

**CITOTOXICIDAD Y ADHESIÓN DE CÉLULAS HUMANAS DE OSTEOSARCOMA,
HOS, SOBRE CERÁMICAS BIOACTIVAS DEPOSITADAS MEDIANTE
PRECIPITACIÓN EN SOLUCIÓN ACUOSA SOBRE Ti6Al4V**

ING. JAVIER ENRIQUE GÓMEZ RAMÍREZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA METALÚRGICA Y CIENCIA DE MATERIALES
BUCARAMANGA**

2009

**CITOTOXICIDAD Y ADHESIÓN DE CÉLULAS HUMANAS DE OSTEOSARCOMA,
HOS, SOBRE CERÁMICAS BIOACTIVAS DEPOSITADAS MEDIANTE
PRECIPITACIÓN EN SOLUCIÓN ACUOSA SOBRE Ti6Al4V**

ING. JAVIER ENRIQUE GÓMEZ RAMÍREZ

**Trabajo de Investigación, para optar al título de Magister en Ingeniería
Área: Ingeniería Metalúrgica**

DIRECTOR

Ph.D.C. M.Sc. Ing. Luis Emilio Forero Gómez

CODIRECTOR

Ph.D. Patricia Escobar Rivero

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA METALÚRGICA Y CIENCIA DE MATERIALES
BUCARAMANGA**

2009

DEDICATORIA

A Dios por ser la fuente de todo lo existente y lo no existente, por concederme la gracia para poder alcanzar esta meta, y ser mi guía en todos los momentos difíciles y de satisfacción que se presentaron en este proceso en mi vida y permitir la existencia de los quienes creyeron en mi.

A mis padres, Arturo y Delfa, quienes con sus valores y dedicación han sido un gran apoyo, fuente y aliciente de inspiración para la consecución de mis metas, gracias viejos por todo lo que me han brindado.

AGRADECIMIENTOS

El autor de este trabajo de investigación, expresa sus más sinceros agradecimientos a:

A la Universidad Industrial de Santander por mi formación recibida. A los profesores, técnicos de la Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de Materiales, especialmente al eternamente colaborador Ambrosio Carrillo, gracias padrecito; por su apoyo durante el desarrollo de esta investigación

Al profesor Luis Emilio Forero Gómez, director de este trabajo de investigación, por su dedicación, colaboración, apoyo, enseñanzas y momentos compartidos; por brindarme parte de sus conocimientos y ser ejemplo de vida de rectitud y formación personal, gracias profe por ser un gran maestro.

Al grupo de trabajo del laboratorio de quimioterapia del CINTROP, la doctora Patricia Escobar, al viejo Wilfredo Valdivieso por su gran apoyo y enseñanzas para alcanzar esta meta.

Al Grupo de Ingeniería Biomédica EIA-CES (GIBEC)) y en especial a su director, el profesor Luis Ernesto López Rojas por su apoyo y el suministro de las células HOS.

Al Grupo de Investigación en Biomateriales, todos sus integrantes, mis compañeros de maestría Clara, Carlos, Lucho compañeros de maestría, y compañeros de pregrado que de una u otra manera colaboraron en el desarrollo de este trabajo

A la empresa Vulcanium Metals Inc., por suministrar el material del sustrato base para la realización de esta investigación.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 EL HUESO	5
2.2 ADHESIÓN CELULAR	6
2.2.1 Interacciones Metal-proteínas-superficie	6
2.2.2 Proteínas en el proceso de adhesión celular.....	7
2.2.2.1 Proteínas matriz extracelular.....	7
2.2.3 Interacciones entre materiales y líneas osteoblásticas	8
2.3 BIOCOMPATIBILIDAD	10
2.3.1 El efecto de la rugosidad.....	12
2.3.2 Modificación Superficial del titanio	13
2.3.2.1 Grabado Ácido	13
2.3.2.2 Otros Métodos.....	14
2.3.3 Modificaciones bioquímicas de superficies de titanio	14
2.3.3.1 Oxidación Anódica (Anodización).....	15
2.3.3.2 Recubrimiento con cerámicas bioactivas	17
2.3.4 Efecto de las modificaciones a los sustratos sobre la respuesta celular	18
2.3.4.1 Líneas Celulares de Morfología Osteoblástica	19
2.3.4.2 Osteoblastos	19
2.3.5 Curva de crecimiento celular	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1 PREPARACIÓN DEL MATERIAL	24
3.2 CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL.....	25
3.2.1 Medición de Rugosidades	25
3.3 LIMPIEZA Y DECAPADO.....	27
3.4 OXIDACIÓN ANÓDICA.....	27
3.5 RECUBRIMIENTO CON CERÁMICA BIOACTIVA	28

3.6 CULTIVO CELULAR – MEDIO DE CULTIVO	29
3.6.1 Conteo Celular	30
3.7 PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD	32
3.7.1 Toxicidad celular	32
3.7.2 Determinación de la viabilidad celular	34
3.7.3 Determinación de la liberación de iones.....	37
3.8 ADHESIÓN CELULAR	38
3.8.1 Recuento microscópico	38
3.8.2 Microscopía de Epifluorescencia.....	40
4. RESULTADOS	42
4.1 CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL.....	42
4.1.1 Probetas sin recubrimiento.....	42
4.1.2 Probetas Anodizadas	45
4.1.3 Probetas Recubiertas con cerámica bioactiva.....	47
4.2 CULTIVO CELULAR	51
4.3 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	53
4.4 DETERMINACIÓN DE LIBERACIÓN DE IONES.....	62
4.5 ADHESIÓN CELULAR	65
4.5.1 Recuento microscópico	65
4.5.2 Microscopía de Epifluorescencia.....	67
5. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.....	74
5.1 ESTADO SUPERFICIAL Y RECUBRIMIENTOS	74
5.2 CITOTOXICIDAD	76
5.3 LIBERACIÓN DE IONES.....	79
5.4 ADHESIÓN CELULAR y EPIFLUOROSCOPIA	81
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	84
BIBLIOGRAFÍA	88
ANEXOS	94
ANEXO A DATOS PARA DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN CITOTÓXICA ...	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Interacción implante y cuerpo receptor.	4
Figura 2 Morfología de células óseas.	5
Figura 3 Proceso de adhesión celular: célula-célula, célula-sustrato	9
Figura 4 Curva de crecimiento celular.	21
Figura 5 Metodología seguida para ensayos de citotoxicidad	23
Figura 6 Metodología seguida para las pruebas de adhesión celular.....	23
Figura 7 Probetas de Ti6Al4V en estado final de pulido mecánico. 20X. El autor	24
Figura 8 Reconstrucción 3D HIROX KH7700.	26
Figura 9 Medida de rugosidades HIROX KH 7700, Centro de Biomateriales, CBIO-UIS. El Autor	26
Figura 10 Probetas anodizadas en solución de ácido sulfúrico y ácido oxálico. 20X. El autor	28
Figura 11 Probetas recubierta con cerámica bioactiva (HA) mediante precipitación directa en solución acuosa. El autor.....	29
Figura 12. Cámara de Neubauer.	31
Figura 13 Tubos de Vacutainer empleados para pruebas de citotoxicidad. El autor	33
Figura 14 Placa de cultivo de 96 pozos. Los pozos en color amarillo, fueron tomados como puntos de control dentro de la placa misma. El autor	35
Figura 15 % Inhibición vs Concentración en viabilidad celular. Software MSXIfit ®.	37
Figura 16 Distribución de probetas dentro de caja de petri para recuento microscópico. El autor	39
Figura 17 Probeta de Ti6Al4V-ELI después de pulido mecánico. Papel carburo de silicio #1500, 20X. El autor.....	43
Figura 18 Probeta de Ti6Al4V-ELI después de pulido mecánico. Detalle de estado superficial. 700X. El autor	43
Figura 19 Reconstrucción 3D probeta de Ti6Al4V-ELI, Pulida mecánicamente papel carburo de silicio #1500. 700X. El autor	44
Figura 20 Probeta de Ti6Al4V-ELI. Pulida mecánicamente papel carburo de silicio #1500, Anodizada en solución de H ₂ SO ₄ . 20X. El autor	45
Figura 21 Probeta de Ti6Al4V-ELI. Pulida mecánicamente papel carburo de silicio #1500, Anodizada en solución de H ₂ SO ₄ . Detalle de estado superficial 700X. El autor.	46
Figura 22 Reconstrucción 3D probeta de Ti6Al4V-ELI. Pulida mecánicamente papel carburo de silicio #1500, Anodizada en solución de H ₂ SO ₄ . 700X. El autor.....	46
Figura 23 Probeta de Ti6Al4V-ELI. Pulida mecánicamente papel carburo de silicio #600, Recubierta con cerámica bioactiva. 20X. El autor	48

Figura 24 Probeta de Ti6Al4V-ELI. Pulida mecánicamente papel carburo de silicio #600, Recubierta con cerámica bioactiva. Detalle de estado superficial 700X. El autor	48
Figura 25 Reconstrucción 3D probeta de Ti6Al4V-ELI. Pulida mecánicamente papel carburo de silicio #600, Recubierta con cerámica bioactiva 700X. El autor	49
Figura 26 Difractograma obtenido para las probetas recubiertas con cerámica bioactiva.	50
Figura 27 Curva de crecimiento de células HOS (ATCC CRL-1543) en RPMI-1640.	53
Figura 28. Distribución de no viabilidad celular, HOS, en las placas de cultivo	58
Figura 29 Distribución de inhibición celular por Al y V, para HOS, en las placas de cultivo	58
Figura 30 Curva CC ₅₀ del HNO ₃ . Software MSXIfit®. El Autor	59
Figura 31 Curva CC ₉₀ del HNO ₃ . Software MSXIfit®. El Autor	59
Figura 32 Curva CC ₅₀ del Aluminio. Software MSXIfit®. El Autor	60
Figura 33 Curva CC ₉₀ del Aluminio. Software MSXIfit®. El Autor	60
Figura 34 Curva CC ₅₀ del Vanadio. Software MSXIfit®. El Autor	61
Figura 35 Curva CC ₉₀ del Vanadio. Software MSXIfit®. El Autor	61
Figura 36 Curva de calibración para iones Vanadio. ICP	63
Figura 37 Curva de calibración para iones Aluminio. ICP	63
Figura 38 Curva de calibración para Calcio. ICP	64
Figura 39 Curva de adhesión de células HOS sobre discos de Ti6Al4V no anodizados, anodizados y recubiertas con HA	66
Figura 40 Adhesión de células HOS sobre discos de Ti6Al4V no anodizados, anodizados y recubiertas con HA	66
Figura 41 Células HOS adheridas sobre disco de Ti6Al4V Probetas no anodizadas. 9 horas	67
Figura 42 Células HOS adheridas sobre disco de Ti6Al4V Probetas anodizadas. 9 horas	68
Figura 43 Células HOS adheridas sobre disco de Ti6Al4V Probetas recubiertas con HA. 9 horas	68
Figura 44 Células HOS adheridas sobre disco de Ti6Al4V Probetas no anodizadas. 24 horas	69
Figura 45 Células HOS adheridas sobre disco de Ti6Al4V Probetas anodizadas. 24 horas	69
Figura 46 Células HOS adheridas sobre disco de Ti6Al4V Probetas recubiertas con HA. 24 horas	70
Figura 47 Células HOS adheridas sobre disco de Ti6Al4V Probetas NO anodizadas. 48 horas	70
Figura 48 Células HOS adheridas sobre disco de Ti6Al4V Probetas anodizadas. 48 horas	71

Figura 49 Células HOS adheridas sobre disco de Ti6Al4V Probetas recubiertas con HA. 48 horas	71
Figura 50 Células HOS adheridas sobre disco de Ti6Al4V Probetas NO anodizadas. 72 horas	72
Figura 51 Células HOS adheridas sobre disco de Ti6Al4V Probetas anodizadas. 72 horas	72
Figura 52 Células HOS adheridas sobre disco de Ti6Al4V Probetas recubiertas con HA. 72 horas	73
Figura 53 Producción de Formazán	77

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Efectos de las características superficiales sobre la adhesión celular	7
Tabla 2 Efectos producidos por modificaciones superficiales	14
Tabla 3 Propiedades de capas anodizadas sobre titanio y sus aleaciones	16
Tabla 4 Proteínas que interactúan con sustratos de titanio y de sus aleaciones	19
Tabla 5 Composición del Ti6Al4V según la casa fabricante, y las normas ASTM F136, ISO 5832-3	24
Tabla 6. Composición del medio de cultivo RPMI-1640.....	30
Tabla 7 Distribución de material dentro de tubos de Vacutainer para realización del ensayo de citotoxicidad	34
Tabla 8 Rugosidad de probetas no anodizadas (codificadas con NA).....	44
Tabla 9 Rugosidad de probetas anodizadas (codificadas con A)	47
Tabla 10 Rugosidad de probetas recubiertas con cerámica bioactiva (codificadas con R)	49
Tabla 11 Rugosidad de probetas según su tratamiento superficial.....	50
Tabla 12 Resultados caracterización química por difracción de rayos X, para las probetas recubiertas.....	51
Tabla 13. Conteo microscópico para elaboración de curva de crecimiento de células HOS	52
Tabla 14 Distribución de resultados de OD, teniendo en cuenta las condiciones analizadas en medio de cultivo. Placa de cultivo 1	54
Tabla 15 Distribución de resultados de OD, teniendo en cuenta las condiciones analizadas en medio de cultivo. Placa de cultivo 2	54
Tabla 16 Distribución de resultados de OD, teniendo en cuenta las condiciones analizadas en medio de cultivo. Placa de cultivo 1. Valores corregidos.....	55
Tabla 17 Distribución de resultados de OD, teniendo en cuenta las condiciones analizadas en medio de cultivo. Placa de cultivo 2. Valores corregidos.....	56
Tabla 18 Distribución de resultados de OD, teniendo presente el efecto de los iones de aluminio, vanadio y el de su medio de suspensión.	57
Tabla 19 Distribución de resultados de OD, teniendo presente el efecto de los iones de aluminio, vanadio y el de su medio de suspensión. Valores corregidos.....	57
Tabla 20 Concentración citotóxicas de los iones aluminio, vanadio y su medio de suspensión, HNO ₃	62
Tabla 21 Concentración de iones aluminio y vanadio en sobrenadantes.	62
Tabla 22 Conteo microscópico para elaboración de curva de crecimiento de células HOS sobre probetas estudiadas.	65



LISTA DE ANEXOS

ANEXO A DATOS PARA DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN CITOTÓXICA...94	
ANEXO B INTERFAZ SOFTWARE MSXLFIT ® PARA OBTENCIÓN DE CONCENTRACIÓN CITOTÓXICA.....95	

TÍTULO: CITOTOXICIDAD Y ADHESIÓN DE CÉLULAS HUMANAS DE OSTEOSARCOMA, HOS, SOBRE CERÁMICAS BIOACTIVAS DEPOSITADAS MEDIANTE PRECIPITACIÓN EN SOLUCIÓN ACUOSA SOBRE Ti6Al4V *

AUTOR: JAVIER ENRIQUE GÓMEZ RAMÍREZ **

PALABRAS CLAVES: adhesión celular, citotoxicidad, condición superficial, ensayos in Vitro, MTT

CONTENIDO

La adhesión celular sobre biomateriales empleados en la fabricación de implantes dentales y ortopédicos, está determinada por las características químicas y superficiales del material base, del recubrimiento depositado y la capacidad del material base para reaccionar con proteínas de adhesión celular. Actualmente en la fabricación de implantes se usa principalmente, Titanio grado 5 (Ti6Al4V), en este trabajo se evaluó la adhesión *in vitro* de células HOS sobre este material con tres diferentes condiciones superficiales. Un grupo pulido mecánicamente, un grupo con superficie modificada por oxidación anódica y otro con un recubrimiento de cerámica bioactiva por precipitación en solución acuosa. Mediante perfilometría se estableció la rugosidad del grupo de probetas y su estado superficial. Células HOS cultivadas en RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, en un período de 9 a 72 horas, a 37°C, en atmosfera de 5% CO₂, se emplearon para realizar el estudio de adhesión celular por conteo microscópico y epifluorescencia, y toxicidad celular por técnica colorimétrica de MTT. Los resultados muestran una mayor adhesión en Ti6Al4V de superficie modificada por anodización y un menor grado para las que fueron recubiertas con cerámica bioactiva. Y, para ninguna de las condiciones superficiales hubo señales de citotoxicidad.

* Tesis de Maestría

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Magister en Ingeniería Área: Ingeniería Metalúrgica. Director: Ph.D.C. Luis Emilio Forero Gómez

TITLE: CITOTOXICITY AND ADHESION OF OSTEOSARCOM HUMAN CELLS DE, HOS, ON BIOACTIVE CERAMICS DEPOSITED BY MEANS OF PRECIPITATION IN AQUEOUS SOLUTION ON Ti6Al4V-ELI *

AUTHOR: JAVIER ENRIQUE GÓMEZ RAMÍREZ **

KEYWORDS: cellular adhesion, citotoxicity, superficial characteristic, In Vitro tests, MTT

ABSTRACT

Cell adhesion on biomaterials used in the manufacture of orthopedic and dental implants, is determined by the chemical characteristics of surface and base material, the coating deposited and the capacity of the base material to react with proteins of cellular adhesion. Today in the manufacture of implants are used mainly Titanium grade 5 (Ti6Al4V), this study evaluated the in vitro adhesion of HOS cells on this material with three different surface conditions, a polished mechanically, other with a surface modified by anodic oxidation and the other with a bioactive ceramic coating by precipitation in aqueous solution. Profilometry was used to determine the roughness of the test group and its surface. HOS cells cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, in a period of 9 to 72 hours at 37 ° C in 5% CO₂ atmosphere, were used for the study of cell adhesion by microscopic counting and epifluorescence. Additionally cellular toxicity was determined by colorimetric technique of MTT. The results show an increased adherence to surface modified Ti6Al4V for anodizing and a lesser degree for which they were coated with bioactive ceramics. And for any of the surface were signs of citotoxicity.

* Thesis of research

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Master of Metallurgical Engineering. Advisor: Ph.D.C. Luis Emilio Forero Gomez

1. INTRODUCCIÓN

En el desarrollo y fabricación de implantes para la industria ortopédica y dental se utiliza el titanio comercialmente puro (Ti c.p.) o sus aleaciones, por sus propiedades mecánicas, biocompatibilidad y resistencia a la corrosión. Pero su oseointegración es limitada; por tal motivo se deben realizar tratamientos superficiales a los sustratos metálicos para incrementarla; como procesos de recubrimientos con cerámicas bioactivas. [1]

Algunos de estos tratamientos superficiales aumentan la velocidad de oseointegración, disminuyendo así el tiempo de recuperación post operatorio de pacientes (de 3 a 9 meses a pocas semanas o días), a quienes se les han realizado cirugía de reconstrucción masilio facial o de estética dental, evitando aflojamientos de piezas implantadas y efectos adversos como generación de residuos metálicos del sustrato recubierto. [2, 3]

En el desarrollo y aplicación de procesos de recubrimientos cerámicos bioactivos para implantes, la biocerámica más empleada es la hidroxiapatita (HA); puesto que el componente mineral, en un 65%, del hueso es un fosfato cálcico de la clase de las hidroxiapatitas (HAs). Esta biocerámica posee una relación calcio-fósforo $Ca/P = 1.67$, lo cual significa que presentará una estructura cristalina que no será biodegradada por el cuerpo. [4, 5]

Los recubrimientos de HA empleados como biomateriales, deben ser caracterizados superficial y biológicamente para determinar su cristalinidad, rugosidad, el grado de adhesión celular, oseointegración y biocompatibilidad; total de compuestos secundarios formados, nivel de citotoxicidad o de degradación que presenta el sustrato donde son depositados y con ello, establecer si pueden ser empleados como un biomaterial.

En este trabajo se depositaron recubrimientos que constan: de capas bioactivas de TiO_2 mediante oxidación anódica utilizando una solución de H_2SO_4 , y otro de cerámica bioactiva depositada mediante precipitación directa en solución acuosa; sobre probetas de una aleación Ti6Al4V-ELI. Sobre estos recubrimientos se evaluó el nivel de adhesión con una línea celular de morfología osteoblástica HOS (células humanas de osteosarcoma ATCC CRL-1543), mediante conteo microscópico en cámara de Neubauer. Adicionalmente, se evaluó el nivel de citotoxicidad de la aleación Ti6Al4V mediante ensayos con la técnica colorimétrica reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).

Los estudios pertinentes se llevaron a cabo en un fluido corporal simulado, RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado.

Como objetivos específicos del trabajo se plantearon:

- Caracterizar superficialmente una aleación de Ti6Al4V recubierta con una cerámica bioactiva y determinar la respuesta celular de las HOS sobre estas cerámicas.
- Establecer el grado de adhesión de las células HOS sobre la aleación Ti-6Al-4V, anodizada con y sin recubrimiento de cerámica bioactiva; de acuerdo con su rugosidad, mediante pruebas in *Vitro*.

- Determinar el grado de citotoxicidad de la aleación Ti6Al4V recubierta con una cerámica bioactiva depositada por precipitación en solución acuosa.
- Cuantificar la liberación de productos secundarios por parte de la aleación Ti6Al4V, con y sin recubrimiento, al interactuar con el medio de cultivo.

Las hipótesis de la investigación fueron: “El recubrimiento de cerámica bioactiva obtenido por precipitación en solución acuosa permitirá un adecuado grado de adhesión celular cuando la rugosidad se encuentra en el rango de 2 a 10 μm y el de cristalinidad del 90 – 100%”, y, “La aleación Ti-6Al-4V recubierta con una cerámica bioactiva depositada mediante precipitación en solución acuosa presentará muy baja biodegradación.” Para comprobar la hipótesis se emplearan técnicas de conteo microscópico apoyado en microscopia de epifluorescencia y de reducción colorimétrica MTT; teniendo presente el efecto individual de los elementos aluminio y vanadio de la aleación Ti6Al4V-ELI.

En este trabajo se estableció una metodología para la evaluación del grado de adhesión celular que puede presentar la aleación Ti6Al4V al evaluarse con células HOS en un medio RPMI-1640 y a su vez la respuesta citotóxica que pueda presentar esta aleación.

2. MARCO TEÓRICO

El titanio y sus aleaciones se emplean para la fabricación de implantes dentales y ortopédicos, por que cumplen los requerimientos que un biomaterial debe cubrir en la implantología dental como son: biofuncionalidad, ser inertes, la resistencia a la corrosión en medios fisiológicos, la biocompatibilidad y la procesabilidad.

Además de estas características debe presentarse una rápida y adecuada oseointegración, es decir la capacidad del implante para que los tejidos circundantes lo acepten y crezcan hacia el implante, generando tejidos nuevos que unan de forma natural el implante al hueso receptor. [6, 7].

La interacción entre el implante y el tejido que lo circunda, crea un ambiente químico, eléctrico y mecánicamente activo, presentándose reacciones y procesos bioquímicos que facilitan su oseointegración. En la Figura 1, se ilustran ciertos procesos atómicos y moleculares que se pueden presentar entre el implante y el lugar donde son ubicados. [8]

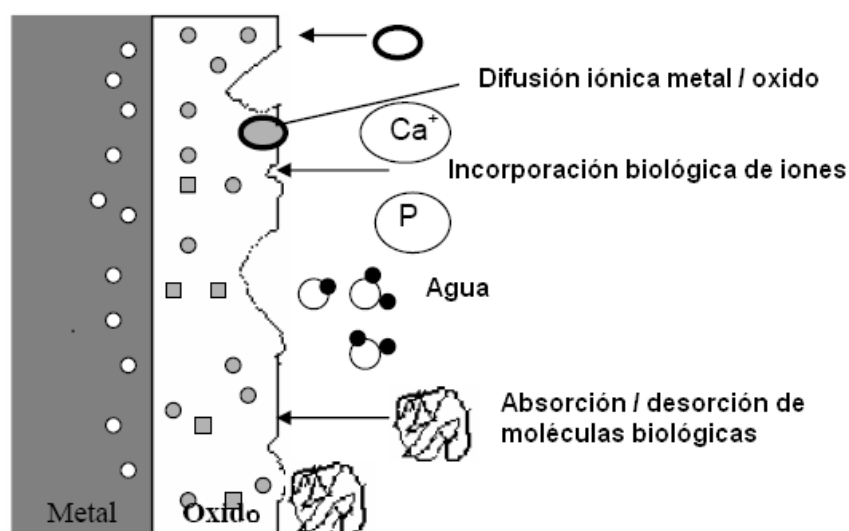


Figura 1 Interacción implante y cuerpo receptor. Estas reacciones pueden variar según su topografía y reactividad química [8]

2.1 EL HUESO

El hueso es un tejido vivo compuesto por células y suministro sanguíneo continuo dentro de una estructura compuesta. La estructura del hueso se clasifica en trabecular (esponjoso) y cortical (denso o compacto), este último haciendo parte del 80% de la masa ósea.

El hueso está compuesto de células y contiene sustancias básicas de proteoglicanos y otras proteínas, entre las cuales la más abundante es el colágeno tipo I dispuesto en forma de fibras. En su fase mineral, el hueso está compuesto principalmente de cristales de hidroxapatita. En el hueso, el colágeno aporta el sustrato sobre el que se depositan los cristales de hidroxapatita y, por otra parte, provee al tejido de la suficiente tenacidad para evitar la fragilidad que el compuesto inorgánico tiene. [2]

Dentro del tejido óseo se encuentran tres clases de células responsables de la formación de hueso, como son, **osteoblastos** células formadoras de hueso encargadas de sintetizar las fibras de colágeno y suponen la sustancia fundamental del hueso. Tienen la función de formar el tejido óseo. **Osteocitos** (ver figura 2): son los osteoblastos ya incorporados a la matriz ósea ya calcificada y son los encargados de mantener vivo el tejido óseo. **Osteoclastos**: son las células encargadas de la resorción y eliminación del tejido óseo no deseado, imprescindible para el desarrollo, crecimiento, mantenimiento y reparación normal del hueso. [2, 9, 10]

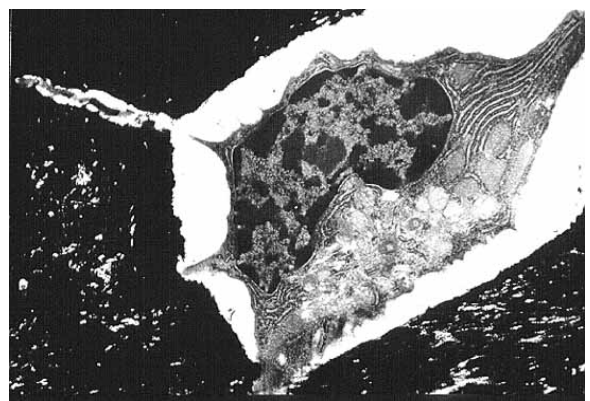
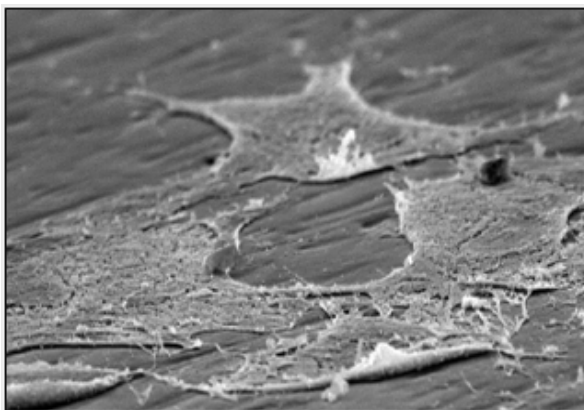


Figura 2 Morfología de células óseas. (a) osteoblasto, muestra extensión de brazos de unión entre ellas. (b) Osteocito, osteoblasto en fase mineralizada <http://www.conganat.org>

El colágeno, en forma de pequeñas microfibras, forma la matriz tridimensional de la estructura interna del hueso. Cada fibra de colágeno presenta un diámetro que varía dentro de un rango de 100 – 2000 nm.

