferenciación de las células cultivadas. Los implantes de nanotubos de TiO_2 se benefician del potencial de funcionalización de la superficie, reduciendo la infección post-operatoria y promoviendo la integración del tejido óseo².

En 2014, Pang et al, realizaron estudios comparativos de las distintas técnicas para la formación de nanotubos de TiO_2 , en las que se encuentran la anodización electroquímica, el tratamiento hidrotérmico y el método asistido por plantilla. Se encontró la alternativa de anodización química como el método más adecuado ya que permite una mejor alineación orientada y dimensión controlada al manipular las variables de estudio³. La técnica de anodización permite generar superficies nanoestructuradas con características controladas, ya que estas dependen de factores como la temperatura, pH, tiempo de anodización y voltaje empleado. Estas superficies dependiendo del electrolito utilizado se pueden clasificar en 3 generaciones, la primera está compuesta por soluciones ácidas, la segunda por soluciones salinas, y la tercera emplea solventes orgánicos.

En 2007, Das Kakoli et al, estudiaron las interacciones de los materiales de las células óseas en una superficie de Ti, para lo cual hicieron crecer una capa de TiO_2 sobre la superficie de titanio mediante un proceso de anodización, utilizando electrolitos de H_2SO_4 , H_3PO_4 y HF a un voltaje constante. Luego de evaluar las propiedades biológicas de las superficies anodizadas se determinó que la mejor adherencia y proliferación celular se dio en las superficies de óxido anodizado HF y H_3PO_4 en comparación con las superficies de H_2SO_4 ⁴.

² AWAD, N., EDWARDS, S., & MORSI, Y. A review of TiO_2 NTs on Ti metal: Electrochemical synthesis, functionalization and potential use as bone implants. *Materials Science and Engineering: C*, 2017, vol. 76, pp. 1401 - 1412.

³ LING PANG, Y., LIM, S., CHYUAN, H., & TONG CHONG, W. A critical review on the recent progress of synthesizing techniques and fabrication of TiO_2 -based nanotubes photocatalysts. *Applied Catalysis A: General*, 2014. vol. 481, pp. 127 - 142.

⁴ DAS, K., BOSE, S., & BANDYOPADHYAY, A. Surface modifications and cell-materials interactions with anodized Ti. *Acta Biomaterialia*, 2007, vol. 3, no. 4, pp. 573 - 585.

Sin embargo, son pocos los trabajos de investigación que se encuentran con estudios comparativos de las respuestas biológicas de este tipo de superficies crecidas en diferentes medios electrolíticos. Por lo cual, aún se desconoce cuál de estas 3 generaciones de anodizado produce el mejor comportamiento de células de osteoblastos humanas en las superficies biofuncionalizadas.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta de las células HOS sobre superficies nanoestructuradas de TiO_2 crecidas mediante anodización electroquímica usando diferentes electrolitos.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar superficies nanoestructuradas de TiO_2 crecidas en 3 diferentes electrolitos mediante anodización electroquímica.
- Analizar la morfología de las superficies nanoestructuradas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Determinar la respuesta biológica de las superficies nanoestructuradas mediante pruebas biológicas in vitro con osteoblastos de osteosarcoma humano.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ANODIZACIÓN

La anodización o anodizado es una técnica utilizada para modificar la superficie de un material. Se conoce como anodizado a la capa de protección artificial que se genera sobre el metal mediante el óxido protector del metal. Esta técnica se consigue por medio de procedimientos electroquímicos, aplicando una diferencia de potencial entre electrodos en una solución electrolítica. Algunas de las propiedades beneficiosas del anodizado son: limpieza de residuos orgánicos e inorgánicos de la superficie del material, mejora la resistencia a la corrosión del implante, disminución de la liberación de iones del titanio al medio fisiológico y el aumento de la dureza superficial, así como de la resistencia del desgaste⁵.

2.2 TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo es una forma de tejido conjuntivo que, como otros tejidos conjuntivos, está compuesto por células y matriz extracelular. La característica que distingue el tejido óseo de los otros tejidos conjuntivos es la mineralización de su matriz, que produce un tejido muy duro capaz de proveer sostén y protección⁶⁻⁷.

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

⁵ VALENTÍ, J., GUASCH, J., SEVILLA, P., & GIL, F. Anodización del titanio para la mejora ante la degradación química de material quirúrgico. *Biomecánica*, 2004, pp. 24 - 30.

⁶ ROSS, M., KAYE, G., PAWLINA W. *Histología: texto atlas color con biología celular y molecular*. Medicina Panamericana. Buenos Aires, 2008, vol. 5.

⁷ SANDOVAL, A. *Biofuncionalización de superficies de Ti6Al4V mediante grabado láser* [Tesis de maestría]. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2015.

- **OSTEOPROGENITORAS:** Son células que derivan de células madre mesenquimáticas de la médula ósea y conservan su capacidad para dividirse por mitosis⁸⁻⁹.
- **OSTEOBLASTOS:** Son células osteoformadoras diferenciadas responsables de sintetizar los elementos proteicos orgánicos de la matriz ósea¹⁰⁻¹¹.
- **OSTEOCITOS:** Son células óseas maduras derivadas de osteoblastos que quedan atrapadas en la matriz ósea¹²⁻¹³.
- **OSTEOCLASTOS:** Son células multinucleadas que se originan en progenitores granulocitos-macrófago y tienen función de resorción ósea¹⁴⁻¹⁵.

⁸ Ibid.

⁹ BELLIDO, T., PLOTKIN L.I., BRUZZANITTI A. Chapter 2. Bone Cells, the basic applied bone biology. Academic Press, 2014, pp. 27-45.

¹⁰ SANDOVAL, A. Óp. Cit.

¹¹ BELLIDO, T., PLOTKIN L.I., BRUZZANITTI A. Óp. Cit.

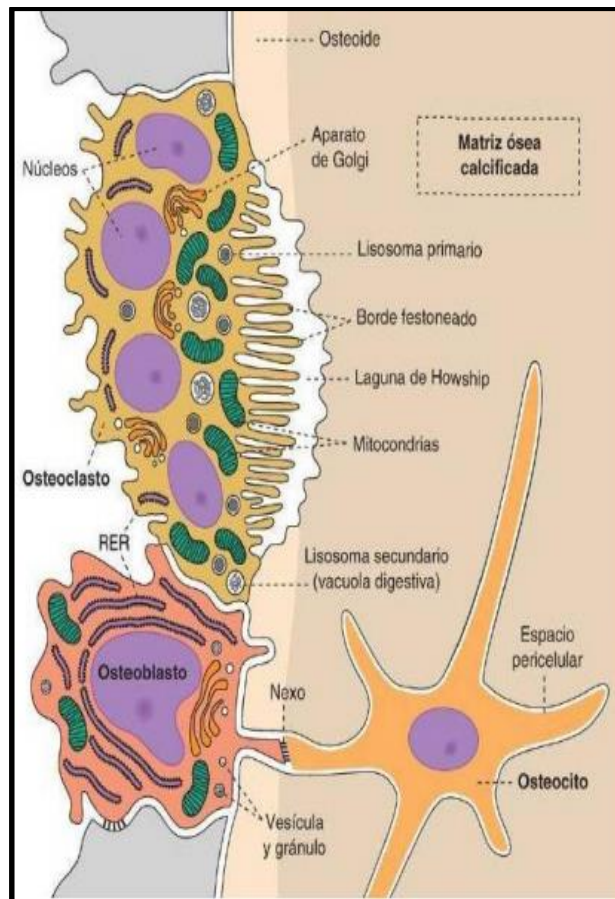
¹² SANDOVAL, A. Óp. Cit.

¹³ BELLIDO, T., PLOTKIN L.I., BRUZZANITTI A. Óp. Cit.

¹⁴ SANDOVAL, A. Óp. Cit.

¹⁵ BELLIDO, T., PLOTKIN L.I., BRUZZANITTI A. Óp. Cit.

Figura 1. Representación esquemática de la relación existente de un osteoclasto, osteoblasto vecino, la matriz ósea y un osteocito.



Fuente: SOBOTTA, J., & WELSCH, U. Histología. 2da edición. Editorial médica panamericana. 2009.

2.3 CÉLULA HOS

La célula HOS es una cepa modelo de osteoblastos humanos derivados de osteosarcoma humano¹⁶.

¹⁶ TAKITOH, T., et al. In vitro osteogenic differentiation of HOS cells on two types of collagen gels. Journal of bioscience and bioengineering, 2010, vol. 110, pp. 471 – 478.

2.4 BIOMATERIALES

Los biomateriales son materiales 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 cuerpo¹⁷.

2.5 CITOTOXICIDAD

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas provocados por anticuerpos específicos o por células citotóxicas que conllevan a que se produzca un daño que pueda ser detectado¹⁸.

2.6 BIOFUNCIONALIZACIÓN

La biofuncionalización se define como una modificación de las propiedades fisicoquímicas de la superficie de cualquier material, que permite incidir en el comportamiento de las células que entren en contacto con el biomaterial (como puede ser un implante o una prótesis) a fin de mejorar la respuesta biológica del organismo ante el material con el que se ha fabricado el implante. Este nuevo concepto permite la mejora de las propiedades superficiales de los implantes dentales para obtener efectos beneficiosos como una osteointegración más rápida, un mejor sellado biológico o superficies con propiedades antibacterianas, entre otros¹⁹.

