



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**“SUPERFICIES PATRONADAS INSPIRADAS EN LA ESTRUCTURA ÓSEA OBTENIDAS
MEDIANTE NANOLITOGRAFÍA AFM SOBRE ÓXIDOS BIOACTIVOS CRECIDOS
SOBRE ALEACIONES ASTM F136 Y ASTM F138”**

Marcela Zuleta Hurtado

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Minas
Medellín, Colombia
2017

**“SUPERFICIES PATRONADAS INSPIRADAS EN LA ESTRUCTURA ÓSEA OBTENIDAS
MEDIANTE NANOLITOGRAFÍA AFM SOBRE ÓXIDOS BIOACTIVOS CRECIDOS
SOBRE ALEACIONES AZ31, ASTM F136 Y ASTM F138”**

Marcela Zuleta Hurtado

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ingeniería Química

Director:

Doctor en Ingeniería Química, Master en Ingeniería, Ingeniero Metalúrgico.
Hugo Armando Estupiñán Durán

Codirector:

Ph.D, Doctor en Ingeniería Metalúrgica, Ingeniero Mecánico.
Alejandro Toro Betancur

Línea de Investigación:

Biomateriales, Biomimesis, Diseño de materiales.

Grupo de Investigación:

Biomateriales

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de minas

Medellín, Colombia

2017

“La ciencia moderna aún no ha producido
un medicamento tranquilizador tan eficaz
como lo son unas pocas palabras
bondadosas”.

Sigmund Freud.

Agradecimientos

A mis compañeros de trabajo Sara, Benjamín y James por transmitirme sus conocimientos y experiencia para el desarrollo de este trabajo; a todo el laboratorio de Biomateriales por su amistad, compañía y por hacer de un grupo de investigación una familia.

Al Doctor Alejandro Toro por su siempre excelente disposición para guiar el trabajo.

A los integrantes del grupo de Tribología y Superficies, especialmente a César Isaza y Juan José Toro por compartir sus conocimientos y por su ayuda incondicional.

A mi novio Oscar Muñoz, por ser mí soporte.

A mi familia por su amor y apoyo incondicional.

A Ruta N y a la Universidad Nacional de Colombia por el apoyo económico.

Y especialmente, mi más sincero agradecimiento al Doctor Hugo Estupiñán, director de la tesis, por todo su apoyo, sus valiosos consejos, por su confianza, su dedicación, por ser un gran maestro y sobre todo una excelente persona.

Resumen

En el presente trabajo se utilizó la nanolitografía por oxidación sobre superficies comúnmente usadas como materiales para osteosíntesis, específicamente se utilizó la técnica de LAO (Local Anodic Oxidation) haciendo uso del microscopio de fuerza atómica AFM, con el objetivo de diseñar estructuras repetitivas, las cuales consistieron en óxidos conocidos por su bioactividad de los sustratos (un Acero grado quirúrgico: Aleación designada bajo la norma ASTM F-138 y una aleación de Titanio grado quirúrgico: designada bajo la norma ASTM F-136) dispuestos en forma ordenada, es decir, en forma de patrones; éstos fueron diseñados en formas y tamaños diferentes para posteriormente aplicar sobre la superficie patronada una capa delgada de un hidrogel capaz de contener colágeno en forma micelar, el cual actúa como factor de crecimiento celular o ligante celular.

Una vez obtenidas las superficies, éstas fueron caracterizadas, tanto las superficies patronadas como las superficies patronadas con la capa de hidrogel; dicha caracterización consistió en una evaluación morfológica, fisicoquímica (caracterización eléctrica, química y mecánica) y biológica (adhesión celular y citotoxicidad).

Se concluye que con un rango de voltaje (desde -10V a 10V) del AFM y con una distribución de fases en los sustratos, reveladas mediante metalografía, que el acero fue más apropiado para realizar la litografía por oxidación. Tras la realización de la caracterización morfológica, fisicoquímica y biológica de las superficies se demostró que los patrones funcionan como inoculadores celulares.

Palabras clave: Nanolitografía, hidrogeles, LAO, colágeno, osteosíntesis, materiales quirúrgicos, AFM.

Abstract

In the present work, oxidation nanolithography was used on surfaces commonly used as osteosynthesis materials, specifically the LAO (Local Anodic Oxidation) technique was used making use of the AFM atomic force microscope, with the objective of designing repetitive structures, which they consisted of oxides known for their bioactivity of the substrates (a surgical grade steel: alloy designated under the ASTM F-138 standard and a surgical grade Titanium alloy: designated under the ASTM F-136 standard) arranged in an orderly manner, that is, in the form of patterns; these were designed in different shapes and sizes to subsequently apply on the patterned surface a thin layer of a hydrogel capable of containing collagen in micellar form, which acts as a cell growth factor or cellular ligand.

Once the surfaces were obtained, they were characterized, both the patterned surfaces and the surfaces patterned with the hydrogel layer; This characterization consisted of a morphological, physicochemical (electrical characterization, chemical and mechanical) and biological (cellular adhesion and cytotoxicity) evaluation.

It is concluded that with a voltage range (from -10V to 10V) of the AFM and with a phase distribution in the substrates, revealed by metallography, the steel was more appropriate to perform the lithography by oxidation. After carrying out the morphological, physicochemical and biological characterization of the surfaces, it was shown that the patterns function as cellular inoculators.

Keywords: Nanolithography, hydrogels, LAO, collagen, osteosynthesis, surgical materials, AFM.

Contenido

1. CAPÍTULO 1: DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.....	17
1.1. Planteamiento del problema	17
1.2. Justificación	17
1.3. Objetivos	19
1.3.1. Objetivo general	19
1.3.2. Objetivos específicos	19
2. CAPÍTULO 2: ESTADO DEL ARTE	20
2.1. Biomateriales.....	20
2.1.1. Una breve historia de los biomateriales.....	20
2.2. Histología del hueso	22
2.2.1. Osteointegración	28
2.3. Biomateriales óseos	28
2.3.1. Biomateriales comúnmente usados para osteosíntesis: Substratos.	30
▪ Biomateriales cerámicos para osteosíntesis.....	30
▪ Biomateriales poliméricos para osteosíntesis.....	31
▪ Biomateriales metálicos para osteosíntesis.....	31
▪ Aleaciones de Titanio, ASTM F136.....	31
▪ Aceros inoxidables, ASTM F138.....	31
2.4. Configuración de superficies de implantes óseos.....	32
2.4.1. Tratamientos superficiales en la escala micrométrica.....	33
▪ Rugosidad de la superficie	34
▪ Dip Coating	34
2.4.2. Tratamientos superficiales en la escala nanométrica	34
2.5. Estado del arte	35
2.5.1. Coloides: Hidrogeles	35
▪ Propiedades de los hidrogeles, biocompatibilidad, contenido de agua o grado de hinchamiento y propiedades mecánicas.....	36
▪ Aplicaciones biomédicas de los hidrogeles, inmovilización de sustancias biológicas.....	37
▪ Hidrogeles de Polietilenglicol (PEG).....	38
2.5.2. Inmovilización de moléculas.....	39
▪ Inmovilización de proteínas: Colágeno.....	41
2.5.3. Nanolitografía.....	42
▪ Nanolitografía mediante AFM.....	42
▪ Nanolitografía mediante oxidación anódica local (Anodic Oxidation- LAO).....	42
3. CAPÍTULO 3: REACTIVOS Y MÉTODOS.....	44
3.1. Reactivos.....	44
3.2. Métodos.....	45
3.2.1. Métodos de obtención	45
▪ Preparación de la superficie	45
▪ Patronamiento de las superficies mediante Oxidación Anódica Local LAO	45
▪ Obtención del hidrogel	45
3.2.2. Métodos de caracterización.....	46
▪ Caracterización morfológica	46
▪ Caracterización fisicoquímica.....	46
4. CAPÍTULO 4: DISEÑO EXPERIMENTAL	50

4.1.	Condiciones fijas.....	50
4.1.1.	Patrones obtenidos LAO	50
4.2.	Definición de variables.....	52
4.3.	Matriz experimental	52
4.3.1.	Primera fase.....	52
4.3.3.	Tercera fase.....	53
5.	CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	54
5.1.	Resultados de la primera fase (Hidrogel).....	54
	Para la Obtención del hidrogel se sigue el procedimiento experimental descrito anteriormente en la sesión 3.2, el cual se muestra esquemáticamente en la Figura 10.....	54
5.1.1.	Caracterización morfológica.....	55
5.1.2.	Caracterización fisicoquímica del hidrogel.....	57
5.1.3.	Caracterización nanomecánica del hidrogel.....	59
5.2.	Resultados de la segunda fase.....	60
5.2.1.	Caracterización morfológica de los patrones sobre ASTM F136 (Acero) y ASTM F138 (Ti6Al4V).....	60
5.2.2.	Caracterización fisicoquímica de los patrones sobre ASTM F136 (Acero).....	70
5.3.	Resultados de la tercera fase (Adhesión Celular y Citotoxicidad)	81
6.	CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES	87
6.1.	Conclusiones.....	87
6.2.	Recomendaciones	91
7.	Bibliografía.....	93

Lista de figuras

Figura 1. Configuración superficial del material de osteosíntesis. Fuente: Creación propia.	18
Figura 2. Representación del hueso en la escala de longitud. (Structural hierarchy of compact bone). Imagen tomada de [4].	22
Figura 3. Estructura del PEG	38
Figura 4. Métodos de inmovilización de sustancias. Tomado de la Fig. 19. [4]	40
Figura 5. Esquema de oxidación anódica local inducida por la punta del AFM.	43
Figura 6. Estructura molecular del PEG DMA.	44
Figura 7 Estructura molecular del PEG	44
Figura 8. Estructura molecular del Agente Reticulante UV. Irgacure 2959	44
Figura 9. Patrón de líneas	51
Figura 10. Patrón en escamas (PE)	51
Figura 11. Obtención del hidrogel.	54
Figura 12. Imagen AFM del hidrogel fijado sobre una muestra de acero y perfil de rugosidad	56
Figura 13. Imágenes de microscopía confocal para la caracterización del gel. a. PEG Reticulado b. Hidrogel con colágeno c. Xerogel d. Hidrogel.	56
Figura 14. Espectro Raman del colágeno, PEG Reticulado, Gel sin colágeno y Gel con colágeno.	58
Figura 15. Análisis de los espectros Raman del hidrogel.	58
Figura 16. Espectro Raman del PEG [28].	58
Figura 17. Curva F/D con una carga de 0,4mN en 4 puntos aleatorios del hidrogel.	59
Figura 18. PL5 en Acero con línea de perfil de altura.	61
Figura 19. PL20 en Acero con línea de perfil de altura.	61
Figura 20. PE5 en Acero con línea de perfil de altura.	62
Figura 21. PE20 en Acero con línea de perfil de altura.	62
Figura 22. PL5 en Titanio con línea de perfil de altura	62
Figura 23. PL20 en Titanio con línea de perfil de altura.	63
Figura 24. PE5 en Titanio con línea de perfil de altura.	63
Figura 25. PE20 en Titanio con línea de perfil de altura.	63
Figura 26 Metalografía del Acero.	66
Figura 27. Metalografía de la aleación de Titanio.	68
Figura 28. Imágenes tridimensionales de algunos de los patrones.	69
Figura 29. Espectros Raman del Acero y los patrones crecidos.	71
Figura 30. Resultados de EDS-X para la superficie de acero patronada.	72
Figura 31, Espectros Raman del Titanio y los patrones crecidos	72
Figura 32. Resultados de EDS-X para la superficie de Titanio patronada	73
Figura 33. Espectro Raman de la Hematita. ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 34. Espectro Raman del Rutilo y la Anatasa. ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 35. Potencial de superficie del Acero patronado.	74
Figura 36. Amplitud y fase de fuerzas electrostáticas sobre Acero.	75
Figura 37. Potencial de superficie del Titanio patronado	76
Figura 38. Amplitud y fase de fuerzas electrostáticas sobre Titanio.	78

Figura 39. Módulo de Elasticidad de la superficie de Acero patronada, obtenida mediante el modo de Pin Point del AFM.....	79
Figura 40. Módulo de Elasticidad de la superficie de Titanio patronada, obtenida mediante el modo de Pin Point del AFM.	81
Figura 41. Adhesión celular sobre PE20 en Acero.....	82
Figura 42. Adhesión celular sobre PE5 en Acero.....	82
Figura 43. Adhesión celular en PL5 en Titanio.....	82
Figura 44. Superficie patronada antes del crecimiento celular.	83
Figura 45. Superficie patronada después del crecimiento celular.	84
Figura 46. Células adheridas a la superficie.	85
Figura 47. Análisis de Citotoxicidad para el Acero, Titanio y el Hidrogel	86

Lista de tablas

Tabla 1. Células óseas	23
Tabla 2. Composición de la matriz orgánica del hueso. [11]	25
Tabla 3. Composición química del Titanio ASTM F136.....	44
Tabla 4. Composición porcentual del hidrogel.....	51
Tabla 5 Diseño experimental del patronamiento.	53
Tabla 6. Diseño experimental para el material compuesto (Sustrato + Patrón + Hidrogel).....	53
Tabla 7. Propiedades mecánicas del hidrogel.....	60
Tabla 8. Condiciones de la nanolitografía en los sustratos	64
Tabla 9. Morfología de los patrones obtenidos, tanto en 316L como en Ti6Al4V.	64
Tabla 11. Rugosidad en la superficie de Acero antes y después de la nanolitografía por oxidación anódica.	69
Tabla 12. Rugosidad en la superficie de Titanio antes y después de la nanolitografía por oxidación anódica.	70
Tabla 13. Cambio de Potencial de Superficie para los patrones sobre Acero.	76
Tabla 14. Cambio de Potencial de Superficie para los patrones sobre Titanio.	78
Tabla 15. Rango de citotoxicidad para el Acero, el Titanio y el Hidrogel a concentraciones de 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16	85
Tabla 16. Valores de citotoxicidad para el Acero, el Titanio y el Hidrogel a concentraciones de 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16	¡Error! Marcador no definido.