La presencia de fosfatos de calcio del tipo cristalino como hidroxiapatita (HA) y/o amorfo de calcio (ACP) le otorgan resistencia al hueso. La HA se presenta en forma de cristales en la matriz de colágeno en forma de plaquetas o de agujas, las que pueden tener una longitud de 40 - 60 nm, ancho de 20 nm y un espesor que varía de 1.5 - 5 nm. A su vez, estos cristales de HA se depositan paralelamente sobre las fibras de colágeno y se van conectando entre ellos para formar una red tridimensional. [2, 8, 11]

2.2 ADHESIÓN CELULAR

Es el proceso mediante 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 tejidos. También, la biocompatibilidad de los biomateriales está muy relacionada con el comportamiento celular en especial con el grado de adhesión celular que puedan presentar así como sus interacciones entre la superficie del sustrato y las proteínas que se depositan sobre estos sustratos. [12]

2.2.1 Interacciones Metal-proteínas-superficie

El comportamiento de las proteínas sobre las superficies de los sustratos en contacto con el tejido circundante juega un papel importante para la formación de la interface de interacción mutua, la cual afecta el grado de adhesión celular. En la Tabla 1 se presentan los efectos de las características superficiales sobre la adhesión celular. [8, 12]

Tabla 1 Efectos de las características superficiales sobre la adhesión celular

CARACTERÍSTICA	EFEECTO
TOPOGRAFÍA	Grandes texturas exponen más área superficial para la interacción con proteínas.
COMPOSICIÓN	La distribución y reactividad química de una superficie determinará los tipos de fuerzas intermoleculares que gobiernan la interacción con proteínas.
HIDROFOBICIDAD	Superficies hidrofóbicas tienden a una mayor interacción proteica.
HETEROGENEIDAD	Zonas superficiales no uniformes trae como consecuencia que se presenten zonas que puedan reaccionar con diferentes clases de proteínas.

Adicionalmente a las características anteriormente mencionadas, las marcas o huellas en la superficie de los metales, implantes o dispositivos pueden modificar la capacidad de interacción con proteínas. Estas marcas que aumentan el área de interacción son inducidas en el proceso de maquinado de los implantes.

2.2.2 Proteínas en el proceso de adhesión celular.

2.2.2.1 Proteínas matriz extracelular

La matriz extracelular ósea está compuesta por 90% de proteínas colágeno (97% de colágeno tipo I y 3% tipo V) y 10% de proteínas no colagénicas (NCP) (20% osteocalcina, 20% osteonectina, 12% sialoproteínas óseas, 10% proteoglicanos, osteopontina, bronectina, factores de crecimiento, proteínas óseas morfogenéticas, entre otras). Estas proteínas son sintetizadas o producidas por los osteoblastos o líneas celulares de morfología osteoblástica, y la mayoría de estas proteínas intervienen en el proceso de adhesión celular. [12,13]

La presencia de receptores celulares (moléculas de adhesión), facilita la adhesión de células sobre los sustratos donde son colocadas. La adhesión de las moléculas está caracterizada por su capacidad de interactuar con un ligando específico; que puede estar ubicado en la membrana celular o en forma de proteínas extracelulares.

Estas moléculas se clasifican en cinco diferentes familias; siendo las principales, las selectinas, las mucinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas, las caderinas e integrinas. Entre las cuales las caderinas e integrinas solo están presentes en células de línea osteoblástica.

Las integrinas y sus ligandos (vitronectinas, fibronectinas, lamininas, fibrinógeno, talina, paxilina, vinculina, tensina, moléculas de adhesión celular) desempeñan un papel importante en la adhesión de osteoblastos sobre sustratos específicos, teniendo en cuenta la capa de proteínas distribuidas en la superficie de dichos sustratos [12, 14,16]

Las caderinas interactúan con proteínas intracelulares para permitir la unión entre células y por medio de puentes de intercambio iónico se presente la transferencia de iones de calcio, sodio y potasio. [17]

2.2.3 Interacciones entre materiales y líneas osteoblásticas

Las interacciones entre líneas celulares osteoblásticas y materiales donde son adheridos, depende de las características superficiales del sustrato, como son topografía, reactividad química o energía superficial. Estas características superficiales determinan que tanta cantidad de moléculas biológicas serán adsorbidas en la superficie del sustrato y su comportamiento. [15]

La superficie del sustrato, los efectos de la preparación superficial, las modificaciones químicas superficiales y las condiciones de esterilidad juegan un papel importante en la respuesta del titanio y de sus aleaciones en el grado de adhesión celular [18].

Durante la adhesión celular, la fase de unión puede ocurrir rápidamente y presentarse eventos como uniones fisicoquímicas entre las células y el material del implante o

sustrato, presentándose fuerzas iónicas o de van der Waals. En la fase de adhesión ocurren múltiples procesos en los que se envuelven varias moléculas biológicas como son: proteínas en la matriz extracelular, proteínas de la membrana celular, del citoesqueleto; las cuales interactúan mutuamente para permitir la comunicación intercelular e intercambio iónico. [12,13, 14]. En la Figura 4, se puede observar cómo se da el proceso de adhesión celular

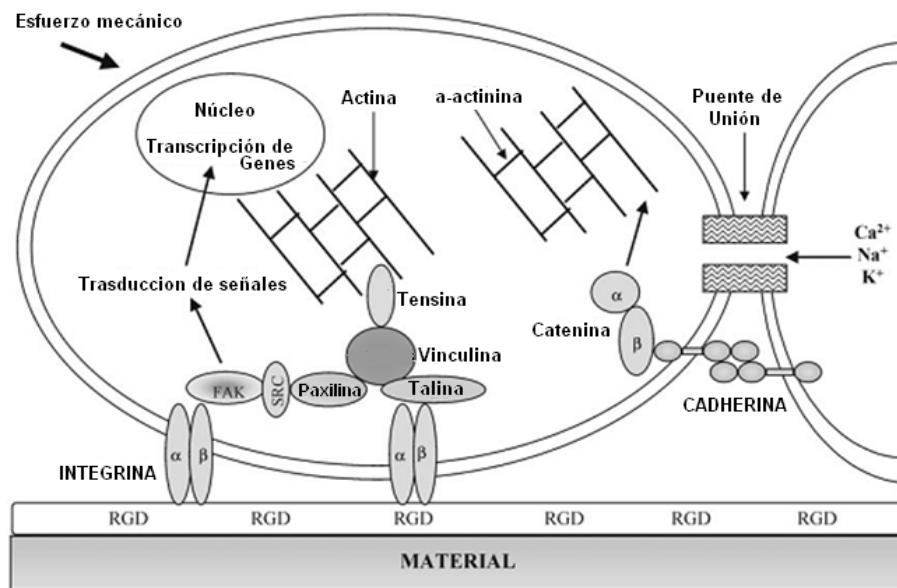


Figura 3 Proceso de adhesión celular: célula-célula, célula-sustrato

En la adhesión celular intervienen proteínas de la familia de las integrinas y cadherinas. Las primeras, ubicadas en la matriz extracelular, son responsables de la adhesión celular a los sustratos por medio de sus receptores, teniendo presente que en la superficie de los sustratos haya una película de proteínas ricas en cadenas de aminoácidos RGD (Arg-Gly-Asp = arginina-glicina-ácido aspártico). Las cadherinas, encargadas de la unión entre células junto con puentes de unión para intercambio iónico [2,12, 37, 38, 39, 47, 48]

La adhesión de células en especial de la línea osteoblástica sobre distintos sustratos sintéticos, incluyendo el titanio, depende de la presencia de la proteína vitronectina en sus superficies. De esta manera se explica porque las células se unen a las superficies por medio de integrinas, que son receptores celulares, ubicados en su membrana, que reconocen lugares específicos en las proteínas de unión. Uno de estos lugares es la secuencia de aminoácidos RGD presente en la fibronectina y la vitronectina.

La naturaleza química del sustrato puede controlar la expresión de las integrinas asociadas a la adhesión celular, es decir, que los puntos focales de adhesión son también sensibles a la naturaleza química del sustrato. [2, 12, 15]

2.3 BIOCMPATIBILIDAD

La biocompatibilidad es “la capacidad de un material o dispositivo médico para desempeñar un trabajo con una respuesta apropiada en una aplicación específica por el organismo o un medio biológico. [1] Cualquier diseño de un biomaterial debe presentar excelentes características de estabilidad química e integridad y que no presente reacciones adversas con el cuerpo. [8]

Para determinar la biocompatibilidad, según la norma ISO 10993-1, se debe tener en cuenta los requerimientos corporales animales; pruebas de genotoxicidad, carcinogenicidad; nivel de toxicidad; interacciones con la sangre; citotoxicidad in Vitro; efectos locales en el lugar de implante (estabilidad del implante); identificación y cuantificación de productos degradados; test de irritación y de sensibilidad.

El titanio comercialmente puro (ASTM F67), Ti6Al4V ELI (ASTM F136) y Ti6Al4V estándar (ASTM F1472) y aleaciones son biomateriales que no reaccionan negativamente con el cuerpo, presenta una alta bioestabilidad, resistencia a la corrosión

en medios fisiológicos por la formación superficial de una capa natural, delgada y estable de TiO_2 autopasivante.

Esta capa se forma de manera natural o controlada mediante procesos de anodizado en diferentes clases de electrolitos [3], [4]. Sin embargo, presentan una baja velocidad de oseointegración, por lo cual se deben realizar tratamientos superficiales o aplicar recubrimientos bioactivos para aumentarla. De esta manera el titanio y sus aleaciones cumplen la condición para ser considerado como un material biocompatible.

Adicionalmente, debido al oxígeno cargado negativamente el TiO_2 tiene capacidad de intercambio iónico, lo que permite el ligar iones calcio y fósforo, ayudando en el proceso de mineralización y de osteosíntesis cuando se expone a los fluidos biológicos. Esta propiedad, la comparte el titanio y sus aleaciones junto con otros elementos o compuestos que se integran en el hueso como son la sílice, zirconia, alúmina, o la hidroxiapatita. [19]

El titanio y sus aleaciones como materiales bioactivos causan reacciones tisulares favorables, permitiendo el establecimiento de enlaces químicos directos con los tejidos circundantes; estas reacciones aumentan al depositarles hidroxiapatita (HA).

La HA que es un material bioactivo para el tejido óseo, debido a que es la fase mineral del hueso. Este depósito permite la unión química entre el implante recubierto y el tejido circundante, lo cual es conocido como *biointegración*.

Además, para que un material sea bioactivo en el tejido óseo, es indispensable que se forme *in vivo* una capa de HA sobre su superficie, para que se dé el enlace con el hueso, condiciones que son cumplidas por el titanio y sus aleaciones [2]

2.3.1 El efecto de la rugosidad

Las superficies de los implantes dentales u ortopédicos, fabricados en aleaciones de titanio, representan un aspecto de relevancia en la respuesta de los tejidos circundantes, incluyendo la oseointegración, tanto a corto como a largo plazo.

Las estrategias más utilizadas para mejorar la respuesta tisular consisten en la modificación de la rugosidad (variación de la topografía, ya sea por pulido mecánico, grabado ácido, oxidación anódica, entre otras) o en la aplicación de recubrimientos bioactivos. [19]

La rugosidad del material determina la respuesta biológica y la calidad de la oseointegración, porque afecta el grado de adhesión celular modificando su interacción proteica, la velocidad y la calidad de la respuesta del tejido óseo. [2, 19, 20]

Teniendo presente la variación de rugosidad superficial, las líneas celulares osteoblásticas identifican una superficie rugosa cuando la altura de los picos es superior a $2\mu\text{m}$ y la separación entre ellos que sea ligeramente mayor a la longitud de la célula de la línea respectiva (aproximadamente $10\mu\text{m}$) para que las líneas celulares puedan ocupar estos espacios e iniciar el proceso de adhesión y proliferación celular.

La variación de la rugosidad, tienen una influencia significativa en la adhesión de líneas celulares osteoblásticas. Esto es un factor crítico en la respuesta celular, porque determina qué células y cuántas poblarán la superficie del sustrato donde son depositadas, para después producir y mineralizar su matriz extracelular. [11]

A partir de la adhesión celular se producen la proliferación, lo que indica que el número inicial de células disponibles condiciona el resto del proceso de regeneración del tejido óseo. Para una misma capacidad de proliferación, el número total de células con que se dispongan en cada momento para producir hueso será mayor cuanto mayor sea el número inicial de células adheridas, indicando una mayor capacidad de regeneración. [2, 11, 19]

2.3.2 Modificación Superficial del titanio

La finalidad de la modificación superficial de los sustratos de titanio o de sus aleaciones, empleados como implantes es permitir que haya una superficie adecuada para que sea reconocida por las células y de esta manera ellas puedan adherirse e iniciar su fase de mineralización dando origen al proceso de oseointegración.

La superficie del titanio por su alta reactividad, forma una delgada y espontánea capa de TiO_2 que puede ser amorfa o cristalina, y posee excelente resistencia a la corrosión. En esta superficie se puede cambiar su textura y realizar modificaciones químicas. Estas modificaciones químicas, se realizan con la finalidad de aumentar su afinidad biológica, permitiendo una mayor actividad celular de crecimiento y diferenciación celular. Características obtenidas al emplearse procesos de recubrimientos superficiales de anodizado, grabado ácido o depósito de recubrimientos bioactivos. [3, 18]

La textura y la rugosidad del titanio y de sus aleaciones son de gran importancia para mejorar su desempeño biológico en la parte del cuerpo donde sea implantado. En un estudio realizado por Conrado *et al* (2004), denota que la rugosidad puede variar de superficies con acabado de brillo espejo hasta un valor de $12\mu m$ y que la porosidad tenga un diámetro de 100 a $500\mu m$. [2]. Yang *et al* (2004) encontró que células de morfología osteoblástica proliferaron y formaron matriz extracelular en los poros de superficies de titanio modificado superficialmente, con un tratamiento de baño alcalino de NaOH y un tratamiento de calentamiento posterior.

2.3.2.1 Grabado Ácido

Técnica en la cual el dispositivo o implante se sumerge en una solución líquida específica para remover la capa de óxido natural formada sobre el titanio o en sus aleaciones para permitir la formación de una capa de ellas de manera uniforme y compacta, con una rugosidad.

En este proceso las soluciones más empleadas son: soluciones al 10-30% vol HNO_3 (69% masa) y 1-3% vol HF (60% masas) en agua destilada. También se puede utilizar 100 ml HCl (18% masa) y 100 ml H_2SO_4 (48% masa) [7]

2.3.2.2 Otros Métodos

Existen muchos métodos para modificación superficial de sustratos; en la Tabla 2 se presentan los métodos más empleados y sus efectos sobre los sustratos. [19]

Tabla 2 Efectos producidos por modificaciones superficiales para alguna clase de sustrato

MÉTODO	EFEECTO
Pulido / Desbaste	Eliminar capas naturalmente formadas. Obtener un acabado superficial muy fino.
Granallado, Sand blasting	<ul style="list-style-type: none"> • Eliminación de contaminantes, eliminar capas naturalmente formadas, aumentando su rugosidad • Mejorar la adhesión en los enlaces
Grabado ácido	<ul style="list-style-type: none"> • Eliminar capas naturalmente formadas • Modificar rugosidad superficial
Grabado alcalino	<ul style="list-style-type: none"> • Mejorar la formación de apatitas • Aumentar la rugosidad superficial
Tratamientos con fosfatos de calcio u otros iones	<ul style="list-style-type: none"> • Hacer precipitar capas de apatitas, HA • Modificar la composición superficial
Oxidación anódica	<ul style="list-style-type: none"> • Modificación de óxidos superficiales • Aumentar la resistencia a la corrosión • Evitar liberación de iones • Modificar la rugosidad
Recubrimiento plasma-espray de fosfatos de calcio	<ul style="list-style-type: none"> • Recubrir con materiales bioactivos y aumentar la rugosidad
Recubrimientos con sol-gel	<ul style="list-style-type: none"> • Recubrir con materiales bioactivos
Recubrimiento por precipitación en solución acuosa	<ul style="list-style-type: none"> • Recubrir con material bioactivo, modificar la rugosidad superficial.

2.3.3 Modificaciones bioquímicas de superficies de titanio

La modificación bioquímica de las superficies de titanio y de sus aleaciones se lleva a cabo para mejorar la respuesta de adhesión de las líneas celulares sobre ellos.

En este proceso se modifica la velocidad de diferenciación celular, disminuye el tiempo de recuperación del tejido circundante al implante, al aumentar la velocidad de integración del mismo entorno a dispositivos que sean implantados; según sea la composición química de películas de proteínas que sean absorbidas.

Una manera de realizar esta modificación es el emplear recubrimientos con cerámicas bioactivas y entre ellas, las más destacadas son las derivadas de fosfatos de calcio para aumentar su velocidad de oseointegración [7]

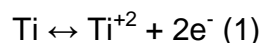
2.3.3.1 Oxidación Anódica (Anodización)

Es un proceso electrolítico en el cual se puede controlar y mejorar la formación de una película de TiO_2 (aleaciones de titanio) de manera uniforme sobre la superficie del titanio o de sus aleaciones; siendo esto función del potencial aplicado, la composición química del electrolito, la temperatura y la corriente aplicada.

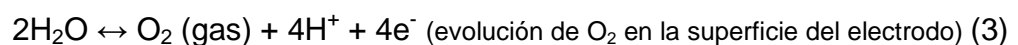
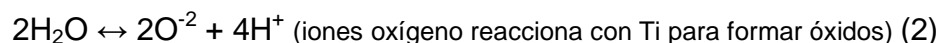
La oxidación anódica de aleaciones de titanio, permite la formación de una red estructurada porosa de óxido de titanio (TiO_2 y Ti_2O_3) homogénea biocompatible sobre la superficie de los sustratos respectivamente; la morfología de la misma y espesor depende del potencial aplicado en el proceso de anodización. La formación de esta red permite una adecuada adhesión y proliferación de células de morfología osteoblástica [18]

En este proceso ocurren las siguientes reacciones:

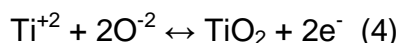
Interface Ti / óxido de Ti:



Interface óxido de titanio / electrolito:



En las dos interfaces:



En la tabla 3 se describen las características principales de procesos de anodizados que se emplean para biomateriales fabricados en titanio y sus aleaciones [21]

Tabla 3 Propiedades de capas anodizadas sobre titanio y sus aleaciones [22]

Proceso (Anodizado)	Composición Del óxido principal	Espesor del óxido	Morfología y estructura
100V en ácido sulfúrico, fosfórico o acético	Principalmente TiO_2 , adsorción e incorporación de aniones del electrolito	10 – 200 nm (2 nm/V)	La morfología varía de acuerdo a la estructura del sustrato, microporos. Puede ser rutilo o anatasa
Ácido crómico con o sin HF (10-40V)	TiO_2 y trazas de cromo	< 100nm	Nanoporos (10-100 nm)
Por chispa sobre 100V en H_2SO_4 , H_3PO_4 o mezclas	TiO_2 adsorción de aniones del electrolito (óxidos)	Superior de 20 μm	Rugosa y microporos (0.1 - 1 μm), parcialmente cristalino (anatasa y rutilo)

La modificación de la superficie de los sustratos metálicos por medio de procesos de oxidación anódica favorece la adhesión de líneas celulares, puesto que la distribución de la capa anodizada sobre el sustrato permite la formación de un sistema de anclaje óptimo para que las células la identifiquen como una superficie adecuada y empiecen su proceso de adhesión y comunicación celular por medio de matrices extracelulares (ECM). [18].

Her-Hsiung *et al* (2004) [18] determinó que por medio de la oxidación anódica trabajando con un potencial de 20V, los sustratos de titanio anodizados presentaron una mayor respuesta de adhesión celular con respecto a los no anodizados.

2.3.3.2 Recubrimiento con cerámicas bioactivas

Al recubrir con cerámicas bioactivas, hidroxiapatita-HA o fosfato tricálcico-TCP (α , β); se aumenta en el grado de adhesión celular y por ende de la velocidad de oseointegración del implante en el sitio del cuerpo donde es puesto. Estos recubrimientos, deben tener una relación de $\text{Ca/P} = 1.67$ y una cristalinidad superior del 90%, características que cumple la hidroxiapatita HA, para que no sea degradada por el cuerpo y permita un intercambio cálcico con la apatita carbonatada del hueso; y el TCP una $\text{Ca/P} = 1.5$, el cual es biodegradable por una combinación de disolución fisicoquímica y fragmentación. De esta manera se presenta una unión adecuada entre el implante recubierto con cerámica bioactiva y la apatita del hueso. [2, 19]

El comportamiento de la HA cuya fórmula química es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, y relación $\text{Ca/P} = 1.67$, depende de forma muy marcada de su estequiometría, cristalinidad, defectos y porosidad.

Para la obtención de HA, los métodos más utilizados son la síntesis por precipitación a bajas temperaturas, la sinterización a altas temperaturas, depósito por plasma-spray, sol-gel, depósito electroforético; pero, estas técnicas presentan un inconveniente, se debe realizar un tratamiento térmico posterior para que la cerámica bioactiva depositada logre el nivel adecuado de cristalinidad y de relación de Ca/P , de tal manera, para evitar este inconveniente se deben realizar depósitos de HA por precipitación directa en solución acuosa, que puede ser obtenida al añadirse soluciones ricas en fosfatos a otra con iones de calcio controlando las condiciones de pH y temperatura. [19, 30]

La HA es poco soluble al ser implantada en tejido óseo, contrariamente a lo que sucede con otros fosfatos de calcio como, fosfato tricálcico (TCP). El grado de solubilidad de la HA está condicionado por su cristalinidad (a mayor cristalinidad, mayor estabilidad), su estructura física (los poros y conductos aumentan la superficie de contacto y por tanto la

degradación), y el ambiente en que es implantada (la acidez del medio aumenta la solubilidad) [19, 30, 31].

Sin embargo, es necesario cierto grado de solubilidad para favorecer un rápido proceso de fijación biológica, mientras que una solubilidad en exceso provocaría la degradación y desaparición prematura del recubrimiento; de tal manera para que se un proceso adecuado de adhesión celular se deben emplear recubrimientos en los cuales haya presencia de fosfatos cristalinos y amorfos como son la HA y el TCP respectivamente [30, 49]

2.3.4 Efecto de las modificaciones a los sustratos sobre la respuesta celular

La actividad de las células depositadas sobre titanio o sus aleaciones, está en función de la topografía de sus superficies, considerando en especial la distancia de separación entre crestas y valles de la misma.

Dada la complejidad de la interacción entre diferentes clases de células y los efectos de la rugosidad y de composición química de las superficies, respecto a la respuesta presente en la adhesión celular y su interacción química, se deben emplear ensayos *in vitro*, para conocer el comportamiento de las células sobre el sustrato donde son depositadas. [23]

También, se debe tener presente la composición de las películas de proteínas que naturalmente se forman sobre el titanio o sus aleaciones cuando son colocados dentro del cuerpo, dado que esta película tiene un papel importante en la regulación del sistema de comunicación entre la superficie del sustrato metálico y la línea celular que se deposite sobre dicho sustrato. En la tabla 4, podemos observar las proteínas que pueden formar películas sobre las aleaciones de titanio o sus aleaciones y las clases de células que pueden interactuar con estas proteínas. [20, 24]

Tabla 4 Proteínas que interactúan con sustratos de titanio y de sus aleaciones

PROTEÍNAS	FUNCIÓN PRINCIPAL	CLASE DE CÉLULA
Albúmina de suero	Transporte corporal y síntesis proteica. Permitir la unión de células sobre diversos sustratos	Endoteliales, hepatocitos
Fibrinógeno (Fib)	Formar fibrina durante la coagulación sanguínea	Plaquetas, endoteliales, osteoclastos
Fibronectina (FNT)	Matrices proteicas extracelulares para la unión celular mediante la secuencia RGD	Macrófagos
Factor 1q (C1q)	Iniciar activación celular	Macrófagos, eosinófilos, plaquetas, fibroblastos, endoteliales, epiteliales

2.3.4.1 Líneas Celulares de Morfología Osteoblástica

Para las líneas celulares de morfología osteoblástica la topografía del sustrato sobre el cual son cultivadas tiene un efecto importante sobre su grado de crecimiento y alineación celular. Las líneas osteoblásticas muestran un mayor alineamiento cuando se presentan porosidades con un diámetro medio entre 200 - 250 nm; su morfología es planar y alargada, presentando un mayor grado de adhesión cuanto mayor profundidad halla entre los surcos de las superficies de los sustratos. [25, 26]

Además, en las líneas osteoblásticas se presenta la fase de mineralización ósea y se alinean con las direcciones de las estriaciones que se presenten en la superficie de los sustratos (aptes) donde son depositados para iniciar el proceso de formación de tejido óseo. [27]

2.3.4.2 Osteoblastos

Los osteoblastos tienen como función la síntesis y la producción del *componente orgánico* de la matriz ósea (conocida como osteoide). Cuando se inicia la fase de mineralización ósea o secreción ósea el osteoblasto se transforma en un osteocito

(osteoblasto inactivo). Una vez están transformados como osteocitos, estos continúan su actividad de osteogénesis al establecer un intercambio iónico entre ellos mismos por medio de pequeños canales, que son proyecciones de sus citoplasmas. Estos osteocitos se van depositando sobre sistemas de andamiaje creado por fibras de colágeno. Posteriormente se empieza a formar la fase no orgánica, la cual se caracteriza por la presencia de hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. La fase mineral se origina sobre una fase orgánica a partir de la desintegración de osteoblastos. [18, 19, 27]

A su vez, los osteoblastos son células que cambian sus propiedades de acuerdo a sus estadios de desarrollo o diferenciación. Cuando los osteoblastos están totalmente diferenciados empiezan a generar la fase de mineralización.

Los osteoblastos, conocidos por su papel en la formación del hueso y por su capacidad para sintetizar matriz osteoide, tienen propiedades reconocidas, como la síntesis de colágeno tipo I (COLL-I), osteonectina, osteopontina (OPN), sialoproteína ósea (BSP), osteocalcina (OCN), y marcada actividad fosfatasa alcalina (ALP); otras propiedades como su respuesta a hormonas (PTH) y a factores de crecimiento. [12, 19]

2.3.5 Curva de crecimiento celular

Para las líneas celulares, de morfología osteoblástica, se debe realizar la caracterización de su crecimiento celular, para conocer la fase en que estas células se encuentran de acuerdo con el medio de cultivo o fluido corporal simulado dentro del cual se va a realizar su estudio.

De tal manera, se realizan las curvas de crecimiento celular, y en ellas se presentan 4 fases: fase lag (a), fase exponencial (b), fase estacionaria (c) y fase de muerte (d); como se puede observar en la Figura 4

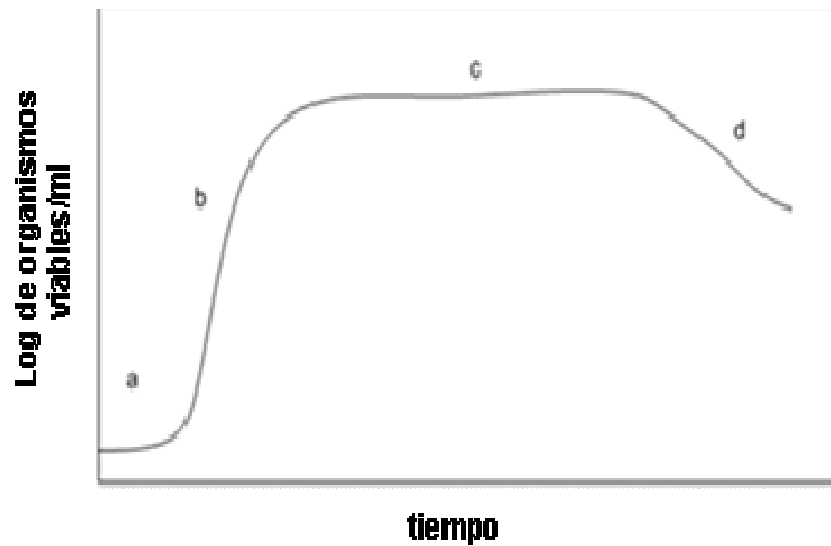


Figura 4 Curva de crecimiento celular. [19, 40]

a) Fase lag o de retraso

Cuando se inoculan células en medio fresco, el crecimiento generalmente no inicia de inmediato, sino después de un cierto tiempo, llamado **fase lag**. Fase en la que las células se adaptan a su nuevo medio ambiente y aun no se dividen. Esta fase puede ser breve o larga, dependiendo de las condiciones del medio de cultivo o de la línea celular escogida para el ensayo.

b) Fase exponencial

Fase de comportamiento logarítmico se da una máxima velocidad de crecimiento. Este comportamiento se presenta por que cada célula se divide para formar dos células, cada una de las cuales también se divide para formar dos células más y así sucesivamente. La velocidad de crecimiento exponencial varía mucho de un organismo a otro. Las condiciones ambientales, temperatura, composición del medio de cultivo, así como las características de la línea celular.

c) Fase estacionaria

Esta fase se presenta cuando el crecimiento exponencial se detiene; dado porque los nutrientes indispensables se encuentran en niveles límites pero suficientes para mantener actividad celular, no hay incremento o decremento en el número de células, y hay acumulación de sustancias tóxicas. En esta fase, las líneas celulares son fisiológicamente activas y viables.

d) Fase de muerte

Si la incubación continúa después que una población alcanza la fase estacionaria, las células pueden seguir vivas y continuar metabolizando, pero lo más probable es que mueran. Si esto último sucede, la población se encuentra en la fase de muerte

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El procedimiento para la realización de los diferentes ensayos se especifica en diagramas de bloques que se consignan en la Figura 5 y 6.