¹⁷ SANDOVAL, A. Óp. Cit.

¹⁸ ARENCIBIA, D., ROSARIO, LUIS., CURVECO D. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. Retel: revista de toxicología en línea, 2003, pp. 40-52.

¹⁹ SEVILLA, P., SALVAGNI, E., SEVILLA, M., PEGUEROLES, M., RODRIGUEZ, D., GIL, J. Biofuncionalización: El futuro de los implantes dentales. Barcelona: Gaceta Dental, 2010.

2.7 ADHESIÓN CELULAR

Es el proceso por el cual las células se adhieren sobre diversos sustratos. En este proceso de adhesión celular, están presentes varios fenómenos tales como, mantenimiento de la estructura tisular, respuestas de inmunidad, metástasis, así como la integración de implantes hacia los tejidos²⁰.

La interacción material-osteoblastos depende de ciertas características de la superficie del sustrato, como son topografía, reactividad química y energía superficial. Estas propiedades superficiales del material implantado determinan cómo y qué moléculas biológicas se absorberán en la superficie²¹⁻²²⁻²³.

2.8 EFECTO DE LA RUGOSIDAD

La rugosidad superficial tiene un efecto directo sobre el grado de adhesión celular, proliferación, producción de matriz extracelular y de factores de crecimiento de los osteoblastos, así como en la respuesta de células a agentes reguladores locales y sistémicos, por lo que se considera un factor importante para la determinación de la respuesta biológica y la calidad de la osteointegración²⁴⁻²⁵⁻²⁶⁻²⁷. Las líneas celulares osteoblásticas identifican una superficie rugosa cuando la altura de los

²⁰ GÓMEZ RAMÍREZ, J. Citotoxicidad y adhesión de células humanas de osteosarcoma, HOS, sobre cerámicas bioactivas depositadas mediante precipitación en solución acuosa sobre Ti6Al4V [Tesis de maestría]. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2009.

²¹ ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 2000, vol. 21, no. 7, pp. 667 - 681.

²² GÓMEZ RAMÍREZ, J. *Op. Cit.*

²³ RAINES, A., BERGER, M., SCHWARTZ, Z., & BOYAN, B. Osteoblasts grown on microroughened titanium surfaces regulate angiogenic growth factor production through specific integrin receptors. *Acta biomaterialia*, 2019, vol. 97, pp. 578 – 586.

²⁴ MAZZAGLIA, G. Evaluación de la humectabilidad y de la rugosidad de superficies de titanio con diferentes tratamientos y su relación con la adhesión celular [Tesis doctoral]. Granada: Universidad de Granada, 2006.

²⁵ DELIGIANNI, D., KATSALA, N., KOUTSOUKOS, P., & MISSIRLIS, Y. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials*, 2000, vol. 22, no. 1, pp. 87 - 96.

²⁶ ROSALES, J., RODRIGUEZ, M., MAZZAGLIA, G., TORREGROSA, R., DÍAZ, L., GARCÍA, O., CABRERIZO, M. Effect of roughness, wettability and morphology of engineered titanium surfaces on osteoblast - like cell adhesion. *Colloids and surfaces a: Physicochemical and Engineering aspects*, 2010, vol. 365, no. 1-3, pp. 222 - 229.

²⁷ CAI, K., BOSSERT, J., & JANDT, K. Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 2006, vol. 49, no. 2, pp. 136 - 144.

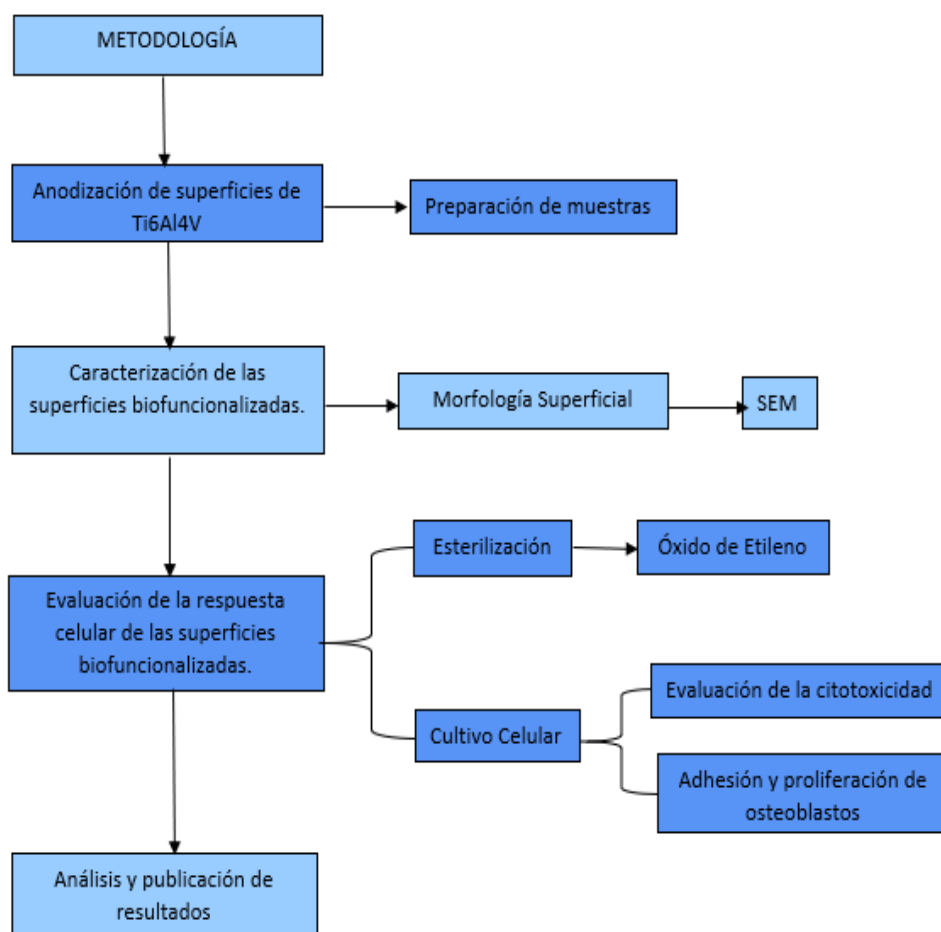
picos es superior a 2 μm y la separación entre ellos que sea ligeramente mayor a la longitud de la célula de la línea respectiva (aproximadamente 10 μm) para que las líneas celulares puedan ocupar estos espacios e iniciar el proceso de adhesión y proliferación celular²⁸.

²⁸ GÓMEZ RAMÍREZ, J. Óp. Cit.

3. METODOLOGÍA

En este capítulo se hace una descripción de las actividades desarrolladas en el presente trabajo de investigación. Inicialmente, se llevó a cabo la preparación de las superficies de las muestras de Ti6Al4V y anodización de estas. Posteriormente, se caracterizó la morfología de los nanotubos de TiO₂. Por último, se evaluó el comportamiento de células HOS sobre las superficies de la aleación Ti6Al4V biofuncionalizadas.

Figura 2. Diagrama de flujo metodología.



3.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

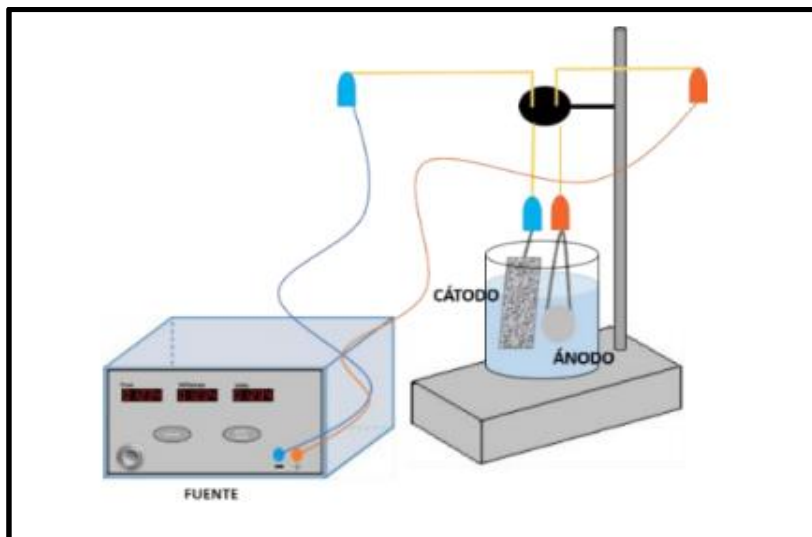
3.1.1 Preparación de la superficie de TiO_2 . Las probetas de Ti6Al4V (con medidas de 13mm de diámetro y 3mm de espesor) fueron pulidas manualmente con papel abrasivo de carburo de silicio número 120, 180, 240, 360, 400, 600, 1000 y 1200, respectivamente. Posterior a esto, se realizó un proceso de limpieza en baño ultrasónico con agua destilada y etanol durante un periodo de tiempo de 10 minutos cada uno. Seguidamente se realizó un proceso químico de decapado con una solución de 10mL de HF al 40% v/v, 45mL de HNO_3 al 70% v/v y 45mL de agua según la norma ASTM E-407 durante 30 segundos para eliminar impurezas antes de la anodización electroquímica²⁹.