Lista de ecuaciones

Ecuación 1. Grado de hinchamiento en peso.....	36
Ecuación 2. Porcentaje de citotoxicidad.....	49

Introducción

En épocas recientes ha ocurrido un continuo crecimiento en el diseño de biomateriales cada vez más complejos usados como implantes en el cuerpo humano, lo cual representa un gran avance para la medicina y la ingeniería; sin embargo el porcentaje de fracaso en aspectos tales como la biocompatibilidad, bioactividad, biofuncionalidad, citotoxicidad, entre otras, sigue siendo alto presentándose casos de necrosis de los tejidos, inestabilidad del implante, reacciones inflamatorias del tejido, reacciones tóxicas o incluso rechazo total de la prótesis, lo cual deja espacio para nuevos desarrollos [1].

Para un tratamiento quirúrgico con ayuda de implantes u osteosíntesis, definida como la estabilización temporal interna de los fragmentos óseos hasta que se obtiene la consolidación o regeneración ósea [2], se hace uso de implantes que otorgan propiedades óptimas tanto mecánicas como fisicoquímicas y biológicas; las propiedades mecánicas dependen del material base o sustrato utilizado, de los cuales hay una alta oferta en el mercado incluyendo metales, cerámicos, polímeros y materiales compuestos; sin embargo, el éxito del implante depende además de las propiedades fisicoquímicas y biológicas; las cuales son otorgadas en gran medida por factores que dependen de las interacciones de la superficie del implante con el tejido circundante y las células, por lo cual se hace necesario aportarle a los materiales cualidades muy precisas para que puedan interactuar favorablemente y de forma ordenada con el cuerpo humano y en un sentido específico, con el tejido óseo, para favorecer su aceptación, dando importancia a modificaciones superficiales que tengan en cuenta la relación entre la escala jerárquica de los procesos de contacto celular y ordenamiento de ligantes sobre superficies que ayuden a mejorar la regeneración tisular.[3]

Debido a lo anterior, con el fin de diseñar un material de implante óptimo a nivel mecánico, fisicoquímico y biológico se hace necesario escoger el material base o sustrato biocompatible adecuado y realizar sobre éste tratamientos de modificación de superficie que logren conservar las propiedades volumétricas del mismo y que además mejoren características superficiales directamente influyentes en la interacción del implante o tejido huésped con el tejido vivo, las cuales incluyen humectabilidad, bioactividad, rugosidad, la composición química, la carga eléctrica, la cristalinidad y la movilidad, adhesión celular, entre otras; estas técnicas de modificación superficial pueden ser micrométricas, sin embargo las

tendencias actuales consisten en optimizar la superficie de estos biomateriales a nivel nanométrico [4].

Uno de los tratamientos superficiales pioneros al día de hoy consiste en técnicas nanolitográficas, las cuales logran otorgar propiedades desde la escala micro hasta la escala nanométrica, mediante una configuración o patronamiento con moléculas funcionalizadas cuyo propósito es que dichas moléculas o estructuras puedan migrar y logren una interacción favorable entre el biomaterial y el sistema biológico [5].

Con base a lo anterior se realizó un tratamiento superficial nanolitográfico sobre dos sustratos comúnmente usado en procesos de osteosíntesis, un acero inoxidable designado bajo la norma ASTM F138 y una aleación de Titanio designada bajo la norma ASTM F136. El tratamiento consistió en hacer crecer óxidos bioactivos de los sustratos base mediante la técnica de Oxidación Anódica Local (LAO: *Local Anodic Oxidation*) en forma ordenada, es decir, en forma de patrones en dos formas y dos tamaños diferentes, para posteriormente aplicarles una capa delgada de un hidrogel capaz de contener colágeno en forma micelar.

Luego de obtenidos los materiales, fueron caracterizados **MORFOLÓGICAMENTE**: la cual incluyó forma y tamaño haciendo uso del microscopio de fuerza atómica (AFM) en los modos de contacto y no contacto, también se hizo uso de la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), **FISICOQUÍMICAMENTE**: la cual incluyó **caracterización química** para la identificación de compuestos formados y de composición elemental haciendo uso de las técnicas de espectroscopía Raman y Difracción de rayos X (EDS-X) respectivamente; **caracterización eléctrica**, la cual incluye interacciones eléctricas y potencial de superficie haciendo uso de los modos de Microscopía de fuerzas electrostáticas (EFM) del AFM y de SKPM (Scanning Kelvin Probe Microscopy) respectivamente; **MECÁNICAMENTE**: mediante los métodos de Pin Point el cual es el modo nanomecánico del AFM y mediante el método de nanoindentación; finalmente las superficies se caracterizaron **BIOLÓGICAMENTE** mediante los métodos de crecimiento celular y fijación celular, las cuales después de fijadas se observan mediante el SEM, también se hizo una evaluación de la citotoxicidad de cada uno de los compuestos del material.

1. CAPÍTULO 1: DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

Se plantea el siguiente interrogante de investigación: “¿Es posible incrementar la interacción ligando-aceptor de la interfase implante-tejido de las aleaciones de Titanio y Acero Inoxidable típicamente usados como sustratos metálicos para implantes óseos, haciendo crecer óxidos sobre la superficie en forma ordenada mediante nanolitografía AFM y depositando sobre ellos factores de crecimiento?”

1.2. Justificación

Los materiales metálicos son ampliamente usados en aplicaciones médicas, dentro de ellas, para los procesos de osteosíntesis, debido a su alta resistencia mecánica, soporte de fuerzas, resistencia a la corrosión, resistencia química y buena biocompatibilidad [4]. Se propone entonces, aplicar tratamiento nanolitográfico sobre sustratos metálicos; específicamente: *aleaciones de Titanio*, debido a que tienen una excelente razón resistencia-peso, larga durabilidad, alta resistencia a la corrosión y buena biocompatibilidad, [6], [7] y *aceros inoxidables*, debido a su bajo costo comparado con otros materiales metálicos, además de sus buenas propiedades mecánicas, resistencia a la corrosión y una biocompatibilidad adecuada[1].

La química de superficies o modificación superficial es una técnica útil para adaptar a los materiales las características necesarias para lograr las interacciones deseadas con los medios a los cuales serán sometidos, entonces en la búsqueda del mejoramiento de la interfase implante-tejido, se toma como hipótesis que el biomaterial compuesto debe apoyar la regeneración de tejidos, como base para el éxito del implante [4].

La actividad de soporte de adhesión y crecimiento celular de la Matriz Extra Celular (MEC) se ha utilizado ampliamente para mejorar la integración y biocompatibilidad de implantes, recubriendo el material de proteínas (fibronectina, integrina, colágeno, vinculina, entre otras), sin embargo, estudios recientes han demostrado que las células reconocen epítomos

peptídicos sintéticos en superficies biomiméticas artificiales solamente cuando están dispuestas en patrones definidos a nanoescala [5]; por tal razón se diseñan capas superficiales a escala nanométrica sobre los óxidos bioactivos de los substratos mencionados, con estructuras de alta biofuncionalidad y agentes de adhesión celular, dichas estructuras son más selectivas a la formación de células [4], es decir, promueven la regeneración celular, con el fin de lograr mayor adhesión, mayor bioactividad y promover así la interacción ligando-aceptor, en este caso de estudio se usa el colágeno como agente de bioactivo depositado en forma micelar en un hidrogel que funciona como una red polimérica tridimensional en la superficie previamente patronada mediante la técnica de oxidación anódica local (LAO); para lo cual usar nanolitografía AFM (Microscopía de Fuerza Atómica), debido a que en años recientes la técnica ha avanzado marcadamente, ya que no solo es una herramienta micro y nanoscópica de caracterización sino también una herramienta de micro y nanofabricación [8], originalmente desarrollada para aplicaciones en la industria electrónica, pero que ha sido usada exitosamente en el campo de la biología celular y en investigación de biomateriales con el fin de estudiar las interacciones célula-superficie.

Con la técnica de obtención se pretende definir características especiales topográficas y químicas, a nivel micro y nanométrico; con el fin de estudiar sus características fisicoquímicas, mecánicas y su influencia biológica en dichas escalas de magnitud; específicamente, se genera una oxidación anódica local y posteriormente se aplica un coloide cargado con factores de crecimiento o ligantes (colágeno) con afinidad electroquímica con sus aceptores, inoculando superficialmente el material que posteriormente tendrá como función, nuclear células osteogénicas y matriz extracelular de forma ordenada (patrones definidos) como se muestra en la Figura 1.

Figura 1. Configuración superficial del material de osteosíntesis. Fuente: Creación propia.



Se obtiene un hidrogel de colágeno debido a que los hidrogeles son cadenas poliméricas tridimensionales de alto peso molecular, con un carácter hidrofílico y con la capacidad de

absorber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos, por lo cual se presentan como una gran alternativa como biomateriales de recubrimiento. El hidrogel contendrá el colágeno como factor biológico en forma micelar, debido a que el colágeno es el principal componente extracelular en la mayoría de los tejidos, los colágenos están involucrados en numerosas interacciones célula-matriz y la regulación de muchas funciones fisiológicas, como la agregación plaquetaria, cicatrización de heridas, procesos fibróticos, encapsulación tumoral y homeostasis de los tejidos, por lo tanto la mayoría de las células tisulares son capaces de unirse, esparcirse y proliferar en superficies planas recubiertas de películas de colágeno nativo (triplehelical) o desnaturalizado (bobina aleatoria), independientemente de la naturaleza química del material de soporte, siempre que no sea tóxico [9].

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Promover la interacción ligando-aceptor de la interfase implante-tejido, mediante inoculación ordenada de óxidos bioactivos y coloides con factores de crecimiento, haciendo uso de una técnica nanolitográfica mediante AFM sobre las aleaciones ASTM F136 y ASTM F138.

1.3.2. Objetivos específicos

- Obtener superficies patronadas mediante la Oxidación Anódica Local usando nanolitografía AFM sobre aleaciones ASTM F136 y ASTM F138.
- Obtener un hidrogel tridimensional capaz de contener colágeno en forma micelar para ser aplicado como recubrimiento sobre las superficies patronadas.
- Evaluar la morfología, topografía y estructura química de las superficies obtenidas mediante la técnica de nanolitografía en AFM y del hidrogel.
- Caracterización fisicoquímica, la cual incluye, caracterización química, composicional y elemental, caracterización eléctrica, electrostática y mecánica de los materiales obtenidos.
- Evaluar la bioactividad de las superficies obtenidas mediante ensayos de adhesión celular y citotoxicidad.

2. CAPÍTULO 2: ESTADO DEL ARTE

2.1. Biomateriales

Los biomateriales están definidos como los materiales diseñados para estar en contacto con sistemas biológicos, humanos o animales, con el propósito de cumplir una función específica para el cual fue proyectado, pueden ser sintéticas o naturales, orgánicos o inorgánicos, pueden incluir sólidos, líquidos y geles; puede además contener cultivos celulares, medios de crecimiento celular, proteínas contenidas en la sangre y otras biomoléculas [10] con buena biocompatibilidad, los cuales pueden ser implantados en el cuerpo humano, bien sea para reconstruir función o forma, reemplazar y mejorar algún tejido vivo [4]; la principal aplicación de los biomateriales es en medicina y su contacto con sistemas biológicos puede ser directo a indirecto [10].

El uso y las aplicaciones de los biomateriales, aumentan rápidamente; involucrando muchas áreas del conocimiento, tales como la medicina, biología, química, física y diferentes áreas de la ingeniería[10], debido a la búsqueda por mejorar la calidad de vida y la longevidad de los seres vivos.

2.1.1. Una breve historia de los biomateriales

La palabra biomaterial fue establecida a mediados del siglo XX, sin embargo los biomateriales han sido usados desde mucho antes [10], a continuación se muestra una línea histórica con algunos de los hallazgos y avances más significativos en el área de los biomateriales[10]:

3000 AC: Uso de suturas de lino en Egipto.

600 DC: Uso de conchas marinas como dientes artificiales.

1775: Un grupo de médicos presentaron la primera técnica de fijación ósea con alambre metálico.

1800: comenzó la investigación en biocompatibilidad de implantes óseos y dentales metálicos, probando metales como; oro, plata, plomo y platino en animales

1860: se introdujo la técnica antiséptica quirúrgica.

1870: se implementan técnicas quirúrgicas antisépticas y técnicas de control de infecciones.

1888: se desarrolló el primer lente de contacto de vidrio exitoso, aunque en 1508 Leonardo Da Vinci tuvo la idea.

1900: se inició la utilización de placas y tornillos para fijación ósea.

1930: introducción de nuevos biomateriales para aplicaciones ortopédicas a base de aceros inoxidable, titanio, aleaciones de cromo y cobalto con pruebas en animales.

1938: se desarrolla el concepto de prótesis total de cadera.

1976: se aprueba la ley "FDA: Food and Dru Act" para regular la producción de dispositivos médicos.

1886: El doctor H. Hansmann en Alemania fue el primer cirujano en realizar una fijación ósea exitosa en humanos mediante tornillos y placas metálicas.

1931: el cirujano Smith Peterson en Boston, introdujo el modelo de capa metálica para el primer reemplazo parcial de cadera.

1940: los polímeros comenzaron a ser usados en aplicaciones biomédicas, por ejemplo el Poli metil metacrilato (PMMA) fue propuesto para reparación de huesos, la celulosa fue introducido como material de filtración para diálisis y los hilos de Nylon fueron usados como elementos de sutura.

1940-1945: se desarrollaron nuevos materiales y técnicas para implantes, pero principalmente fueron usados metales debido a la baja disponibilidad de polímeros.

1947: Ingraham et al. Publicó el primer artículo para la aplicación de Polietileno como material de implante.

1949: Ingraham et al. Publicó el primer artículo sobre implementación de aditivos sobre polímeros para mejorar la reacción biológica.

1952: se desarrollaron prototipos de válvulas cardíacas mecánicas hechas de metales y polímeros.

1953: se desarrolla una prótesis de injerto vascular hecha a partir de Dacron.

1958: se desarrolla una combinación de polímeros y metales para el desarrollo de la primera cadera cementada.

1960: introducción de las primeras válvulas cardíacas en un entorno clínico.