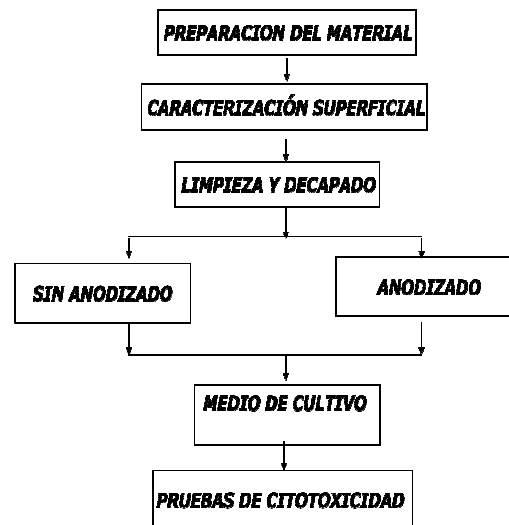


Figura 5 Metodología seguida para ensayos de citotoxicidad

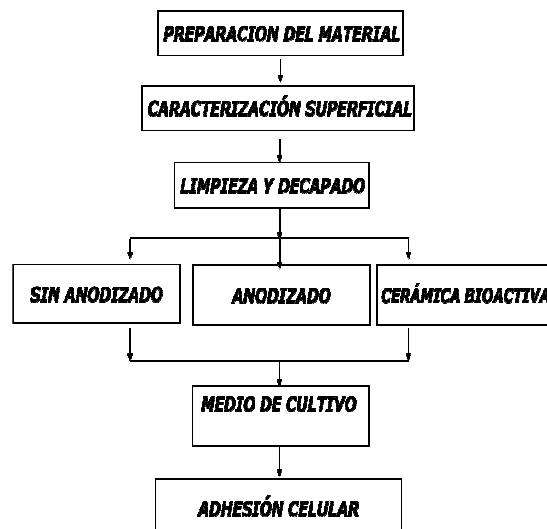


Figura 6 Metodología seguida para las pruebas de adhesión celular

3.1 PREPARACIÓN DEL MATERIAL

Probetas de Ti6Al4V-ELI con forma de discos de 12 mm de diámetro y un espesor de 1.5 mm (ver Figura 7) fueron empleadas para los diferentes ensayos. Se les realizó una preparación mecánica superficial mediante papel abrasivo de carburo de silicio siguiendo la secuencia de 240, 320, 400, 600, 1200, 1500.

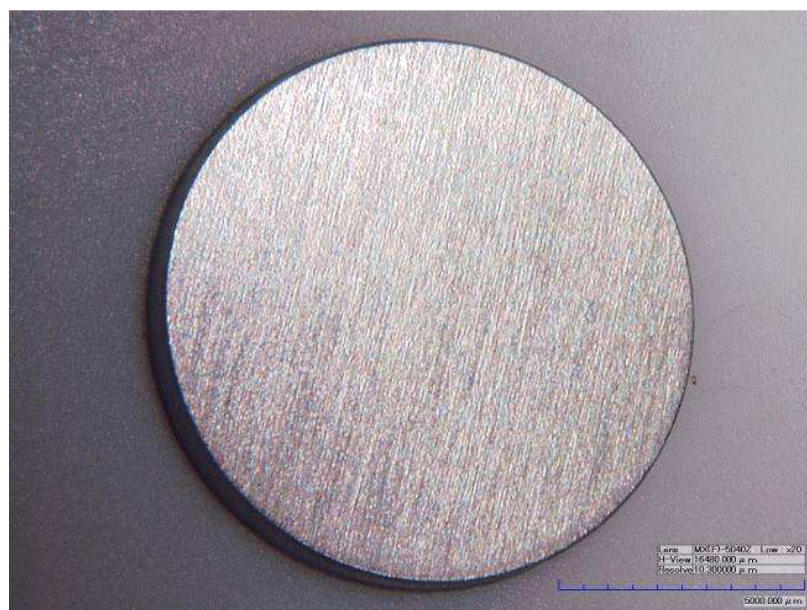


Figura 7 Probetas de Ti6Al4V en estado final de pulido mecánico. 20X. El autor

El análisis químico de la aleación de Ti6Al4V del fabricante presenta una composición química como se describe en la Tabla 5; la cual se encuentra dentro de los rangos especificados por las normas ASTM F136 e ISO 5832-3.

Tabla 5 Composición del Ti6Al4V según la casa fabricante, y las normas ASTM F136, ISO 5832-3

ELEMENTO	Al	V	Fe	C	O	N	H	Ti
Sustrato empleado	6,020	4,070	0,109	0,014	0,115	0,005	0,003	Balance
ASTM F136	5,50 -6,50	3,50-4,50	0,25	0,08	0,13	0,05	0,012	Balance
ISO 5832-3	5,50-6,75	3,50-4,50	0,30	0,08	0,20	0,05	0,015	Balance

Las probetas se dividieron en tres grupos identificados con las letras NA, A, y R y cada unos con 12 probetas. En el grupo NA, las probetas se dejaron en su estado final de pulido manual; las probetas A fueron anodizadas y un grupo final, R, fueron recubiertas con una cerámica bioactiva depositada mediante precipitación directa en solución acuosa.

Para los tres grupos de probetas se mantuvo la rugosidad dentro de un rango (2-10 μm), para que se pueda llegar a presentar una adhesión celular adecuada. Esto se basa en lo estipulado por Conrado en su tesis doctoral (2004), Her-Hsiung *et al* (2004). [2, 18]

3.2 CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL

3.2.1 Medición de Rugosidades

Se caracterizaron por medio de reconstrucción tridimensional de imágenes tomadas con un aumento de 700X para determinar su morfología superficial. El proceso fue llevado a cabo mediante el software Eye Dynamic Plus 3D, del video microscopio digital 3D HIROX modelo KH-7700 (GBIO, Grupo de Investigaciones en Biomateriales de la Universidad Industrial de Santander). Mediante este software se realizó la reconstrucción tridimensional de superficies; partiendo de la toma de múltiples fotografías secuenciales desde el punto más bajo de la muestra analizada hasta el más alto de la misma; y la posterior reconstrucción por superposición de puntos focalizados en cada imagen, como se puede observar en la Figura 8.

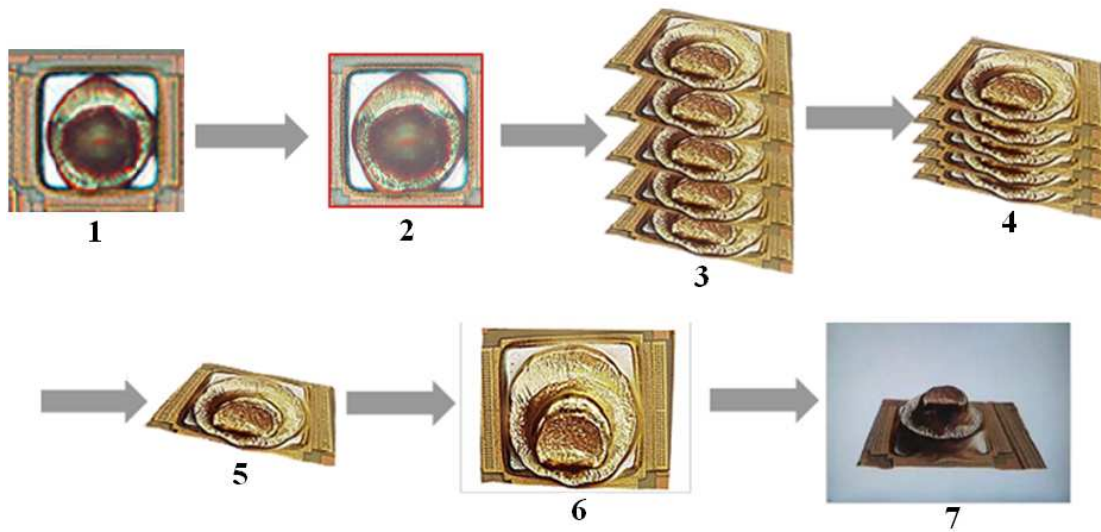


Figura 8 Reconstrucción 3D HIROX KH7700. www.hirox-usa.com

Una vez realizada la reconstrucción 3D, esta puede ser expresada como mapa de mallas, a partir de los cuales se puede realizar la medición de la rugosidad, tal como se observa en la Figura 9

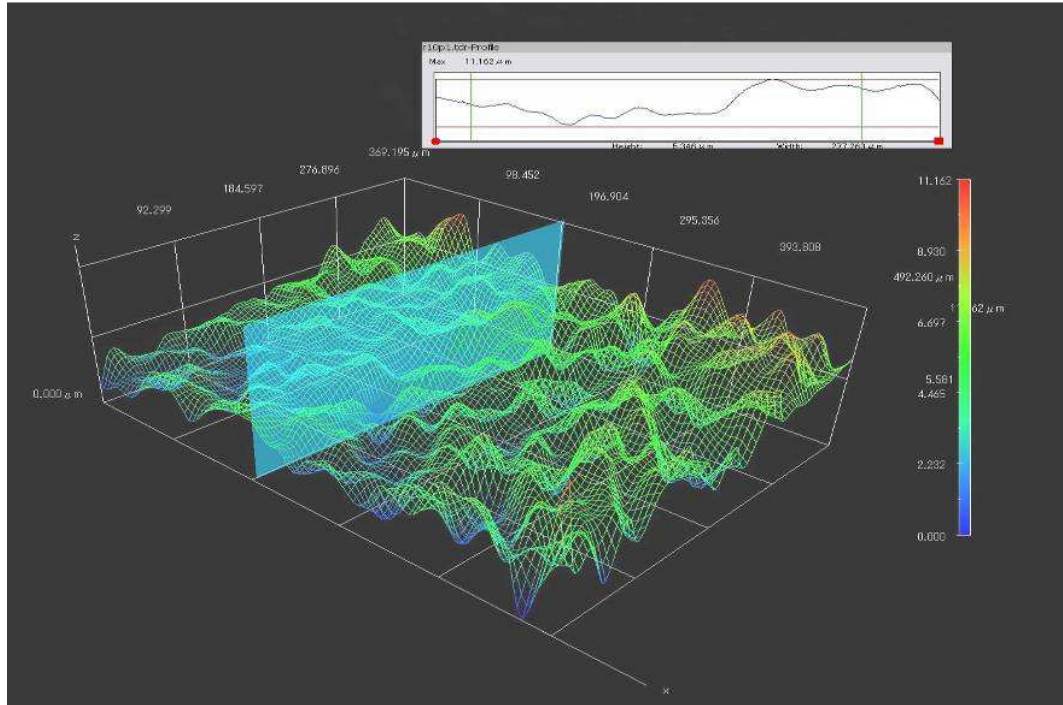


Figura 9 Medida de rugosidades HIROX KH 7700, Centro de Biomateriales, CBIO-UIS. El Autor

En la reconstrucción por mallas y por medio de perfilometría en cada una de las probetas, tomando tres puntos aleatorios sobre su superficie y en cada uno de ellos se hizo un barrido de 5 puntos, se determinó su **rugosidad**, Ra, (distancia promedio entre picos y valles). El registro de proceso se puede observar en la Figura 8, en la cual el rectángulo brillante indica el punto donde se efectuó el barrido, y el rectángulo superior ilustra la variación perfilométrica.

3.3 LIMPIEZA Y DECAPADO

Se realizó una limpieza ultrasónica de las probetas con solución de trifosfato de sodio, durante 180 segundos para retirar los restos de grasas que pudieran presentar.

Posteriormente se realizó un decapado al grupo de probetas que se prepararon para ser anodizadas y a las preparadas para ser recubiertas con cerámica bioactiva. En una solución de NH_3 y HF para remover la capa de TiO_2 formado naturalmente y preparar la superficie de las probetas para el proceso de formación de capa de TiO_2 uniforme.

3.4 OXIDACIÓN ANÓDICA

El proceso de oxidación anódica se llevó a cabo con un electrolito de H_2SO_4 y ácido oxálico, empleando una diferencia de potencial de 25V por un periodo de tiempo de 3 minutos, en el que las probetas de Ti6Al4V-ELI trabajaron como electrodo de trabajo (ánodo) y se emplearon como contra-electrodos barras planas de Ti de alta pureza.

Posteriormente se hizo una limpieza en metanol seguido por una limpieza ultrasónica. Se realizó un sellado en agua deionizada a 80°C , por un periodo de tiempo de 1 minuto. Finalmente se realiza un secado al aire.

Al llevarse a cabo el proceso de oxidación anódica, se obtuvieron probetas como se muestran en la Figura 10.

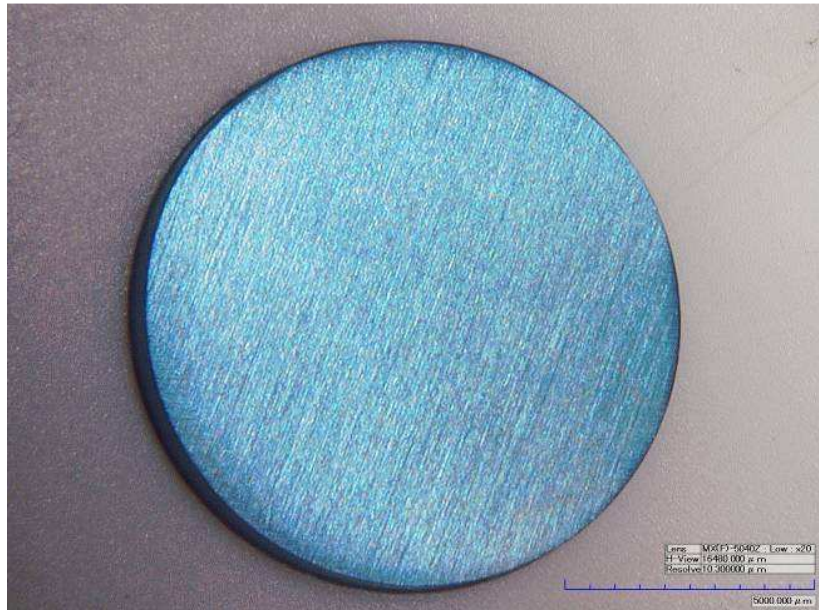


Figura 10 Probetas anodizadas en solución de ácido sulfúrico y ácido oxálico. 20X. El autor

3.5 RECUBRIMIENTO CON CERÁMICA BIOACTIVA

Para realizar el recubrimiento, se llevó a cabo una metodología desarrollada en la tesis de maestría Oviedo [50]. Manteniendo un control de temperatura ($140^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$).

En el proceso de recubrimiento se realizó una fosfatación en una solución de ácido ortofosfórico y H_2O_2 , durante 3 horas a 80°C . Posteriormente se hizo circular una solución con los reactivos en precursores en suspensión sobre probetas de la aleación Ti6Al4V-ELI

Como reactivos precursores para la precipitación de cerámica bioactiva, se emplearon Dihidrogenofosfato de Potasio (KH_2PO_4 en concentraciones de 3×10^{-4} M) y Cloruro de Calcio Dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, con una concentración 5×10^{-4} M).

Una vez terminado el flujo, se llevó a un sistema de secado durante 12 horas a una temperatura de 100°C para obtener probetas como se indica en la Figura 11.



Figura 11 Probetas recubierta con cerámica bioactiva (HA) mediante precipitación directa en solución acuosa. El autor.

3.6 CULTIVO CELULAR – MEDIO DE CULTIVO

Este ensayo fue llevado a cabo para conocer el perfil de crecimiento de las células HOS (ATCC CRL-1543), y determinar su fase de crecimiento exponencial. Las HOS, fueron cultivadas en medio RPMI-1640, cuya composición se describe en la Tabla 7, suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFBi), en una atmósfera de 5% CO₂ y 95% de aire a 37°C.

Para conocer la fase de crecimiento exponencial de las HOS se realizó la curva de crecimiento colocando 25000 células/mL de HOS en una caja de cultivo de 24 pozos por un período de tiempo de 7 días.

Diariamente las células fueron desprendidas con 0.25% de Tripsina-EDTA y contadas microscópicamente, por duplicado, en una cámara de Neubauer utilizando 0.25% de eosina amarilla en buffer salino-fosfato (PBS) pH= 7,2.

Tabla 6. Composición del medio de cultivo RPMI-1640

COMPONENTE	CANTIDAD (g/L)	COMPONENTE	CANTIDAD (g/L)
L-Arginina	0.2	L-Valina	0.02
L-Asparagina (anhidra)	0.05	Biotina	0.0002
L-Ácido Aspártico	0.02	Colina cloruro	0.003
L-Cystina-2HCl	0.0652	Ácido Fólico	0.001
L-Ácido Glutámico	0.02	Myo-Inositol	0.035
L-Glutamina	0.3	Niacinamida	0.001
Cisteína	0.01	D-Ácido pantoténico (hemicalcio)	0.00025
L-Histidina	0.015	PABA	0.001
L-Prolina hidróxida	0.02	Piridoxina	0.001
L-Isoleucina	0.05	Riboflavina	0.0002
L-Leucina	0.05	Tiamina*HCl	0.001
L-Lysina.HCl	0.04	Vitamina B12	0.000005
L-Methionina	0.015	Nitrato de calcio*4H ₂ O	0.1
L-Phenylalanina	0.015	Sulfato de magnesio anhidro	0.04884
L-Prolina	0.02	Cloruro de potasio	0.4
L-Serina	0.03	Cloruro de sodio	6.0
L-Treonina	0.02	Fosfato de sodio dibásico (anhidro)	0.8
L-Tryptophan	0.005	D-glucosa	2.0
L-Tyrosina*2Na*2H ₂ O	0.02883	Glutaciona reducida	0.001

3.6.1 Conteo Celular

El conteo celular se realiza en una cámara de Neubauer (ver Figura 12), la cual tiene las siguientes dimensiones:

- Área de conteo $L = 1\text{mm}^2$
- Profundidad de la cámara = 0.1 mm
- Volumen ocupado = 0.1 mm^3

Para llevar a cabo el conteo, se toma un volumen de 0.1 mm^3 de HOS y se depositan en los espacios denotados como A y B en la Figura 12; luego se observa en un microscopio a 100 aumentos y se procede a realizar el conteo de las células respectivamente, en cada uno de sus superficies de conteo (4 cuadrantes identificados con la letra L)

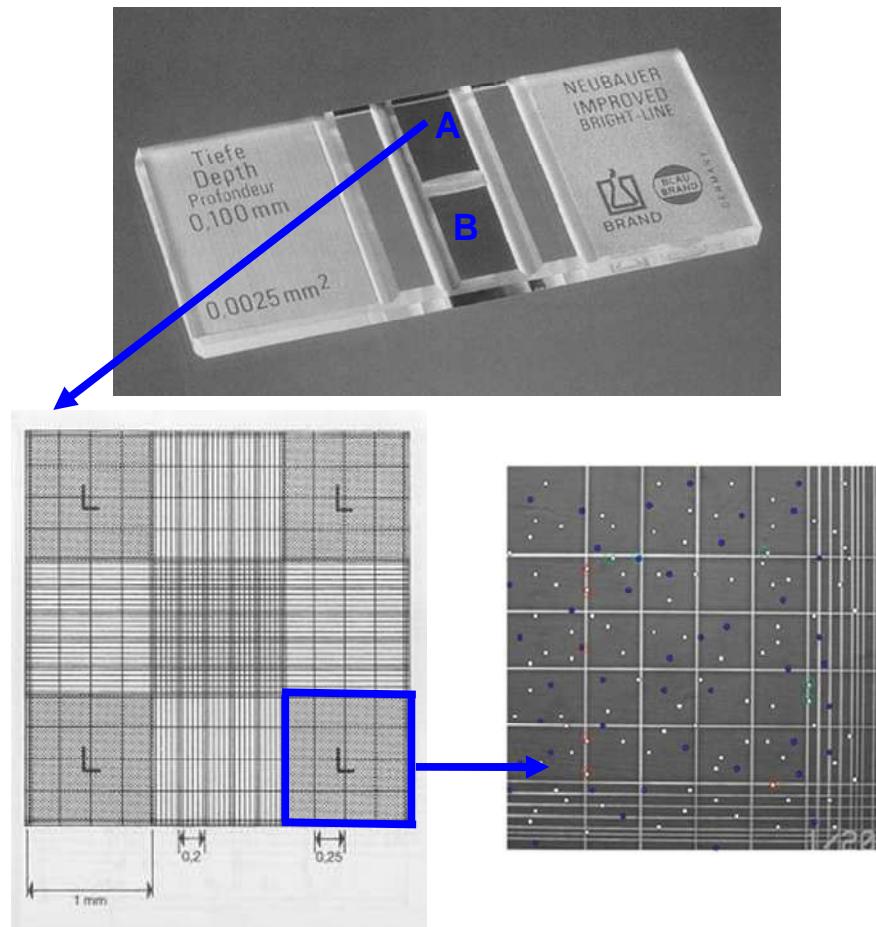


Figura 12. Cámara de Neubauer. <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/contajecelular.htm>

Quando se está realizando el conteo, solo se tienen en cuenta las células que no adsorbieron la eosina amarilla. Puesto que las células que se colorean están muertas y su citoplasma se hace permeable, por lo que penetra este reactivo.

Una vez contabilizadas las células vivas, se emplea la siguiente fórmula para establecer el número de células por mL de solución.

$$\text{células por } \mu\text{L} = \frac{\text{células contadas}}{\text{sup.de conteo}(\text{mm}^2) * \text{profundidad de cámara (mm)} * \text{dilución}} \quad (5)$$

$$\text{células por } \mu\text{L} = \frac{X}{4(\text{mm}^2) * 0.1(\text{mm}) * d} = \frac{10 * X}{4 * d} \quad (6)$$

$$\text{células por mL} = \frac{10000 * X}{4 * d} \quad (7)$$

X = número de células contadas,

d, puede tomar un valor de 1 o 2, de acuerdo con la concentración celular en la superficie de conteo.

3.7 PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD

3.7.1 Toxicidad celular

En el ensayo de toxicidad celular, las probetas anodizadas y no anodizadas fueron pesadas y trasladadas a un tubo de vidrio estéril (Vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, ver Figura 13) con medio RPMI - 1640 suplementado con 10% de SBFi.



Figura 13 Tubos de Vacutainer empleados para pruebas de citotoxicidad. El autor

Para conocer el comportamiento celular se hizo una distribución como se muestra en la Tabla 7 y, se emplearon como parámetros de control:

- Medio de cultivo suplementado y sin suplementar sin probetas
- Iones de aluminio y vanadio en solución

El medio se adicionó teniendo en cuenta la relación peso: volumen de la probeta, 70 mg/ml. Los discos se incubaron a 37°C, 5% CO₂ por 6 meses.

Tabla 7 Distribución de material dentro de tubos de Vacutainer para realización del ensayo de citotoxicidad

TUBO	MATERIAL DEPOSITADO DENTRO DEL VACUTAINER	MEDIO DENTRO DEL VACUTAINER
1	Probeta NO anodizada	RPMI
2	Probeta NO anodizada	RPMI
3	Probeta NO anodizada	RPMI + 10% SBFi
4	Probeta NO anodizada	RPMI + 10% SBFi
5	Probeta Anodizada	RPMI
6	Probeta Anodizada	RPMI
7	Probeta Anodizada	RPMI + 10% SBFi
8	Probeta Anodizada	RPMI + 10% SBFi
9	Solución de Control	RPMI
10	Control Iones Aluminio	RPMI + 10% SBFi
11	Solución de Control	RPMI + 10% SBFi
12	Control Iones Vanadio	RPMI + 10% SBFi

3.7.2 Determinación de la viabilidad celular

Células HOS en fase exponencial de crecimiento fueron colocadas en 2 placas de cultivo de 96 pozos con diferentes diluciones seriadas 1:3 con cada una de las suspensiones de HOS, e incubadas durante 72 horas. En la Figura 14, se puede observar la distribución tenida en cuenta para las pruebas de viabilidad celular. Los pozos coloreados en amarillo, representan pozos de control, mientras que los que no posee control, es donde se colocaron sobrenadantes de los tubos de Vacutainer que contenían a las probetas anodizadas y no anodizadas.

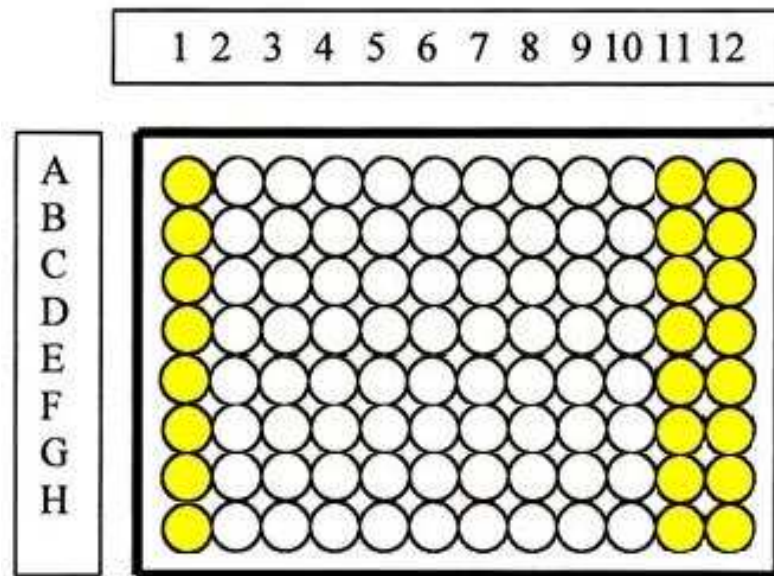


Figura 14 Placa de cultivo de 96 pozos. Los pozos en color amarillo, fueron tomados como puntos de control dentro de la placa misma. El autor

La viabilidad celular puede ser medida utilizando técnicas colorimétricas de reducción de sales de tetrazolium como **INT** (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium cloruro), **XTT** (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) o el **MTT** (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol).

La viabilidad celular se determinó mediante la reducción metabólica del (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul llamado **formazán**, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Este método es muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de **formazán** producido. [32]

Para determinar la cantidad de cristales de formazán producidos se colocó una concentración de 25000 cel/mL de HOS por pozo.

Los cristales de **formazán**, producidos por la reducción del MTT por las mitocondrias de las células HOS, fueron solubilizados con dimetilsulfoxido (DMSO). La densidad óptica (OD) de cada pozo fue medida utilizando un lector de microplacas con una longitud de onda (λ) de 580 nm.

El porcentaje de viabilidad y de inhibición celular fue calculado usando la ecuación (4) y el de muerte celular mediante la (5) respectivamente

$$\%Viabilidad = \frac{OD \text{ células tratadas}}{OD \text{ células control}} * 100 \quad (4)$$

$$\% Inhibición = \left(1 - \frac{OD \text{ células tratadas}}{OD \text{ células control}} \right) * 100 \quad (5)$$

La actividad citotóxica de los iones fue calculada utilizando análisis de regresión sigmoideal con el programa MsXlfit™ (ID Business Solution, Guildford, UK) y fue expresada como **concentración citotóxica, CC**, que es la dosis capaz de matar el 50% (CC₅₀) o el 90% (CC₉₀) de las células respectivamente.