3.1.2 Anodización electroquímica. Para el proceso de anodización se realizó un montaje como el mostrado en la figura 3, empleando las condiciones experimentales mostradas en la tabla 1. Se abarcaron los parámetros más significativos que afectan el desarrollo de nanoestructuras de TiO_2 , los cuales son el voltaje, el tiempo de anodización y el electrolito, se mantuvo la temperatura constante a temperatura ambiente.

Una vez finalizado el proceso de anodización cada probeta permaneció durante 10 minutos en baño ultrasónico en agua y etanol respectivamente. Finalmente, las probetas permanecieron en estufa a 80°C durante 30 minutos para el proceso de secado. Para las muestras blanco (sin anodizar), las probetas de Ti6Al4V fueron lijadas y decapadas.

²⁹ ASTM. E3-11 Standard Guide for Preparation of Metallographic Specimens 1. ASTM Copyright, 2011, vol. 1, pp. 1 - 12.

Figura 3. Montaje de anodizado electroquímico.



Fuente: LOPÉZ, J. NIÑO, J. Análisis del efecto de los parámetros de anodizado en la morfología y humectabilidad de nanoestructuradas de TiO_2 crecidas sobre Ti6Al4V [Tesis de pregrado]. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2017.

Tabla 1. Condiciones de anodización.

Tipo de Muestra	Electrolito	Voltaje (V)	Tiempo (h)	Cátodo	Agitación (rpm)
G1	1M H_3PO_4 +0,2 v/v HF+ Agua	20	1	Platino	300
G2	0,3%M NH_4F + 1M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + Agua	20	1	Platino	300
G3	0,3%w NH_4F +2%v H_2O + Etilenglicol	20	1	Platino	300

3.1.3 Caracterización de la morfología de los nanotubos de TiO_2 . Las superficies nanoestructuradas fueron observadas mediante el Microscopio Electrónico de barrido QUANTA FEG 650. Estas imágenes fueron tomadas con alto vacío, voltaje de aceleración 25Kv, y utilizando un detector para imágenes de electrones secundarios (SE). Para caracterizar las estructuras se hizo uso del software libre Image J, en el cual se realizó la medición de espesores, longitudes y diámetros de los nanotubos de TiO_2 .

3.2 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR DE LAS SUPERFICIES

3.2.1 Esterilización de las muestras. Con el fin de eliminar microorganismos, se realizó un proceso de esterilización a las probetas, con y sin recubrimiento, usando óxido de etileno, pasando inicialmente por una fase de acondicionamiento, posteriormente una fase de esterilización donde el gas de etileno lavó las probetas durante un tiempo de 2 horas. Finalmente, las probetas permanecieron en una fase de ventilación o aireación con el fin de eliminar todas las partículas residuales de óxido de etileno. Este proceso fue realizado en colaboración con la unidad de esterilización de la clínica Foscal.

3.2.2 Cultivo celular. Se utilizaron células de osteosarcoma humano (HOS, ATCC CRL-1543). Las células fueron mantenidas en cajas de cultivo con medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado y 1% de penicilina/estreptomicina en una atmósfera de 5% de CO₂, 95% de humedad y temperatura de 37°C. Una vez alcanzaron un 90% de confluencia celular (3 días de cultivo), las células fueron sub-cultivadas mediante el desprendimiento celular con tripsina-EDTA³⁰.

3.2.3 Preparación de los sobrenadantes. La obtención de los sobrenadantes para ensayos de toxicidad celular se realizó como sigue: los materiales (probetas G1, G2, G3 y blanco) fueron colocados en el fondo de placas de 24 pozos y medio de cultivo RPMI-1640 fue agregado hasta cubrir completamente el material (2 mL), la preparación se incubó durante 30 días a 37°C, 5% CO₂ y 95% humedad. Los sobrenadantes obtenidos fueron congelados a -20°C hasta su uso³¹.

3.2.4 Ensayos de toxicidad celular. Las células HOS en fase de crecimiento exponencial a una concentración de 50.000 células/mL y colocadas en placas de 96

³⁰ SANDOVAL, A. Óp. Cit.

³¹ Ibid.

pozos fueron incubadas durante 72 horas con diluciones seriadas 1:2,1:6, 1:18 y 1:24 de los sobrenadantes previamente obtenidos. Después del tratamiento la toxicidad celular fue medida mediante la prueba colorimétrica de reducción Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Como control probetas sin modificación superficial y pozos libres de materiales fueron realizados³². Se determinó el porcentaje de inhibición utilizando la ecuación 1.

$$\%inhibición = 100 * \left(\frac{Absorbancia\ células\ no\ tratadas - Absorbancia\ células\ tratadas}{Absorbancia\ de\ células\ tratadas} \right)$$

(Ec.1)

3.2.5 Observación por microscopía de epifluorescencia. Características cualitativas de la adhesión celular a las probetas fueron determinadas mediante el uso de la microscopía de epifluorescencia. Para esto, células en fase exponencial de crecimiento (15.000 células/ml) fueron colocadas sobre la superficie de probetas e incubadas durante 3 días. Luego de la incubación, citoplasma y núcleo de células adheridas fueron marcados utilizando 500 µl de ftalocianina de aluminio (1 µg/ml) durante 3 horas y 500 µl de Hoesch 33342 (0,5 µg/ml) por 10 minutos respectivamente. Las células fueron fijadas con paraformaldehído 2%. Antes y después de cada proceso se lavó con PBS pH =7,4 para retirar restos de reactivos. Las probetas fueron examinadas en el microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E4000) utilizando el filtro UV2A (Ex=330-380, DM=400, BA=420)³³.

3.2.6 Observación de las células HOS mediante SEM. Las probetas fueron colocadas en el fondo de placas de 24 pozos, posteriormente las células HOS fueron cultivadas sobre la superficie de los materiales a una concentración de 15.000 células/mL durante 72 horas a 37°C, 5% CO₂ y 95% humedad. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron lavadas con PBS, fijadas con glutaraldehído al 4% durante toda la noche a 4°C y deshidratadas con

³² Ibid.

³³ SANDOVAL, A. Óp. Cit.

concentraciones ascendentes de etanol (entre el 10 y 100%). Para la visualización mediante SEM, las muestras fueron recubiertas con oro mediante pulverización catódica.

Las imágenes fueron tomadas con las siguientes características: alto vacío, voltaje de aceleración 25kV. Detector para imágenes: Electrones secundarios (SE): everhart thornley detector ETD, Electrones retrodispersados (BSE): back scattered electrón detector (BSED) tipo SSD.

3.2.7 Adhesión cuantitativa por conteo. La adhesión cuantitativa de células fue evaluada de la siguiente manera: Se colocaron células HOS en la superficie de cada una de las probetas esterilizadas, con una concentración de 15.000 células/ml, en medio RPMI al 10% de SFB, previo a esto, dichas muestras fueron puestas en el interior de placas de 24 pozos. La preparación fue incubada a 37 °C, 5% de CO₂ y 90% de humedad durante 5 días. Luego de este tiempo las células adheridas a las probetas fueron desprendidas con Tripsina-EDTA y contadas con cámara de Neubauer usando el colorante vital eosina amarilla³⁴.

3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar la distribución de los datos se utilizó el test de Normalidad Kolmogórov-Smirnov, para comparación entre grupos el análisis de varianza de una vía (ANOVA), y como test Post hoc Bonferroni.

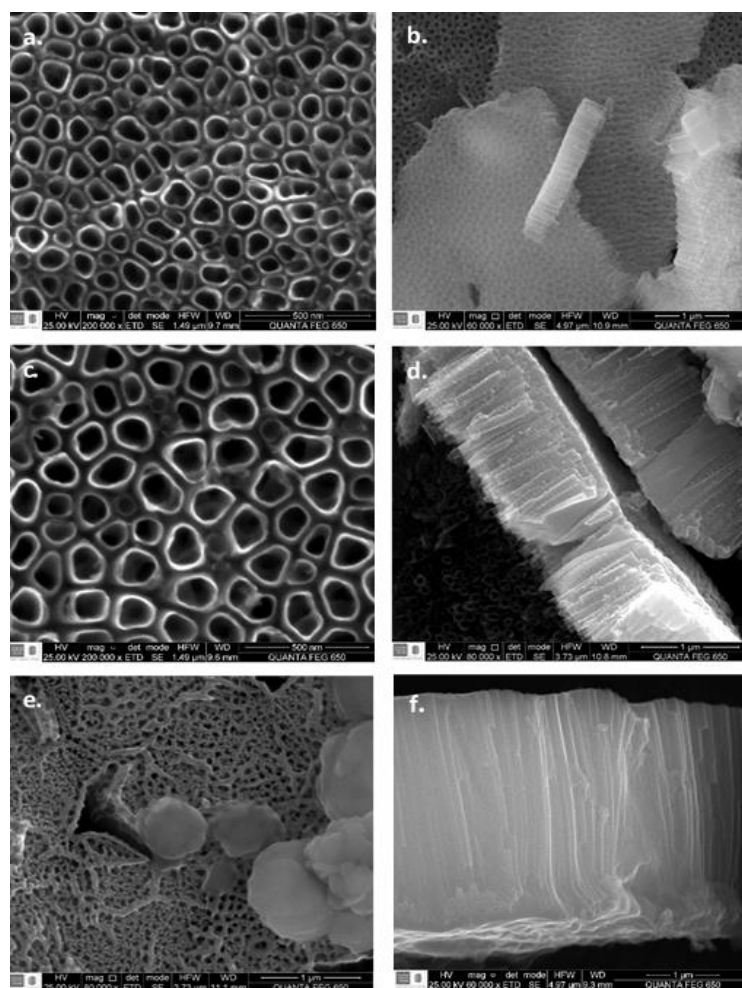
³⁴ SANDOVAL, A. Óp. Cit.