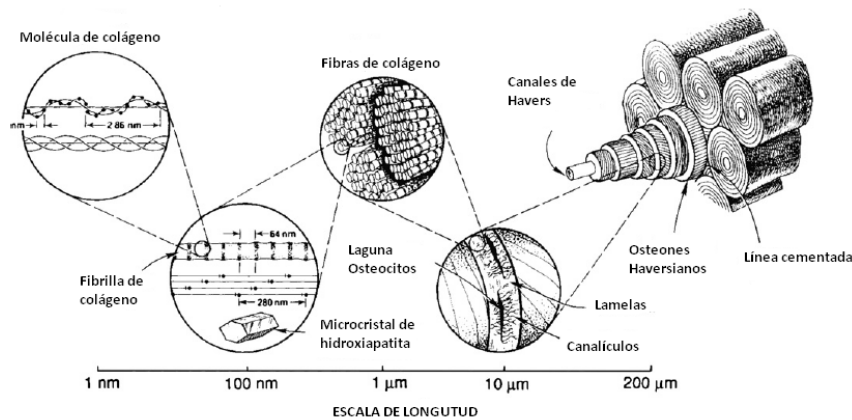
1970: desarrollo de películas finas resistentes a las proteínas, para ser usados como revestimientos para materiales de implante, como por ejemplo el óxido de polietileno.

1970-Actualidad: se diseñan tratamientos de modificación superficial para mejorar la biocompatibilidad y bioactividad, debido a que se comprende que el éxito de un biomaterial depende en gran medida de la interacción del material con el cuerpo.

2.2. Histología del hueso

Las características mecánicas, fisicoquímicas y las funciones biológicas del hueso están fuertemente relacionadas con la escala de longitud; entonces con el fin de reconocer la estructura ósea en sus diferentes escalas de longitud; en la Figura 2, se muestra un esquema del hueso desde la mesoescala hasta la escala nanométrica (de derecha a izquierda). Partiendo de la mesoescala se encuentran las líneas cementadas, las cuales contienen en la escala micrométrica los osteones Haversianos, compuestos a su vez de lamelas y poros; las lamelas están constituidas de fibras formadas por fibrillas, las cuales a nivel nanométrico están compuestas de proteínas, especialmente colágeno e hidroxiapatita mineral; todas las estructuras se encuentran anidadas o ensambladas mediante células. [4] Teniendo en cuenta los diversos elementos constituyentes se puede dividir en una matriz orgánica que forma un tercio del tejido óseo y otra inorgánica que compone los otros dos tercios restantes. [11]

Figura 2. Representación del hueso en la escala de longitud. (Structural hierarchy of compact bone). Imagen tomada de [4]



Desde un punto de vista histológico, el hueso es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado e innervado, que está estructurado en forma de laminillas de matriz osteoide calcificada, la disposición de estas laminillas es la que determina que el hueso sea cortical o esponjoso, ambos constituidos por osteonas; el hueso cortical o compacto se estructura en conductos de Havers recubiertos de laminillas en disposición concéntrica donde se sitúan los osteocitos, el hueso esponjoso o trabecular lo constituyen laminillas óseas en forma de red que delimitan cavidades areolares en cuyo interior se encuentra médula ósea; [12] tanto el hueso cortical como el esponjoso contienen células especializadas, matriz extracelular y la fase mineral.

La matriz extracelular se puede dividir en varios compartimentos teóricos que ayudan a describir la secuencia de síntesis, secreción, acumulación y mineralización de la matriz ósea. Después de la síntesis de las moléculas orgánicas por los osteoblastos se forma el estroma de colágeno u osteoide, que actúa como un andamio para el depósito de apatita y el acúmulo de las proteínas no colágenas, esto último sucede en lo que es conocido como frente de mineralización, zona donde la calcificación se propaga ampliamente a través de las fibras de colágeno) [11]

El hueso es el único tejido del organismo capaz de regenerarse, permitiendo la restitución tras un trauma, cuando se produce una fractura, se coloca un implante osteointegrado o se realiza un injerto para aumentar el sustrato óseo antes de la inserción de implantes, lo que se pretende es la regeneración ósea, es decir, la formación de hueso nuevo que, tras un proceso de remodelado, sea idéntico al preexistente; por lo tanto el hueso es un tejido dinámico en constante formación y reabsorción. [12]

- **Células óseas**

Tabla 1. Células óseas

ESTROMA MEDULAR	CÉLULAS ÓSEAS
Células madre hematopoyéticas	Osteoblastos
Células madre mesenquimales	Pre-Osteoblastos
Adipocitos	Osteositos
Macrófagos	Osteoclastos
Mastocitos	Pre-Osteoclastos
Células endoteliales	Células linfoides

En el hueso coexisten varios tipos de células, nombradas en la Tabla 1; dichas células óseas se encuentran dentro del tejido óseo o en el estroma conjuntivo de la médula ósea, es rico en células mesénquimas pluripotenciales indiferenciadas (o células madre mesenquimales). Las células madre pueden dar origen a cinco familias celulares distintas: fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos [29].

En la **diferenciación osteoblástica**, las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) las cuales constituyen los reguladores más potentes de la diferenciación, dan lugar a las células

CBFA1 la cual es la primera evidencia y alcanza su máximo nivel con la formación de pre-osteoblastos; el colágeno y la osteopontina se expresan de forma temprana en células osteoprogenitoras; igualmente la fosfatasa (ALP) es una proteína de superficie que podría participar en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de células osteoblásticas.

Los **osteoblastos**, son células grandes de 20-30 μm de forma poliédrica, con citoplasma basófilo y con un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso de tamaño importante, proceden de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares, emiten procesos citoplasmáticos hacia la matriz, que comunican con la red de osteocitos y con osteoblastos vecinos, los osteoblastos y osteocitos se comunican entre sí por proteínas transmembrana o integrinas, que actúan como enlace entre células o entre una célula y la matriz extracelular, permitiendo el paso de mensajeros como calcio, citoquinas o prostaglandinas. Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica o sustancia osteoide a un ritmo de 2 a 3 μm por día y expresan una enzima característica la fosfatasa alcalina (ALP), que permite la mineralización a un ritmo de 1-2 μm por día.

Actualmente, se sabe que dentro de sus funciones se encuentran: sintetizar las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso, dirigir la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular, contribuir a la mineralización de la sustancia osteoide, gracias a la fosfatasa alcalina, mediar en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas y sintetizar factores de crecimiento.

La vida media de los osteoblastos humanos es de 1 a 10 semanas, al término de las cuales pueden desaparecer por mecanismos de apoptosis, transformarse en células limitantes o de revestimiento (bone lining cells) o en osteocitos.

Los **osteocitos son** las células más abundantes del hueso (10 veces más que los osteoblastos). Poseen forma estrellada y su cuerpo se sitúa en el interior de lagunas u osteoplasmas y los procesos citoplasmáticos se comunican entre sí a través de los conductos calcóforos que están llenos de fluido óseo extracelular, de esta forma, los osteocitos se organizan formando una aglomeración de células interconectadas que representa una única estructura, con la ventaja de que existe una gran superficie de contacto en el interior y hacia la superficie ósea, que permiten obtener oxígeno y nutrientes.

Una vez mineralizada la matriz, algunos osteoblastos quedan atrapados dentro, transformándose en osteocitos. Los osteoblastos, osteoclastos y células limitantes se hallan en la superficie ósea, mientras que los osteocitos están en el interior.

Los osteocitos también participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, pero se cree que su función principal es la de controlar el remodelado óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas, fenómeno denominado mecanotransducción, constituyen el paso final desde la línea osteoblástica y son incapaces de renovarse; cuando se produce un trauma en el hueso, el cese de la circulación sanguínea origina hipoxia y necrosis de los osteocitos.

Los **osteoclastos**, son las células encargadas de la reabsorción, son células grandes de 100 μm , multinucleadas, ricas en mitocondrias y vacuolas, los osteoclastos contienen fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), que permite la desfosforilación de las proteínas, cuya actividad es aprovechada para su identificación, tanto in vivo como in vitro.

Los osteoclastos tienen dos especializaciones en la membrana: un borde en cepillo, que es donde tiene lugar la reabsorción y una zona clara, rica en microfilamentos, con integrinas que sirven de anclaje a la matriz; para ello, los osteoclastos se movilizan hacia la zona a reabsorber y, seguidamente, se adhieren a la superficie ósea mineralizada mediante las integrinas. [12]

- **Matriz Orgánica**

La matriz orgánica o sustancia osteoide representa un tercio del peso óseo, está formada fundamentalmente por proteínas colágenas y no colágenas. Las cuales se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición de la matriz orgánica del hueso. [11]

COLÁGENO		Tipo I Tipo III Tipo V Tipo XII
PROTEÍNAS NO COLAGENAS	PROTEOGLICANOS	Condroitin sulfato Decorina Biglicano hilonano
	PROTEÍNAS CON ÁCIDO γ - CARBOXIGLUTÁMICO	Osteocalcina Proteína de la matriz con ácido γ - carboxiglutámico

	Y GLICOPROTEÍNAS	Osteonectina Fosfatasa alcalina Proteínas con RGD <ul style="list-style-type: none"> ▪ Fibronectina ▪ Trombospondina ▪ Osteopontina ▪ Vitronectina ▪ Sialoproteínas óseas
	PROTEÍNAS DEL PLASMA	Albúmina 2-SH-glicoproteína
	FACTORES DE CRECIMIENTO	IGF-I y II (<i>Insulin Grow Factor I y III</i>) TGF- β (<i>Transforming Grow Factor-Beta</i>) PDGF (<i>Platelet Derived Grow Factor</i>)

El **colágeno**, el cual representa el 90% de la matriz extracelular (MEC) está constituida por colágeno, sobre todo tipo I (>95%) y tipo V (<5%), y pequeñas proporciones de colágeno tipo III, y tipo XII, formado bajo estrés mecánico, en la molécula de colágeno se halla la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), que es reconocida por las integrinas de superficie de las células óseas; las fibras de colágeno se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre aminoácidos y a través de la formación de puentes de piridinolina, entre las hidroxilisinas y lisinas. Sin embargo, el colágeno no tiene gran afinidad por el calcio, por lo que son otras las proteínas implicadas en el depósito mineral.

En hueso de rápida formación, y en zonas de reparación, el colágeno se halla muy entretrejido, dejando así gran cantidad de espacios que van a ser ocupados por cristales minerales y proteínas ácidas, mientras que en el maduro forma láminas perpendiculares entre las que apenas quedan espacios. [11]

Los **proteoglicanos** constituyen el 10% de las proteínas no colágenas, son moléculas de gran tamaño, las proteínas Hialuronano y Condroitín-sulfato de molécula grande, intervienen en las etapas iniciales de la morfogénesis ósea y el Biglicano y decorina de molécula más pequeña, aparecen en las fases siguientes de la formación ósea.

Las **proteínas con ácido γ -carboxi-glutámico**, representan un 15% de las proteínas no colágenas de la matriz; compuestas por la osteocalcina (OCN) la cual es una pequeña proteína de la matriz sintetizada por los osteoblastos y plaquetas, dependiente de las vitaminas D y K y la proteína de la matriz con ácido γ -carboxiglutámico, éste ácido es un aminoácido que liga calcio y necesita vitamina K para su síntesis. Sus niveles plasmáticos

se han considerado como uno de los marcadores bioquímicos de la osteogénesis, relacionándose con el número y actividad de los osteoblastos.

Las **Glicoproteínas**, son la osteonectinas, las cuales tienen afinidad por el colágeno tipo I, por el calcio y por la hidroxiapatita e intervienen en la regulación de la adhesión celular entre la matriz y las células; en el hueso es necesaria para la mineralización normal; la fosfatasa alcalina, la cual es una enzima que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos, necesario para la mineralización y las proteínas con el tripéptido RGD (Arg-Gly-Asp) también llamadas SIBLINGS (*Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein*) son fundamentalmente cinco: osteopontina, sialoproteínas óseas, fibronectina, trombospondina y vitronectina; las cuales son esenciales en los procesos de remodelado y regeneración ósea, también actúan como receptores de superficie de las células óseas permitiendo la adhesión de las células a la matriz extracelular y activando señales.

Las **proteínas procedentes del plasma**, se encuentran en la matriz orgánica ósea en mayor proporción que en el plasma, son la albúmina y la α 2-SH-glicoproteína, y están relacionadas con la incorporación del calcio a la matriz osteoide.

Los **factores de crecimiento**, son polipéptidos sintetizados en el hueso o procedentes de otros lugares como el hígado, plaquetas, etc., que intervienen en la diferenciación, crecimiento y proliferación de las células.[12]

- **Fase mineral**

El hueso está constituido por una fase mineral, la cual representa el 65% del peso óseo; ésta fase contiene calcio, fosfato y carbonato, en proporciones aproximadas de 10:6:1; en forma de pequeños cristales de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y, en menor proporción hay magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor; adicional, el plasma se encuentra sobresaturado de calcio y fósforo respecto a la hidroxiapatita, por lo que debe haber sustancias que inhiban la mineralización; las proteínas con capacidad adhesiva favorecen la mineralización, mientras que los proteoglicanos, magnesio, ATP y pirofosfato la inhiben. [12]

2.2.1. Osteointegración

El proceso de osteointegración, está definido como la formación de regeneración de hueso y se basa en la resorción para mantener la masa ósea; ésta implica la proliferación y diferenciación de las células que permiten la formación de los osteoblastos, el proceso comienza con la producción de colágeno, fosfatasa alcalina y osteopontina por parte de células formando la matriz extracelular; posteriormente las células evolucionan a osteoblastos, que permiten el inicio de la mineralización y, después suben los niveles de osteopontina y osteocalcina lo que indicaría el paso a osteocitos de los osteoblastos.

A pesar del gran potencial de cicatrización y regeneración que posee el sistema óseo, puede ocurrir que los defectos no se curen con un tejido similar al original necesiéndose recurrir a diversas técnicas de regeneración ósea.