Por medio de este software, se obtiene la curva de %Inhibición vs concentración (ver Figura 15), para cada uno de los elementos analizados, en la cual por medio de regresión sigmoideal se determina la CC₅₀ y CC₉₀, respectivamente

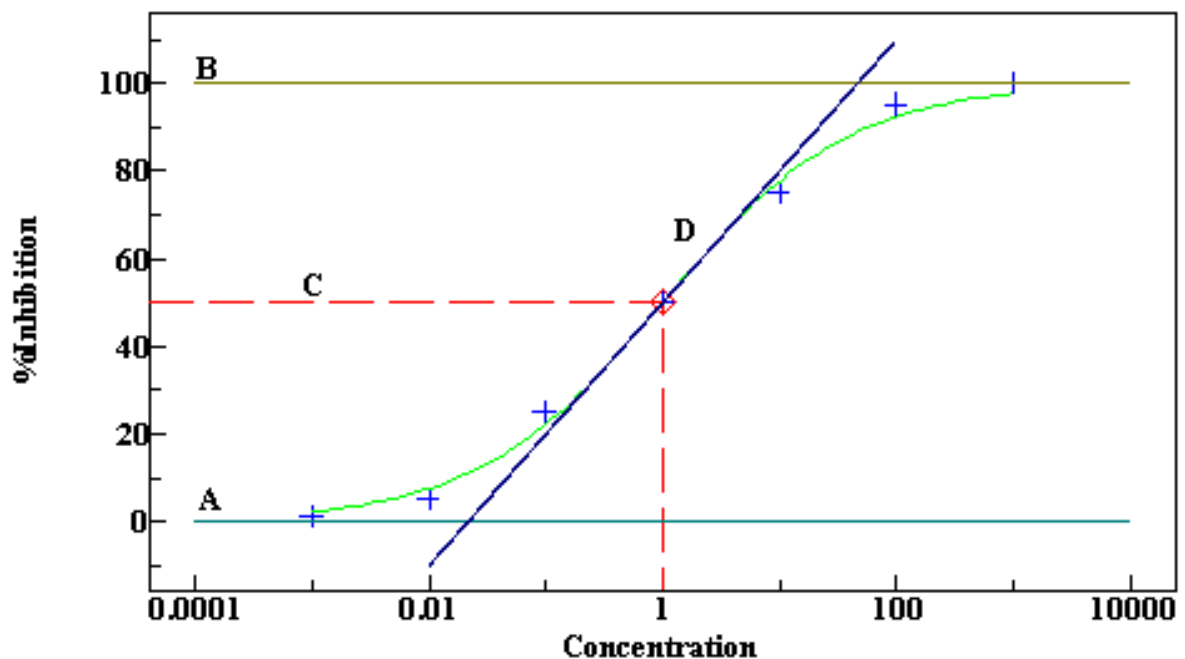


Figura 15 % Inhibición vs Concentración en viabilidad celular. Software MSXlfit ®. Laboratorio de Quimioterapia, Centro de Investigaciones de enfermedades tropicales, CINTROP

3.7.3 Determinación de la liberación de iones

En el ensayo de liberación de iones, probetas anodizadas y no anodizadas fueron pesadas y trasladadas a un tubo de vidrio estéril Vacutainer con medio RPMI - 1640 suplementado con 10% de SBFi.

El medio se adicionó teniendo en cuenta la relación peso: volumen de la probeta, 70 mg/ml. Los discos se incubaron a 37°C, en una atmósfera de 5% CO₂ por 6 meses.

Para la determinación de la liberación de iones se empleó la técnica de espectrometría de plasma de masas (*ICP*), tomando como base las normas **ASTM D5184** (Standard Test Methods for Determination of Aluminum and Silicon in Fuel Oils by Ashing, Fusion, Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, and Atomic Absorption Spectrometry) y **ASTM D5863** (Standard Test Methods for Determination of Nickel,

Vanadium, Iron, and Sodium in Crude Oils and Residual Fuels by Flame Atomic Absorption Spectrometry), mediante un Espectrómetro de plasma masas Elan 6000G.

Para determinar la cantidad de iones de vanadio, la muestra debe ser acidulada con 1% de ácido nítrico de alta pureza y se emplea la ecuación (6):

$$\text{concentración de la especie, } \frac{mg}{kg} = \frac{(C*V*F)}{W} \quad (6)$$

C = concentración de la especie, corregida pa ser expresada en $\mu\text{g} / \text{mL}$

V = volumen de la solución de ensayo, mL

F = factor de dilución, vol/vol o masa/masa

W = masa de la especie, g

Para determinar la cantidad de iones de aluminio, la muestra debe ser acidulada con ácido nítrico de alta pureza y se emplea la ecuación (7):

$$\text{concentración de la especie, } \frac{mg}{kg} = \frac{(100*C*d)}{M} \quad (7)$$

M = masa de la especie, g

d = relación de dilución

C = concentración del aluminio en mg / L en la curva de calibración respectiva

3.8 ADHESIÓN CELULAR

3.8.1 Recuento microscópico

Se colocaron probetas de Ti6Al4V-ELI, anodizadas, no anodizadas y recubiertas con

cerámica bioactiva dentro de cajas de Petri, fijadas mediante gotas de agua, en una distribución como se observa en la Figura 16. Las probetas se encuentran identificadas con la letra A. Posteriormente, se depositó una suspensión con una concentración de 4×10^3 células HOS cubriendo la superficie de las probetas como se aprecia en la Figura 16, identificado con la letra B.

Las células fueron incubadas durante 9, 24, 48 y 72 h a 37°C en una atmósfera de 5% CO_2 y 95% de humedad. Las células fueron desprendidas con tripsina-EDTA y contadas microscópicamente. Para cada tiempo se utilizaron dos discos y los conteos se realizaron por duplicado. Los resultados fueron expresados como número de células en cada disco.

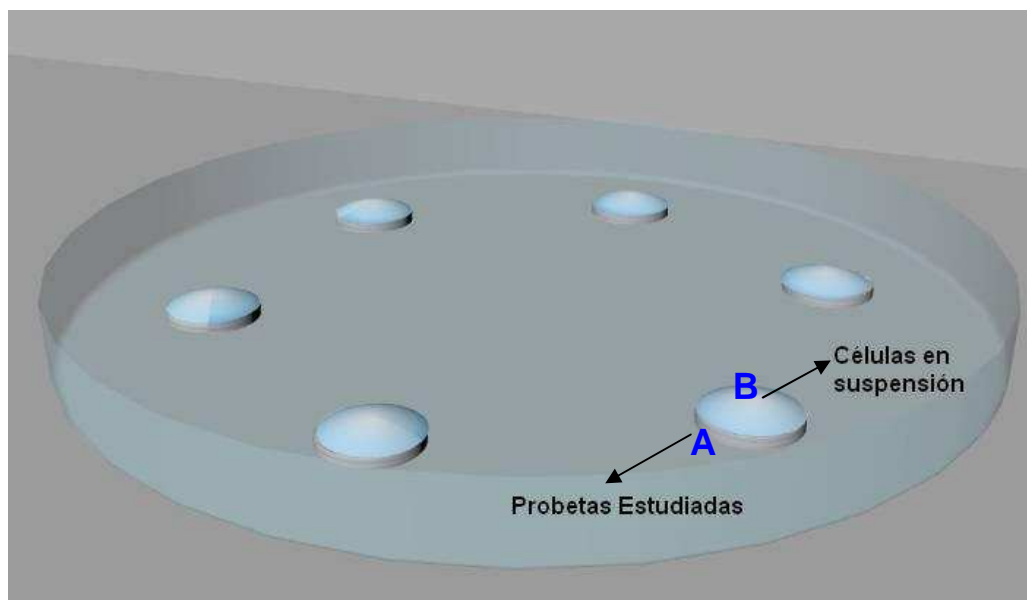


Figura 16 Distribución de probetas dentro de caja de petri para recuento microscópico. El autor

Para conocer el número de HOS adheridas por probeta se tuvo en cuenta:

Retirar el medio de la probeta, se adicionó **100 μL** de tripsina, incubándose a 37°C , con una atmósfera de 5% CO_2 durante 5 minutos

La suspensión total sobre las probetas fue retirada pasado a un vial de 1.5. Se adicionó **100 μ L** de buffer salino-fosfato (PBS); se homogenizó y se mezcló partes iguales de eosina amarilla 0.25% con las células y contar en cámara de Neubauer

Teniendo presente los dos volúmenes de 100 μ L, se tiene un total de 0.2 mL, el cual se convierte en un factor multiplicativo que se adiciona a la ecuación 3, y de esta manera obtener la ecuación 9:

$$\text{células por probeta} = \frac{10000 * X}{4} * 0.2 = 500 * X \quad (8)$$

$$\text{células por probeta} = 500 * X \quad (9)$$

3.8.2 Microscopía de Epifluorescencia.

Se utilizó la técnica de epifluorescencia para determinar la morfología que van a presentar las HOS sobre los diferentes sustratos. Esta técnica consiste en que las moléculas fluorescentes absorben la luz de una determinada longitud de onda y emiten luz de otra longitud de onda más larga.

Si un componente fluorescente es iluminado a su longitud de onda absorbente y visualizado a través de un filtro que sólo permita pasar la luz de longitud de onda igual a la de la luz emitida, el componente aparece brillante sobre un fondo oscuro.

De tal manera, las especies que quieren ser observadas deben ser coloreadas con fluorocromos (colorante fluorescente) para permitir ver su comportamiento.

Para llevar a cabo las pruebas de epifluorescencia se retiró el medio de la probeta. Se adicionó **100 μ L** de PBS. Posteriormente se adicionó 100 μ L de RPMI al 10% con 15 μ M de ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl, Sigma-Aldrich, USA) e incubar a 37°C, en

una atmósfera con 5% CO₂ durante 1 hora; para marcar el citoplasma. Seguido de 50 µL de RPMI al 10% con 0.1 µg/mL de Hoechs 33342 e incubar a 37°C, en una atmósfera con 5% CO₂ durante 5 minutos; para marcar el núcleo. Luego se retiran estos fluorocromos y se hacen dos lavados con 100 µL de PBS, al cabo de los cuales se adicionó 100 µL de RPMI 10% y 2 % de formalina e incubar durante 10 minutos a 37°C, en una atmósfera con 5% CO₂. Posteriormente se lava el exceso de PBS y adicionar una gota de glicerina tamponada y, se colocan en una laminilla circular y observar al microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E4000) utilizando el filtro UV2A (Ex= 330-380, DM= 400, BA= 420).

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL

La caracterización superficial de las probetas sin anodizado, anodizadas y con recubrimiento de cerámica bioactiva, se realizó mediante microscopía óptica cofocal 3D, a aumentos de 20X y 700X. La evaluación de la morfología y la rugosidad de las probetas mencionadas anteriormente, se realizaron mediante reconstrucciones tridimensionales de las superficies. Los resultados respectivos, se presentan a continuación.

4.1.1 Probetas sin recubrimiento

En las Figuras 17 y 18, se aprecian los cambios topográficos provocados por el proceso de pulido mecánico manual de la superficie con papel abrasivo #1500.

La Figura 19 describe la reconstrucción 3D, realizada para establecer la rugosidad promedio del sustrato pulido para el primer grupo. La rugosidad promedio (Ra) obtenida fue de 6.67 μm , con un máximo de 10.433 μm y un mínimo de 4.1474 μm , con una desviación estándar (DS) de 1.7825 μm .

Los valores respectivos de las rugosidades para el grupo de probetas se muestran en la Tabla 8.

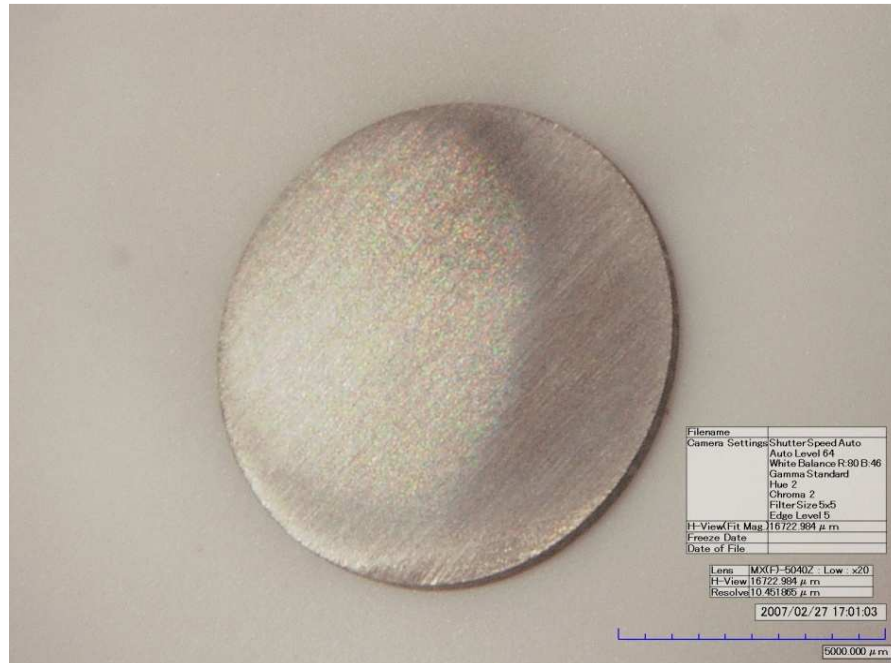


Figura 17 Probeta de Ti6Al4V-ELI después de pulido mecánico. Papel carburo de silicio #1500, 20X. El autor.

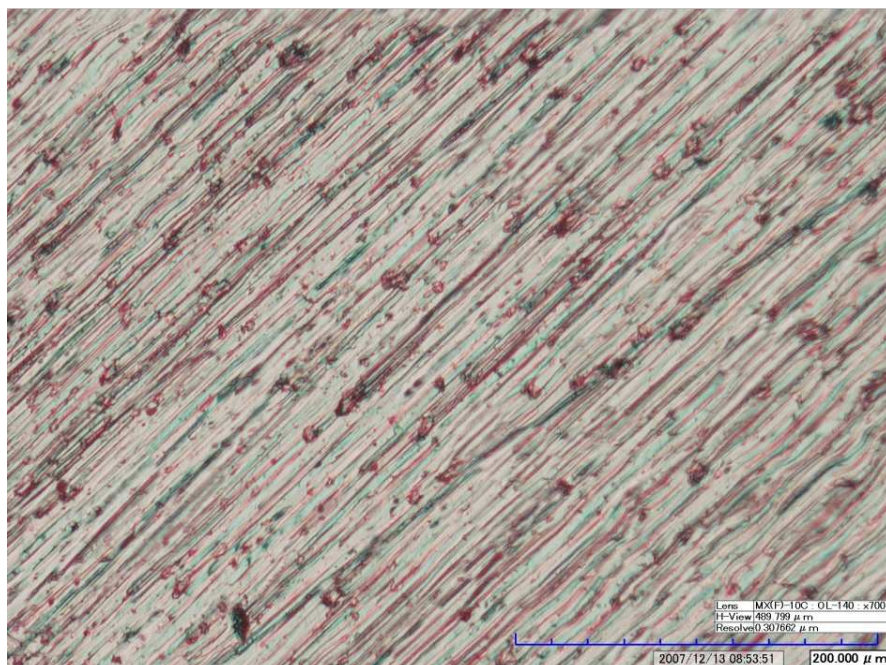


Figura 18 Probeta de Ti6Al4V-ELI después de pulido mecánico. Detalle de estado superficial. 700X. El autor

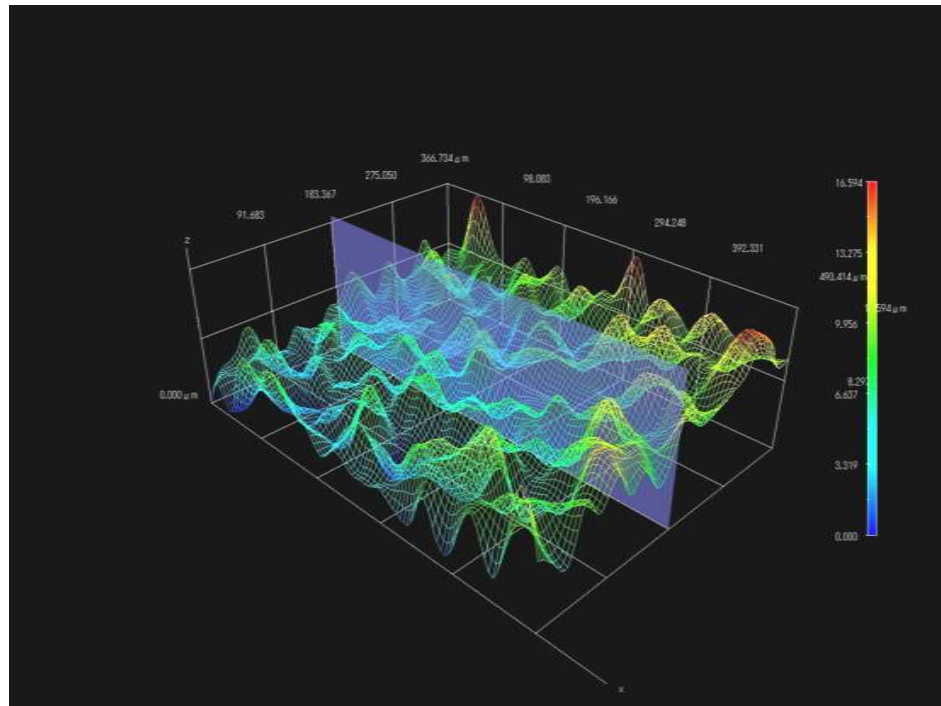


Figura 19 Reconstrucción 3D probeta de Ti6Al4V-ELI, Pulida mecánicamente papel carburo de silicio #1500. 700X. El autor

Tabla 8 Rugosidad de probetas no anodizadas (codificadas con NA)

PROBETAS	Rugosidad (Ra μm)	DS
NA1	5.13	0,46363
NA2	10.43	0,40301
NA3	7.77	0,84799
NA4	5.29	0,49848
NA5	4.15	1,16193
NA6	5.30	0,79197
NA7	5.80	0,90315
NA8	7.18	0,46776
NA9	6.88	0,93873
NA10	6.42	0,41716
NA11	6.16	0,61759
NA12	9.06	0,54714

4.1.2 Probetas Anodizadas

Las probetas anodizadas (A), en una solución de H_2SO_4 ; presenta una superficie homogénea, como se puede apreciar en la Figura 20, con zonas homogéneas que se observan en la Figura 21; presentando R_a de $4.403 \mu m$, como se puede apreciar en su reconstrucción 3D respectiva (Figura 22). En la que se presenta máximos con valores de $7.14 \mu m$ y mínimos de $3.26 \mu m$, respectivamente.

Los valores respectivos de las rugosidades para el grupo de probetas se muestran en la Tabla 9.

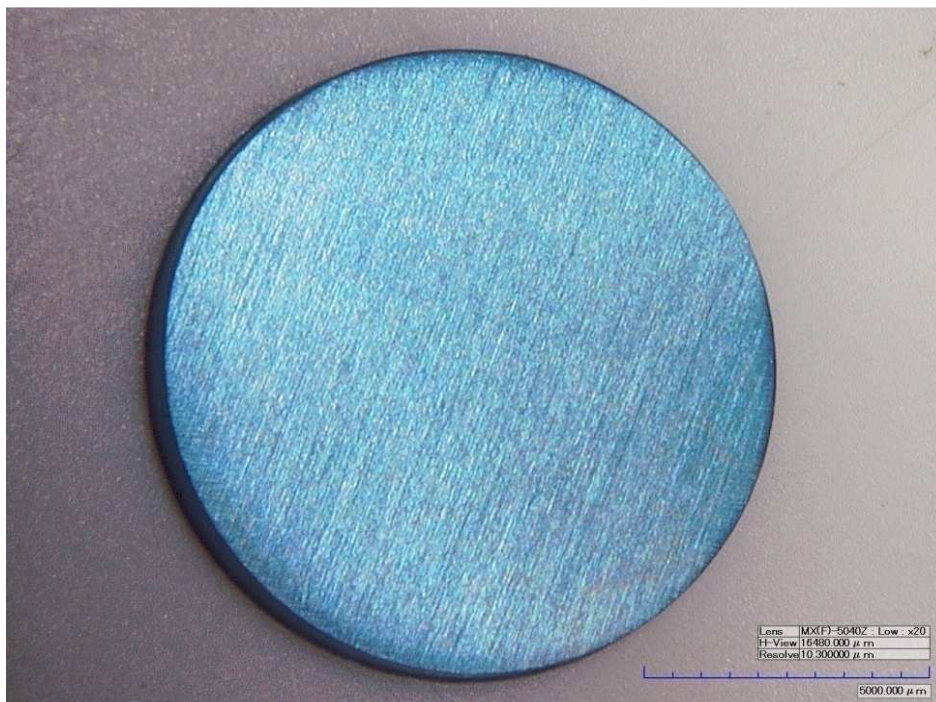


Figura 20 Probeta de Ti6Al4V-ELI. Pulida mecánicamente papel carburo de silicio #1500, Anodizada en solución de H_2SO_4 . 20X. El autor

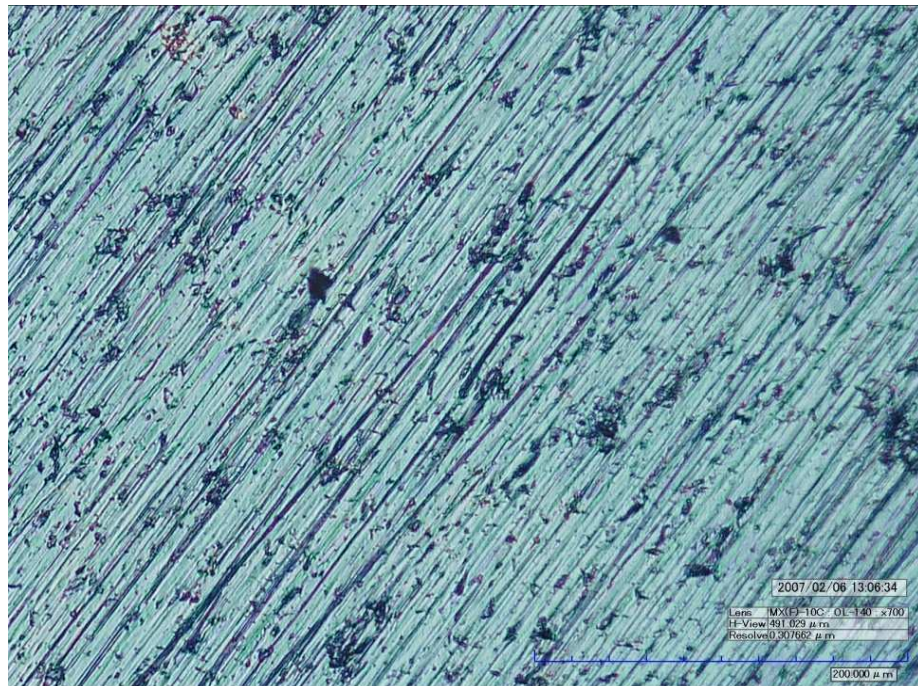


Figura 21 Probeta de Ti6Al4V-ELI. Pulida mecánicamente papel carburo de silicio #1500, Anodizada en solución de H_2SO_4 . Detalle de estado superficial 700X. El autor

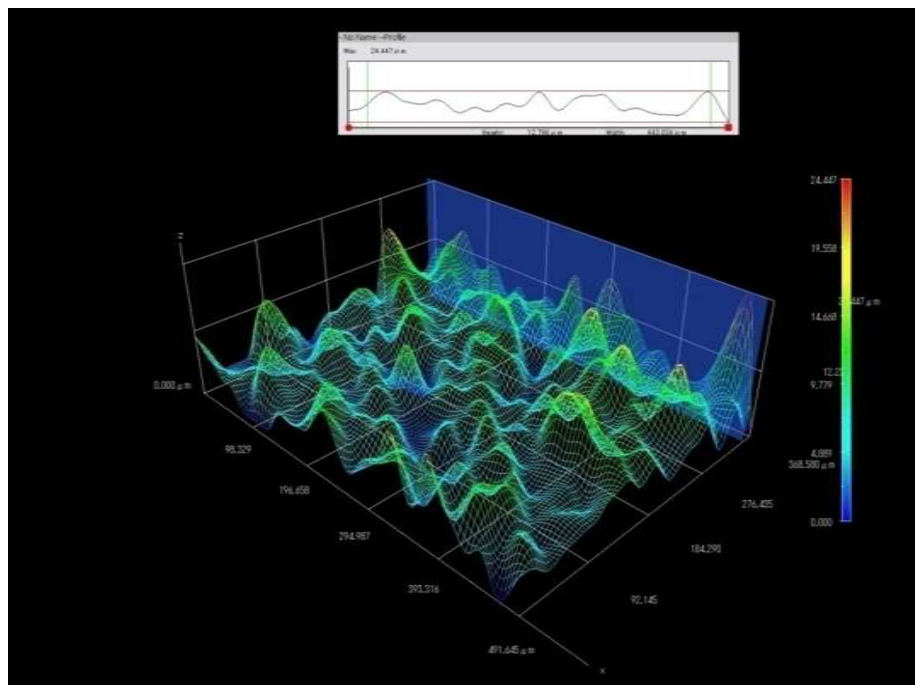


Figura 22 Reconstrucción 3D probeta de Ti6Al4V-ELI. Pulida mecánicamente papel carburo de silicio #1500, Anodizada en solución de H_2SO_4 . 700X. El autor

Tabla 9 Rugosidad de probetas anodizadas (codificadas con A)

PROBETAS	Rugosidad (Ra μm)	DS
A1	3.99	0,53952912
A2	6.50	0,92276306
A3	4.74	0,53879495
A4	4.03	0,30203477
A5	7.64	1,49922202
A6	5.61	1,82244113
A7	4.83	0,59657355
A8	4.51	1,02229725
A9	3.78	0,52258173
A10	5.60	0,08225975
A11	4.69	0,27801379
A12	4.73	0,21406775

4.1.3 Probetas Recubiertas con cerámica bioactiva

El recubrimiento con cerámica bioactiva, fue obtenido a 140 °C dentro de un rango de pH de 10-11, puede ser observado en las Figuras 23, y 24. En la Figura 24 se puede observar la presencia de poros distribuidos uniformemente sobre la superficie del recubrimiento,

En la Figura 25, se presenta la reconstrucción 3D para el recubrimiento, en la que se puede evidenciar una superficie relativamente homogénea pese a la presencia de los poros. La rugosidad promedio para R22 fue de 4.79 μm , presentando un valor máximo de 5.46 μm y un mínimo de 4.07 μm ; con una desviación estándar de 0,69634761.