4. ANÁLISIS Y RESULTADOS

4.1 ANÁLISIS SEM PARA LOS NANOTUBOS DE TiO_2

La figura 4, muestra las imágenes obtenidas del microscopio electrónico de barrido SEM, a(G1), c(G2), e(G3) corresponden a las vistas superiores, mientras que en b(G1), d(G2), f(G3) se observan las vistas transversales de los nanotubos obtenidos.

Figura 4. Imágenes SEM, vista superior y transversal de la morfología de las generaciones G1, G2 y G3.



En la tabla 2 se presentan los valores de diámetro y longitud que alcanzaron los nanotubos para cada generación.

Tabla 2. Valores de diámetro, longitud grosor y espacio intercolumnar para cada probeta con recubrimiento.

Electrolito	Longitud (nm)	Diámetro (nm)	Grosor (nm)	Espacio intercolumnar (nm)
G1	342,5±37,5	100,68±6,8	16,21±2,56	10,33±5,02
G2	817,5±15,6	166,95±16,24	18,35±5	24,41±1,78
G3	3230±40	55±25	42,5±17,5	-

Los resultados muestran que los nanotubos crecidos con la solución G3 presentan longitudes muy superiores a las obtenidas con las soluciones G1 y G2, esto se debe a que los iones fluoruro en soluciones a base de agua son mucho más agresivos que en los medios orgánicos, por lo que el crecimiento de los nanotubos en el agua se limita a unas pocas micras³⁵.

En la figura 4, presenta las imágenes de vista superior **a.**(G1) y **c.**(G2) donde se evidencia un crecimiento ordenado y de pared ondulada para los nanotubos de TiO₂, debido a las condiciones de anodización establecidas a voltaje constante³⁶, por el contrario, en la imagen **e.**(G3), se observa un crecimiento desordenado, estructuras porosas y una pared con mayor grosor respecto a las anteriores, esto se atribuye a la presencia de solventes orgánicos con un bajo porcentaje de agua en la solución electrolítica y a la viscosidad del electrolito³⁷⁻³⁸.

Los nanotubos crecidos mediante G1 mostraron un crecimiento tipo tornillo. Para la G2 se evidencia un crecimiento tipo bambú, el cual se caracteriza por la presencia de anillos de óxido en la pared externa, estos anillos son inducidos por la presencia

³⁵ REGONINI, D., BOWEN, C., JAROENWORALUCK, A., & STEVENS, R. A review of growth mechanism, structure and crystallinity of anodized TiO₂ nanotubes. *Materials science and engineering: R: Reports*, 2013, vol. 74, no. 12, pp. 377 - 406.

³⁶ ALBU, S. P., KIM, D., & SCHMUKI, P. Growth of Aligned TiO₂ Bamboo-Type Nanotubes and Highly Ordered. *Angewandte chemie*, 2008, vol. 47, no. 10, pp.1942-1945.

³⁷ HILARIO, F., ROCHE, V., PEREIRA NOGUEIRA, R., & JORGE JUNIOR, A. Influence of morphology and crystalline structure of TiO₂ nanotubes on their electrochemical properties and apatite-forming ability. *Electrochimica Acta*, 2017, vol. 245, pp. 337-349.

³⁸ REGONINI, D., SATKA, A., JAROENWORALUCK, A., ALLSOPP, D., BOWEN, C., & STEVENS, R. Factors influencing surface morphology of anodized TiO₂ nanotubes. *Electrochimica Acta*, 2012, vol. 74, pp. 244-253.

de agua y la formación de burbujas de oxígeno en el ánodo³⁹⁻⁴⁰. En la superficie de la G3 se observa una densa gama de nanotubos largos de paredes lisas, lo anterior, debido a la baja cantidad de agua presente en la solución⁴¹⁻⁴².

4.2 PRUEBAS DE TOXICIDAD CELULAR

Los resultados de las pruebas de toxicidad celular con los sobrenadantes obtenidos después de 30 días de incubación se muestran en la figura 5; la prueba del MTT (evalúa actividad metabólica celular) mostró que las probetas poseen toxicidades superiores al 20% para la concentración más alta evaluada, el mayor porcentaje de toxicidad celular fue obtenido para las probetas G3 con un valor promedio del 45,6% (viabilidad del 54.3%) cuando las células fueron cultivadas a la más alta concentración (1:2) de los sobrenadantes. Las probetas G2 resultaron ser las de menor toxicidad con un valor promedio de 19.7% (viabilidad del 80%).

La figura 5 presenta el porcentaje de viabilidad celular para cada una de las probetas mediante el ensayo del MTT. Sobrenadantes obtenidos después de la incubación de probetas en medio RPMI durante 30 días. Los resultados graficados corresponden a la máxima concentración de los sobrenadantes evaluados (1:2). El control corresponde a medio RPMI 1640.

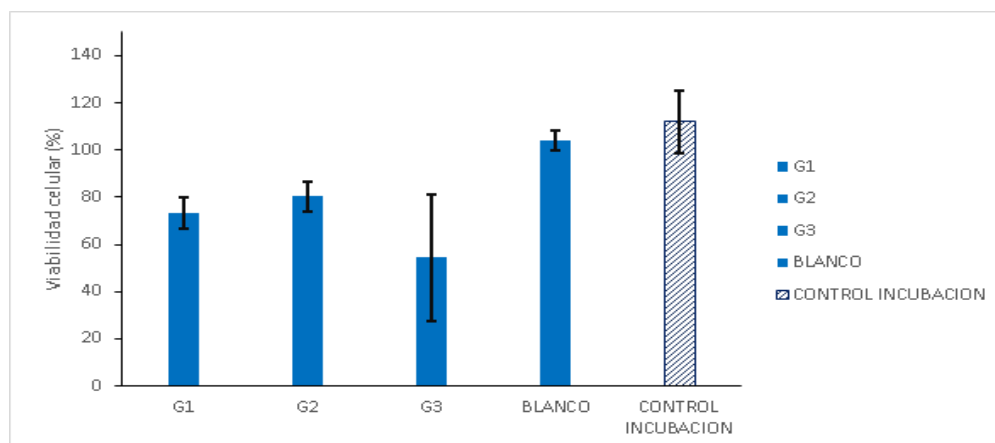
³⁹ Ibid.

⁴⁰ LIN, C., CHEN, S., & CAO, L. Anodic formation of aligned and bamboo-type TiO₂ nanotubes at constant low voltages. *Materials science in semiconductor processing*, 2013, vol. 16, no. 1, pp. 154 - 159.

⁴¹ HILARIO, F., ROCHE, V., PEREIRA NOGUEIRA, R., & JORGE JUNIOR, A. *Óp. Cit.*

⁴² GROFF, A., REGONINI, D., SORARÚ, G., & CLEMENS, F. Photoelectrochemical study of anodized TiO₂ nanotubes prepared using low and high H₂O contents. *Electrochimica Acta*, 2015, vol. 186, pp. 101 - 111.

Figura 5. Porcentaje de viabilidad celular para las diferentes superficies (G1, G2, G3, blanco y control).



De lo anterior, se puede determinar que la solución G3 resulta ser tóxica para las células, ya que genera una inhibición celular superior al 30%, lo cual es el máximo permitido según la norma ISO 10993-5. Las soluciones G1 y G2 presentan valores de toxicidad inferiores a dicho porcentaje, por lo que se consideran dentro de un rango de viabilidad permitido⁴³.

Los valores de viabilidad que superan el 100% son normales en este tipo de pruebas biológicas, ya que esta mide la actividad mitocondrial de las células, es decir, que tan activas son. Esto ocurre cuando el compuesto no es tóxico y la densidad óptica de la muestra es mayor a la densidad óptica de la muestra de control, dando así un color más acentuado que la muestra de control en la prueba de colorimetría MTT.