La osteoinducción y osteoconducción junto con la osteointegración, representan los tres sucesos deseables tras la colocación de implantes en el hueso. La osteoinducción significa que células indiferenciadas, pluripotenciales, son de alguna manera estimuladas para transformarse en osteogénicas, es decir, el proceso por el cual se induce la osteogénesis, el cual es un mecanismo biológico básico que ocurre en la cicatrización de fracturas y en la incorporación de implantes, comenzando inmediatamente tras la lesión inicial siendo muy activo durante la primera semana, aunque los resultados no se vean hasta varias semanas más tarde; por otra parte la osteoconducción se relaciona con el crecimiento óseo sobre una superficie, considerándose una superficie osteoconductor si permite el crecimiento de tejido óseo a lo largo de su extensión, poros o canales. Cuando esta superficie es la de un implante, la osteoconducción no depende sólo de los mecanismos de cicatrización ósea, sino también del material y sus interacciones. [11]

2.3. Biomateriales óseos

Para biomateriales de osteosíntesis o fijación ósea, los cuales tienen como objetivo de diseño, interactuar o reemplazar un tejido en un organismo vivo; se deben considerar las características mecánicas, fisicoquímicas y biológicas tanto del material como del tejido con el cual va a entrar en contacto; se conoce además que dichas características están fuertemente relacionadas con la naturaleza del hueso en toda la escala de magnitud, es decir; el biomaterial, debe tratar de simular el hueso, desde la escala nanométrica hasta la macrométrica. [4]

El material ideal para regeneración ósea aparte de ser biocompatible, osteoconductor, osteoinductor y osteogénico, debe tener buenas propiedades mecánicas, ser fácil de manipular quirúrgicamente y tener una velocidad de reabsorción equiparable a la velocidad de crecimiento óseo.

La osteoconducción es la capacidad de un material para guiar y soportar la neoformación de hueso (por ejemplo la hidroxiapatita). La osteoinducción es la capacidad de un material para transformar células mesenquimales en células osteoformadoras (por ejemplo las proteínas morfogenéticas). Y la osteogénesis es la capacidad de crear hueso donde antes no lo había (por ejemplo Las células osteoprogenitoras). El único material que cumple todas estas cualidades es el auto injerto óseo [13]

- **Aspectos mecánicos, fisicoquímicos y biológicos**

En la escala macrométrica el material de implante se debe adaptar o ser similar a las propiedades de volumen (*bulk properties*) específicas del tejido óseo, y está altamente relacionada con la compatibilidad del implante con el tejido; es decir, su estructura química primaria o substrato, debe tener *propiedades mecánicas* similares al hueso, como por ejemplo, la dureza, módulo de elasticidad, ductilidad, resistencia a la tracción, resistencia a la fatiga, resistencia al desgaste, flexibilidad, entre otros. [4]

En la escala micrométrica el material de implante debe tener las propiedades de grano tales que logre adaptarse a los componentes micrométricos del hueso, debido a que en dicha escala existe una correlación con las propiedades *fisicoquímicas*, tales como resistencia química al medio altamente corrosivo, mojabilidad, estructura química, aspectos topográficos y morfológicos; por otra parte los aspectos *biológicos* están relacionados con las escalas micro y nanométricas, que rigen aspectos de biocompatibilidad y bioactividad.[4] Entonces, las propiedades *mecánicas* son aportadas por el substrato, las propiedades *fisicoquímicas* son aportadas tanto por el substrato como por las propiedades superficiales y las propiedades *biológicas* son netamente controladas por los tratamientos superficiales que se le realicen al biomaterial.

La adecuada elección de los biomateriales, depende de la aplicación final a la que será sometido dicho material; entonces, en el caso de los implantes que serán utilizados para reemplazar tejido óseo u osteosíntesis, el principal requisito del material base, también

llamado sustrato, es que pueda imitar la matriz natural del tejido óseo [2] principalmente por sus *características mecánicas*; con el fin de que pueda soportar elevadas cargas, que tenga una adecuada resistencia a la fatiga, módulo de elasticidad similar al hueso, entre otros; además, que sus *características fisicoquímicas* puedan simular el peso específico del hueso, y que soporte las condiciones corrosivas del medio y por último que posean una aceptable *interacción biológica*, es decir que no genere toxicidad o carcinogenicidad en el tejido vivo [3] y garantizar así la bioseguridad y biocompatibilidad [4]. Entonces, dado a que el propósito de este trabajo es diseñar un material biomimético (es decir que imite la naturaleza y funciones del hueso humano), se hace necesario proponer un método determinístico para sustraer las características mecánicas, fisicoquímicas y biológicas del tejido óseo, con cuyo concepto se podrá proponer el diseño de un biomaterial de alta funcionalidad ósea, desde la escala macrométrica hasta la nanométrica. [4]

2.3.1. Biomateriales comúnmente usados para osteosíntesis: Substratos.

La elección de los sustratos se convierte en uno de los puntos clave para el éxito del implante; en el caso de la fijación ósea, es necesario que el sustrato brinde propiedades mecánicas, soporte de cargas, además de buena biocompatibilidad y nula citotoxicidad. [4][19][15]. Para ello, se han utilizado materiales metálicos, cerámicos y poliméricos y materiales compuestos con el fin de aprovechar las propiedades de diversos tipos de materiales [1]. Los cuales se especifican a continuación:

- **Biomateriales cerámicos para osteosíntesis**

El tejido óseo es un tejido conjuntivo compuesto, el cual contiene fosfato de calcio altamente mineralizado, por tal razón los materiales cerámicos son muy usados para procesos de osteosíntesis; los materiales cerámicos biocompatibles comúnmente usados son de naturaleza cristalina, tales como alúmina, zirconia, fosfatos de calcio y cristales bioactivos; los cuales presentan resistencia mecánica, durabilidad, características apropiadas de dureza, resistencia a la degradación y coeficientes de fricción de desgaste bajos [4], [1], además son altamente biocompatibles dado a que su composición química es similar a las sales de calcio de la matriz mineralizada del hueso [15], por tal razón han sido usados como sustratos o como recubrimientos.

- **Biomateriales poliméricos para osteosíntesis**

Son ampliamente usados debido a que son materiales orgánicos que se pueden sintetizar con el fin de ofrecer una amplia gama de propiedades físicas y químicas, una de sus principales ventajas son, que se pueden moldear fácilmente a diferentes formas, se pueden sintetizar de manera sintética o derivarse de fuentes naturales como proteínas, lo cual promueve la biocompatibilidad y sus propiedades superficiales se pueden ajustar fácilmente; sin embargo a diferencia de los materiales cerámicos y metálicos pueden ser más blandos, pueden sufrir más desgaste mecánico y descomposición. [4]

- **Biomateriales metálicos para osteosíntesis**

A pesar de la amplia oferta de biomateriales, los metales son los más usados para aplicaciones ortopédicas y fijación ósea [14], debido a su alta resistencia mecánica que fin garantiza una buena distribución de carga durante un tiempo prolongado y a su rigidez mecánica próxima a la del hueso; sin embargo la resistencia a la corrosión es uno de los requisitos fundamentales con el fin de garantizar la biocompatibilidad [4], por tal razón los metales de implante están generalmente oxidados en la superficie con el fin de evitar la oxidación tras su implante.

- Aleaciones de Titanio, ASTM F136

El Titanio puro y sus aleaciones, poseen excelente resistencia a la corrosión y capacidad de pasivación que generan una buena biocompatibilidad; tiene también una buena relación fuerza-peso, por lo tanto puede soportar altas cargas y ha sido usado para reemplazo total de caderas y rodillas, mostrando buenos resultados clínicos a cortos, medianos y a largo plazo; por tal razón es uno de los materiales metálicos de implante más usados. [16], [7]. Se selecciona una aleación Ti6Al4V ELI, la cual ha sido ampliamente usada en implante dentales y ortopédicos, principalmente debido a su alta estabilidad química, propiedades mecánicas y biocompatibilidad.[17]. Designado bajo la norma **ASTM F136** [18], es una aleación que contiene aproximadamente 6% de Aluminio, 4% de Vanadio y su balance con Titanio y además, un bajo nivel intersticial de carbono, nitrógeno, oxígeno e hidrógeno.

- Aceros inoxidable, ASTM F138

El acero inoxidable es uno de los materiales de implante más usados, la razón es que cuenta con una adecuada combinación de propiedades mecánicas, tales como

resistencia a cargas elevadas y cargas cíclicas, resistencia a la corrosión y aceptable biocompatibilidad, a un bajo costo, comparado con otros materiales de implante; sus características especiales se obtienen mediante los diferentes elementos de aleación, métodos de fabricación y estados cristalinos; para usos ortopédicos es necesario que no tenga características magnéticas. [14], se selecciona la aleación **ASTM F138**, la cual es comúnmente usada como material para cirugías ortopédicas, debido a que combina buena biofuncionalidad y una aceptable biocompatibilidad a un bajo costo, sin embargo la adecuada interacción de éste material con el cuerpo humano y su capacidad de lograr el servicio deseado, depende de su preparación superficial [19], designado bajo la norma ASTM F138, es una aleación de acero inoxidable austenítico, con composición aproximada de 18 a 21% de Cromo, 14% de Níquel, 2,5% de Molibdeno, 0,03% de Carbono, con balance a Hierro. [20]

2.4. Configuración de superficiales de implantes óseos

Como se mencionó anteriormente, el éxito del material de implante, no solo depende de las propiedades intrínsecas del material base o sustrato, sino que también depende de los procesos de fabricación y los post-tratamientos superficiales; en donde dichas modificaciones de superficie se aportan ciertas propiedades *fisicoquímicas*, aunque las propiedades fisicoquímicas son aportadas tanto por el sustrato como por la superficie, recubrimientos o películas formadas sobre el sustrato.

De esta forma, las propiedades superficiales y las propiedades *biológicas*, están ligadas especialmente al desarrollo de la ingeniería de superficie en los implantes [4]; entonces, tras la elección del biomaterial, se hace necesario dotarlo de características especiales, con el fin de lograr que el biomaterial pueda ofrecer una respuesta óptima tanto mecánica, fisicoquímica y biológicamente, con una adecuada interacción celular; es decir, que tenga una bioactividad consecuente a los requerimientos de diseño; esto, se ha logrado a través de diferentes técnicas de modificación superficial o modificación de parámetros de superficie; debido a que los átomos en la superficie dictan la mayoría de las reacciones biológicas en la interfaz del implante de tejido, debido a que son los primeros en entrar en contacto con el tejido vivo. [4]

Los diversos parámetros superficiales que rigen el comportamiento entre el implante y el tejido incluyen la mojabilidad, la rugosidad, la composición química, la carga eléctrica y la movilidad.[5]

Dado a que los átomos en la superficie generalmente poseen menos energía de unión, esto conduce a una mayor movilidad y mayor reactividad, entonces cuando dicha superficie entra en contacto con el entorno biológico y reaccionan inmediatamente para formar nuevos enlaces y reduce la energía superficial.[5]

Entonces, en la escala micro y nanométrica se pueden configurar o patronar con el fin de funcionalizar la superficie con el propósito de que dichas estructuras puedan migrar y lograr así una interacción entre la especie y el sistema biológico. Los factores importantes desde el punto de vista de la ingeniería de superficies incluyen la química superficial, la topografía a nivel micro y nanométrico, los efectos fisicoquímicos y los factores biológicos tales como la diferenciación celular, la colonización bacteriana, las dimensiones biológicas y la histología del hueso; las técnicas adecuadas de modificación de la superficie logran conservar los atributos deseados de los materiales base o sustratos y promueven la respuesta deseada de la superficie con el entorno; en el caso de la investigación se busca como principal propósito, mejorar la adhesión celular. Algunas de las técnicas de modificación de superficies se presentan brevemente a continuación, según la escala de longitud.

2.4.1. Tratamientos superficiales en la escala micrométrica

En la escala micrométrica el material de implante debe tener las propiedades de grano tales que logre adaptarse a los componentes micrométricos del hueso, y dado que en dicha escala existe una correlación con las propiedades *fisicoquímicas*, tales como resistencia química al medio altamente corrosivo, carga eléctrica, mojabilidad, estructura química, aspectos topográficos y morfológicos; por otra parte los aspectos *biológicos* están relacionados con las escalas micro y nanométricas, que rigen aspectos de biocompatibilidad y bioactividad.[4]

- **Rugosidad de la superficie**

La rugosidad superficial tiene una alta influencia en la tasa de osteointegración y fijación biomecánica de los implantes, dicha rugosidad puede aumentar mediante técnicas tales como pulido mecánico, blasting o ataque ácido, lo cual estimula la bioactividad, adsorción de proteínas, actividad celular y respuesta tisular, también controlan la formación de nuevos tejidos en la interfase implante-tejido. [4]

- **Dip Coating**

Es un recubrimiento logrado mediante inmersión logrando formar capas delgadas del recubrimiento, controlando la concentración en el medio y el tiempo de inmersión; es decir, la capa delgada se deposita en el sustrato mientras es extraído de la solución, la extracción debe realizarse a una velocidad constante con el fin de que el recubrimiento tenga un espesor homogéneo, la velocidad determina el espesor de la capa del recubrimiento de manera que a una velocidad de extracción mayor produce una capa de recubrimiento más gruesa.[21]

2.4.2. Tratamientos superficiales en la escala nanométrica

En la escala nanométrica, la modificación superficial se realiza con el fin de diseñar materiales capaces de responder de forma activa o adaptativa a los estímulos dinámicos, lográndose controlar las funciones biológicas y químicas a nivel nanométrico y anticipándose a las diferentes respuestas del material en el organismo tras su implante, con el fin de lograr una recuperación de los tejidos en función y forma. [10]

- **Nanolitografía**

Se usan técnicas de estructuración para obtener características de superficie bien definidas, es decir **patrones**; pueden establecerse a nivel micro y nano. Existen diferentes métodos de nanolitografía sin embargo se usará nanolitografía mediante oxidación anódica localizada.