Figura 23 Probeta de Ti6Al4V-ELI. Pulida mecánicamente papel carburo de silicio #600, Recubierta con cerámica bioactiva. 20X. El autor

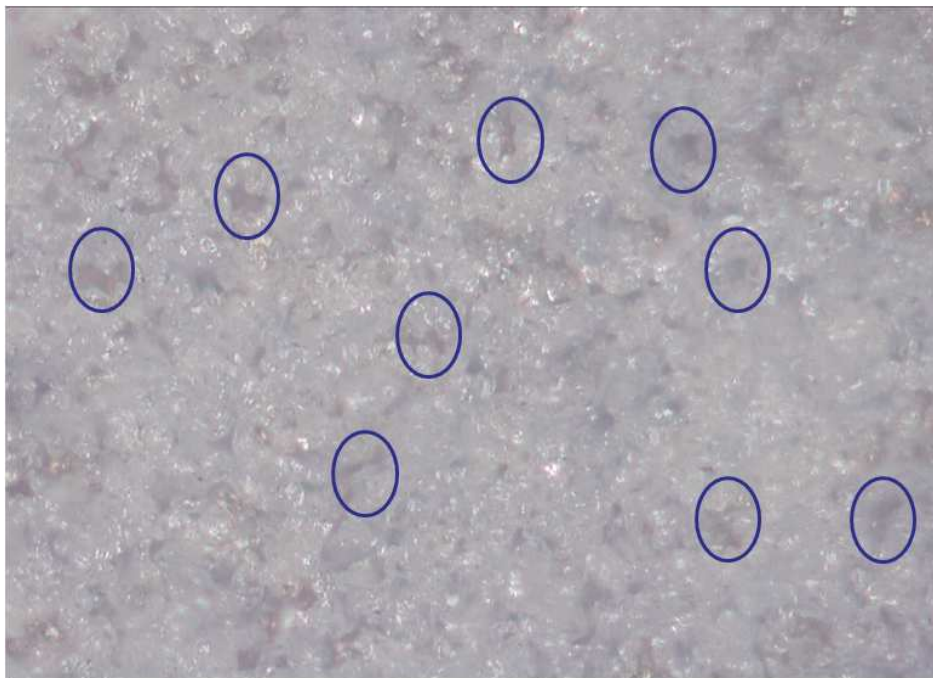


Figura 24 Probeta de Ti6Al4V-ELI. Pulida mecánicamente papel carburo de silicio #600, Recubierta con cerámica bioactiva. Detalle de estado superficial 700X. El autor

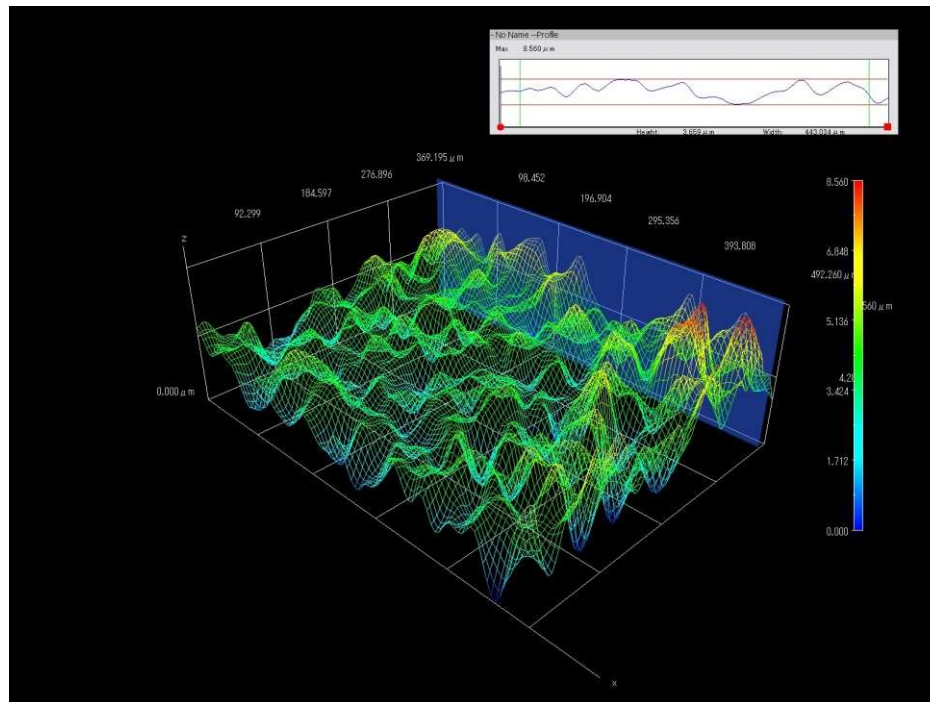


Figura 25 Reconstrucción 3D probeta de Ti6Al4V-ELI. Pulida mecánicamente papel carburo de silicio #600, Recubierta con cerámica bioactiva 700X. El autor

Tabla 10 Rugosidad de probetas recubiertas con cerámica bioactiva (codificadas con R)

PROBETAS	Rugosidad (Ra μm)	DS	PROBETAS	Rugosidad (Ra μm)	DS
R1	7.78	0,62745518	R14	5.65	0,70405966
R2	9.29	1,37004866	R15	9.41	2,48742839
R3	11.24	0,16772994	R16	6.55	0,86263163
R4	10.51	1,88796186	R17	7.16	0,39585350
R5	5.98	1,08518816	R18	8.16	0,39585351
R6	4.89	0,02516611	R19	6.25	1,52880127
R7	7.24	1,52700142	R20	7.25	1,52880127
R8	7.60	0,79525677	R21	6.80	1,15526332
R9	10.86	2,04431733	R22	4.79	0,69634761
R10	9.07	1,95041021	R23	8.55	3,12030447
R11	11.72	1,27516012	R24	8.83	1,62009259
R12	6.47	1,19441757	R25	6.06	0,40066611
R13	10.04	3,92382466	R26	6.30	0,50520623

Según los valores de rugosidad para cada una de las probetas analizadas, presentaron una distribución superficial como se indica en la Tabla 11

Tabla 11 Rugosidad de probetas según su tratamiento superficial

PROBETAS	Ra (μm) +/- DS	R min	R max
No Anodizadas (NA)	6.63 +/- 1.78	4.14 +/- 1.78	10.43 +/- 1.78
Anodizadas (A)	4.40 +/- 1.16	3.26 +/- 1.16	7.14 +/- 1.16
Recubiertas con HA (R)	7.86 +/- 1.95	4.79 +/- 1.95	11.72 +/- 1.95

A las probetas recubiertas con cerámica bioactiva se les determinó su composición mediante DRX. Al observar su difractograma (ver figura 26), los recubrimientos presentan picos representativos de una fase cristalina HA, lo cual se puede evidenciar por picos característicos de alta intensidad; y se encontró fases secundarias de presencia de amorfos en el cual el más representativo es la Monetita (DCPA)

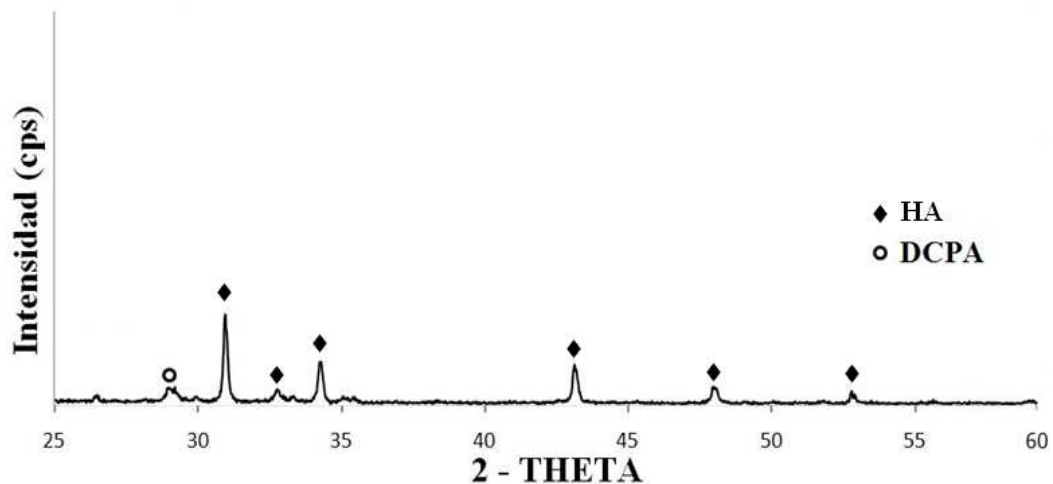


Figura 26 Difractograma obtenido para las probetas recubiertas con cerámica bioactiva.

La caracterización química realizada por difracción de rayos X (DRX), se resume en la Tabla 12, en la que además se presenta el porcentaje de las fases presentes y de cristalinidad de los recubrimientos, se calculó mediante el software *Powder X*.

La cristalinidad de los recubrimientos se calculó empleando la ecuación 10 [33, 34].

$$\text{---} \quad (10)$$

En la que, A_c es el área bajo los picos cristalinos de la fase de interés y A_t es el área total bajo el difractograma analizado, es decir la suma de las áreas bajo los picos cristalinos y los picos amorfos.

Tabla 12 Resultados caracterización química por difracción de rayos X, para las probetas recubiertas

FASES PRESENTES	FORMULA	RELACIÓN Ca/P	% FASES	% CRISTALINIDAD HA
HA (hidroxiapatita)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67	68	89.92
D CPA (Monetita)	CaHPO_4	1	9	

4.2 CULTIVO CELULAR

El comportamiento de las células está condicionado por las características ambientales que presente el entorno o medio en el cual son cultivadas. Por tal motivo, se determinó mediante curva de crecimiento celular para las HOS, el período en el cual se encuentran en fase exponencial. En la Tabla 13 se presentan los valores obtenidos por conteo microscópico para la elaboración de la curva de crecimiento de células HOS, teniendo en cuenta la ecuación (1), la cual se puede observar en la figura 27.

Tabla 13. Conteo microscópico para elaboración de curva de crecimiento de células HOS

Día	Ensayo	células contadas				células/ml	Promedio	DS
0						50000	50000	0
1	M	7	1	0	5	65.000	72.500	11.902
		4	3	2	5	70.000		
	CM	5	5	3	5	90.000		
		3	1	6	3	65.000		
2	M	9	8	10	9	180.000	183.750	11.087
		10	11	9	10	200.000		
	CM	7	11	10	7	175.000		
		9	11	6	10	180.000		
3	M	20	20	28	25	465.000	440.000	54.006
		17	23	15	18	365.000		
	CM	33	23	23	19	490.000		
		23	23	21	21	440.000		
4	M	40	28	33	30	655.000	683.750	36.142
		35	32	22	42	655.000		
	CM	42	33	25	39	695.000		
		47	31	31	37	730.000		
5	M	37	49	45	40	855.000	915.000	92.014
		57	43	41	68	1.045.000		
	CM	32	48	46	43	845.000		
		47	48	40	48	915.000		
6	M	41	30	39	52	810.000	870.000	107.781
		44	37	52	46	895.000		
	CM	36	33	36	48	765.000		
		60	42	46	54	1.010.000		
7	M	40	43	41	45	845.000	963.750	125.855
		54	28	40	51	865.000		
	CM	45	47	49	74	1.075.000		
		70	69	35	40	1.070.000		

M = muestra**CM** = contramuestra**DS** = desviación estandar

Curva de crecimiento de células HOS

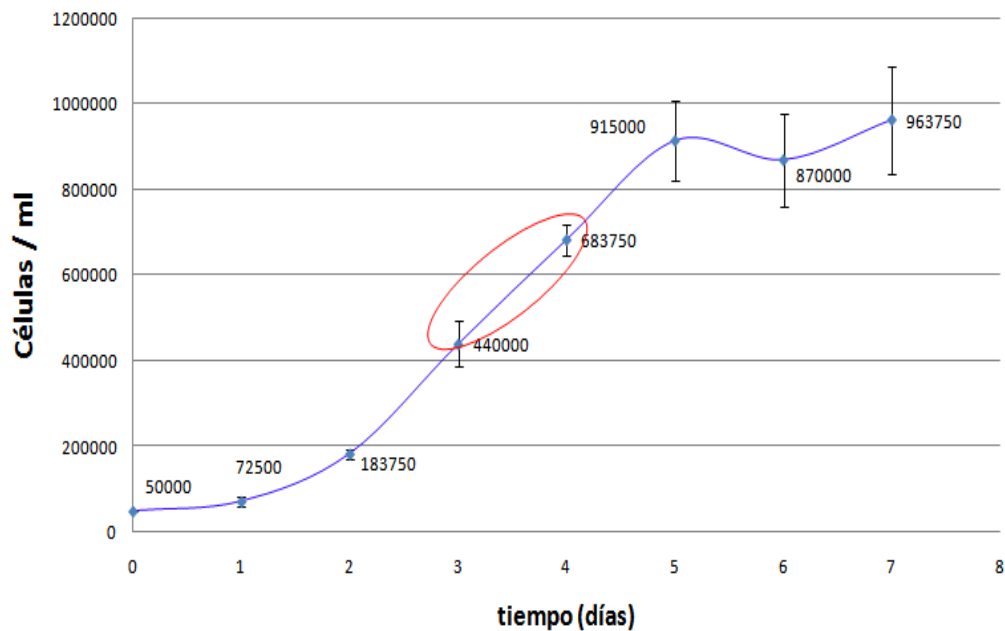


Figura 27 Curva de crecimiento de células HOS (ATCC CRL-1543) en RPMI-1640.

Al analizar la gráfica de crecimiento celular, descrita en la Figura 26, la fase exponencial de crecimiento de las HOS cultivadas en el medio RPMI-1640 se presenta entre el 3^{er} y 4^o día. Lo cual se toma como punto de partida para llevar a cabo los demás ensayos ejecutados en este trabajo

4.3 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

El análisis de los datos de citotoxicidad se realizó por triplicado, teniendo en cuenta el valor de la densidad óptica (OD) para cada uno de los pozos de la placa de cultivo (96 pozos). La distribución de los pozos se puede apreciar en la Tabla 7.

En las tablas 14, 15, 16 y 17 se pueden observar los valores respectivos de la OD para cada uno de los pozos de las placas de cultivo.

Tabla 14 Distribución de resultados de OD, teniendo en cuenta las condiciones analizadas en medio de cultivo. Placa de cultivo 1

	Control Células	TUBO 1			TUBO 3			TUBO 5			Control Células	Control Pozo
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.533	1.437	1.559	1.524	1.422	1.35	1.402	1.583	1.543	1.638	1.632	0.168
B	1.486	1.429	1.471	1.533	1.487	1.459	1.462	1.558	1.552	1.557	1.579	0.183
C	1.519	1.444	1.528	1.427	1.531	1.519	1.408	1.44	1.487	1.489	1.544	0.169
D	1.711	1.54	1.504	1.557	1.503	1.598	1.548	1.486	1.607	1.537	1.606	0.183
E	1.712	1.583	1.712	1.642	1.402	1.48	1.505	1.55	1.688	1.642	1.631	0.221
F	1.548	1.518	1.677	1.566	1.518	1.547	1.571	1.548	1.639	1.605	1.60	0.206
G	1.665	1.561	1.66	1.631	1.591	1.615	1.593	1.557	1.715	1.645	1.668	0.229
H	1.625	1.605	1.789	1.462	1.632	1.648	1.684	1.617	1.706	1.664	1.73	0.53
		TUBO 2			TUBO 4			TUBO 6				

El recuadro de color rojo representa la distribución de los sobrenadantes para las probetas no anodizadas; mientras que el azul para las anodizadas

Tabla 15 Distribución de resultados de OD, teniendo en cuenta las condiciones analizadas en medio de cultivo. Placa de cultivo 2

	Control Células	TUBO 7			TUBO 9			TUBO 11			Control Células	Control Pozo
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.731	1.498	1.404	1.311	1.645	1.682	1.604	1.444	1.524	1.444	1.662	0.156
B	1.763	1.51	1.429	1.455	1.653	1.636	1.625	1.508	1.579	1.559	1.494	0.173
C	1.766	1.602	1.487	1.466	1.559	1.647	1.579	1.573	1.557	1.617	1.635	0.142
D	1.759	1.585	1.596	1.587	1.584	1.646	1.636	1.567	1.465	1.441	1.665	0.153
E	1.726	1.299	1.324	1.441	0.134	0.14	0.136	0.11	0.11	0.121	1.525	0.199
F	1.498	1.271	1.327	1.28	0.869	0.955	0.931	0.106	0.118	0.132	1.528	0.177
G	1.5	1.372	1.376	1.409	1.24	1.201	1.229	0.316	0.328	0.334	1.569	0.192
H	1.509	1.488	1.422	1.32	1.38	1.395	1.393	1.048	1.177	1.268	1.606	0.23
		TUBO 8			TUBO 10 Control Iones Al			TUBO 12 Control Iones V				

El recuadro de color azul representa la distribución de los sobrenadantes para las probetas anodizadas; mientras que el anaranjado para los controles

En las Tablas 14 y 15 los valores que aparecen en la columna 1, 11 y 12 son parámetros de control, empleados para conocer la variación de OD que presentan las células respecto al sustrato donde fueron colocadas (Ti6Al4V).

Dado que, se toma como parámetro de análisis la OD de los sobrenadantes puestos en cada uno de los pozos; a los datos obtenidos se les debe restar el valor de OD de pozos vacíos y de esta forma evitar el error que puede inducir el material de la placa de cultivo. Este parámetro de control está representado por la columna 12.

Posteriormente al corregir los datos con el valor de la placa vacía se toma ahora como parámetro final los valores presentes en las columnas 1 y 11, ver Tabla 16 y 17

Tabla 16 Distribución de resultados de OD, teniendo en cuenta las condiciones analizadas en medio de cultivo. Placa de cultivo 1. Valores corregidos

	Control Células	TUBO 1			TUBO 3			TUBO 5			Control Células	Control Pozo
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.29687	1.20087	1.32287	1.28787	1.18587	1.11387	1.16587	1.34687	1.30687	1.40187	1.39587	
B	1.24987	1.19287	1.23487	1.29687	1.25087	1.22287	1.22587	1.32187	1.31587	1.32087	1.34287	
C	1.28287	1.20787	1.29187	1.19087	1.029487	1.28287	1.17187	1.20387	1.25087	1.25287	1.30787	
D	1.47487	1.30387	1.26787	1.32087	1.26687	1.36187	1.31187	1.24987	1.37087	1.30087	1.36987	
E	1.47587	1.34687	1.47587	1.40587	1.16587	1.24387	1.26887	1.31387	1.45187	1.40587	1.39487	
F	1.31187	1.28187	1.44087	1.32987	1.28187	1.31087	1.33487	1.31187	1.40287	1.36887	1.36387	
G	1.42887	1.32487	1.42387	1.39487	1.35487	1.37887	1.35687	1.32087	1.47887	1.40887	1.43187	
H	1.38887	1.36887	1.55287	1.22587	1.39587	1.41187	1.44787	1.38087	1.46987	1.42787	1.49387	
		TUBO 2			TUBO 4			TUBO 6				

Tabla 17 Distribución de resultados de OD, teniendo en cuenta las condiciones analizadas en medio de cultivo. Placa de cultivo 2. Valores corregidos

	Control Células	TUBO 7			TUBO 9			TUBO 11			Control Células	Control Pozo
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.55325	1.32025	1.22625	1.1325	1.46725	1.50425	1.42625	1.26625	1.34625	1.26625	1.48425	
B	1.58525	1.33225	1.25125	1.27725	1.47525	1.45825	1.44725	1.33025	1.40125	1.38125	1.31625	
C	1.58825	1.42425	1.30925	1.28825	1.38125	1.46925	1.40125	1.39525	1.37925	1.43925	1.45725	
D	1.58125	1.40725	1.41825	1.40925	1.40625	1.46825	1.45825	1.38925	1.28725	1.26325	1.48725	
E	1.54825	1.12125	1.14625	1.26325	-0.0437	-0.0377	-0.0517	-0.0677	-0.0677	-0.0567	1.34725	
F	1.32025	1.09325	1.14925	1.10225	0.69125	0.77725	0.75325	-0.0717	-0.0597	-0.0457	1.35025	
G	1.32225	1.19425	1.19825	1.23125	1.06225	1.02325	1.05125	0.13825	0.15025	0.15625	1.39125	
H	1.33125	1.31025	1.24425	1.14225	1.20225	1.21725	1.21525	0.87025	0.99925	1.09025	1.42825	
		TUBO 8			TUBO 10 Control Iones Al			TUBO 12 Control Iones V				

Para conocer si se presenta o no citotoxicidad se tienen en cuenta los valores enmarcados en los recuadros negros (VA), tomando como parámetro el valor medio de los puntos de control. Si los VA, presentan una diferencia muy marcada respecto al valor medio de los parámetros de control y su magnitud es inferior a 1, indicará que se está presentando muerte celular. Esto sucede porque cuando hay muerte celular, habrá poca producción de formazán, por lo tanto se leerán valores menores de OD. Esto, se evidencia en las diluciones correspondientes a los controles realizados con iones de aluminio y vanadio; las cuales se resaltan en color rojo en la Tabla 17.

Como hubo evidencia de muerte celular en los controles realizados con los iones de aluminio y de vanadio, se realizó una lectura adicional en una placa de cultivo de 96 pozos para determinar la concentración citotóxica (CC_{50} y CC_{90}) para estos iones. Los valores respectivos de OD se pueden observar en las Tablas 18 y 19.

Tabla 18 Distribución de resultados de OD, teniendo presente el efecto de los iones de aluminio, vanadio y el de su medio de suspensión.

	Control Células	IONES ALUMINIO			IONES VANADIO			HNO ₃			Control Células	Control Pozo
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.318	0.083	0.085	0.083	0.085	0.081	0.083	0.084	0.086	0.088	1.232	0.153
B	1.412	0.099	0.103	0.102	0.102	0.099	0.100	0.102	0.103	0.102	1.1416	0.172
C	1.406	0.726	0.637	1.716	0.091	0.088	0.084	0.637	0.613	0.679	1.491	0.146
D	1.357	1.035	0.936	0.947	0.137	0.149	0.131	1.208	1.207	1.321	1.430	0.145
E	1.495	1.238	1.266	1.120	0.371	0.342	0.325	1.410	1.483	1.449	1.521	0.187
F	1.475	1.449	1.333	1.270	0.382	0.360	0.364	1.407	1.472	1.491	1.465	0.167
G	1.542	1.590	1.603	1.491	1.014	1.047	0.923	1.502	1.562	1.609	1.558	0.194
H	1.438	1.427	1.596	1.566	1.307	1.410	1.347	1.523	1.629	1.662	1.566	0.210

Tabla 19 Distribución de resultados de OD, teniendo presente el efecto de los iones de aluminio, vanadio y el de su medio de suspensión. Valores corregidos

	Control Células	IONES ALUMINIO			IONES VANADIO			HNO ₃			Control Células	Control Pozo
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.146	-0.089	-0.087	-0.089	-0.087	-0.091	-0.089	-0.088	-0.086	-0.084	1.060	
B	1.240	-0.073	-0.069	-0.070	-0.070	-0.073	-0.072	-0.070	-0.069	-0.070	1.244	
C	1.233	0.554	0.465	1.544	-0.081	-0.084	-0.088	0.465	0.441	0.507	1.319	
D	1.185	0.863	0.764	0.775	-0.035	-0.023	-0.041	1.036	1.035	1.149	1.258	
E	1.323	1.066	1.094	0.948	0.199	0.170	0.153	1.238	1.311	1.277	1.349	
F	1.303	1.277	1.161	1.098	0.210	0.188	0.192	1.235	1.300	1.319	1.293	
G	1.370	1.418	1.431	1.319	0.842	0.875	0.751	1.330	1.390	1.437	1.386	
H	1.266	1.255	1.424	1.394	1.135	1.238	1.175	1.351	1.457	1.490	1.394	

En las tablas 18 y 19 en los recuadros de colores se pueden apreciar los valores respectivos de OD para los iones de aluminio, vanadio y su medio de suspensión HNO_3 , respectivamente. A partir de los valores de OD se determinó la no viabilidad o porcentaje de inhibición celular y calcular la dosis letal respectiva para cada uno de las condiciones establecidas en la tabla 7 y en el análisis de iones aluminio y vanadio.

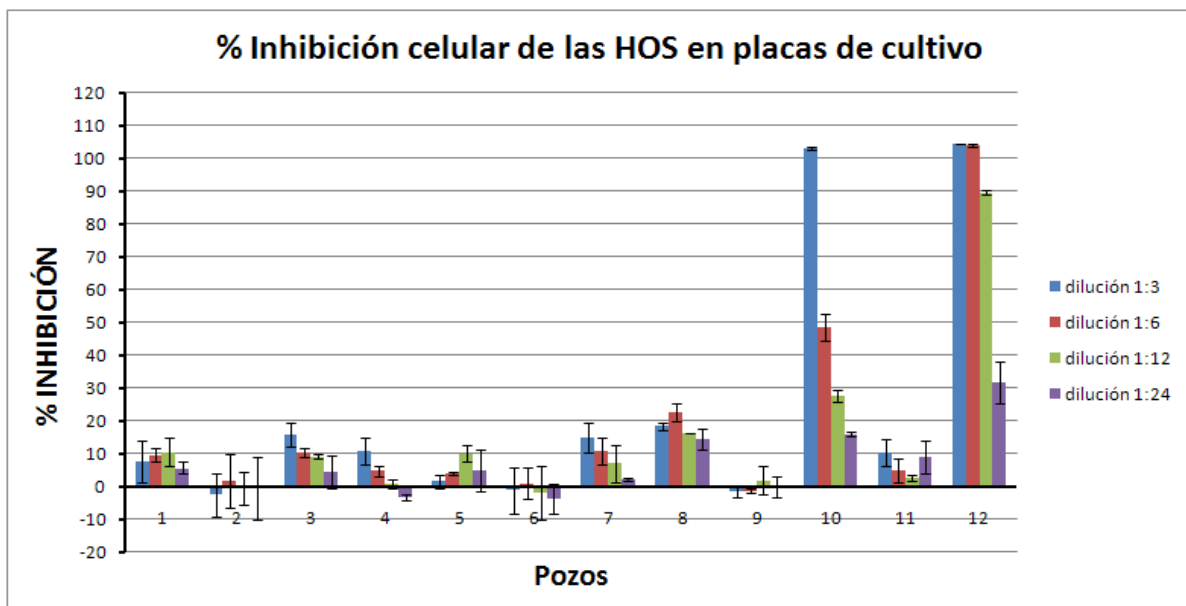


Figura 28. Distribución de no viabilidad celular, HOS, en las placas de cultivo

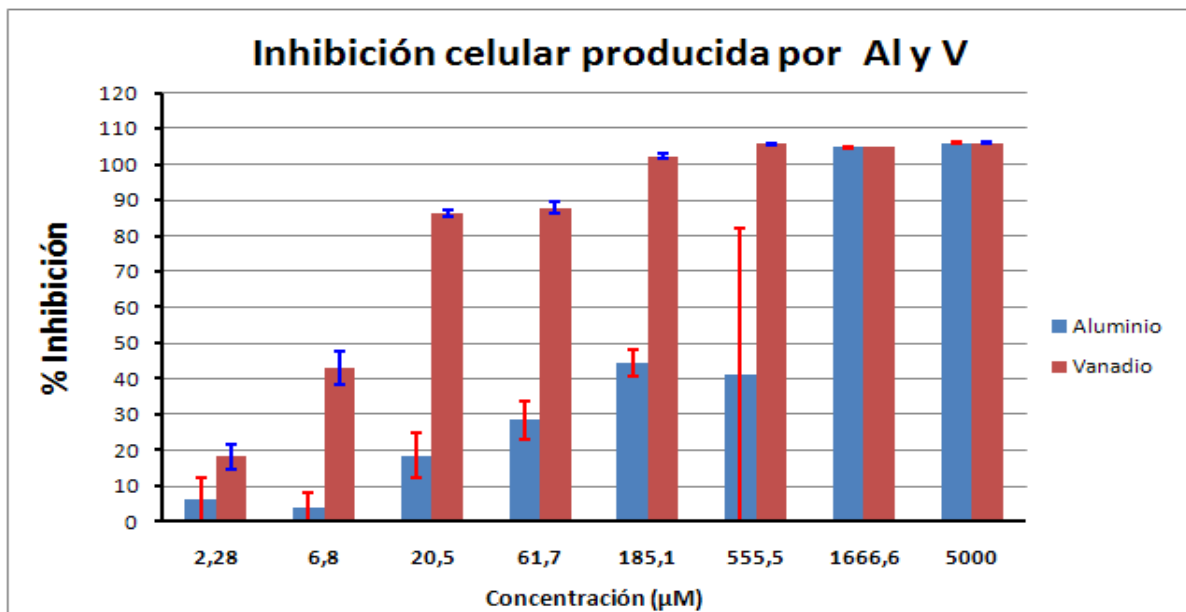


Figura 29 Distribución de inhibición celular por Al y V, para HOS, en las placas de cultivo

En las figuras 30 – 35 se pueden observar las curvas respectivas de concentración citotóxica (CC_{50} y CC_{90}), las cuales son obtenidas mientras la interfaz mostrada en el anexo B