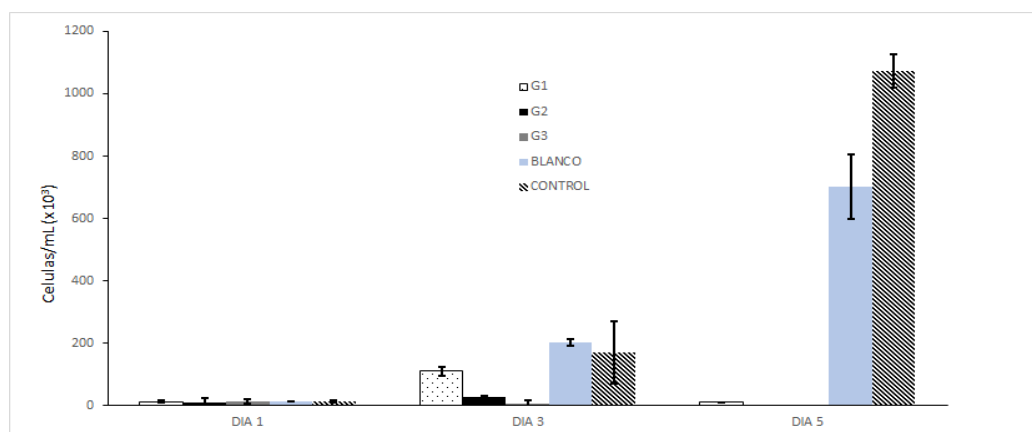
4.3 ADHESIÓN CUANTITATIVA SOBRE LA SUPERFICIE DE LAS PROBETAS

Las probetas G1, G2 y G3 mostraron menor cantidad de células adheridas a la superficie en comparación con los controles (probetas sin anodizar y pozos sin

⁴³ ISO. Biological evaluation of medical devices-10993-5. Geneva, Switzerland, 2009.

probetas) después de 1 y 3 días. Al día 5 de incubación solo las probetas G1 mostraron un pequeño número de células (1×10^4 células/ml en promedio) en comparación con los controles (7.0×10^5 y 1.0×10^6 células/ml) para probetas no anodizadas y pozos sin probetas respectivamente. La figura 6 muestra en resumen los resultados para adhesión cuantitativa obtenidos.

Figura 6. Las probetas fueron colocadas en el interior de placas de 24 pozos. probetas sin anodizar y pozos sin probetas fueron utilizados como control.



Lo anterior, permite inferir que hay una inhibición de la adherencia y proliferación celular, una de las posibles causas que pueden justificar este comportamiento, se debe a que la interacción material-osteoblastos depende de ciertas características de la superficie del sustrato, como son topografía, reactividad química y energía superficial⁴⁴⁻⁴⁵⁻⁴⁶. Por ejemplo, una superficie rugosa tiene una influencia muy significativa en la adhesión inicial de células en comparación con una superficie lisa⁴⁷⁻⁴⁸.

⁴⁴ ANSELME, K. Óp. Cit.

⁴⁵ GÓMEZ RAMÍREZ, J. Óp. Cit.

⁴⁶ RAINES, A., BERGER, M., SCHWARTZ, Z., & BOYAN, B. Óp. Cit.

⁴⁷ HUANG, H.-H., HO, C.-T., LEE, T.-H., LIAO, K.-K., & CHEN, F.-L. Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion. *Biomolecular Engineering*, 2004, vol. 21, no. 3-5, pp. 93 - 97.

⁴⁸ ZAN, Q., WANG, C., DONG, L., CHENG, P., & TIAN, J. Effect of surface roughness of chitosan-based microspheres on cell adhesion. *Applied Surface Science*, 2008, vol. 255, no. 2, pp. 401 - 403.

La poca adhesión celular también se podría atribuir al tipo de superficie, ya que, si esta es hidrofílica, favorece la reacción biológica de proteínas en ese medio. Materiales con superficie hidrofílica absorben más fácilmente las proteínas de adhesión celular, que a su vez son necesarias para la unión celular. Sin embargo, en el presente estudio no se realizaron pruebas de hidrofobicidad⁴⁹.

Otro factor que puede incidir en la poca adherencia y proliferación de las líneas celulares osteoblásticas es la presencia de flúor en las soluciones de anodización para cada una de las generaciones en estudio. El fluoruro puede inducir al estrés oxidativo, lo que causa apoptosis en células osteoblásticas⁵⁰⁻⁵¹. La apoptosis o muerte celular programada, es considerada como una muerte natural fisiológica, resultando en un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas o desconocidas⁵².

4.4 ADHESIÓN CUALITATIVA POR FLUORESCENCIA

La figura 7 muestra imágenes de células adheridas a la superficie de las probetas por microscopía de epifluorescencia. Una mayor confluencia de células fue observada en todos los campos microscópicos (Blanco>G1>G2>G3) después de 3 días de incubación.

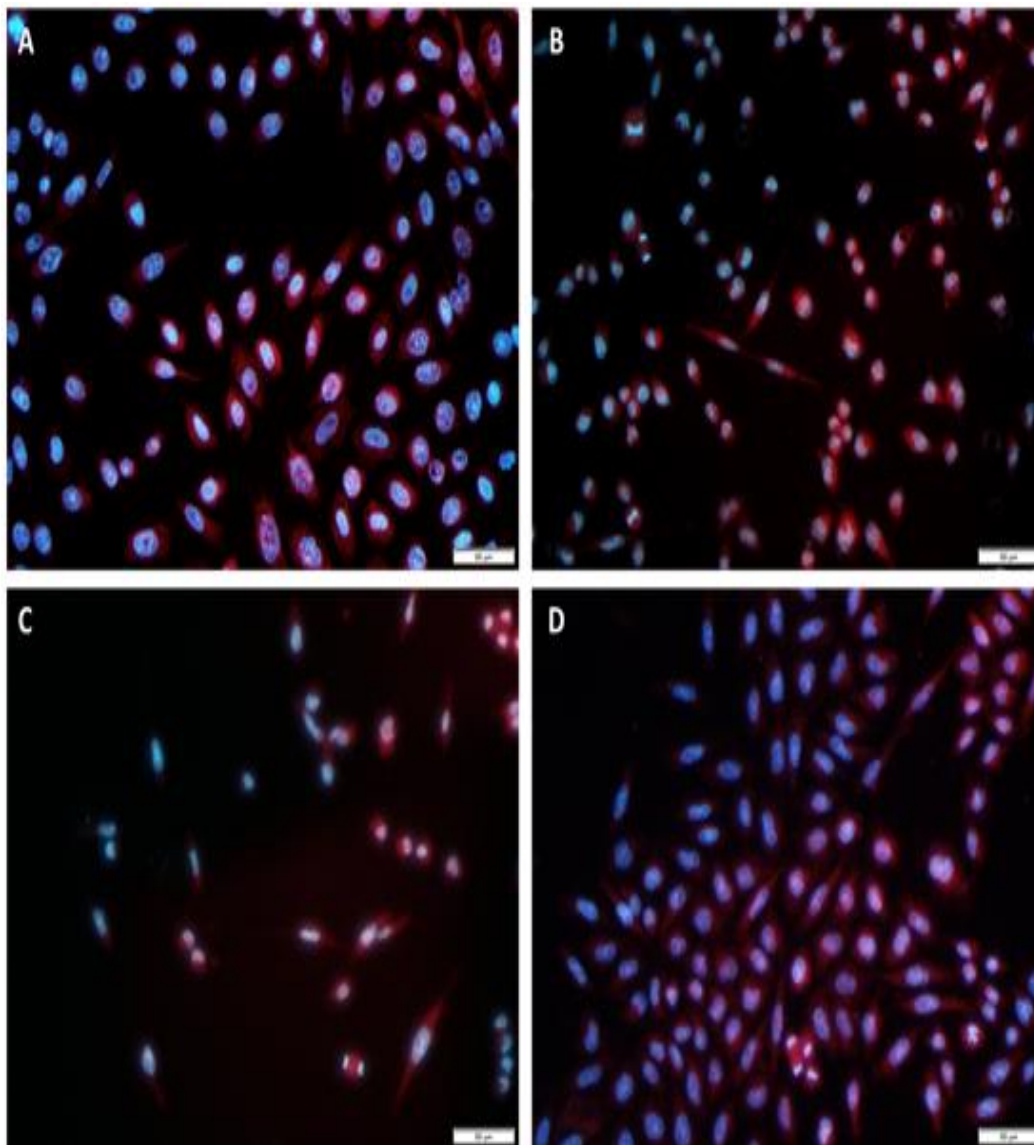
⁴⁹ OHTSU, N., KOZUKA, T., HIRANO, M., & ARAI, H. Electrolyte effects on the surface chemistry and cellular response of anodized titanium. *Applied Surface Science*, 2015, vol. 349, pp. 911-915.

⁵⁰ BARBIER, O., ARREOLA, L., & DEL RAZO, L. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 2010, vol. 188, no. 2, pp. 319 - 333.

⁵¹ YANG, S., WANG, Z., ALKASIR, R., ZAHRA, M., REN, G., & HAN, B. Sodium fluoride induces apoptosis and alters bcl-2 family protein expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 2011, vol. 410, no. 4, pp. 910 - 915.

⁵² JORDÁN, J. Apoptosis: muerte celular programada. *Ámbito farmacéutico*, 2003, pp. 100 - 106.