2.5. Estado del arte

2.5.1. Coloides: Hidrogeles

Un coloide, sistema coloidal, suspensión coloidal o dispersión coloidal es un sistema estable formado por dos o más fases, normalmente una de las fases es líquida y la otra o las otras fases son las o las fases dispersas, las cuales son partículas generalmente sólidas de tamaño micro y nanométrico

Los coloides se diferencian de las suspensiones químicas, principalmente en el tamaño de las partículas de la fase dispersa; las partículas en los coloides no son visibles directamente, son visibles a nivel microscópico y nanoscópico (entre 1 nm y 1 μ m), mientras que en las suspensiones químicas sí son visibles a nivel macroscópico.

Un gel es un coloide formado por la fase sólida que consiste en redes poliméricas tridimensionales de alto peso molecular con la capacidad de absorber grandes cantidades del fluido al cual se someta, si el gel retiene en el interior de su estructura reticulada un disolvente orgánico se le denomina organogel y en el caso en que el disolvente retenido sea agua o una solución acuosa se le denomina hidrogel. [22]

Dado a que los sistemas coloidales son de gran importancia en la fisicoquímica fisiológica, debido a que aproximadamente un 90% de la actividad funcional de las células se encuentra en forma coloidal [23] y los hidrogeles son cadenas poliméricas tridimensionales de alto peso molecular, con un carácter hidrófilico y con la capacidad de absorber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos, por lo cual se presentan como una gran alternativa como biomateriales de recubrimiento.

La cualidad hidrofílica de estos geles se debe a la presencia de grupos solubles en agua, los cuales incluyen: -OH, -COOH, -CONH₂, y -SO₃H y la red es estabilizada por el agente entrecruzante (*cross-linked, agent*) el cual puede presentar enlaces covalentes, cargas complejas, enlaces por puente de hidrógeno, enlaces del tipo de Van der Waals o interacciones hidrofóbicas; a medida que el agua penetra en las cadenas poliméricas, el hidrogel se hincha dando lugar a propiedades físicas comunes a los tejidos vivos incluyendo una consistencia blanda y elástica, y baja tensión interfacial con el agua o fluidos

biológicos[22]; los hidrogeles generalmente son obtenidos mediante polimerización y entrecruzamiento simultáneo de uno o varios monómeros mono o polifuncionales, debido a que en la mayoría de los casos, un solo monómero no proporciona al mismo tiempo todas las características buscadas según la aplicación final, tales como buenas propiedades mecánicas y gran retención de agua, por ello es necesario recurrir a la copolimerización, para poder obtener una mezcla con las características buscadas.

- **Propiedades de los hidrogeles, biocompatibilidad, contenido de agua o grado de hinchamiento y propiedades mecánicas**

Las propiedades de los hidrogeles dependerán principalmente de su densidad de entrecruzamiento, ésta es una expresión del número promedio de unidades de monómeros repetidos entre nudos, al tener una densidad de entrecruzamiento pequeña el hidrogel posee mayor capacidad de absorción de agua, mientras que si aumenta la densidad de entrecruzamiento, la absorción del líquido dentro del gel disminuye.

El grado de entrecruzamiento determina la solubilidad, el porcentaje de hinchamiento, el tamaño del poro del material, el área total superficial y la resistencia mecánica del polímero.

Un biomaterial biocompatible no debe presentar reacciones inflamatorias y de toxicidad tanto a nivel local como sistemático, sin embargo la presencia de agua dentro del hidrogel no es una garantía de su biocompatibilidad, pero si el gel acepta que esa elevada fracción de agua, esta característica está directamente relacionada con su buena biocompatibilidad; así mismo, el contenido de agua controla un gran número de propiedades en los hidrogeles, tales como, la permeabilidad, las propiedades mecánicas y superficiales y su biocompatibilidad. Además el agua presente en una red polimérica puede existir en una serie de estados cuyos dos extremos son: un estado de agua fuertemente asociada con la matriz polimérica a través de enlaces de hidrógeno y un estado de agua con alto grado de movilidad, que no se ve influenciada por el entorno polimérico; a su vez, la proporción entre los tipos de agua está determinada por el contenido de monómero hidrofílico y de agente entrecruzante en el polímero. El total de agua retenida dentro del hidrogel en el equilibrio, puede expresarse así:

Ecuación 1. Grado de hinchamiento en peso.

$$D = \frac{\text{Peso húmedo}}{\text{Peso seco}}$$

Dado a que los coloides son cadenas poliméricas entrecruzadas, las cuales forman una malla o red tridimensional, pueden resistir grandes esfuerzos sin perder su forma original, ésto se debe a que los enlaces intermoleculares evitan el desplazamiento de unas cadenas con respecto a otras denominándose a este tipo de polímero un elastómero.

En los hidrogeles se pueden existir **Fuerzas de Van der Waals**, las cuales pueden ser atractivas o repulsivas entre moléculas o entre partes de una misma molécula, las cuales aumentan con la longitud de la parte no polar de la cadena, la afinidad polímero-polímero entre las cadenas se debe principalmente a interacciones de Van der Waals; **Interacciones hidrófobas**, son las fuerzas que mantienen juntas las regiones apolares de las moléculas, refiriéndose éstas a la asociación de las porciones hidrofóbicas de las moléculas anfífilas que poseen poco carácter direccional, pero tienden a producir sistemas de elevada estabilidad. Energéticamente son del orden de unas pocas Kcal/mol (inferiores a las de enlaces de hidrógeno) jugando un papel decisivo en la estabilización de la configuración de polímeros; **enlace de hidrógeno**, los cuales generan fuerzas atractivas entre un átomo electronegativo y un átomo de hidrógeno unido covalentemente a otro átomo electronegativo; las energías en este tipo de interacción son del orden de 3-6 Kcal/mol y son las que generan interacciones cooperativas que se desarrollan entre segmentos de cadena; es decir para que se forme un enlace de hidrógeno en una cadena polimérica se requiere de una configuración especial donde se establecen interacciones intra e intermoleculares; por último las **Interacciones electrostáticas**, las cuales son cargas de la misma naturaleza que se repelen y que sus fuerzas opuestas se atraen siendo esta interacción inversamente proporcional a la constante dieléctrica del medio, en polímeros sintéticos se puede introducir cargas a la cadena mediante procesos de copolimerización o de ionización parcial, lo que origina una fuerte repulsión en el sistema, se ha observado que en geles poli(anfolitos), que contienen cationes y aniones en su estructura molecular, se evidencia la influencia de las interacciones electrostáticas sobre las propiedades del hinchamiento del gel; esto debido a la sensibilidad de los geles a los cambios de pH.[22]

- **Aplicaciones biomédicas de los hidrogeles, inmovilización de sustancias biológicas.**

Como se mencionó anteriormente, los hidrogeles son altamente hinchables en el agua y combinan la capacidad de transportar especies moleculares y especies nanoscópicas

a lo largo de todo el material mientras mantienen las propiedades mecánicas similares a las del sólido, ésta característica ha llevado al uso generalizado de hidrogeles como un material de andamio (*scaffolds*) en aplicaciones biomédicas, incluyendo la entrega de fármacos, capacidad de absorción, capacidad de encapsulación o inmovilización de moléculas de interés, capacidad de interacción con medio biológicos, funcionalización química y encapsulación de materiales funcionales, liberación controlada de fármacos, capacidad de cicatrización, cinética de hinchamiento, permeabilidad para disolver solutos, propiedades superficiales por ejemplo adhesividad, características mecánicas y ciertas propiedades ópticas; sin embargo la propiedad más importante de los hidrogeles es el grado de hinchamiento que estos presentan ya que las otras propiedades están directamente influenciadas por ésta dado a que su microestructura y propiedades interfaciales pueden responder a diversos estímulos a través de señales fisicoquímicas, así como campos aplicados, dando como resultado materiales "inteligentes" capaces de responder a su entorno local y necesidades de diseño. [22] [24]

▪ Hidrogeles de Polietilenglicol (PEG)

Los hidrogeles de PEG es uno de los materiales más ampliamente estudiados y usados para aplicaciones biomédicas, dado a que éstos son no tóxicos, no inmunogénicos, y están aprobados por la *Food and Drug Administration (FDA)* para diversos usos clínicos ; en muchos casos, el PEG se ha aplicado como un "material silencioso" ya que es inerte a la mayoría de las moléculas biológicas tales como proteínas; en su forma más común, el polietilenglicol (PEG) es un poliéter polimérico con grupos hidroxilos en sus extremos y su estructura general se muestra en la Figura 3.

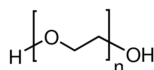


Figura 3. Estructura del PEG

Además el PEG es soluble tanto en agua como en solventes orgánicos, lo cual le permite poder ser funcionalizado fácilmente y que la conjugación química a nanopartículas o biomoléculas, pueda hacerse en condiciones suaves sin que afecten la estabilidad de éstas.

El PEG es un inmunógeno débil, incluso los de altos pesos moleculares, no se ha observado generación de anticuerpos anti-PEG durante la aplicación clínica “normal” de proteínas PEGiladas, así como de ningún patrón de toxicidad o efectos adversos asociados a la presencia del PEG en las formulaciones farmacéuticas aprobadas.

En principio, los coloides de hidrogel con motivos litográficos pueden prepararse por cualquiera de las vías típicamente utilizadas para producir un enlace cruzado, incluyendo la reticulación química, la asociación física, y el autoensamblaje molecular [9].

Método de formación de hidrogel en el proceso litográfico es a través de la reticulación covalente a través de la reacción de polimerización. Casi todos los estudios hasta la fecha implican la polimerización de radicales libres fotoiniciada debido a la iniciación controlada y la cinética de propagación relativamente rápida comparada a otros tipos de polimerización. La inmensa mayoría de estos métodos implica el procesamiento de un precursor de hidrogel que consiste en, al mínimo, un fotoiniciador, un monómero o polímero reactivo, y un agente reticulante.

Los precursores de hidrogel usados en el procesamiento litográfico se basan típicamente en especies funcionalizadas con acrílico, incluyendo acrilatos y metacrilatos.

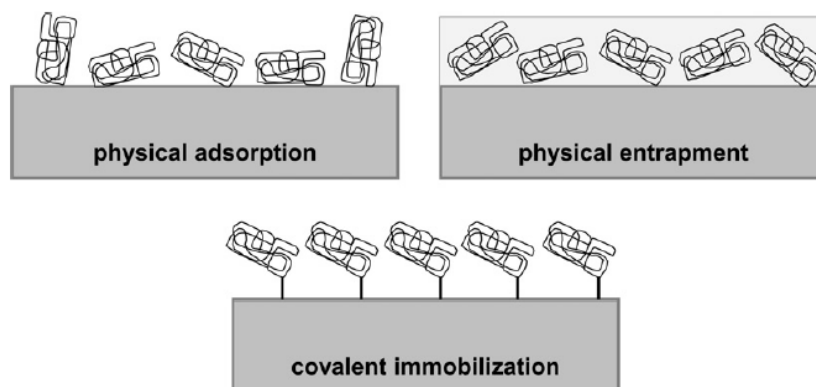
Los precursores más comúnmente utilizados se basan en poli (etileno) glicoles (PEG) ya que son relativamente baratos, disponibles en una amplia variedad de pesos moleculares y químicas derivadas, biocompatibles, y presentan una citotoxicidad insignificante [27].

2.5.2. Inmovilización de moléculas

Se han estudiado diferentes métodos para la inmovilización de biomoléculas en las superficies de implantes, incluyendo la **adsorción física**, la cual se realiza a través de fuerzas de van der Waals o fuerzas electrostáticas, la adsorción de biomoléculas en superficies por métodos de inmersión simple es el método más directo, sin embargo, esto tiene el inconveniente de que dicho método aporta muy poco control sobre la cinética de liberación y, por lo tanto, la liberación, retención y orientación de las moléculas adsorbidas se ven obstaculizadas; en general, la fuerza motriz para la adhesión y la estabilidad de tales moléculas en las superficies depende solamente de una fisorción deficiente; **atrapamiento físico**, por ejemplo, a través de sistemas de barrera o hidrogeles; éste método en comparación con la adsorción o atrapamiento de la matriz para la funcionalización de la superficie, este método es en principio más complejo ya que a

diferencia de la adsorción y atrapamiento de biomoléculas, las moléculas que están unidas covalentemente a la superficie y genera la ventaja de soportar cargas muy altas y las tasas de pérdida relativamente bajas; las biomoléculas que se inmovilizan sobre las superficies del implante van a interactuar directamente con el tejido huésped circundante durante un cierto período de tiempo para activar completamente las respuestas celulares, por lo tanto, las concentraciones inmovilizadas en tales superficies deben superar los niveles umbral para la actividad celular; e **inmovilización covalente**, la cual se basa en la activación de grupos químicos para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas; dentro de las más usadas para la formación de enlaces son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina y el ácido aspártico y glutámico. [4] [25]. Estos métodos de inmovilización se representan en la Figura 4. [4]

Figura 4. Métodos de inmovilización de sustancias. Tomado de la Fig. 19. [4]



Con el fin de garantizar una respuesta óptima en términos de adhesión y cinética de liberación para aplicaciones médicas de la inmovilización de las biomoléculas, se hace necesario una comprensión más profunda de la biología y la bioquímica del tejido huésped en la interfaz en términos de mecanismos por los que las células se adhieren a las superficies, el papel de las biomoléculas, secuencias de péptidos funcionales y proteínas de la matriz extracelular en influir o regular la diferenciación y generación de hueso y tejido. [5]

Pierschbacher y Ruoslahti encontraron que la secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) constituía el sitio activo de varias proteínas de matriz plasmática y matriz extracelular, tales como fibronectina, vitronectina, colágeno tipo I y osteopontina, éstos

péptido se han inmovilizado sobre superficies, con lo cual se ha logrado mejorar notablemente la adhesión celular, sin embargo, una variedad de células tisulares poseen las mismas integrinas, y por lo tanto la fijación inespecífica de esas células a superficies modificadas con RGD están siendo investigadas, con el fin de obtener superficies funcionalizadas, modificadas con agentes de unión celular y factores de crecimiento que son más selectivas hacia la formación de células óseas.[5]

- **Inmovilización de proteínas: Colágeno.**

Los recubrimientos de colágeno han sido intensamente investigados ya que poseen la capacidad de imitar las condiciones de la matriz ósea y el tejido duro y cartilaginoso debido a que éste se encuentra naturalmente en el cuerpo humano, hasta el 2010 se habían identificado alrededor de 30 tipos diferentes de colágeno en vertebrados, además de éstos también existen algunos colágenos invertebrados que son de interés potencial en la ingeniería de tejidos debido a una mayor resistencia a las proteasas y excelentes propiedades biomecánicas.