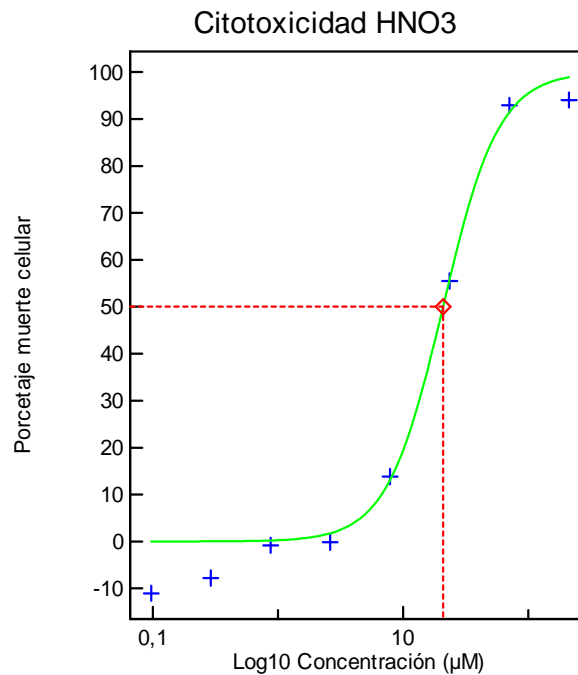


Figura 30 Curva CC_{50} del HNO₃. Software MSXIfit ®. El Autor

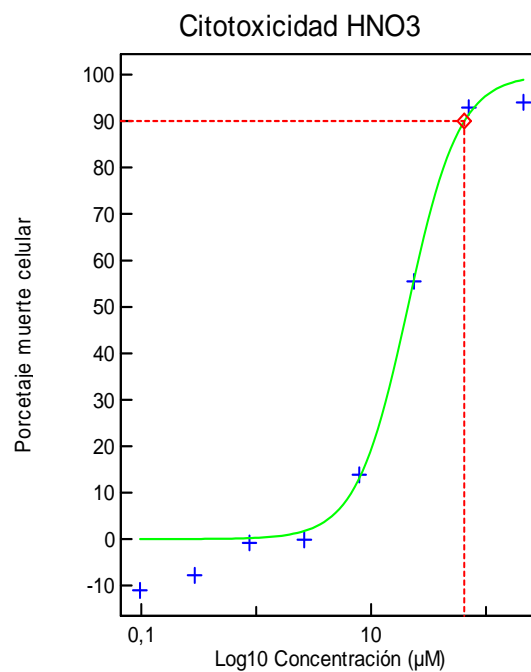


Figura 31 Curva CC_{90} del HNO₃. Software MSXIfit ®. El Autor

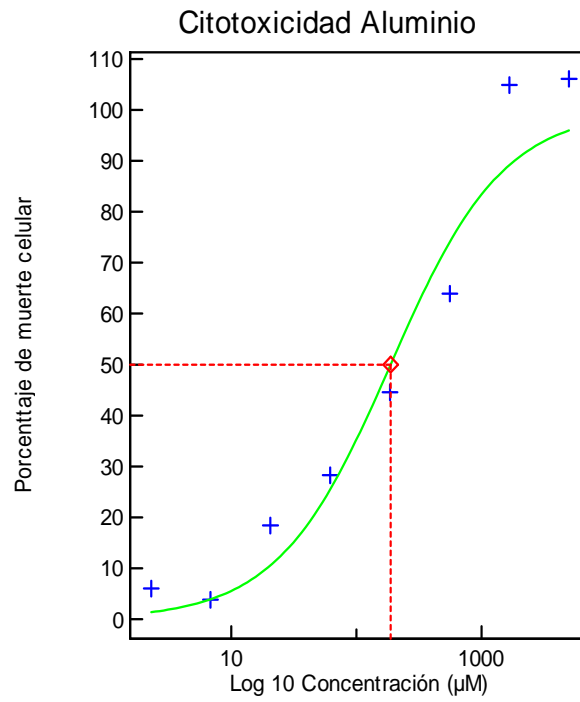


Figura 32 Curva CC_{50} del Aluminio. Software MSXIfit ©. El Autor

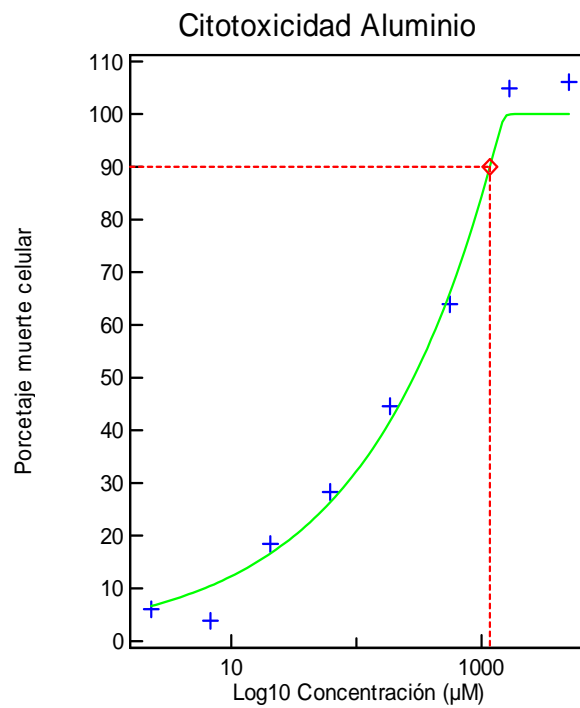


Figura 33 Curva CC_{90} del Aluminio. Software MSXIfit ©. El Autor

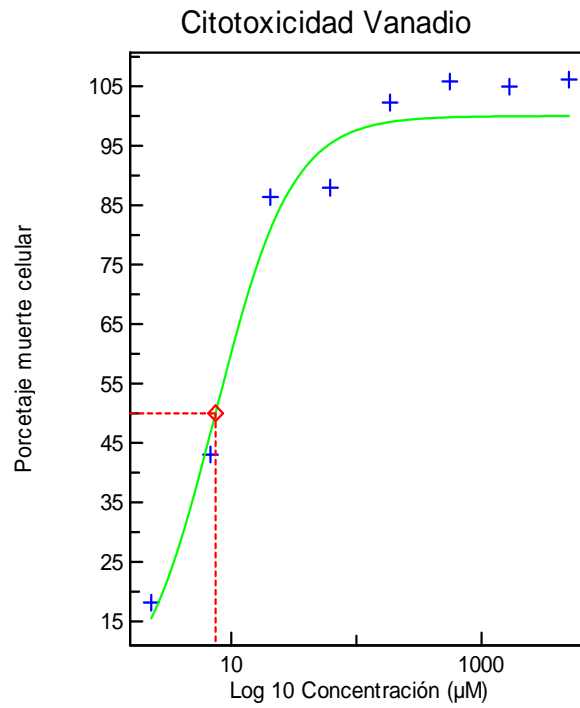


Figura 34 Curva CC₅₀ del Vanadio. Software MSXIfit ®. El Autor

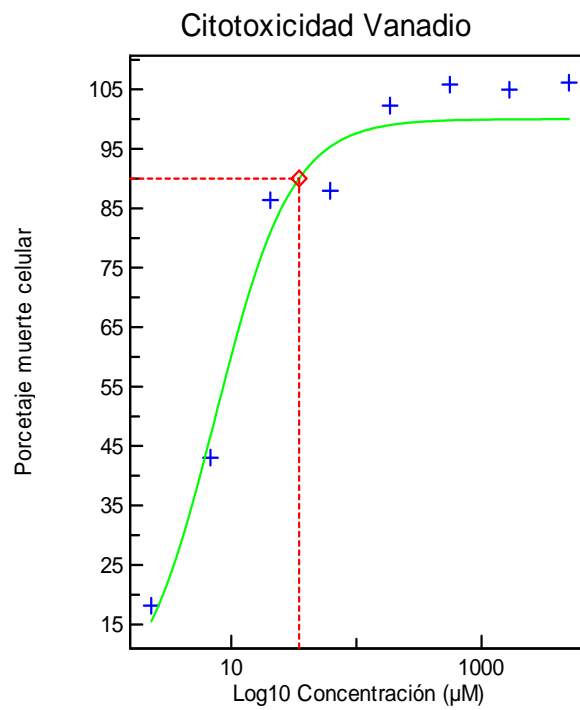


Figura 35 Curva CC₉₀ del Vanadio. Software MSXIfit ®. El Autor

En la Tabla 20 se pueden observar los valores de las concentraciones citotóxicas (CC_{50} y CC_{90}) para los elementos analizados HNO_3 , aluminio y vanadio

Tabla 20 Concentración citotóxicas de los iones aluminio, vanadio y su medio de suspensión, HNO_3

	HNO_3		ALUMINIO		VANADIO	
CC_{50} (± 0.71)	20.87	μM	187.25	μM	7.46	μM
	1.13	ppm	5.05	ppm	0.38	ppm
CC_{90} (± 2.20)	64.61	μM	1165.53	μM	34.53	μM
	4.07	ppm	31.45	ppm	1.76	ppm

4.4 DETERMINACIÓN DE LIBERACIÓN DE IONES

Después de realizar el ensayo de espectrometría de plasma de masas (*ICP-MS*), tomando como blanco una muestra de agua tipo I acidulada con HNO_3 , para los sobrenadantes de RPMI-1640 suplementado con 10% de SBFi en los cuales estuvo inmersas probetas anodizadas, no anodizadas y patrón de control; los resultados se reportan en la Tabla 21.

Tabla 21 Concentración de iones aluminio y vanadio en sobrenadantes. Técnica ICP-MS.

ELEMENTO	BLANCO Agua acidulada	CONTROL	NO ANODIZADAS	ANODIZADAS	RECUBIERTAS
	Concentración ($\mu g / L = ppb$)				
V	<0.080	2.904	3.601	3.076	3.369
Al	<3.508	<3.508	<3.508	<3.508	<3.508
	Concentración (mg /L = ppm)				
Ca	-0.005	3.575	3.234	3.314	3.575

Las muestras fueron codificadas con NA para probetas sin anodizado, con A las probetas anodizadas, con R a las recubiertas y CONT para la solución de control

Para la obtención de los datos reportados en la Tabla 20, se emplearon las curvas de calibración reportadas en las figuras 36, 37 y 38.

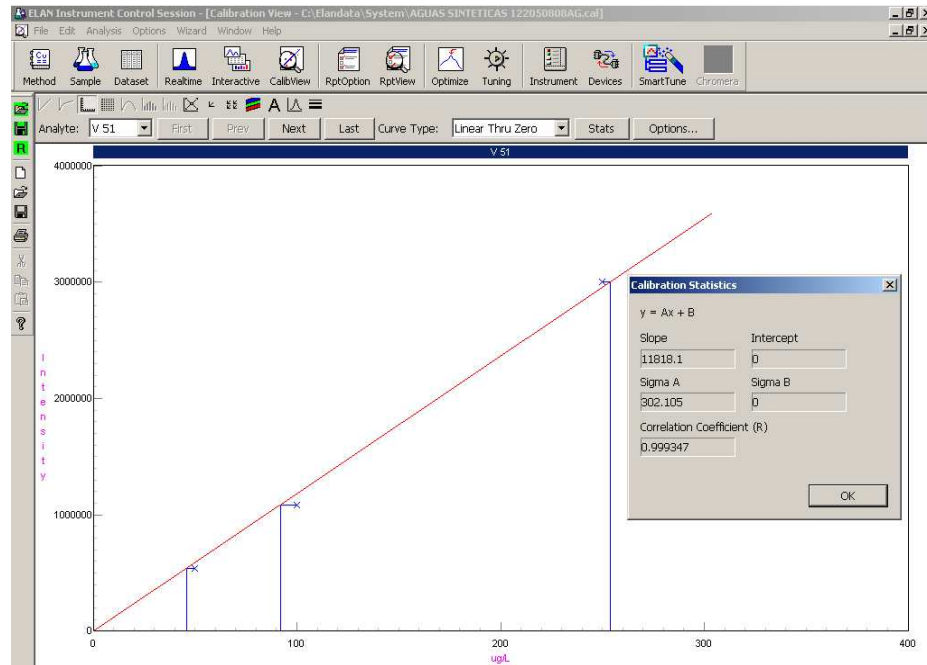


Figura 36 Curva de calibración para iones Vanadio. ICP (Instituto Colombiano del Petróleo)

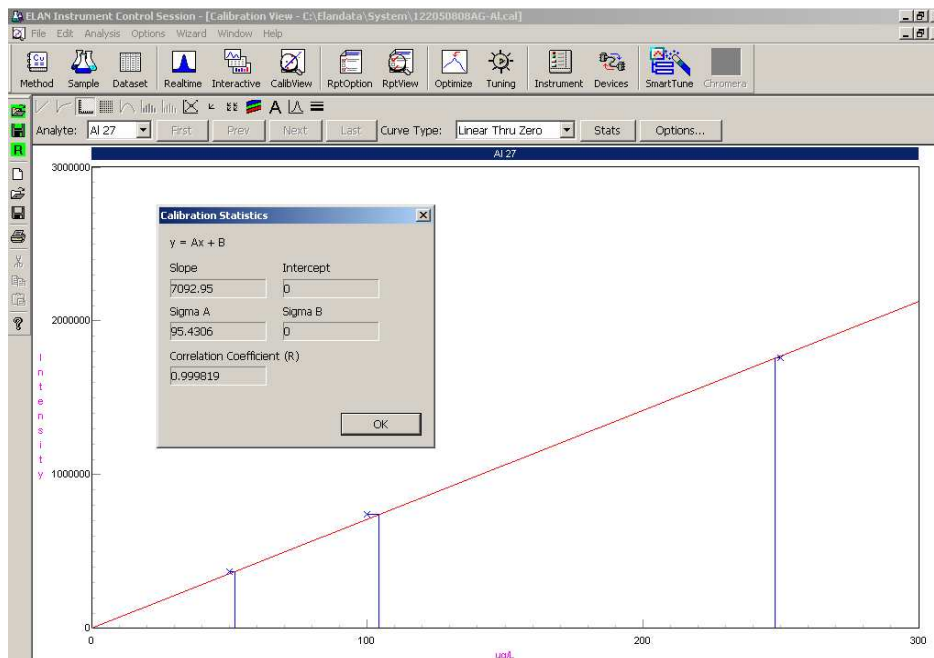


Figura 37 Curva de calibración para iones Aluminio. ICP (Instituto Colombiano del Petróleo)

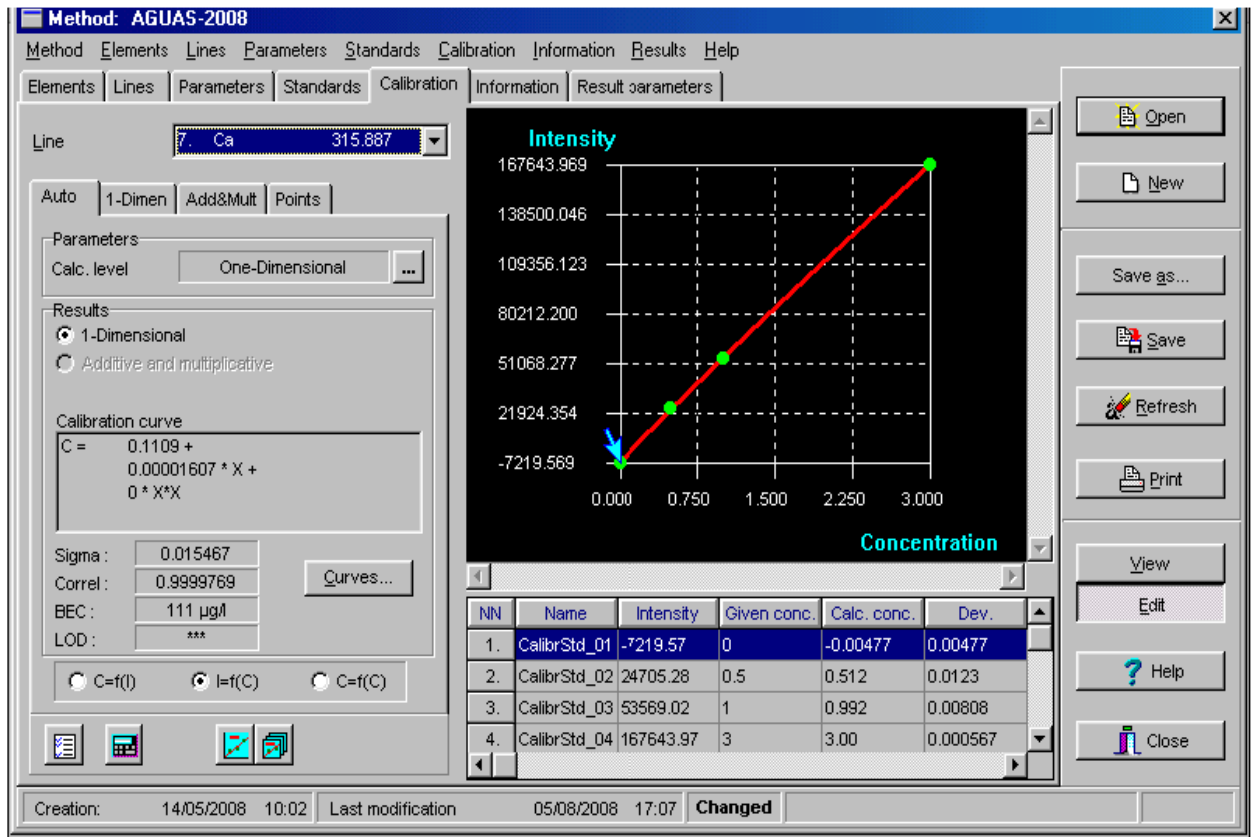


Figura 38 Curva de calibración para Calcio. ICP (Instituto Colombiano del Petróleo)

4.5 ADHESIÓN CELULAR

4.5.1 Recuento microscópico

En la tabla 22 se consignan los datos respectivos para la elaboración de las curvas de adhesión celular, según las condiciones superficiales para las probetas de Ti6Al4V-ELI

Tabla 22 Conteo microscópico para elaboración de curva de crecimiento de células HOS sobre probetas estudiadas.

Tiempo	Probeta	Marcaje probeta	Conteos				Promedio	Dil	[] Células/ml	Promedio	Desviación estándar	[] Células / probeta	Promedio	Desviación estándar
			1	2	3	4								
9	NO	M2	3	3	3	4	3,25	1	32500	36.250	5.303	6500	7.250	1.061
	Anodizada	M3	4	2	5	5	4	1	40000			8000		
	Anodizada	E2	6	3	4	2	3,75	1	37500	32.500	7.071	7500	6.500	1.414
		E3	3	4	2	2	2,75	1	27500			5500		
	Recubierta HA	R6	1	2	0	0	0,75	1	7500	3.750	5.303	1500	1.500	1.061
		R3	0	0	0	0	0	1	0			0		
24	NO	M5	3	1	3	5	3	30000	43.750	19.445	6000	8.750	3.889	
	Anodizada	M6	9	2	4	8	5,75	1	57500			11500		
	Anodizada	E5	8	5	3	5	5,25	1	52500	63.750	15.910	10500	12.750	3.182
		E6	11	8	6	5	7,5	1	75000			15000		
	Recubierta HA	R5	0	1	0	0	0,25	1	2500	1.250	1.768	500	500	354
		R11	0	0	0	0	0	1	0			0		
48	NO	M8	22	16	23	16	19,25	2	385000	362.500	31.820	77000	72.500	6.364
	Anodizada	M9	21	12	19	16	17	2	340000			68000		
	Anodizada	E8	33	20	25	21	24,75	2	495000	437.500	81.317	99000	87.500	16.263
		E9	24	18	20	14	19	2	380000			76000		
	Recubierta HA	R8	1	0	0	1	0,5	2	10000	15.000	7.071	2000	3.000	1.414
		R26	0	2	2	0	1	2	20000			4000		
72	NO	M11	52	48	39	65	51	2	1020000	992.500	38.891	204000	198.500	7.778
	Anodizada	M12	54	52	39	48	48,25	2	965000			193000		
	Anodizada	E11	41	49	53	61	51	2	1020000	1.132.500	159.099	204000	226.500	31.820
		E12	76	78	46	49	62,25	2	1245000			249000		
	Recubierta HA	R10	1	0	0	1	0,5	2	10000	30.000	28.284	2000	6.000	5.657
		R9	4	1	1	4	2,5	2	50000			10000		

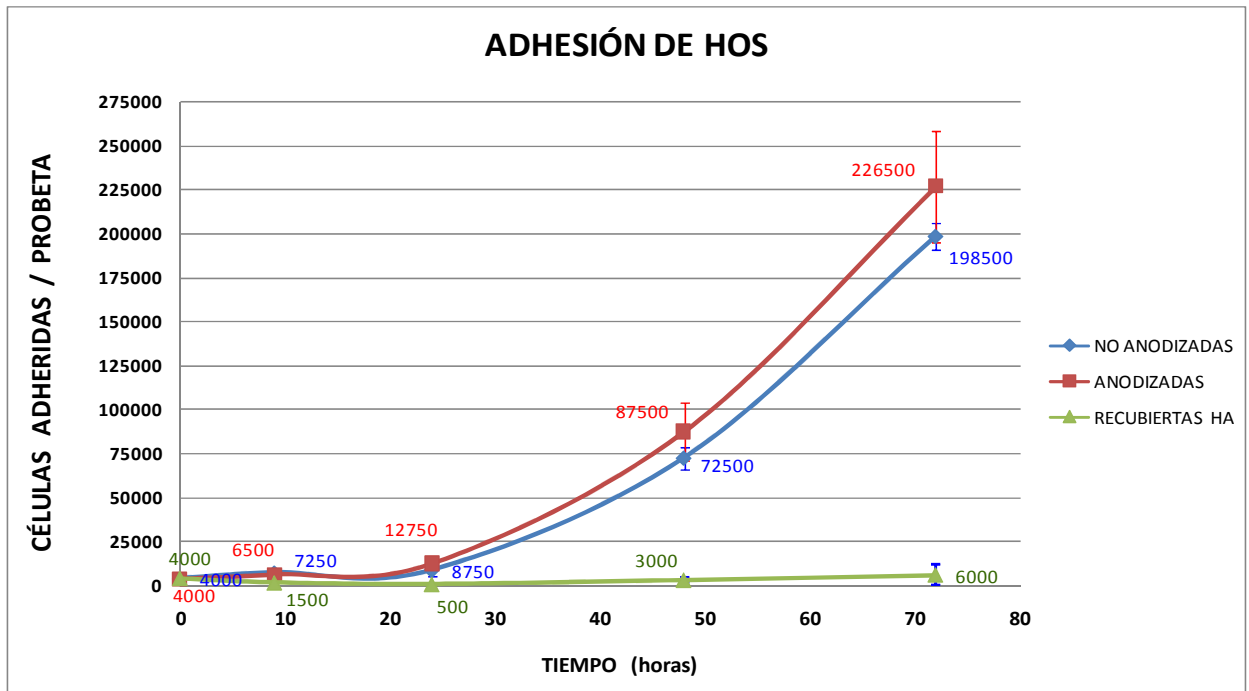


Figura 39 Curva de adhesión de células HOS sobre discos de Ti6Al4V no anodizados, anodizados y recubiertas con HA

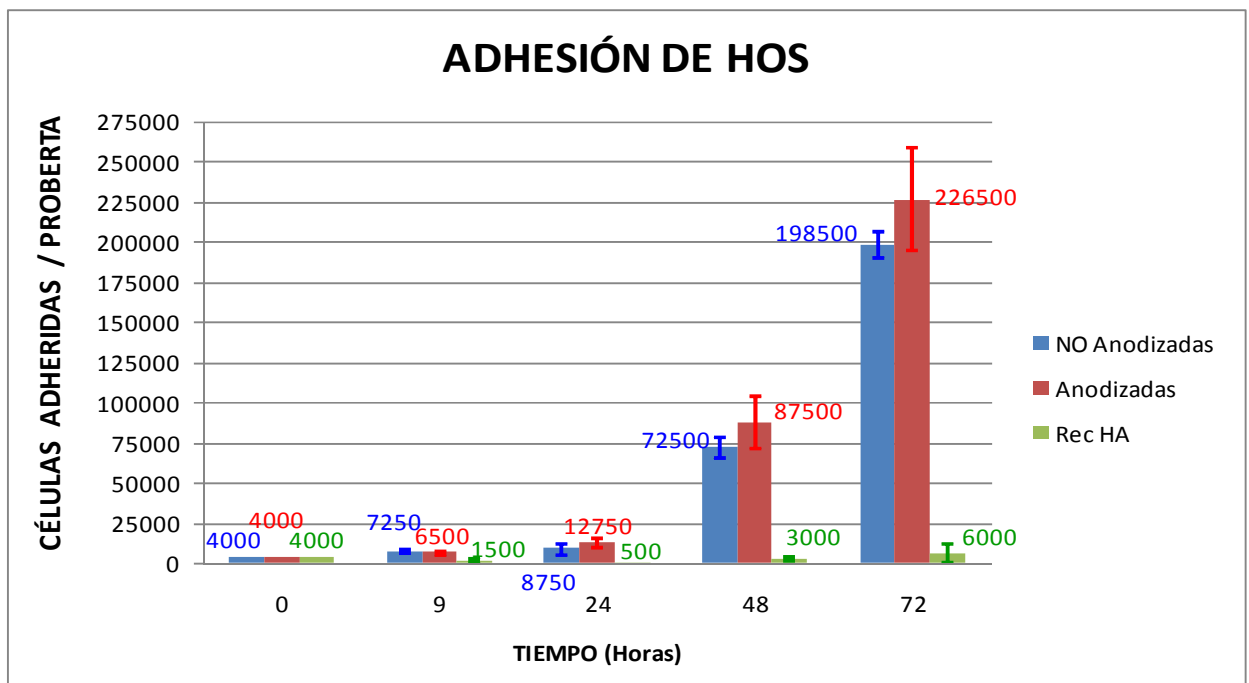


Figura 40 Adhesión de células HOS sobre discos de Ti6Al4V no anodizados, anodizados y recubiertas con HA

4.5.2 Microscopía de Epifluorescencia

Se realizó para probetas anodizadas, no anodizadas y recubiertas con cerámica bioactiva en forma simultánea con los ensayos de adhesión celular, colocando HOS en fase exponencial de crecimiento. Se adicionó medio de cultivo y después de 24h se lavó con buffer salino fosfato (PBS) y se marcaron con ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl para el citoplasma, durante una hora) y posteriormente Hoechs 33342 (5 min para marcar el núcleo) Se emplearon los filtros UV2A; las fotografías fueron tomadas a 10X. (Ver figuras 41 - 52)

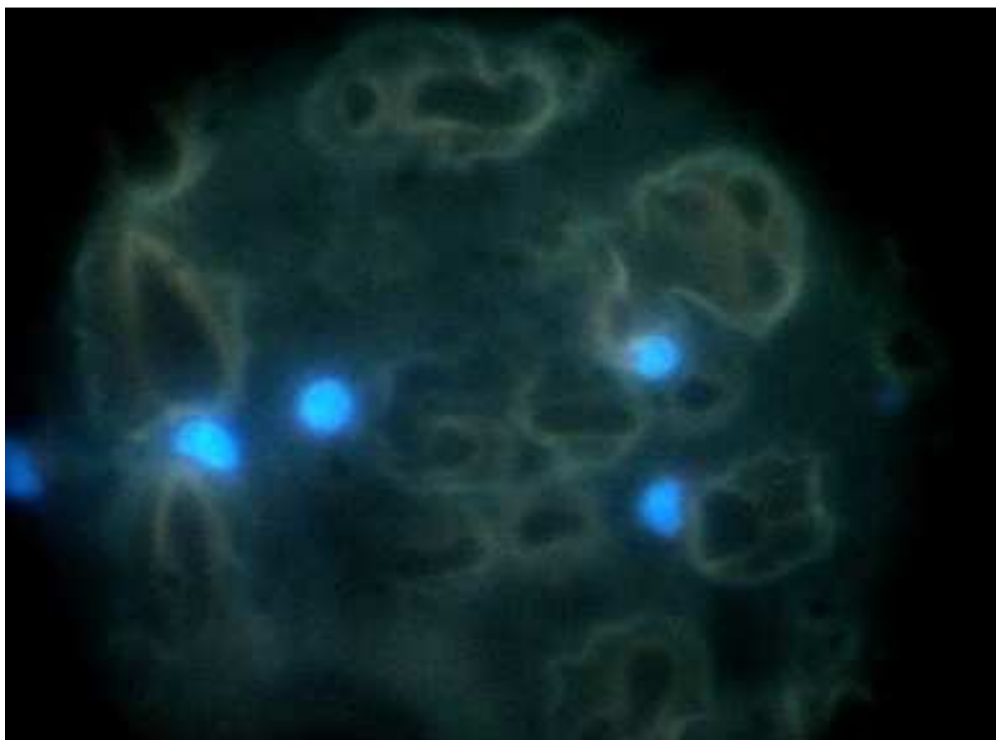


Figura 41 Células HOS adheridas sobre disco de Ti6Al4V Probetas no anodizadas. 9 horas



Figura 42 Células HOS adheridas sobre disco de Ti6Al4V Probetas anodizadas. 9 horas