Figura 7. Células HOS adheridas a la superficie de las probetas después de 72 horas de incubación. A. Probetas G1 (A), probetas G2 (B), probetas G3 (C) y probetas blanco (D).



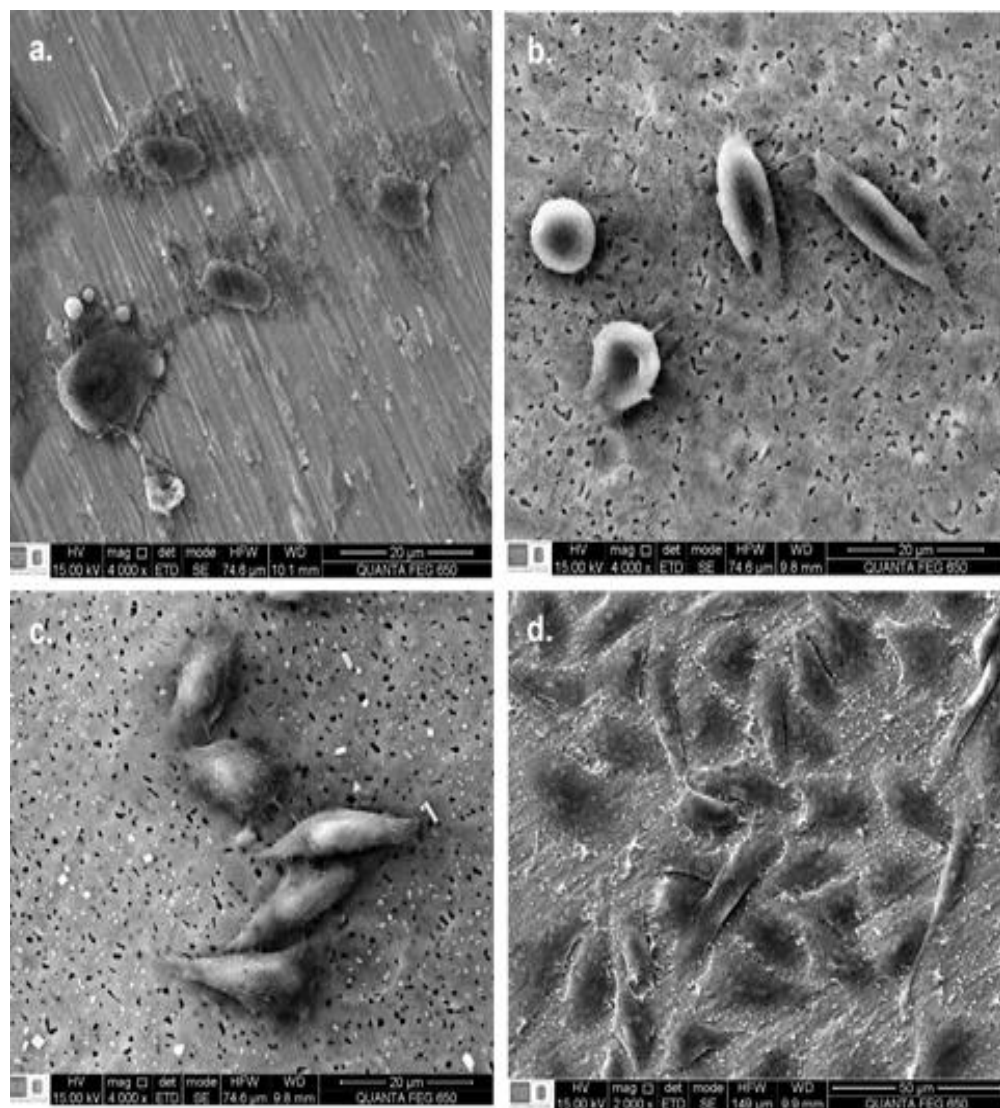
En las micrografías de epifluorescencia, imágenes **a**, **b** y **c**, se observa una disminución de las células HOS. Mientras que en la imagen **d**, se logra evidenciar

proliferación celular, lo que corrobora los resultados obtenidos en el ensayo de conteo celular en cámara Neubauer utilizada en la adhesión cuantitativa⁵³⁻⁵⁴.

4.5 MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS HOS

Figura 8. Imágenes SEM de las células HOS presentes en las diferentes superficies.

a) solución G1. b) solución G2. c) Solución G3. d) Probeta en blanco.



⁵³ SANDOVAL, A. Óp. Cit.

⁵⁴ GÓMEZ RAMÍREZ, J. Óp. Cit.

En la figura 8, se observan las imágenes obtenidas de las células HOS sobre las diferentes superficies, así mismo, se identifica que para las superficies con recubrimiento hay poca proliferación celular, las células tienen una forma redondeada, lo cual indica muerte celular. Mientras que en la imagen **d**, se observan células de forma alargada y aplanada indicando así que estas células se encuentran en fase de crecimiento⁵⁵⁻⁵⁶.

4.6 ANÁLISIS DE LA RUGOSIDAD DE LA SUPERFICIE

Debido a la poca adhesión celular presentada en las probetas anodizadas respecto a las muestras de control, se realizó un análisis de perfilometría para determinar la rugosidad de las superficies en estudio. Dicho procedimiento se llevó a cabo en colaboración con el grupo de investigación en desarrollo y tecnología de nuevos materiales (GIMAT), el cual se realizó en el microscopio digital 3D HIROX modelo KH-7700. Para la medición de la altura de los picos del perfil de rugosidad (Ra), se tomaron tres puntos aleatorios sobre cada superficie y en cada uno de ellos se hizo un barrido de 3 puntos, este procedimiento se efectuó mediante el software Eye Dynamic Plus 3D. A continuación, se presenta la reconstrucción de las superficies obtenidas:

⁵⁵ LINKS, J., BOYAN, B., BLANCHARD, C., LOHMANN, C., LIU, Y., COCHRAN, D., SCHWART, Z. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials*, 1998, vol. 19, no. 23, pp. 147-160.

⁵⁶ KAKOLI D., BOSE, S., & BANDYOPADHYAY, A. Surface modifications and cells-materials interactions with anodized Ti. *Acta Biomaterialia*, 2007, vol. 3, no. 4, pp. 573-585.

Figura 9. Reconstrucción 3D probeta anodizada con G1.

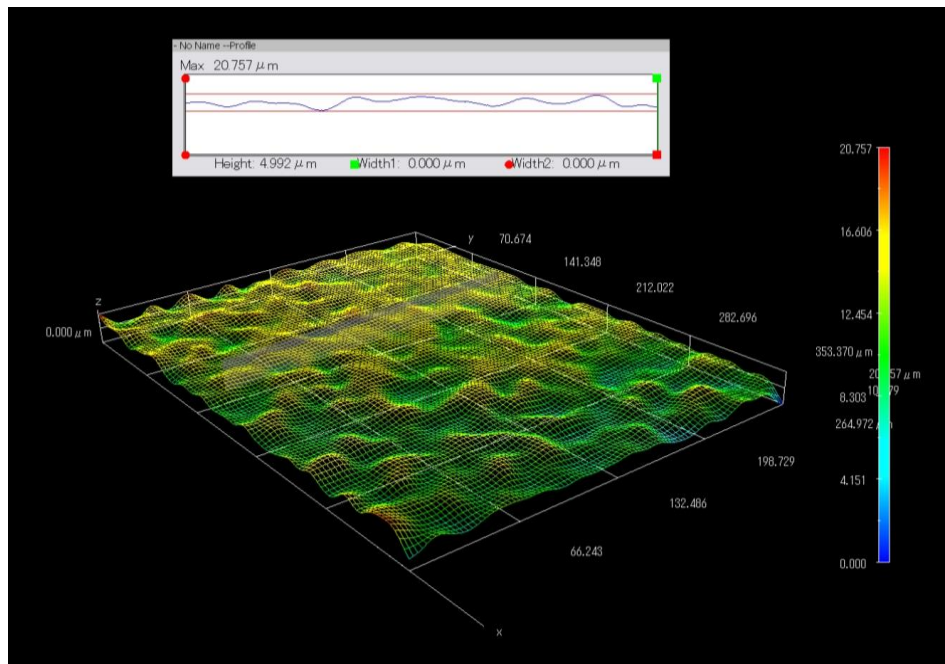


Figura 10. Reconstrucción 3D probeta anodizada con G2.