Los colágenos son capaces de ensamblarse en una gran variedad de estructuras extracelulares, la mayoría de ellos desempeñan un papel estructural esencial en la organización y la estabilidad de los tejidos, pero además sirven como sustratos para la adhesión celular, la migración y la proliferación.

Además como el colágeno es el principal componente extracelular en la mayoría de los tejidos, los colágenos están involucrados en numerosas interacciones célula-matriz y la regulación de muchas funciones fisiológicas, como la agregación plaquetaria, cicatrización de heridas, procesos fibróticos, encapsulación tumoral y homeostasis de los tejidos, por lo tanto, la mayoría de las células tisulares son capaces de unirse, esparcirse y proliferar en superficies planas recubiertas de películas de colágeno nativo (triplehelical) o desnaturalizado (bobina aleatoria), independientemente de la naturaleza química del material de soporte, siempre que no sea tóxico y pueda absorber colágenos, entonces para muchos propósitos, el recubrimiento superficial con gelatina, que es el colágeno desnaturalizado tipo I extraído del hueso o la piel, es un procedimiento simple, efectivo y más barato.

Además, se han investigado los recubrimientos de colágeno para la incorporación de biomoléculas y se ha demostrado una fuerte capacidad para interacciones cooperativas

entre factores de crecimiento; además se es un agentes bioactivos a la interfase hueso-implante. [4][5].

2.5.3. Nanolitografía

Las modificaciones de las superficies en la escala nanométrica tienen un efecto sobre la reactividad química de un material biomédico y, por lo tanto, afectarán las interacciones iónicas o biomoleculares de la superficie con el tejido huésped.

Tales cambios en las propiedades superficiales alteradas por modificaciones a nanoescala pueden cambiar las propiedades de humectación y posteriormente conducir a una adsorción de proteínas o influir en la mineralización de la formación de hueso nuevo.

La importancia de la topografía a escala nanométrica ha sido tema de interés en investigaciones recientes, debido a que los procesos y reacciones biológicas son sensibles a la nanotopografía dado a las pequeñas diferencias en la química entre una parte de la topografía y otra.

Hasta ahora no existe un conocimiento absoluto sobre la influencia de tales características en el entorno biológico, debido a la dificultad de obtener superficies estandarizadas con topografía ordenada a nanoescala con resolución y repetibilidad altamente controlable.

La creciente disponibilidad de métodos para obtener estructuras superficiales a escala nanométrica ayudará a dilucidar los fenómenos e interacciones entre proteínas y células específicas. [26] [27]

▪ Nanolitografía mediante AFM

La demanda por un elevado desempeño, integridad, repetibilidad, reproducibilidad y miniaturización de superficies ha conllevado al desarrollo de diversas técnicas nanolitográficas, la nanolitografía obtenida mediante el microscopio de fuerza atómica, AFM, es considerado como una de las mejores técnicas de litografía para la fabricación de nanoestructuras, debido a su excelente capacidad de manipulación a nivel atómico. [27]

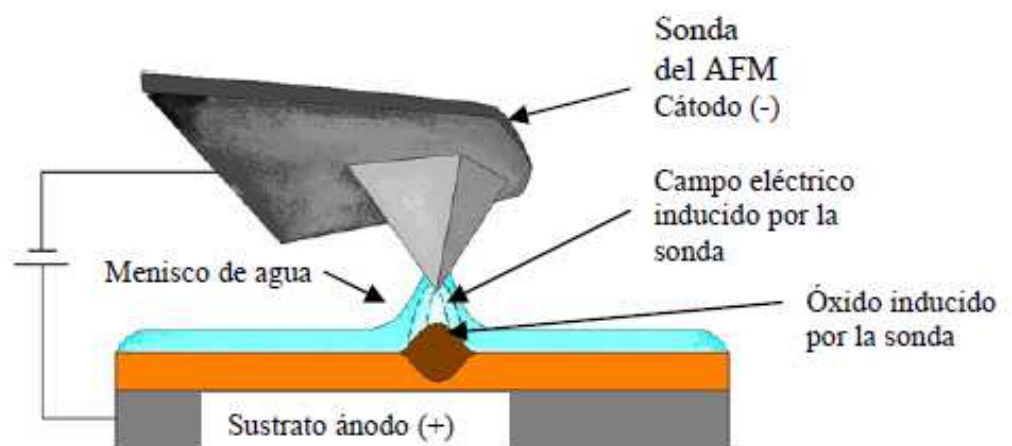
▪ Nanolitografía mediante oxidación anódica local (Anodic Oxidation- LAO)

Con el AFM (Atomic Force Microscope) marca Park System, modelo NX-10, usando los software XEP (Data Acquisition Program for XE series SPM) y XEL (Nanolithography

Software) se realiza la litografía LAO (Local Anodic Oxidation) la cual se basa en la oxidación anódica local de las superficies y es una técnica que ha sido utilizada para la fabricación de nanoestructuras y dispositivos a escala nanométrica; ésta técnica involucra la aplicación de un potencial eléctrico tanto en la sonda conductora como en la muestra para oxidar localmente regiones seleccionadas o patrones diseñados. [26] [27].

Éste proceso de oxidación es presentado esquemáticamente en la Figura 5 en el cual se aplica un potencial entre la muestra y la punta, la electrolisis del menisco de agua formado por la fuerza de capilaridad entre la punta (cátodo) y la humedad absorbida por la superficie de la muestra (ánodo) suministra los aniones necesarios para la oxidación de los sustratos. El potencial aplicado a la muestra además suministra un fuerte campo eléctrico que permite la migración de iones a la muestra.

Figura 5. Esquema de oxidación anódica local inducida por la punta del AFM.

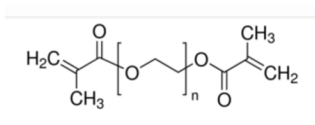


3. CAPÍTULO 3: REACTIVOS Y MÉTODOS

3.1. Reactivos utilizados

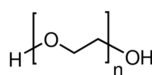
- Polietilenglicol Dimetacrilato (PEG-DMA) con $M_n = 550$ (Número molecular), marca Sigma-Aldrich. (Anexo A)

Figura 6. Estructura molecular del PEG DMA.



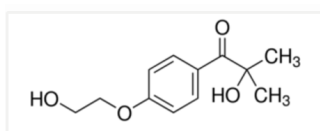
- Polietilenglicol (PEG) de $M_n = 1000$

Figura 7 Estructura molecular del PEG



- 2-Hidroxi-4'-(2-hidroxi-etoxi)-2-metilpropiofenona (Agente Reticulante UV, Irgacure D 2959) al 98%, marca Sigma-Aldrich (Anexo A)

Figura 8. Estructura molecular del Agente Reticulante UV. Irgacure 2959



- Colágeno, Colágeno Tipo 2.
- ASTM F136, aleación de Titanio grado quirúrgico. Proveedor: Quirúrgicos especializados S.A

Tabla 3. Composición química del Titanio ASTM F136. [18]

Elemento	Al	V	Fe	O	C	N	H	Ti
%	5.5-6.5	3.5-4.5	0.25 (Max)	0.13 (Max)	0.08 (Max)	0.05 (Max)	0.012 (Max)	Balance

- ASTM F138 aleación de Hierro grado quirúrgico. Proveedor: Quirúrgicos especializados S.A.

Tabla 4. Composición química del Acero ASTM F138.[20]

Elemento	C	P	Si	Ni	Cu	Mn	S	Cr	Mb	N	Fe
%	0.03	0.025	0.75	13-15	0.05	2	0.01	17-19	2.25-3	0.1	Balance

3.2. Métodos

3.2.1. Métodos de obtención

- **Preparación de la superficie**

Se realizó un pulido manual en seco con papel abrasivo de Carburo de Silicio con números 240, 400, 600, 1200 y 2000. Luego un pulido mecánico en paño con micropartículas de alúmina de 5 μm . Adicionalmente fue realizado un pulido mecánico en paño con micropartículas de alúmina de 0.05 μm .

- **Patronamiento de las superficies mediante Oxidación Anódica Local LAO**

Los óxidos (Patrones) se obtuvieron mediante la técnica de oxidación anódica local haciendo uso del AFM, realizando un diseño previo en el software XEL del AFM y posteriormente se aplicó la técnica LAO, como se muestra en la Figura 5.

- **Obtención del hidrogel**

El hidrogel se obtuvo mediante mezclado con agitación magnética y a una temperatura de 40°C la mezcla polimérica (PEG-DMA y PEG) en relación 2 a 3. En otro recipiente se obtuvo la solución acuosa coloidal del colágeno a una concentración de 4%, mediante agitación magnética a una temperatura de 40°C.

Posteriormente se mezclaron las dos soluciones en relación 1 a 1. Luego se le adicionó un 1% del agente reticulante UV, se aplica sobre las probetas (patronadas y sin patronar) de forma manual por inmersión asegurando de forma visual la aplicación de una película delgada. Posteriormente se sometió a irradiación UV con una longitud de onda de 365 nm, en atmósfera de nitrógeno durante 60 minutos para lograr la reticulación del PEG-DMA y por lo tanto el encapsulamiento del colágeno en una red tridimensional (*scaffolds*).

3.2.2. Métodos de caracterización

▪ Caracterización morfológica

Una vez obtenidos los patrones, se evaluó su morfología mediante el AFM mediante el módulo de contacto, en el cual la punta del AFM realiza un barrido en donde la fuerza entre punta y la muestra se mantiene constante, ésta corresponde a la constante de deflexión propia del tipo de punta y muestra en específico, en donde la deflexión de la punta estática se utiliza como una señal de retroalimentación con el fin de obtener información topográfica y morfológica de los patrones diseñados sobre las superficies.

Dichas mediciones se corroboran usando el *SEM (Scanning Electron Microscope)* el cual obtiene imágenes de alta resolución de la superficie.

Para la caracterización morfológica del hidrogel se usan imágenes de microscopía confocal e imágenes de AFM, el cual se utiliza en el modo de no contacto para la preservación de la muestra y la punta del AFM.

▪ Caracterización fisicoquímica

La caracterización fisicoquímica constó de caracterización química (composicional y elemental), eléctrica y mecánica.

Para la **caracterización química**, se empleó, para los metales, un estudio metalográfico para cada uno con el fin de identificar las diferentes fases presentes antes de la oxidación anódica local; luego de obtenidos los patrones se caracterizaron, mediante la obtención de espectros RAMAN, con el fin de identificar compuestos y mediante espectroscopía de energía dispersiva de rayos X, *EDS (Energy Dispersive X-ray spectroscopy)*, con el fin de realizar un análisis elemental.

Adicionalmente, el hidrogel obtenido fue caracterizado mediante espectroscopia Raman con el fin de identificar la presencia de colágeno en forma micelar.

Para la **caracterización eléctrica**; se utilizó el modo *EFM (Electrostatic Force Microscopy)* del AFM que opera en No-Contacto de forma dinámica, es decir que el cantiléver oscila sin tocar la muestra según sean las fuerzas de atracción y repulsión entre la punta y la muestra; éste mapea las propiedades eléctricas en una superficie al medir la fuerza electrostática entre la superficie y el cantiléver de AFM cargado con un voltaje específico, el cantiléver entonces, se desvía cuando escanea cargas estáticas. Se usa

también SKPM (Scanning Kelvin Probe Microscopy) usando también el módulo de EFM en el AFM, su principio de funcionamiento es similar al del EFM sin embargo se mejora la señal mediante un voltaje de polarización de corriente directa eliminando el voltaje entre la muestra y la punta, obteniéndose así el potencial de superficie de la muestra.

Para la **caracterización mecánica** de los sustratos y los sustratos patronados se empleó el AFM en el modo de *PinPoint Nanomechanical*, definiendo para el sistema la fuerza de contacto y el tiempo de contacto entre la punta y la muestra; por lo cual se obtienen en tiempo real y a alta velocidad, curvas fuerza-distancia en cada pixel de la imagen analizada, lo que permite estudiar la variación y la posición de las propiedades mecánicas en las superficie a altas resoluciones, posteriormente el software arroja imágenes de algunas propiedades mecánicas, tales como: módulo de Young, deformación, adhesión, entre otras.

Para el análisis de las propiedades mecánicas del gel se usó el método de nanoindentación usando un nanoindentador IBIS Authority, Fisher- Cripps laboratorios con una punta de indentación de diamante de Berkovich, realizando sobre la superficie del hidrogel nanoindentaciones a una carga específica, con el fin de obtener curvas de deformación fuerza-distancia.

- **Caracterización biológica.**

Para los ensayos in-vitro, fueron utilizadas células de la línea osteosarcoma humano (HOS, ATCC –CRL-1534). Durante el manejo y preparación de los medios de cultivo se mantuvo un ambiente estéril, como el material y muestras utilizadas fueron previamente esterilizadas mediante peróxido de hidrógeno a 40°C durante 1 hora.

Para el trabajo con células en los ensayos in-vitro fue necesario el cultivo celular previo hasta alcanzar el número de células viables óptimo para su posterior uso. Para su cultivo, estas fueron mantenidas en cajas de cultivo, se utilizó como caldo de cultivo una solución RPMI-1640 (Gibco, Brasil) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (BSA) (Gibco, USA) para favorecer el crecimiento y reproducción celular, además al caldo de cultivo le fue agregado 1% de Penicilina Estreptomina para evitar alguna contaminación por microorganismos. Los medios de cultivo se mantuvieron en incubación bajo una atmósfera de 5% de CO₂, 95% de humedad y temperatura de 37°C, cada vez que las células presentaban un 90% de confluencia celular se realizaba un subcultivo. Para esto las células

fueron desprendidas de la superficie utilizando una solución de tripsina-EDTA (0.05% Tripsina-0.02% EDTA-4Na-99.93% PBS Thermo-Fisher Scientific), parte de las células viables fueron trasladadas a unas cajas nuevas de cultivo hasta alcanzar una confluencia del 90% para repetir el proceso.