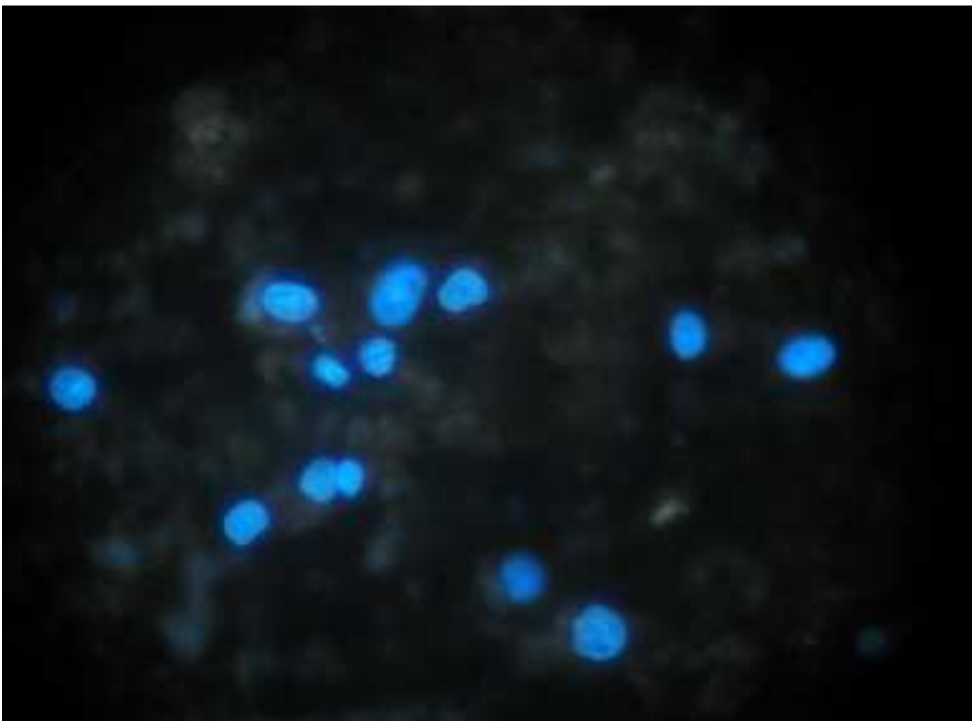


Figura 43 Células HOS adheridas sobre disco de Ti6Al4V Probetas recubiertas con HA. 9 horas

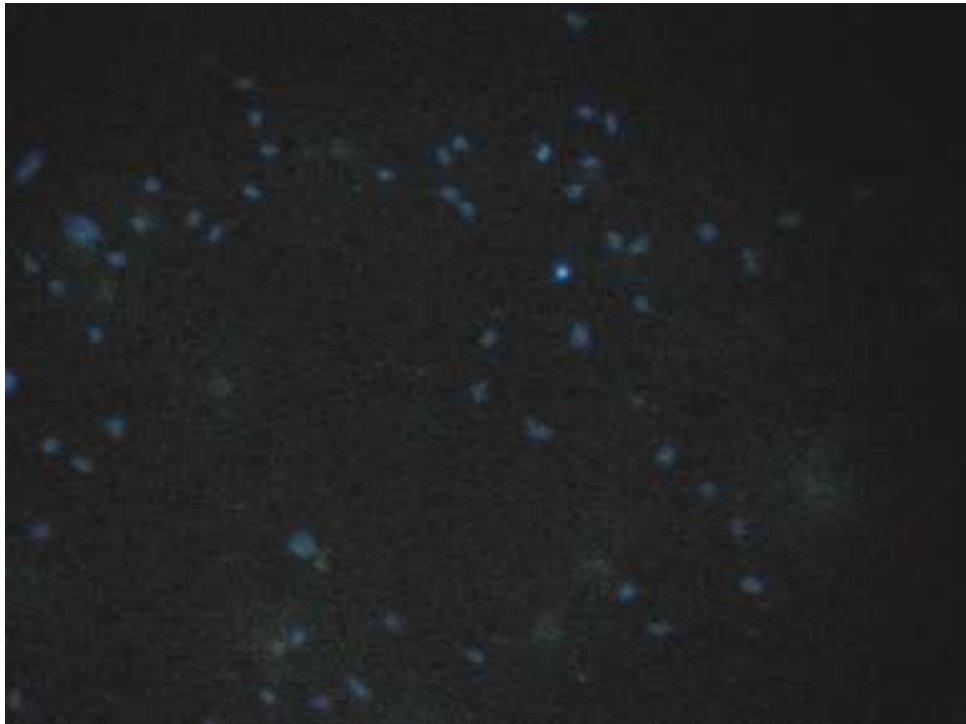


Figura 44 Células HOS adheridas sobre disco de Ti6Al4V Probetas no anodizadas. 24 horas

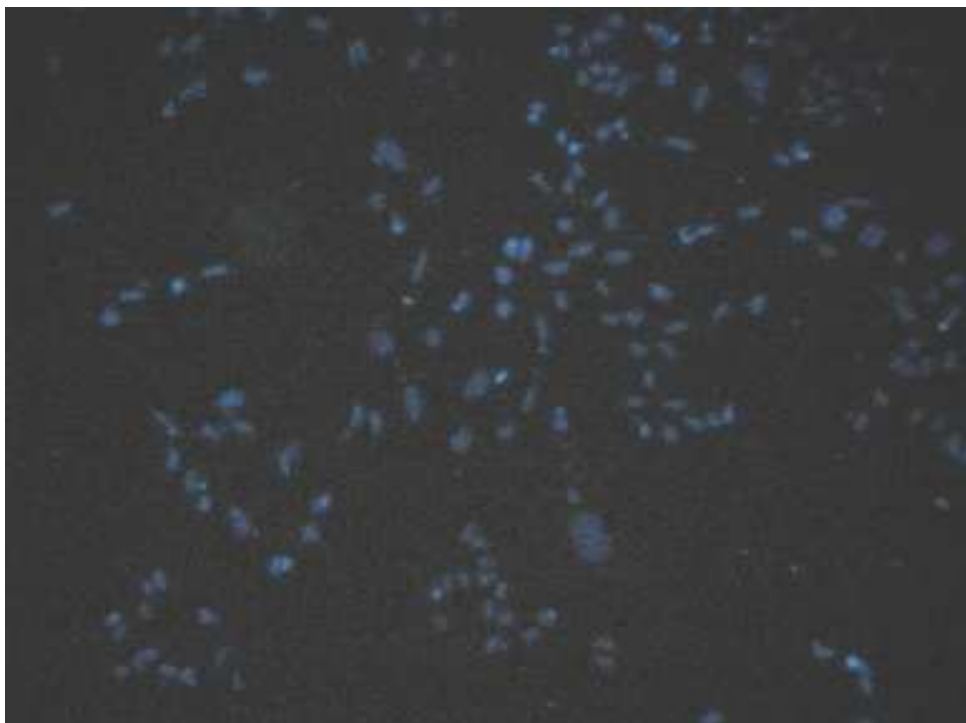


Figura 45 Células HOS adheridas sobre disco de Ti6Al4V Probetas anodizadas. 24 horas

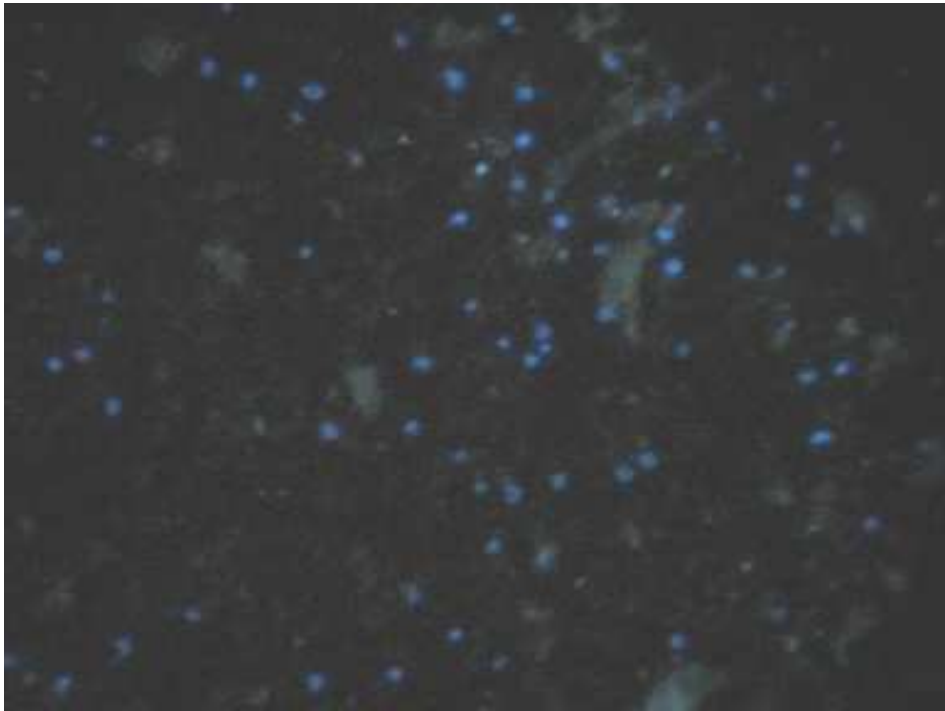


Figura 46 Células HOS adheridas sobre disco de Ti6Al4V Probetas recubiertas con HA. 24 horas

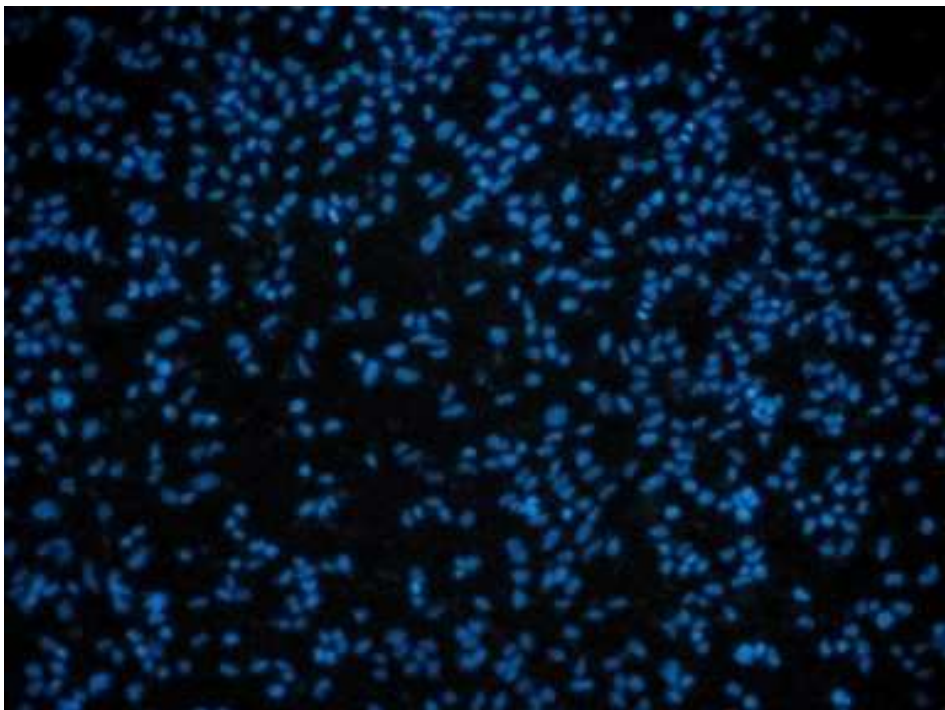


Figura 47 Células HOS adheridas sobre disco de Ti6Al4V Probetas NO anodizadas. 48 horas

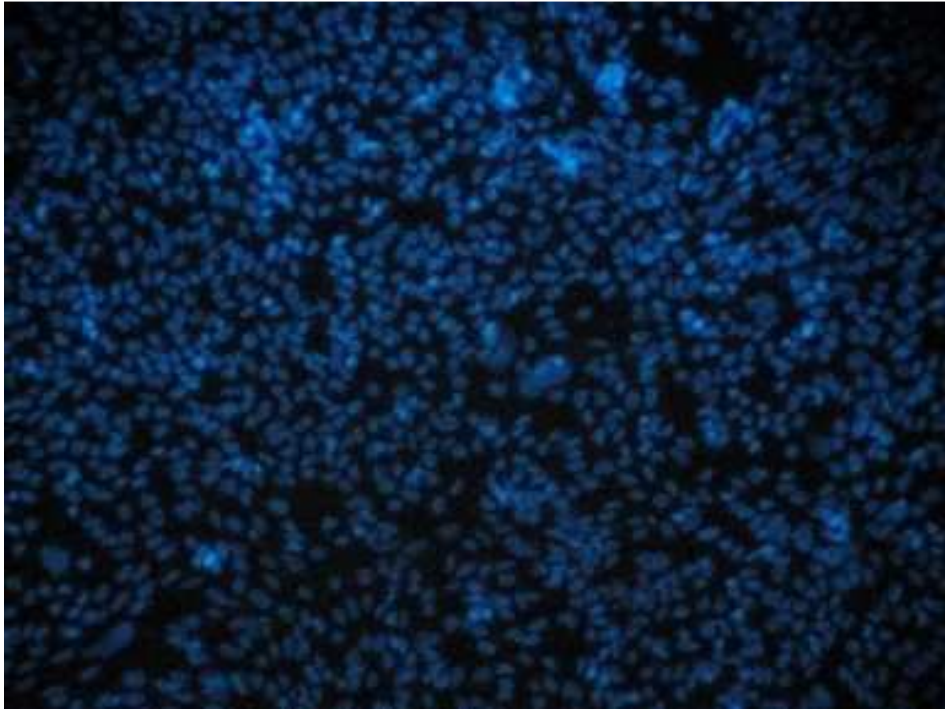


Figura 48 Células HOS adheridas sobre disco de Ti6Al4V Probetas anodizadas. 48 horas

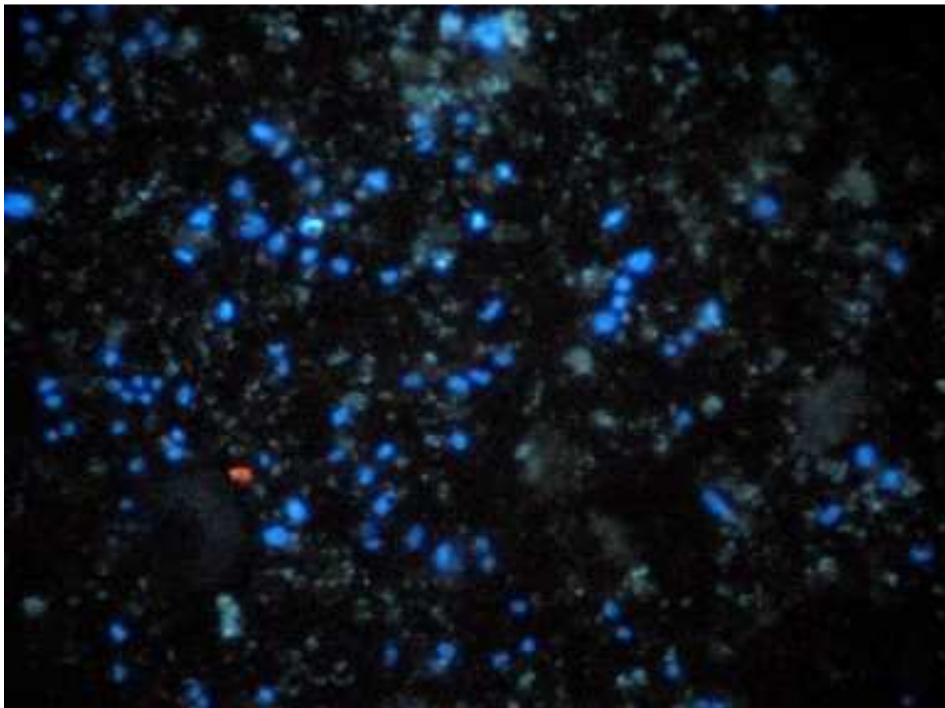


Figura 49 Células HOS adheridas sobre disco de Ti6Al4V Probetas recubiertas con HA. 48 horas

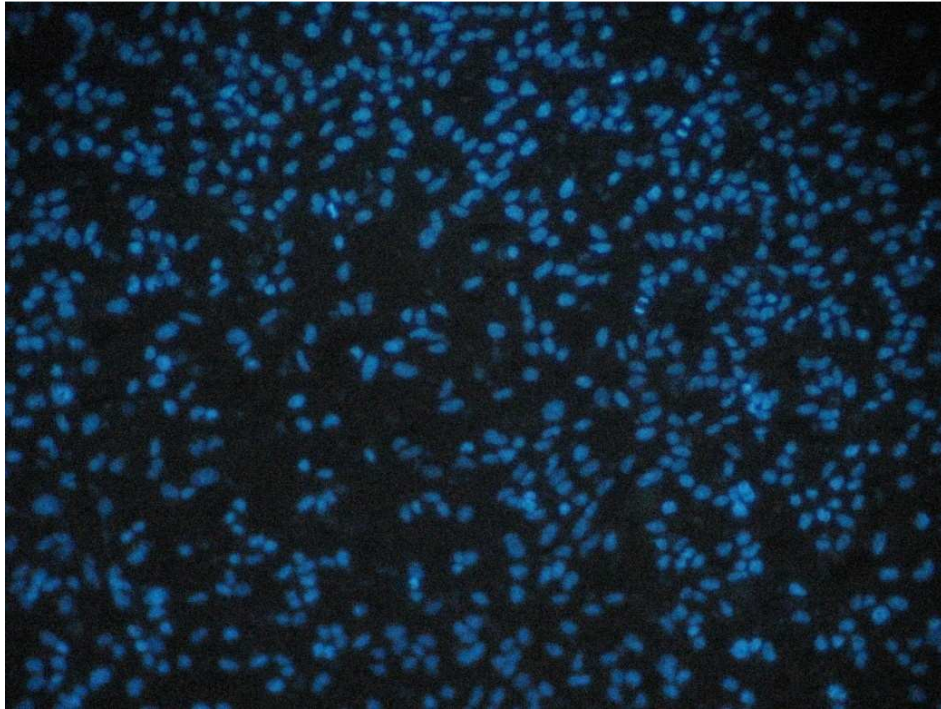


Figura 50 Células HOS adheridas sobre disco de Ti6Al4V Probetas NO anodizadas. 72 horas

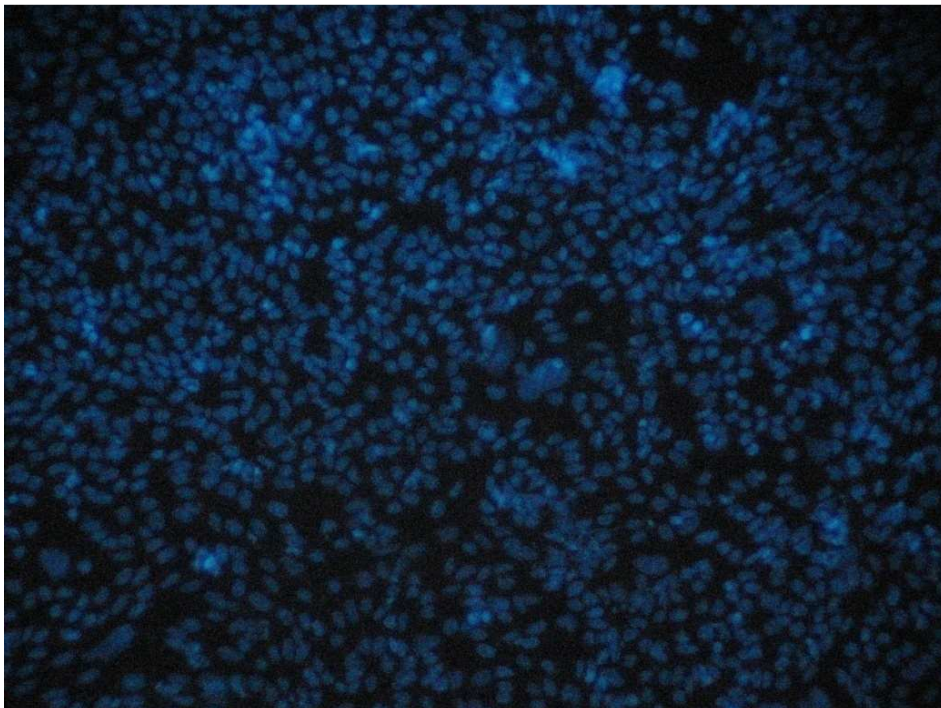


Figura 51 Células HOS adheridas sobre disco de Ti6Al4V Probetas anodizadas. 72 horas

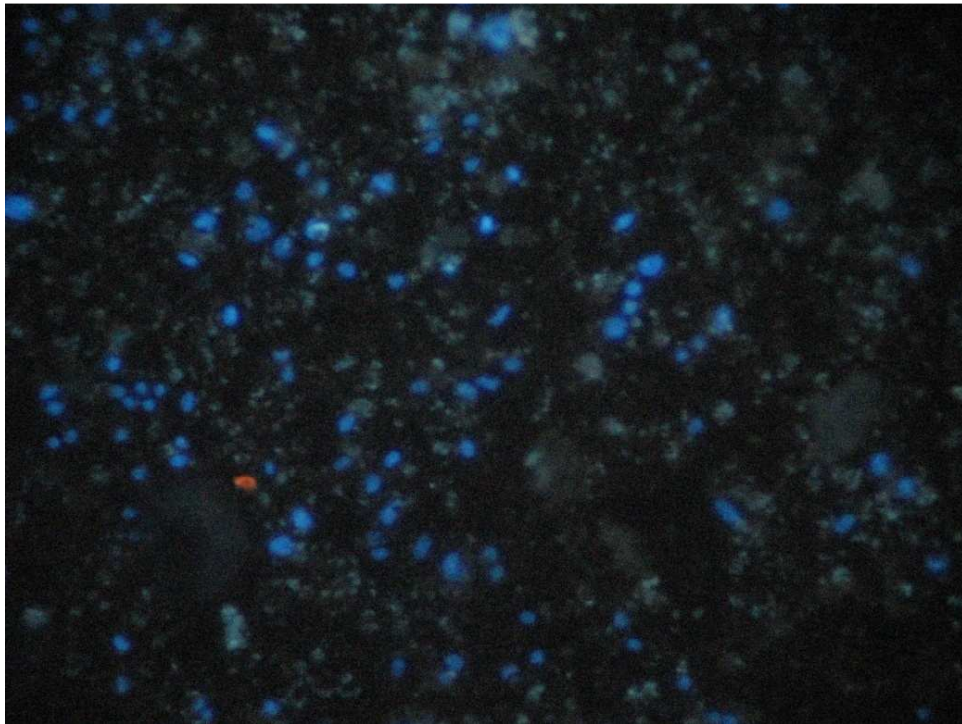


Figura 52 Células HOS adheridas sobre disco de Ti6Al4V Probetas recubiertas con HA. 72 horas

5. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

5.1 ESTADO SUPERFICIAL Y RECUBRIMIENTOS

La topografía superficial de las probetas de Ti6Al4V-ELI obtenida por el tratamiento superficial realizado sobre ellas, tienen un papel importante en el proceso de adhesión y proliferación celular; puesto que la distribución de valles y crestas de la superficie inhiben o permiten que se lleven a cabo estos procesos, teniendo en cuenta su interacción con proteínas de adhesión celular.

Las probetas anodizadas (A) y no anodizadas (NA) muestran una distribución topográfica superficial más homogénea (figuras 9 y 22), en comparación con las recubiertas por cerámica bioactiva (R) (figura 25). Las “E” presentan una rugosidad promedio de $4.40 \mu\text{m}$ – DS: 1.17; las “M” de $6.63 \mu\text{m}$ – DS: 1.78 y las “R” de $7.86 \mu\text{m}$ – DS: 1.95.

La distribución superficial más homogénea para las A y NA, radica en la posibilidad de formarse capas homogéneas de TiO_2 que permitirán una mejor distribución de sistemas de anclaje [18, 39]; caso contrario con las R en las cuales es complejo obtener una capa homogénea durante el proceso de precipitación directa para la formación de los recubrimientos.

En las probetas recubiertas, se presentó distancias medias de separación entre valles y crestas principales dentro de un rango aproximado de $50 - 70 \mu\text{m}$ (como se puede ver en la figura 25). Con esta distancia de separación se podría presentar un proceso de

proliferación celular, puesto que las HOS tienen una longitud media de 20 μm . Pero se presentan poros uniformemente distribuidos que dan origen a valles secundarios profundos formando un relieve irregular (ver figura 24), presentándose valores promedio mayor de rugosidad respecto a las probetas A y NA; de tal manera puede contribuir a que se presente un menor grado de adhesión celular de las probetas recubiertas con cerámicas bioactivas. Estas características concuerdan con las enunciadas por Conrado en su tesis doctoral [2] para que no se presente una adecuada adhesión y proliferación celular

Al llevar a cabo el procedimiento de depósito de cerámicas bioactivas por precipitación en solución acuosa es complejo controlar la morfología y espesor de capa que se forma sobre las probetas de Ti6Al4V. La variación de la topografía de los recubrimientos, se debe a la no homogeneidad del flujo de la solución precursora, variando la velocidad de precipitación de los fosfatos de calcio que darán origen a la capa de cerámica bioactiva. Por este comportamiento, se presentó una variación de R_a dentro de un rango de 4.89 – 11.24 μm ; valores muy altos que inhibirán el proceso de adhesión y proliferación celular. [2]

Adicionalmente, como es un proceso que se lleva a cabo a una temperatura de 140°C; la solución precursora se evapora rápidamente formando el recubrimiento y, generando a su paso burbujas, las cuales dan origen a la topografía irregular que se presenta en las capas de cerámica bioactiva.

Las capas de cerámica bioactiva presentan Hidroxiapatita (HA) en un 68 % y el balance en amorfos (datos obtenidos al analizar el difractograma de la figura 26), entre los cuales el más representativo es la Monetita (DCPA) en un nivel del 9%. Del mismo, se encontró que estas capas de HA presentan una cristalinidad del 89.92% (ver tabla 11, de la sección 4.4)

Estas características que presentaron los recubrimientos de cerámica bioactiva (cantidad de HA y cristalinidad) son teóricamente adecuadas para que presente un grado de adhesión y de proliferación celular [2, 18, 37]. No obstante, al comparar los valores de adhesión de las HOS en las probetas recubiertas respecto a los de las anodizadas y no anodizadas, se presentó un menor nivel de adhesión celular.

El menor nivel de adhesión de las HOS puede estar originado en las condiciones de topografía irregular que presentan los recubrimientos además por la presencia de amorfos

La presencia de amorfos es un factor determinante en el proceso de adhesión y proliferación celular. Ellos de manera teórica, presentan grados de disolución en fluidos corporales naturales o simulados cambiando de esta manera la capacidad de las líneas celulares de interactuar con proteínas de adhesión celular. Según el trabajo de Zhao *et al* (2005) [41], para que se presente un adecuado nivel de adhesión celular sobre recubrimientos con cerámica bioactivas se debe presentar una combinación de una fase cristalina y otra amorfa, como son la HA y el fosfato tricálcico (TCP), en un porcentaje del 88-92% y 8-12% respectivamente.

5.2 CITOTOXICIDAD

La citotoxicidad de un sustrato metálico está determinada por el grado de liberación o producción de sustancias que actúen como agentes patógenos para la línea celular que se esté analizando en un caso específico.

Para la línea celular HOS, se analizaron los valores de OD de las placas de cultivo mediante el software MSXifit® como se muestra en la sección 4.3. No se encontró contaminación aparente de los sobrenadantes de las probetas anodizadas y no

anodizadas. La no citotoxicidad, está dada porque sobre las probetas de la aleación Ti6Al4V-ELI se forma una capa estable de TiO_2 , la cual actúa como barrera impermeable evitando la liberación de sustancias contaminantes para las células HOS durante el tiempo de ensayo; lo cual permitió una mayor producción de formazán, por medio de la actividad mitocondrial de las HOS al reducir las sales de tetrazolium empleada en la técnica MTT.