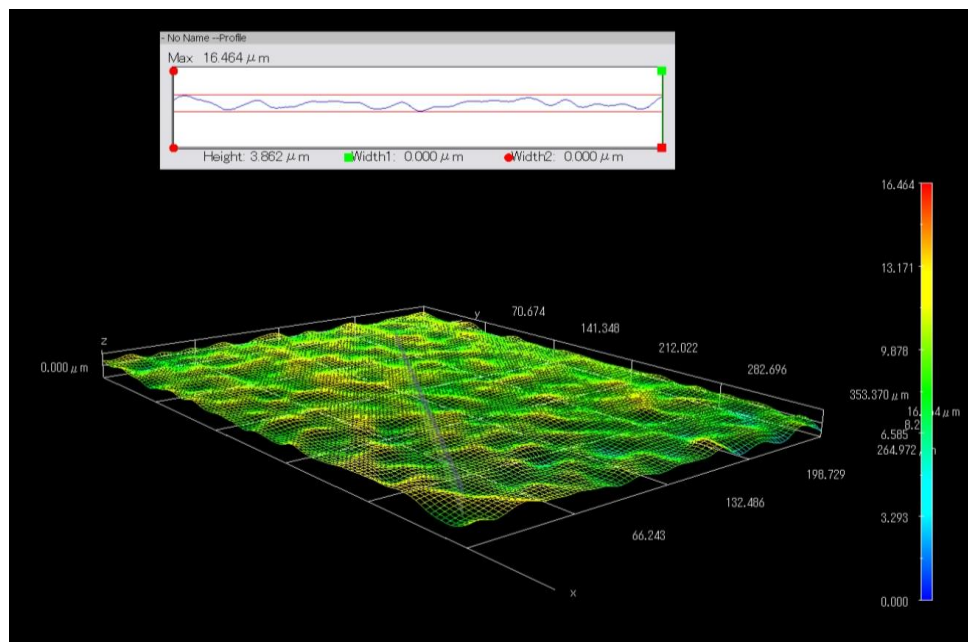


Figura 11. Reconstrucción 3D probeta anodizada con G3.

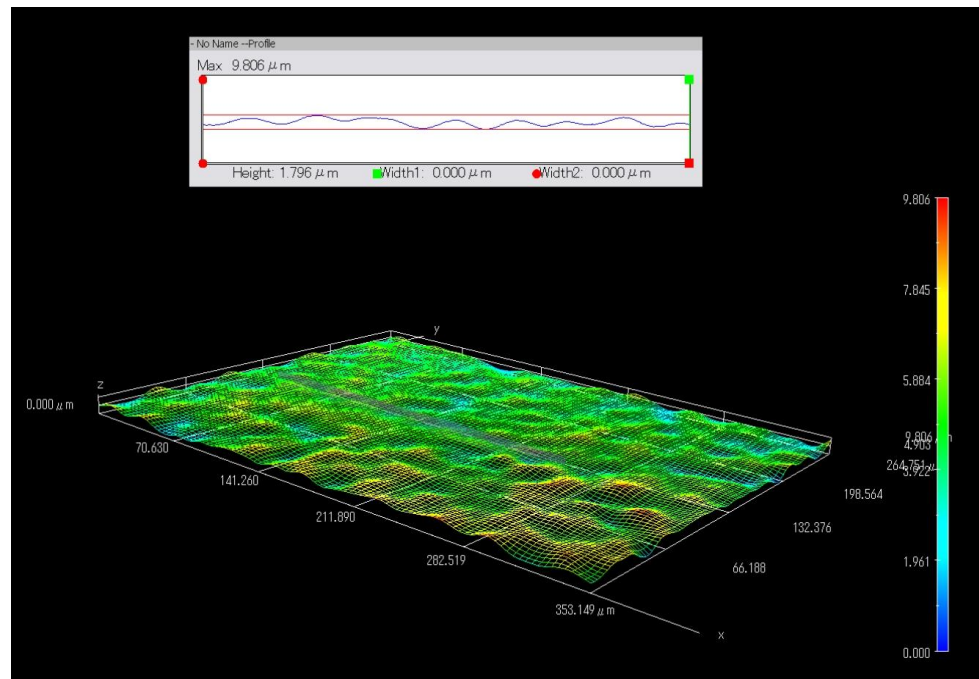
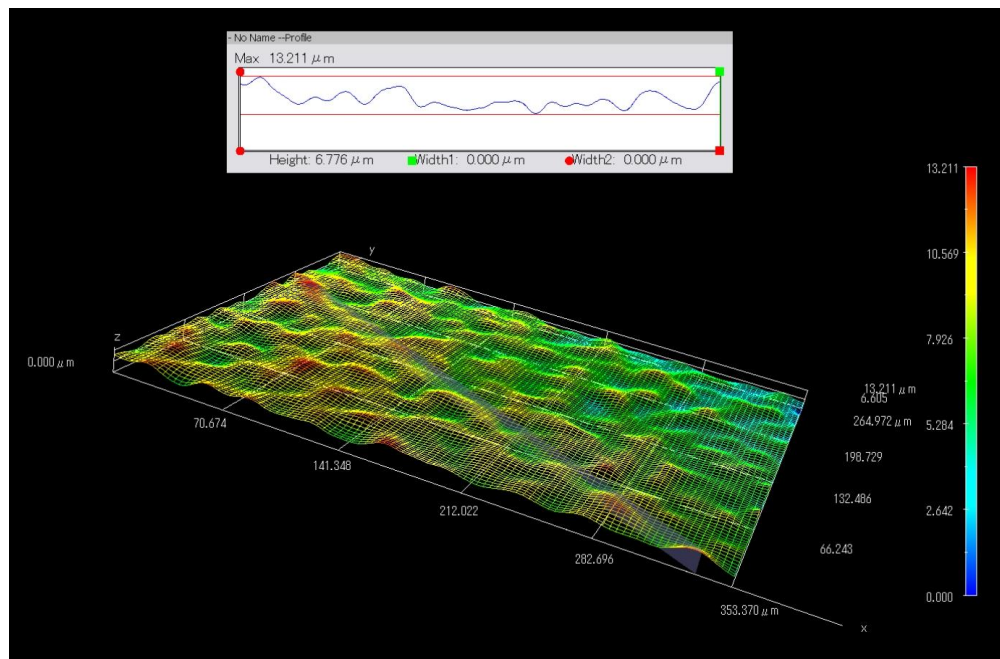


Figura 12. Reconstrucción 3D probeta sin anodizar.



Realizando una comparación de las reconstrucciones 3D obtenidas para cada una de las superficies, se evidencia un mayor grado de rugosidad en la superficie sin anodizar (Fig. 12), mientras que las superficies con recubrimiento presentan una topografía aparentemente lisa. Las superficies rugosas producen mejor fijación ósea que las superficies lisas debido a que la superficie rugosa ejerce un efecto directo en la unión de los osteoblastos y su subsecuente proliferación y diferenciación⁵⁷⁻⁵⁸.

La tabla 3, presenta alturas de los picos correspondientes para cada superficie. Los valores de Ra se obtuvieron con ayuda del software Eye Dynamic Plus 3D, haciendo un promedio de los picos en los perfiles de rugosidad realizados.

Tabla 3. Valores promedios de altura del perfil de rugosidad para cada superficie (Ra).

Probeta	G1	G2	G3	Blanco
Ra (μm)	2,202 ± 0,3	1,928 ± 0,1	1,184 ± 0,2	3,528 ± 0,5

Las muestras anodizadas con G3 (solución orgánica), exhiben una superficie con un bajo nivel de rugosidad, la altura promedio de los picos en el perfil de rugosidad presentan un valor de 1,184 μm, lo cual conlleva a que los resultados de adherencia celular sean los más bajos en comparación con las superficies anodizadas con G1(ácidos) y G2(sales). Por otra parte, analizando únicamente las muestras con recubrimiento, las probetas que fueron anodizadas con la solución G1 presentaron un mayor grado de adhesión celular, como se puede evidenciar en las figuras 6 y 7. Dicho resultado se debe a que la rugosidad de la superficie cuenta con un valor promedio de 2,202μm.

Sin embargo, los mejores resultados de adherencia y proliferación celular se obtuvieron con las muestras sin recubrimiento (blanco), las cuales presentaron el

⁵⁷ MAZZAGLIA, G. Óp. Cit.

⁵⁸ ZURUZI, A., BUTLER, B., MACDONALD, N., & SAFINYA, C. Nanostructured TiO₂ thin films as porous cellular interfaces. Institute of physics publishing, 2006, pp. 531-535.

mayor grado de rugosidad en la superficie del material base. Teniendo en cuenta que las líneas celulares osteoblásticas identifican una superficie rugosa cuando la altura de los picos es superior a $2\mu\text{m}$ ⁵⁹, se puede atribuir la poca adhesión celular presente en las superficies anodizadas a este factor.

El voltaje al que se realiza el proceso de anodizado es uno de los principales factores al que se le puede acusar la poca rugosidad de la superficie. Investigadores como Kuromoto et al, concluyeron que el voltaje y la rugosidad son directamente proporcionales, es decir, mientras mayor sea el voltaje, el grado de rugosidad aumenta⁶⁰.

⁵⁹ GÓMEZ RAMÍREZ, J. Óp. Cit.

⁶⁰ KUROMOTO, N., SIMÃO, R., & SOARES, G. Titanium oxide films produced on commercially pure titanium by anodic oxidation with different voltages. *Materials Characterization*, 2007, vol. 58, no. 2, pp. 114 - 121.

5. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron nanotubos de TiO_2 con morfología tipo tornillo, bambú y de superficie lisa para las soluciones G1, G2 Y G3, respectivamente, cuyos diámetros oscilan entre los 50 y 100 nm.
- Los resultados obtenidos durante la investigación no permiten determinar cuál de las 3 generaciones de anodizado produce el mejor comportamiento de células de osteoblastos humanas en las superficies biofuncionalizadas, ya que la mejor respuesta celular se obtuvo con las muestras sin recubrimiento.
- Las condiciones de anodización planteadas en este estudio no permitieron un buen grado de adhesión celular debido a la poca rugosidad presente en las probetas de Ti6Al4V, recubiertas con las soluciones G1, G2 y G3, por lo cual se puede afirmar que la adhesión de una línea celular osteoblástica, como la HOS, está directamente relacionada con la topografía superficial (rugosa o lisa) y el tipo de preparación superficial de las probetas previa al cultivo celular.
- Las probetas anodizadas con la solución G3, resultaron ser tóxicas para la línea celular osteoblástica con un porcentaje promedio de inhibición del 45,6%, mientras que las anodizadas con soluciones G1 y G2 presentan porcentajes de viabilidad permitidos.

6. RECOMENDACIONES

- Para futuros estudios se recomienda aumentar el voltaje durante el proceso de anodización y disminuir el tiempo de este, con el fin de obtener una superficie con un mayor grado de rugosidad que favorezca la adhesión celular.

BIBLIOGRAFÍA

ALBU, S. P., KIM, D., & SCHMUKI, P. Growth of Aligned TiO₂ Bamboo-Type Nanotubes and Highly Ordered. *Angewandte chemie*, 2008, vol. 47, no. 10, pp.1942-1945.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 2000, vol. 21, no. 7, pp. 667 - 681.

ARENCIBIA, D., ROSARIO, LUIS., CURVECO D. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Retel: revista de toxicología en línea*, 2003, pp. 40-52.

ASTM. E3-11 Standard Guide for Preparation of Metallographic Specimens 1. ASTM Copyright, 2011, vol. 1, pp. 1 - 12.

AWAD, N., EDWARDS, S., & MORSI, Y. A review of TiO₂ NTs on Ti metal: Electrochemical synthesis, functionalization and potential use as bone implants. *Materials Science and Engineering: C*, 2017, vol. 76, pp. 1401 - 1412.

BARBIER, O., ARREOLA, L., & DEL RAZO, L. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 2010, vol. 188, no. 2, pp. 319 - 333.

BELLIDO, T., PLOTKIN L.I., BRUZZANITTI A. Chapter 2. Bone Cells, the basic applied bone biology. *Academic Press*, 2014, pp. 27-45.

CAI, K., BOSSERT, J., & JANDT, K. Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 2006, vol. 49, no. 2, pp. 136 - 144.

DAS, K., BOSE, S., & BANDYOPADHYAY, A. Surface modifications and cell-materials interactions with anodized Ti. *Acta Biomaterialia*, 2007, vol. 3, no. 4, pp. 573 - 585.

DELIGIANNI, D., KATSALA, N., KOUTSOUKOS, P., & MISSIRLIS, Y. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials*, 2000, vol. 22, no. 1, pp. 87 - 96.

GÓMEZ RAMÍREZ, J. Citotoxicidad y adhesión de células humanas de osteosarcoma, HOS, sobre cerámicas bioactivas depositadas mediante precipitación en solución acuosa sobre Ti6Al4V [Tesis de maestría]. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2009.

GROFF, A., REGONINI, D., SORARÚ, G., & CLEMENS, F. Photoelectrochemical study of anodized TiO₂ nanotubes prepared using low and high H₂O contents. *Electrochimica Acta*, 2015, vol. 186, pp. 101 - 111.

HILARIO, F., ROCHE, V., PEREIRA NOGUEIRA, R., & JORGE JUNIOR, A. Influence of morphology and crystalline structure of TiO₂ nanotubes on their electrochemical properties and apatite-forming ability. *Electrochimica Acta*, 2017, vol. 245, pp. 337-349.

HUANG, H.-H., HO, C.-T., LEE, T.-H., LIAO, K.-K., & CHEN, F.-L. Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion. *Biomolecular Engineering*, 2004, vol. 21, no. 3-5, pp. 93 - 97.

ISO. Biological evaluation of medical devices-10993-5. Geneva, Switzerland, 2009.

JORDÁN, J. Apoptosis: muerte celular programada. Ámbito farmacéutico, 2003, pp. 100 - 106.

KAKOLI D., BOSE, S., & BANDYOPADHYAY, A. Surface modifications and cells-materials interactions with anodized Ti. Acta Biomaterialia, 2007, vol. 3, no. 4, pp. 573-585.

KHUDHAIR, D., BHATTI, A., LI, Y., AMANI, H., GARMESTANI, H., HODGSON, P., & NAHAVANDI, S. Anodization parameters influencing the morphology and electrical properties of TiO₂ nanotubes for living cell interfacing and investigations. Materials Science and Engineering: C, 2016, vol. 59, pp. 1125 - 1142.

KUROMOTO, N., SIMÃO, R., & SOARES, G. Titanium oxide films produced on commercially pure titanium by anodic oxidation with different voltages. Materials Characterization, 2007, vol. 58, no. 2, pp. 114 - 121.

LIN, C., CHEN, S., & CAO, L. Anodic formation of aligned and bamboo-type TiO₂ nanotubes at constant low voltages. Materials science in semiconductor processing, 2013, vol. 16, no. 1, pp. 154 - 159.

LING PANG, Y., LIM, S., CHYUAN, H., & TONG CHONG, W. A critical review on the recent progress of synthesizing techniques and fabrication of TiO₂-based nanotubes photocatalysts. Applied Catalysis A: General, 2014. vol. 481, pp. 127 - 142.

LINKS, J., BOYAN, B., BLANCHARD, C., LOHMANN, C., LIU, Y., COCHRAN, D., SCHWART, Z. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. Biomaterials, 1998, vol. 19, no. 23, pp. 147-160.

MAZZAGLIA, G. Evaluación de la humectabilidad y de la rugosidad de superficies de titanio con diferentes tratamientos y su relación con la adhesión celular [Tesis doctoral]. Granada: Universidad de Granada, 2006.

OHTSU, N., KOZUKA, T., HIRANO, M., & ARAI, H. Electrolyte effects on the surface chemistry and cellular response of anodized titanium. *Applied Surface Science*, 2015, vol. 349, pp. 911-915.

RAINES, A., BERGER, M., SCHWARTZ, Z., & BOYAN, B. Osteoblasts grown on microroughened titanium surfaces regulate angiogenic growth factor production through specific integrin receptors. *Acta biomaterialia*, 2019, vol. 97, pp. 578 – 586.

REGONINI, D., BOWEN, C., JAROENWORALUCK, A., & STEVENS, R. A review of growth mechanism, structure and crystallinity of anodized TiO₂ nanotubes. *Materials science and engineering: R: Reports*, 2013, vol. 74, no. 12, pp. 377 - 406.

REGONINI, D., SATKA, A., JAROENWORALUCK, A., ALLSOPP, D., BOWEN, C., & STEVENS, R. Factors influencing surface morphology of anodized TiO₂ nanotubes. *Electrochimica Acta*, 2012, vol. 74, pp. 244-253.

ROSALES, J., RODRIGUEZ, M., MAZZAGLIA, G., TORREGROSA, R., DÍAZ, L., GARCÍA, O., CABRERIZO, M. Effect of roughness, wettability and morphology of engineered titanium surfaces on osteoblast - like cell adhesion. *Colloids and surfaces a: Physicochemical and Engineering aspects*, 2010, vol. 365, no. 1-3, pp. 222 - 229.

ROSS, M., KAYE, G., PAWLINA W. *Histología: texto atlas color con biología celular y molecular*. Medicina Panamericana. Buenos Aires, 2008, vol. 5.

SANDOVAL, A. Biofuncionalización de superficies de Ti6Al4V mediante grabado láser [Tesis de maestría]. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2015.

SEVILLA, P., SALVAGNI, E., SEVILLA, M., PEGUEROLES, M., RODRIGUEZ, D., GIL, J. Biofuncionalización: El futuro de los implantes dentales. Barcelona: Gaceta Dental, 2010.

TAKITOH, T., et al. In vitro osteogenic differentiation of HOS cells on two types of collagen gels. Journal of bioscience and bioengineering, 2010, vol. 110, pp. 471 – 478.

VALENTÍ, J., GUASCH, J., SEVILLA, P., & GIL, F. Anodización del titanio para la mejora ante la degradación química de material quirúrgico. Biomecánica, 2004, pp. 24 - 30.

YANG, S., WANG, Z., ALKASIR, R., ZAHRA, M., REN, G., & HAN, B. Sodium fluoride induces apoptosis and alters bcl-2 family protein expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells. Biochemical and biophysical research communications, 2011, vol. 410, no. 4, pp. 910 - 915.

ZAN, Q., WANG, C., DONG, L., CHENG, P., & TIAN, J. Effect of surface roughness of chitosan-based microspheres on cell adhesion. Applied Surface Science, 2008, vol. 255, no. 2, pp. 401 - 403.

ZURUZI, A., BUTLER, B., MACDONALD, N., & SAFINYA, C. Nanostructured TiO₂ thin films as porous cellular interfaces. Institute of physics publishing, 2006, pp. 531-535.