Tras la realización de las pruebas In Vitro, se llevó a cabo un proceso de fijación celular con el fin de analizar la **morfología celular**, la adherencia celular, así como el crecimiento celular sobre la superficie, el cual es un indicio de una buena compatibilidad de estos ante el contacto con un cuerpo biológico. Para el caso de los recubrimientos, la adherencia de células óseas sobre la superficie juega un papel importante en el proceso de osteosíntesis.

Posteriormente se identificó el crecimiento de HOS en las diferentes superficies mediante imágenes SEM. Una vez las muestras estériles fueron retiradas y colocadas en el campo de trabajo estéril, colocándolas en una caja de pozos, posteriormente se les añadió 2mL de caldo de cultivo RPMI-10% BSA-1% Penicilina Estreptomina y se dejó temperar a 36.5°C, una vez alcanzada la temperatura se adicionó un ml de una solución 1.5×10^4 células/ml en fase de crecimiento exponencial y se dejó en incubación bajo condiciones de crecimiento celular a una atmosfera de 5% de CO₂, 95% de humedad y temperatura de 37°C, por un periodo de 4 días, el medio fue cambiado al segundo día de haber iniciado el proceso de incubación celular; una vez transcurrido el tiempo total de incubación les fue retirado el medio a las muestras para su posterior preparación para análisis mediante SEM.

Para la preparación de muestras para ser observadas en el SEM, fue necesario llevar un procedimiento de lavado mediante solución PBS1X para eliminar residuos de solución RPMI, con el fin de preservar las células se pasó a un proceso de fijación celular mediante inmersión de la muestra en una solución de 4% de glutaraldehído en PBS con incubación toda la noche a 4°C; posteriormente las muestras fueron lavadas con solución PBS1X. Una vez fijadas las células se realizó una deshidratación de la matriz celular mediante inmersión en etanol al 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% comenzando con la menor concentración y lograr una deshidratación por 10 min en cada solución, finalmente se dejaron secar por 10 horas en desecador y se recubrieron con oro para su observación en SEM.

Luego se analizaron la **citotoxicidad celular**, la cual es definida como una alteración de las funciones celulares básicas causadas por un agente citotóxico, cuya interacción

conlleva a que se produzca un daño celular irreversible el cual puede ser detectado. Para evaluación de citotoxicidad en células se encuentra el ensayo de reducción del MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólico) a nitroazul de tetrazolio (NBT) o Formazan. El MTT es captado por las células viables y reducidas a Formazan por la acción enzimática de la succinodeshidrogenasa mitocondrial, el formazan producido queda retenido en las células, para su cuantificación debe ser liberado mediante la solubilización de las células. La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional, la cual es interpretada como una medida de la viabilidad celular, esto muestra una relación directa en citotoxicidad celular al compuesto que se evalúa. Dicha reacción fue cuantificada mediante un método colorimétrico, ya que se produce como consecuencia de la reacción un cambio de coloración del amarillo al azul.

Para el ensayo de citotoxicidad mediante reducción de MTT, los materiales fueron colocados en inmersión en un medio de caldo de cultivo RPMI-10% BSA-1% Penicilina durante un periodo de 20 días, dicho tiempo tiene como objetivo la posible liberación de partículas que pudieran tener un comportamiento citotóxico ante las células HOS, posteriormente el medio de inmersión ó sobrenadante fue retirado y mantenido en incubación. Son colocadas en placas de 96 pozos diluciones seriadas; 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16, de cada uno de los sobrenadantes previamente incubados, se agregó una concentración de $2,5 \times 10^4$ células/ml en fase de crecimiento exponencial, además se adicionaron $20\mu\text{l}$ de reactivo MTT, posteriormente fueron incubadas a condiciones de crecimiento celular durante 72 horas. La viabilidad celular fue medida mediante la prueba colorimétrica de reducción del MTT a Formazan, en la cual las mitocondrias de las células viables son capaces de reducir el MTT a cristales coloreados insolubles de formazan los que posteriormente son solubilizados por acción del dimetilsulfoxido (DMSO). La medida de la densidad óptica (DO) se determina por espectrofotometría a 580 nm usando el lector de microplacas Multiskan. El porcentaje de citotoxicidad se calcula mediante la siguiente expresión:

Ecuación 2. Porcentaje de citotoxicidad.

$$\% \text{ de citotoxicidad} = 100 * \frac{(\text{DO grupo control} - \text{DO grupo tratado})}{\text{DO Grupo control}}$$

4. CAPÍTULO 4: DISEÑO EXPERIMENTAL

4.1. Condiciones fijas

Según la revisión bibliográfica y ensayos preliminares, se fijaron las siguientes variables:

- **Substratos**

2 substratos comúnmente usados en osteosíntesis:

ASTM F136: Aleación de Titanio, Ti6Al4V ELI

ASTM F138: Acero inoxidable AISI-SAE 316LVM

4.1.1. Patrones obtenidos LAO

Se realizó crecimiento de óxidos en los metales propuestos por medio de LAO usando el AFM, dos tipos de patrones PL (Patrón Lineal) y PE (Patrón de Escamas), mostrados en las Figura 9 y Figura 10 respectivamente, en dos tamaños (recuadros de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ y de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$) sobre las superficies previamente preparadas.

Los cuales se les da la nomenclatura de:

PL5: Patrón de Líneas de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$

PL20: Patrón de Líneas de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$

PE5: Patrón de Escamas de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$

PE20: Patrón de Escamas de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$

Figura 9. Patrón de líneas

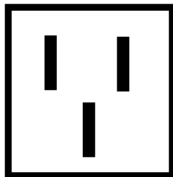


Figura 10. Patrón en escamas (PE)



- **Formulación del hidrogel para la fijación de colágenos a los sustratos patronados**

Según ensayos previos realizados en el laboratorio se fijó la composición del hidrogel, como se muestra en la Tabla 4:

Tabla 4. Composición porcentual del hidrogel.

COMPUESTO	PORCENTAJE EN PESO (%w/w)
Colágeno	2
Agente reticulante UV	1
PEG	30
PEG-DMA	20
Agua	47
TOTAL	100

4.2. Definición de variables

- **Condiciones para la Oxidación Anódica Local (LAO).**

Usando el software XEL (Nanolithography Software) del AFM, en LithoMode Bias, se analizaron las siguientes variables:

ScanRate, ScanSize y los voltajes de inicio y final de la nanolitografía como principales variables para lograr la Oxidación Anódica Local en cada uno de los sustratos.

- **Variable de respuesta: Morfología de los patrones.**

De los patrones, las variables de respuesta fueron, la morfología (crecimiento de óxidos) y la variable principal de respuesta fue el potencial de superficie, es decir se buscó una configuración de patrón con un cambio de potencial de superficie mayor, esto fue soportado con los ensayos de SKPM.

De acuerdo a esto, se seleccionó un patrón de cada sustrato con el mayor potencial de superficie.

- **Segunda variable de respuesta: Adhesión celular**

Posterior a la selección del patrón que presentó un aumento en el potencial de superficie, se llevaron a cabo ensayos biológicos de citotoxicidad y adhesión celular, evaluando las muestras con y sin la aplicación del hidrogel.

4.3. Matriz experimental

4.3.1. Primera fase

Obtención y caracterización morfológica, fisicoquímica y mecánica del hidrogel.

4.3.2. Segunda fase

Obtención y caracterización morfológica, fisicoquímica y mecánica de los patrones formados sobre los sustratos. El diseño experimental propuesto y llevado a cabo se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5 Diseño experimental del patronamiento.

TIPO DE SUSTRATO	PATRON	VARIABLE DE RESPUESTA
ASTM F136 (Aleación de Titano)	PL5	SKPM arroja valores de potencial de superficie, la cual se usa como variable de respuesta para seleccionar una probeta cuyo patronamiento aumente el potencial de la superficie.
	PL20	
	PE5	
	PE20	
ASTM F136 (Aleación de Hierro)	PL5	SKPM arroja valores de potencial de superficie, la cual se usa como variable de respuesta para seleccionar una probeta cuyo patronamiento aumente el potencial de la superficie.
	PL20	
	PE5	
	PE20	

4.3.3. Tercera fase

Tras la selección de las probetas de la segunda fase, estas fueron recubiertas con el hidrogel mediante la técnica *Dip Coating*. Luego de esto, se realizaron los ensayos biológicos descritos anteriormente (Citotoxicidad y Adhesión celular). La variable de respuesta fue la adhesión celular. El diseño experimental se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Diseño experimental para el material compuesto (Sustrato + Patrón + Hidrogel)

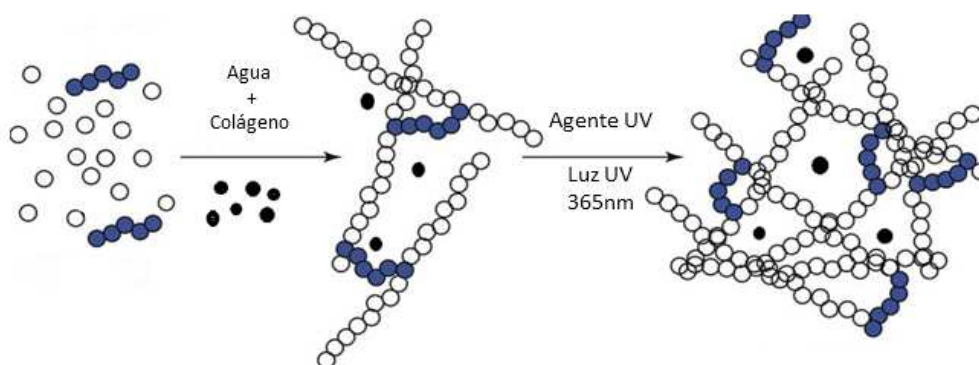
SUSTRATO	TRATAMIENTO SUPERFICIAL	VARIABLE DE RESPUESTA
ASTM F136 (Aleación de Ti6Al4V)	CON PATRÓN + HIDROGEL	Adhesión celular
	SIN PATRÓN + HIDROGEL	
ASTM F136 (Aleación de acero 316L)	CON PATRÓN + HIDROGEL	Adhesión celular
	SIN PATRÓN + HIDROGEL	

5. CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

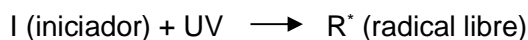
5.1. Resultados de la primera fase (Hidrogel)

Para la **Obtención del hidrogel que contiene el colágeno que se depositó sobre las superficies patronadas**, se siguió el procedimiento experimental descrito en la sesión 3.2, el cual se muestra esquemáticamente en la Figura 11.

Figura 11. Obtención del hidrogel.

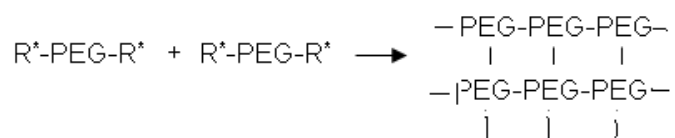


Tras la mezcla del PEG y PEG-DMA con el colágeno, se adicionó un agente reticulante UV (Irgacure 2959), comenzando un proceso de polimerización radicalaria que es un tipo concreto de polimerización en cadena; luego, al ser sometida la mezcla a irradiación UV, se da inicio a la fotopolimerización por radicales libres, la cual implica cuatro procesos: iniciación, propagación, transferencia de radicales y terminación. La iniciación comprende el proceso de la absorción de energía UV por el fotoiniciador, en éste caso el Irgacure 2959. Este fue elegido como agente reticulante UV sobre otros fotoiniciadores por su mayor solubilidad en agua, lo cual fue importante para contener las moléculas de proteína de colágeno suspendidas en solución, las moléculas de PEG hidratadas y el fotoiniciador juntos en la misma fase para que pueda producirse la fotoiniciación y formación de radicales; la formación de radicales y la reacción de un radical con un acrilato para crear un monómero reactivo se da, según como se describe en la siguiente reacción:

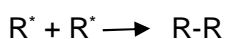


Dicho radical libre corresponde a la funcionalización de dimetilacrilato del reactivo.

La propagación parte del radical libre y luego se produce la transferencia de radicales libres, dejando reactivos la terminación del PEG produciéndose la reticulación, ya que se emplean polímeros multifuncionales capaces de unirse a cadenas lineales similares de PEG, y se comienza a formar la red polimérica tridimensional. Así:



Las cadenas laterales de PEG crean una superficie no contaminante, resistente a la unión celular y proteínas debido a la repulsión entrópica y al alto contenido de agua de las cadenas de PEG, debido a la interacción de los grupos OH en la estructura química con agua; la terminación de estas reacciones radicales solo se produce tras la reacción de 2 radicales cuando termina la irradiación UV o cuando se agotan los radicales libre. Así:



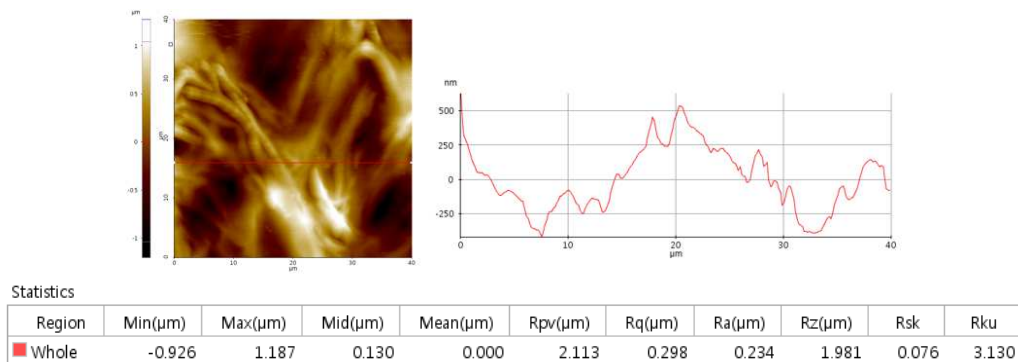
5.1.1. Caracterización morfológica

La caracterización morfológica del hidrogel se realizó mediante AFM y microscopia confocal, en estado fijado sobre los sustratos de Acero y aleación de Titanio. Imagen obtenida en AFM, junto con el respectivo perfil de rugosidad, es mostrada en la Figura 12. Imágenes confocales de la superficie del hidrogel es mostrada en la

Con relación a la caracterización morfológica del hidrogel, en la Figura 12 se observa que presentó una rugosidad promedio de 234 nm; dado que los sustratos fueron pulidos hasta acabado espejo, el espesor de la película de hidrogel puede tener unas cuantas micras, sin embargo este valor no fue determinado al no ser considerado relevante para el propósito de la investigación.