La reducción de la sal de tetrazolium a formazán obtenida por la actividad mitocondrial de las células HOS se puede apreciar en la figura 53

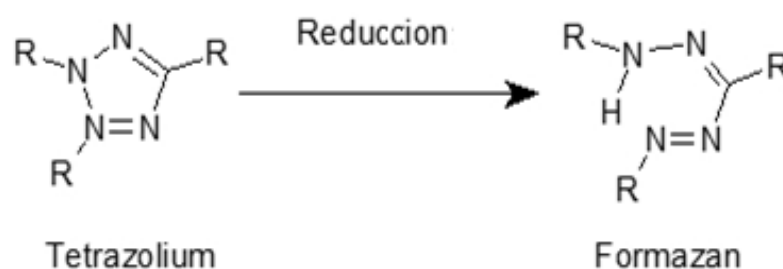


Figura 53 Producción de Formazán [32]

Una vez reducida la sal de tetrazolium, se leyeron los valores de OD obtenidos por la aplicación de la técnica de reducción colorimétrica MTT: aquellos que presentan un valor mayor a 1 (ver en las TABLAS 13 – 18 de la sección 6.3), indican que hubo una mayor formación de cristales de formazán, porque el medio en el que se encontraban suspendidas las HOS es adecuado para su adhesión y proliferación. [32]

Como la aleación Ti6Al4V-ELI al liberar iones de vanadio y aluminio, que pueden causar problemas de muerte celular; para determinar sus contenidos se tomaron como parámetros de control en las placas de 96 pozos en el proceso de análisis de los sobrenadantes de las probetas anodizadas y no anodizadas. La lectura de la OD respectiva para estos parámetros de control mostraron valores inferiores a 1 y valores

negativos, indicando que había poca presencia o nula de cristales de formazán y en consecuencia respuesta de muerte celular (ver figura 28). Se analizó por separado el efecto de los iones de aluminio, vanadio y el de su medio de suspensión (HNO_3) sobre las células HOS; determinando su concentración citotóxica CC_{50} y CC_{90} , tomando como base la OD de sus sobrenadantes mediante regresión sigmoideal.

Al analizar los valores de OD mediante la ecuación (5) de la sección 3.7.2, se determinó la inhibición celular producida por estos iones, cuyos valores se visualizan en la gráfica 29. El efecto citotóxico del vanadio es mayor al del aluminio, lo cual se puede percibir a partir de la segunda dilución, concentración de $555 \mu\text{M}$, y aumenta hasta llegar a un máximo en la sexta dilución, $6.8 \mu\text{M}$ (en la placa de cultivo de 96 pozos). Por lo tanto, se comprueba que los iones de vanadio presentan un mayor efecto citotóxico respecto a los de aluminio así se encuentre en pequeñas concentraciones.

Por consiguiente, se determinaron las concentraciones citotóxicas 50 y 90 para estos iones mediante regresión sigmoideal como se ilustra en las figuras de 30 – 35 (los valores de porcentaje de viabilidad celular de HOS utilizados para la elaboración de las figuras 30 – 35 se consignan en el anexo A) se obtuvieron; $\text{CC}_{50, \text{VANADIO}} = 7.46 \mu\text{M}$ y $\text{CC}_{90, \text{VANADIO}} = 34.66 \mu\text{M}$; $\text{CC}_{50, \text{ALUMINIO}} = 187.25 \mu\text{M}$ y $\text{CC}_{90, \text{ALUMINIO}} = 1165.53 \mu\text{M}$; $\text{CC}_{50, \text{HNO}_3} = 20.87 \mu\text{M}$ y $\text{CC}_{90, \text{HNO}_3} = 64.61 \mu\text{M}$. Estos resultados denotan que los iones de vanadio tienen un efecto citotóxico 29 veces mayor al producido por los iones de aluminio sobre la línea celular HOS; lo que produce un efecto de inhibición celular en ellas.

Campbell *et al* (2001) [42] determinaron que con concentraciones de $500 \mu\text{M}$ para iones de aluminio provenientes del su acetilacetato afectan la integridad y funcionalidad de las membranas celulares así como su capacidad de adhesión celular. Al comparar estos resultados con los obtenidos para iones de aluminio sobre las HOS, se presenta una

inhibición celular del 63.93% (ver anexo A).

Resultados obtenidos por Sargazi *et al* (2001) [43], afirman que los iones de aluminio provenientes de su citrato con una concentración de 100 μM produce una ligera citotoxicidad y, al compararlo con los obtenidos para las HOS se obtiene una muerte celular del 30%.

Estudios adicionales realizados por Rodríguez *et al* (2003) [44] y Riley *et al* (2003) [45] sobre la citotoxicidad de estos iones, determinaron que el vanadio (IV) produce una disminución en la frecuencia de la proliferación celular y daños cromosómicos al presentar una concentración de 8 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (aproximadamente 157.04 μM) y de 100 μM respectivamente. Al comparar este valor con los consignados en la figura 29 y en el anexo A, indican que el vanadio para esta concentración produce una muerte celular del 100 % para las HOS y tiene un efecto citotóxico del 229.41% superior al producido por los iones de aluminio para esta misma concentración.

5.3 LIBERACIÓN DE IONES

Un metal o una aleación metálica al estar en contacto directo con tejidos corporales, es posible que pueda presentarse liberación de iones, ya sea en menor o mayor grado. La presencia de estos iones puede tener efectos diferentes en el organismo, como encapsulamiento de tejidos o muerte celular, los que van a estar en función de su concentración en la zona del cuerpo donde se encuentre. [35, 36]

Por lo tanto existen cantidades máximas permisibles para estos iones, como son:

- **0.2 ppm para el aluminio** (requerimientos de la Agencia de Protección del Medio Ambiente de EE.UU., EPA).
- Para **el vanadio de 0.05 ppm** (Administración de Salud y Seguridad Ocupacionales, OSHA). El Instituto Nacional de Salud y Seguridad Ocupacional (NIOSH) recomienda que deba considerarse peligroso para la salud y la vida un nivel de 35 mg/m³ de vanadio. Esta concentración puede causar problemas permanentes de salud o muerte

Se determinó el valor de la cantidad de iones de vanadio liberados por las probetas anodizadas, no anodizadas y recubiertas en el medio de cultivo, pero los de aluminio no fueron posibles; debido a que su concentración estaba en cantidades inferiores a las de las que puede detectar el espectrómetro de plasma de masas ELAN 6000 empleado para tal fin.

Según los resultados obtenidos mediante ICP-MS, descritos en la tabla 21 de la sección 4.4, después de un período de incubación de 6 meses; tanto las probetas anodizadas, las no anodizadas y las recubiertas con cerámica bioactiva liberaron un volumen de iones que no representan problemas de muerte celular para la línea HOS. Este bajo nivel de liberación de iones se debe a la estabilidad y resistencia a la corrosión de la capa de óxido de titanio, formada naturalmente o controlada en la superficie de los sustratos de Ti6Al4V no anodizadas y anodizadas respectivamente.

Adicionalmente, al observar los valores de ICP consignados en la tabla antes mencionada, se puede deducir que gracias al proceso de anodizado se formó una capa estable de TiO₂ puesto que las cantidades de iones vanadio liberados por las probetas anodizadas es menor respecto a las no anodizadas y recubiertas con cerámica bioactiva.

5.4 ADHESIÓN CELULAR y EPIFLUOROSCOPIA

La adhesión de una línea celular, en especial de morfología osteoblástica como lo es la HOS; está directamente relacionada con la topografía superficial y el tipo de preparación superficial de las probetas previa al cultivo celular.

Según los resultados de adhesión celular para cada uno de los tiempos de las condiciones de estudio respectivamente (ver figura 39); las curvas para las probetas anodizadas y no anodizadas presentan una diferencia estadísticamente no representativa porque sus desviaciones estándar se superponen; pero si es notoria la diferencia con la curva para las probetas recubiertas con cerámica bioactiva.

Al analizar los resultados de adhesión celular como se visualiza en la figura 40, el nivel de adhesión celular de las HOS sobre las probetas anodizadas respecto a las no anodizadas fue 1.16 veces mayor; lo cual concuerda con los resultados presentados por Her-Hsiung Huang et Al [18], en los cuales la diferencia del nivel de adhesión de la línea celular de morfología osteoblástica entre la superficie anodizada y no anodizada era de 1.14. De manera adicional, el nivel de adhesión celular en las anodizadas fue 19.75 veces mayor respecto a las recubiertas con cerámica bioactiva.

El mayor grado de adhesión celular presente en las probetas anodizadas respecto a las no anodizadas y recubiertas con cerámicas bioactivas, se dio por la formación controlada de una capa de TiO_2 , permitiendo la presencia de un sistema de anclaje adecuado para que las HOS que se depositen sobre ella y se de la interacción con las proteínas de adhesión, integrinas y cadherinas. [18].

La diferencia en el grado de adhesión celular, también pudo darse por la composición del recubrimiento, porque se presenta un 68% de HA, con una cristalinidad del 89.92%; lo que en manera real indica que la totalidad de la HA como fase cristalina en el

recubrimiento es del 61.15% y el porcentaje restante corresponde a la presencia de amorfos como el DCPA que tienen una relación de $Ca/P = 1$, lo cual le confiere un alto grado de solubilidad, afectando la integridad superficial de la capa de cerámicas bioactivas depositadas sobre el Ti6Al4V-ELI y posiblemente modificando el pH el medio de cultivo, características que inhiben el crecimiento celular y se puede iniciar un proceso de muerte celular.

Investigadores como Zhao *et al* (2005) [45] y Matsuura *et al* (2000) [37], estudiaron este fenómeno y determinaron que para evitar estos resultados y se presente un adecuado grado de adhesión celular de líneas celulares de morfología osteoblástica, como las HOS sobre la capa de cerámicas bioactivas, estas debían presentar una composición combinada de fosfato de calcio cristalino y amorfo como son la HA (90%) y fosfatos tricálcicos TCP (alfa o como whitlockita, 10%) respectivamente. Esta combinación de fosfatos cristalinos y amorfos daba una respuesta de adhesión celular mayor que si trabajara con una monocapa de HA o el sustrato base sin ningún tipo de recubrimiento, permitiendo una adecuada producción de vitronectina (proteína de adhesión celular) por parte de las células cultivadas.

Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis simultáneo de microscopía de epifluorescencia para observar los cambios morfológicos de las HOS sobre las superficies de donde fueron cultivadas. En las epifluoroscopías se visualiza que las HOS presentan una morfología poliédrica con proyecciones citoplásmicas indicando que el sustrato donde fueron puestas presentaba condiciones para su crecimiento. (Ver figuras 41- 52).

Si los sustratos de las probetas con diferentes condiciones superficiales no hubiesen presentado condiciones adecuadas para el crecimiento, las HOS habrían presentado una morfología equiaxial con formación de vacuolas en su núcleo, e iniciarían un proceso de muerte celular

Al observar las figuras 45, 48 y 51 de microscopía por epifluorescencia (tiempos de 24, 48 y 72 horas respectivamente) se puede notar que hay mayor población de células HOS sobre los sustratos anodizados, presentando formas poligonales. Esto indica que esta superficie, les permitió extender proyecciones citoplásmicas para llevar a cabo procesos de adhesión y proliferación celular respectivamente sobre la superficie de las probetas de Ti6Al4V-ELI. Lo cual concuerda con los resultados presentados por Her-Hsiung Huang et al (2004) [18]. En ellos, los sustratos anodizados forman redes con sistemas de anclaje que hacen más favorable el proceso de adhesión y de proliferación celular

Este fenómeno puede observarse en las figuras 43, 46, 49 y 52 en períodos de tiempo de 9, 24, 48 y 72 horas respectivamente; presentándose una menor distribución celular de HOS sobre la superficie de las probetas con cerámicas bioactivas comparación con la mayor densidad de las HOS presente sobre superficies anodizadas o no anodizadas.

El grado de adhesión de las HOS sobre las probetas recubiertas con cerámica bioactiva es 19.6 veces inferior respecto a las anodizadas; lo cual indica que el recubrimiento no presenta las condiciones adecuadas para que se dé un proceso de adhesión y proliferación celular de manera óptima.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Para el tiempo de análisis de 6 meses dentro del cual las muestras de Ti6Al4V-ELI anodizadas, no anodizadas y recubiertas con cerámica bioactiva, estuvieron inmersas dentro del fluido RPMI-1640, no se liberaron iones de aluminio y vanadio en una cantidad que produzca contaminación o punto de inicio para un proceso de muerte celular.
- La morfología superficial y tratamientos realizados sobre la superficie de las probetas de Ti6Al4V-ELI determina el grado de adhesión celular que se pueda presentar sobre ellas; especialmente si con el tratamiento se depositan cerámicas bioactivas. Para tal caso se debe asegurar que se presente una combinación de fosfatos de calcio cristalinos y amorfos, como son HA y TCP, y de esta manera obtener un adecuado nivel de adhesión celular.
- El nivel de fase cristalina total (61.15%) en los recubrimientos con cerámica bioactiva y el balance en amorfos no son niveles adecuados para que se presente un proceso adecuado de adhesión celular, porque para que esto suceda, debe haber una distribución del 90% para las fases cristalinas (HA) y un 10% para TCP (fase amorfa) y no DCPA.
- Los análisis con los patrones de iones de aluminio y vanadio, nos muestra que los iones de vanadio son mucho más citotóxicos que los de aluminio para las HOS en el medio de cultivo.

- Los resultados obtenidos mediante la técnica MTT evidencian que tanto las probetas no anodizadas como las anodizadas, no presentaron citotoxicidad, cambios nucleares ni formación de vacuolas que generasen un proceso de muerte celular. Lo cual, es posible por la estabilidad química de la capa de óxido de titanio naturalmente formado en las probetas sin recubrir y por el óxido formado en el proceso de anodizado.
- Se presentó adhesión de las células HOS sobre las probetas con los diferentes tratamientos superficiales, lo que se evidenció por medio de la microscopía de epifluorescencia. Las células HOS presentaron formas poliédricas con proyecciones citoplásmicas y no se evidenció la formación de vacuolas.
- De acuerdo con los resultados obtenidos en adhesión celular y en epifluorescencia, el mayor grado de adhesión celular se presentó sobre los sustratos anodizados, seguido por los no anodizados y en menor cantidad para los recubiertos con cerámicas bioactivas. Lo cual indica que la superficie más adecuada para este proceso fue la de las probetas anodizadas.
- El procedimiento llevado a cabo para obtener los recubrimientos mediante la técnica de precipitación directa en solución acuosa no es el más adecuado, porque para cada uno de los tiempos de análisis siempre se presentó un menor grado de adhesión celular respecto a los sustratos anodizados y no anodizados.
- Al no ser mayor el grado de adhesión celular sobre las probetas de la aleación Ti6Al4V-ELI recubiertas con cerámicas bioactivas mediante precipitación directa en

solución acuosa en comparación con las anodizadas y no anodizadas, la primer hipótesis no quedó validada

- Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las pruebas de ICP y de MTT se presentó un muy bajo nivel de liberación de sustancias secundarias como iones vanadio, aluminio o de calcio en las probetas anodizadas, no anodizadas y recubiertas que indicasen un proceso de biodegradación y, de tal manera la segunda hipótesis fue validada.

Para trabajos posteriores se recomienda:

- Desarrollar un método alternativo de aplicación de recubrimientos con cerámica bioactiva vía acuosa, en el cual se mantenga un flujo constante de solución precursora y de esta manera poder controlar la topografía superficial, mantener un perfil más homogéneo y disminuir la presencia de amorfos con un alto nivel de disolución; para que permita una adhesión y proliferación celular en mayor cantidad.
- Realizar análisis con microscopía electrónica de barrido y microscopía cofocal en tiempo real para observar el comportamiento y las proyecciones citoplásmicas de las HOS durante el proceso de adhesión celular y su posterior proliferación. Con ello se puede conocer la adaptabilidad de la línea celular sobre las superficies de Ti6Al4V-ELI con los diferentes tratamientos superficiales realizados a esta aleación.
- Medir la producción de proteínas, como son vitronectina y fibronectina, por parte de la línea celular HOS, para determinar la actividad celular y complementar la respuesta de adhesión y proliferación celular.

- Simular un mayor tiempo de análisis, porque los implantes in Vivo están expuestos a medios biológicos por períodos de tiempo de varios años, en los cuales se podría presentar liberación de iones que dieran inicio a un proceso citotóxico o de muerte celular.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Williams D.F. "Definitions in Biomaterials". Progress in Biomedical Engineering (1987): 2474 – 2491
- [2] Conrado Aparicio B. *Tratamientos de superficies de titanio comercialmente puro para la mejora de la oseointegración de los implantes dentales*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Cataluña. Nov.2004.
- [3] Steinmann S. G. Titanium alloys as metallic biomaterials. Proceedings of the 5th International conference on Titanium. (1984): 1327 - 1334
- [4] Fraker A. C. Ruff A. W. Sung P. Van Orden A. "Surface preparation and corrosion behavior of titanium alloys for surgical implants". Titanium Alloys in Surgical Implants. ASTM (Special Technical Publication 796): 206 - 219.
- [5] Donachie M. J. Titanium A. Technical Guide. ASM International Metals Park. (1988): 1 - 4
- [6] ASTM Standard F86 "Standard practice for surface preparation and marking of metallical surgical implants". Annual Book of ASTM Standards Vol 13.01 (1996): 6 - 8
- [7] Hanawa T. Titanium and its oxide film: a substrate for formation of apatite. The bone-Biomaterial Interface. University of Toronto. (1991): 49 - 61.

- [8] Karoli D. *Anodized Titania: Processing and Characterization to improve cell-materials interactions for load bearing implants*. Tesis PH.D. Washington (EE.UU.) Universidad de Washington, 2007
- [9] Heungsoo Shina, Kyriacos Zygourakisb, Mary C. Farach-Carson. "Attachment, proliferation, and migration of marrow stromal osteoblast cultured on biomimetic hydro gels modified with an osteopontin-derived peptide". *Biomaterials* 25 (2004): 895 - 906
- [10] Karageorgiou V, Kaplan D. "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis". *Biomaterials* 26 (2005): 5474 – 5491
- [11] Ge Zhao, *Effects of surface microstructure and nanostructure on osteoblast-like MG63 cell number, differentiation and local factor production*. Tesis. M.Sc. Georgia (Estados Unidos) Georgia Institute of Technology November 2003
- [12] Anselme K. "Osteoblast adhesion on biomaterials" *Biomaterials* 21 (2000): 667- 681
- [13] Malaval L, Chenu C, Delmas PD, "Proteines de los Maladies methaboliques osseuses de l'adulte". Kuntz D, Editors. Paris: Flammarion Mèdecine Sciences, (1996): 17 - 35.
- [14] Gronthos S. Stewart K. "Integrin expression and function on human osteoblast-like cells". *J Bone Miner Res* 12 (1997): 1189 – 1197
- [15] Boyan B., Hummert T. "Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response". *Biomaterials* 17 (1996): 137 – 146.
- [16] Pistone M, Sanguinetti C. "Integrin synthesis and utilization in cultured human osteoblasts" *Cell Biol Int* 20 (1996): 471 – 479

- [17] Takeichi M. "Morphogenetic roles of classic cadherins" *Curr Opin Cell Bio* 7 (1995): 619 – 627
- [18] Her-Hsiung Huang, Szu-Jung Pan. "Osteoblast-like cell initial adhesion onto a network-structured titanium oxide layer" *Scripta Materiala* 51 (2004): 1017 – 1021.
- [19] 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 Ph.D. Granada (España) Universidad de Granada 2006.
- [20] Brash J. L. "Effect of plasma dilution on adsorption of fibrinogen to solid surfaces" *Thromb Hemostas* 51(1984): 326 - 330
- [21] Brunette D. M. *Titanium in Medicine. Material Science, surface Science, engineering, biological responses and medical applications*. 2001
- [22] Aladjem A. "Anodic oxidation of titanium and its alloys". *J Matter Sci* (8): 688 - 704
- [23] Horbett T. A. "Mass action effects on competitive adsorption of fibrinogen from hemoglobin solutions and from plasma" *Thromb Hemostas* 51(1984): 174 - 181
- [24] Ivarsson B, Lundström. "Physical characterization of protein adsorption on metal and metal oxide surfaces". *CRC Critical Reviews in Biocompatibility*. CRC Press Boca Raton. (2002): 1 – 96
- [25] Clark P, Connolly P. "Cell guidance by ultrafine topography in vitro". *J Cell Sci* (99): 73 – 77

- [26] Oakley C, Brunette D. M. "The response of single, pairs, and clusters of epithelial cells to substratum topography". *Biochemistry and Cell Biology* (73): 473 - 489.
- [27] Oakley C, Brunette D. M. "The sequence of alignment of microtubules, focal contacts, and actin filaments in fibroblasts spreading on smooth and grooved titanium substrates". 1993. *J. Cell Sci* (106): 343 - 354
- [28] Boyer R, Welsh G, Collings E. *Materials Properties Handbook. Titanium Alloys*. ASM International Metals Park. (1994): 3 - 11
- [29] Buser D Nydegger, Oxland T. "Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs". *J Biomed Mater Res* 1999. 45(2): 75 - 83
- [30] Jaffe, W. y Scott, B. "Total hip arthroplasty with hydroxyapatite coated prostheses". *J Bone Joint Surg Am*, (1996): 1918 - 1934.
- [31] Manley, M., Hurst, L., Hinds, R., Dee, R. y Chiang, F. "Effects of low-modulus coating on pin-bone contact stresses in external fixation". *J Orthop Res*, 2, (1984): 385-392.
- [32] De Pardo, C. "Pruebas de Tamizaje para determinar efectos citotóxicos en extractos, fracciones o sustancias; utilizando la prueba del MTT". Facultad de Medicina, Fundación Universitaria San Martín, Bogotá, Colombia, 2006
- [33] Limin Sun, Christopher C. Berndt A, Clare P. Grey. "Phase, structural and microstructural investigations of plasma sprayed hydroxyapatite coatings" *Materials Science and Engineering A360* (2003): 70 - 84.

- [34] Yu-Peng Lu, Yi-Zhang song, Rui-Fu Zhu. "Factors influencing phase compositions and structure of plasma sprayed hydroxyapatite coatings during heat treatment". *Applied surface science*, 206 (2003): 345 - 354.
- [35] Williams D.F., *Definitions in Biomaterials: Proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials*, Chester, UK, Ed. Elsevier, Amsterdam (1987)
- [36] Steinmann S. G., "Corrosion of surgical implants – *in vivo* and *in vitro* tests", *Evaluation of Biomaterials*, Winter G. D., Leray J. L., de Groot K. Eds., John Wiley & Sons, New York, USA. (1980): 1-34
- [37] Matsuura T, Hosokawa R. "Diverse mechanisms of osteoblast spreading on hydroxyapatite and titanium". *Biomaterials* 21 (2000): 1121-1127
- [38] Danen E, Lafrenie R, Miyamoto S, Yamada K. "Integrin signaling: cytoskeletal complexes, MAP kinase activation, and regulation of gene expression". *Cell Adhes Commun* 6 (1998): 217- 224.
- [39] Yang Y, Tian J. "Morphological behavior of osteoblast-like cells on surface-modified titanium *in vitro*". *Biomaterials* 23 (2002): 1383-1389.
- [40] Navarro M. *Desarrollo y caracterización de materiales biodegradables para regeneración ósea*. Tesis Ph.D. Catalunya (España) Universitat Politècnica de Catalunya 2005
- [41] Zhao B. H., Lee I. "Improvement of fibroblast adherence to titanium surface by calcium phosphate coating formed with IBAD". *Surface & Coatings Technology* 193 (2005): 366 – 371

- [42] Campbell A., Hamai D. "Differential Toxicity of Aluminum Salts in human cell lines of neural origin: implications for neurodegeneration". *Neurotoxicology* 22 (2001): 63 – 71.
- [43] Sargazi M, Roberts N. "In-vitro studies of aluminum-induced toxicity on kidney proximal tubular cells". *Journal of Inorganic biochemistry* 87 (2001): 37 - 43
- [44] Rodríguez J. J, Roldán E. "Genotoxic effects of Vanadium (IV) in human peripheral blood cells". *Toxicology Letters* 144 (2003): 359 – 369
- [45] Riley M, Boesewetter D. "Effects of metals Cu, Fe, Ni, V and Zn on rat lung epithelial cells". *Toxicology* 190 (2003): 171 - 184
- [46] Eisenhart D, Velten K. "Interactions between cells and titanium surfaces" *Biomolecular Engineering* 19 (2002): 243 – 249
- [47] Howlett C. R, Evans M. D "Mechanism of initial attachment of cells derived from human bone to commonly used prosthetic materials during cell culture". *Biomaterials* 15 (1994): 213 – 222
- [48] Gronowicz G, McCarthy M. B. "Response of human osteoblasts to implant materials: integrin-mediated adhesion". *J Orthop Res* 14 (1996): 878 – 887
- [49] Jaffe W, Scott B. "Current concepts review. Total hip arthroplasty with hydroxyapatite coated prostheses". *J Bone Joint Surg Am* (1996): 1918 – 1934.
- [50] Oviedo C. *Desarrollo y caracterización de un recubrimiento con cerámica bioactiva para implantes dentales fabricados en Ti6Al4V*. Tesis de maestría. Bucaramanga (Colombia) Universidad Industrial de Santander 2008.

ANEXOS

ANEXO A DATOS PARA DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN CITOTÓXICA

ÁCIDO NÍTRICO

Dilución 1:3	% Muerte celular	DS	1	2	3	% Muerte celular	% Muerte celular	% Muerte celular
212,5	94,0487003	0,11300502	0,084	0,088	0,086	94,1871026	93,910298	94,0487003
70,8	92,9184147	0,03262174	0,102	0,103	0,102	92,9414818	92,8722806	92,9414818
23,6	55,5036547	1,88755596	0,637	0,613	0,679	55,9188616	57,5796895	53,012413
7,87	13,8214898	3,70267518	1,208	1,207	1,321	16,4049998	16,4742009	8,5852688
2,62	-0,1571443	2,06395349	1,41	1,483	1,449	2,42636564	-2,62531897	-0,27247956
0,874	-0,80302178	2,4888912	1,407	1,472	1,491	2,63396912	-1,86410622	-3,17892825
0,291	-7,79233886	3,03031201	1,502	1,562	1,609	-3,940141	-8,09221054	-11,344665
0,097	-11,0447933	4,10347249	1,523	1,629	1,662	-5,39336534	-12,7286882	-15,0123265
CC ₅₀	20,8700555					20,1725418	19,8421701	22,4498666
CC ₉₀	64,612149					69,1663492	63,4535006	60,5050728

ALUMINIO

Dilución 1:3 (µM)	% Muerte celular	DS	1	2	3	% Muerte celular	% Muerte celular	% Muerte celular
5000	106,095469	0,06524348	-0,089	-0,087	-0,089	106,141603	106,003201	106,141603
1666,6	104,872915	0,11761935	-0,073	-0,069	-0,070	105,034384	104,75758	104,826781
555,5	63,9288958	2,75475088	0,554	0,465	0,544	61,6452576	67,8041607	62,3372691
185,1	44,5756383	3,06592289	0,863	0,764	0,775	40,2620994	47,1130141	46,3518014
61,7	28,2902989	4,37812424	1,066	1,094	0,948	26,2142641	24,2766316	34,3800009
20,5	18,4176002	5,13033248	1,277	1,161	1,098	11,6128195	19,640154	23,999827
6,8	3,83922264	3,46113425	1,418	1,431	1,319	1,85545608	0,95584101	8,70637083
2,28	6,03059268	5,09473871	1,255	1,424	1,394	13,135245	1,44024912	3,5162839
CC ₅₀	187,246143	29,7746954				226,478756	184,257233	153,866504
CC ₉₀	1165,52759	280,377148				1791,82482	1505,46196	2189,24332

VANADIO

Dilución 1:3 (µM)	% Muerte celular	DS	1	2	3	% Muerte celular	% Muerte celular	% Muerte celular
5000	106,141603	0,11300502	-0,087	-0,091	-0,089	106,003201	106,280005	106,141603
1666,6	104,942116	0,08630901	-0,070	-0,073	-0,072	104,826781	105,034384	104,965183
555,5	105,818664	0,19843029	-0,081	-0,084	-0,088	105,587994	105,795597	106,072402
185,1	102,266338	0,51785406	-0,035	-0,023	-0,041	102,40474	101,574326	102,819947
61,7	87,941698	1,31421486	0,199	0,170	0,153	86,211669	88,2185027	89,3949224
20,5	86,3731384	0,66214899	0,210	0,188	0,192	85,4504563	86,9728818	86,6960772
6,8	43,0532128	3,62864614	0,842	0,875	0,751	41,7153237	39,4316855	48,0126292
2,28	18,1407955	2,9339623	1,135	1,238	1,175	21,4393841	14,3116647	18,6713377
CC ₅₀	7,46101683					7,46241121	8,1335772	6,78798553
CC ₉₀	34,6553068					40,6641314	31,6726518	31,6114345

ANEXO B INTERFAZ SOFTWARE MSXLFIT ® PARA OBTENCIÓN DE CONCENTRACIÓN CITOTÓXICA