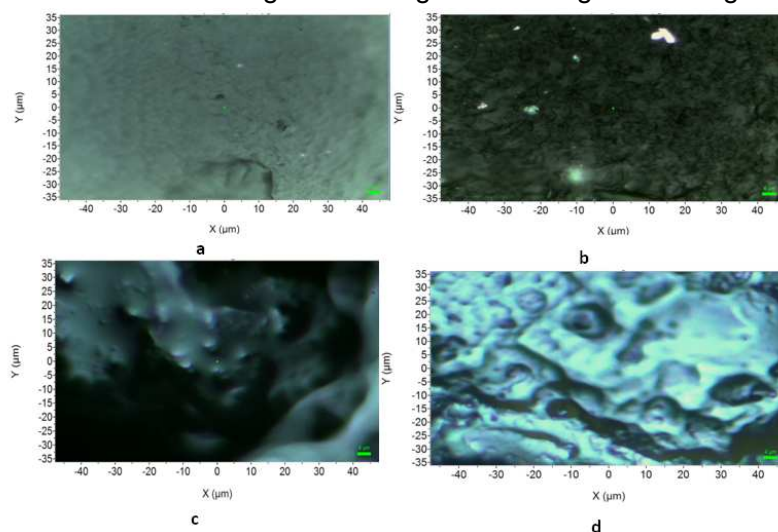
Figura 13.

Figura 12. Imagen AFM del hidrogel fijado sobre una muestra de acero y perfil de rugosidad



Con relación a la caracterización morfológica del hidrogel, en la Figura 12 se observa que presentó una rugosidad promedio de 234 nm; dado que los sustratos fueron pulidos hasta acabado espejo, el espesor de la película de hidrogel puede tener unas cuantas micras, sin embargo este valor no fue determinado al no ser considerado relevante para el propósito de la investigación.

Figura 13. Imágenes de microscopía confocal para la caracterización del gel. a. PEG Reticulado b. Hidrogel con colágeno c. Xerogel d. Hidrogel.



En la

Con relación a la caracterización morfológica del hidrogel, en la Figura 12 se observa que presentó una rugosidad promedio de 234 nm; dado que los sustratos fueron pulidos hasta acabado espejo, el espesor de la película de hidrogel puede tener unas cuantas micras, sin embargo este valor no fue determinado al no ser considerado relevante para el propósito de la investigación.

Figura 13.b. se aprecia la presencia de unas partículas (blancas), lo cual se presume que se trate del colágeno en forma micelar.

5.1.2. Caracterización fisicoquímica del hidrogel

- Espectroscopía micro Raman

El análisis composicional del hidrogel, se realizó por medio de espectroscopia Raman. Para este propósito, se obtuvieron espectros de cada una de los componentes empleados (PEG, PEG-DMMA, Colágeno y del gel reticulado con y sin colágeno); Los espectros son mostrados en la Figura 14 y Figura 15 y en la Figura 16 se muestra el espectro del PEG, de acuerdo a la literatura.

Figura 14. Espectro Raman del colágeno, PEG Reticulado, Gel sin colágeno y Gel con colágeno.

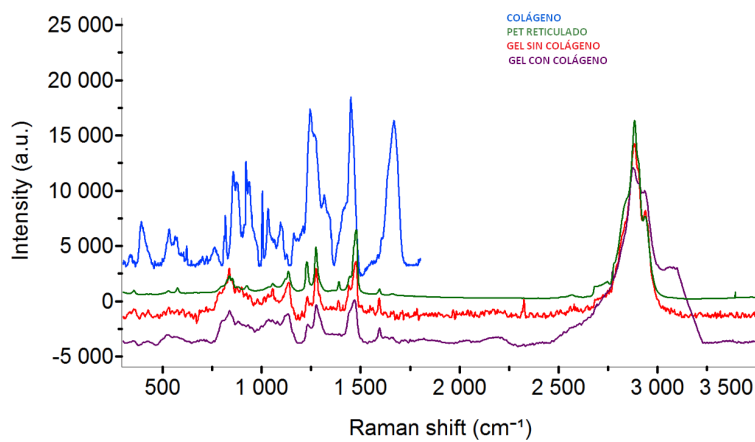
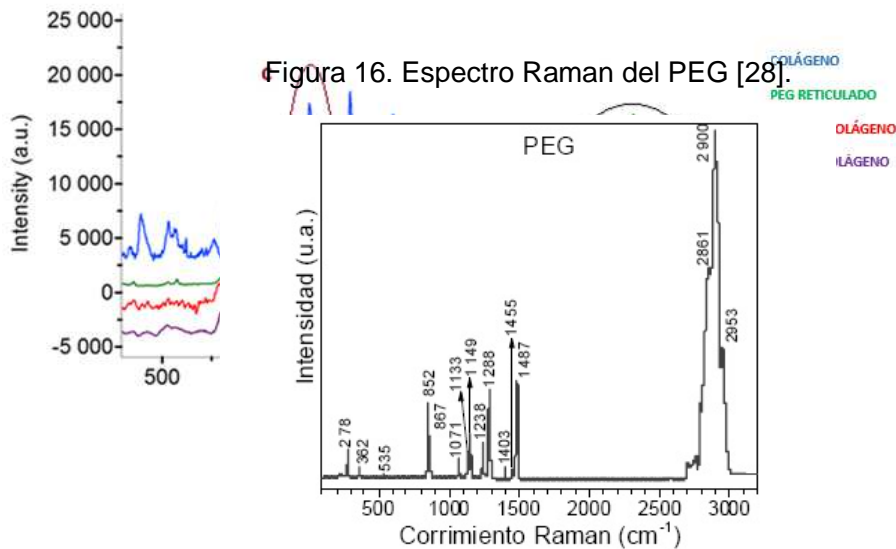


Figura 15. Análisis de los espectros Raman del hidrogel.



En el espectro Raman de la Figura 14 y Figura 15 se observan tres bandas características. Las bandas llamadas **(a)**, corresponden a las bandas típicas del PEG (de acuerdo a la Figura 16 [28]), junto con el colágeno, presenta una doble banda llamada **(b)**, que

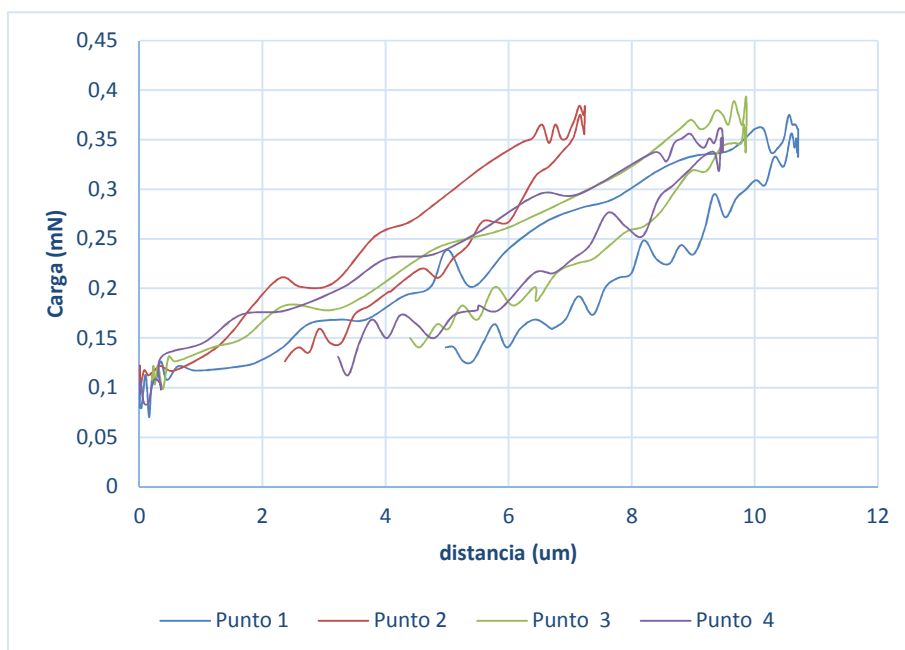
comparado con el espectro del hidrogel sin colágeno se observa que esta doble banda no aparece. Finalmente, las bandas llamadas **(c)** corresponden a un exceso de agente reticulante tras finalizada la irradiación UV.

5.1.3. Caracterización nanomecánica del hidrogel

Haciendo uso del método de nanoindentación, se realizaron indentaciones en 4 puntos diferentes y aleatorios sobre el hidrogel fijado sobre acero 316L, (sustrato usado como soporte para esta caracterización). Se aplicó una carga de 0,4mN (definido mediante ensayos previos, dado a que el hidrogel es un material muy blando) con el fin de lograr pasar el límite de elasticidad, hasta alcanzar una deformación plástica sin llegar a tener contacto con el sustrato.

En la Figura 17 se muestran las curvas fuerza distancia de cada uno de los puntos indentados. Adicionalmente, en la Tabla 7 se muestra el módulo de elasticidad y dureza, determinado en cada punto de medición.

Figura 17. Curva F/D con una carga de 0,4mN en 4 puntos aleatorios del hidrogel.



Estas curvas de fuerza-distancia, muestran una gran deformación, característica de materiales blandos poliméricos. El módulo de elasticidad esperado es bajo comparado con

otro tipo de materiales. La deformación plástica se explica en la amplitud de las curvas de retroceso. Igualmente es evidenciable que existe comportamientos mecánicos similares en todos los puntos medidos.

Tabla 7. Propiedades mecánicas del hidrogel.

PUNTO	DISTANCIA(μm)	MODULO DE ELASTICIDAD (GPa)	DUREZA (GPa)
Punto 1	10,65	0,00115633	0,00027324
Punto 2	7,21	0,00259723	0,00060098
Punto 3	9,85	0,00230894	0,00018192
Punto 4	9,46	0,00160816	0,00025811
PROMEDIO	9,29	0,00191766	0,00032856

De la Tabla 7, se observa que los datos del "Punto 2" son mayores (especialmente el valor de la dureza) que el resto de los datos por lo que podría corresponder a un aglomerado de colágeno ya que sus valores coinciden con los valores teóricos para el módulo de elasticidad y dureza del colágeno [24]. Por lo tanto se calcula el promedio de los valores de módulo de elasticidad y dureza el cual corresponde a 1.917 MPa y 0.328 MPa respectivamente, concluyendo que puede ser un material manipulable para procedimientos quirúrgicos [29][14].

5.2. Resultados de la segunda fase

5.2.1. Caracterización morfológica de los patrones crecidos sobre ASTM F136 (Acero) y ASTM F138 (Ti6Al4V)

Desde la Figura 18, hasta la Figura 21 se muestran las imágenes obtenidas mediante el microscopio de fuerza atómica de los patrones crecidos por la técnica LAO sobre el Acero 316L; así mismo, desde la Figura 21 hasta la Figura 25 se muestran los patrones crecidos sobre la aleación de Ti6Al4V. En éstas figuras se muestra el mapa de altura generado, en

donde las partes más claras representan una mayor altura, así mismo, al lado derecho de cada Figura se muestra un perfil de altura característico del crecimiento de estos óxidos.

Los óxidos crecidos sobre Acero 316L fueron obtenidos a un voltaje de anodización de -10V, a una velocidad de litografía de $0,2\mu\text{m/s}$, entre un 50 y 60% de humedad relativa a temperatura ambiente.

Figura 18. Patrón de líneas de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ en Acero 316L con línea de perfil de altura.

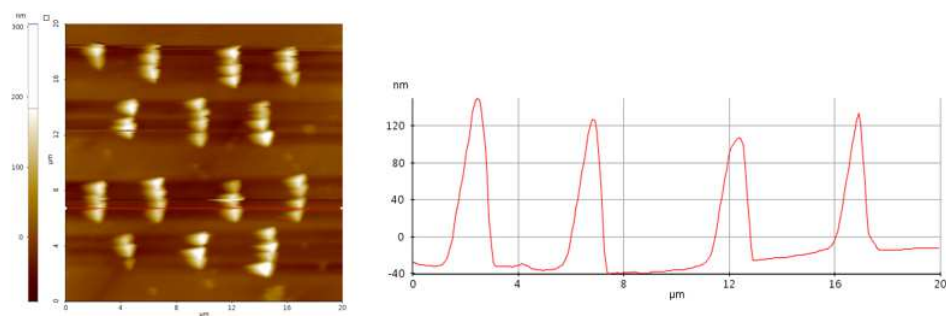


Figura 19. Patrón con líneas de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ en Acero 316L con línea de perfil de altura.

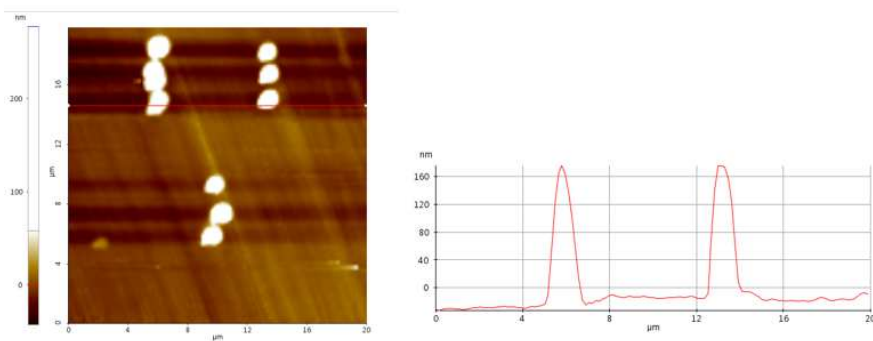


Figura 20. Patrón de escamas de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ en Acero 316L con línea de perfil de altura.

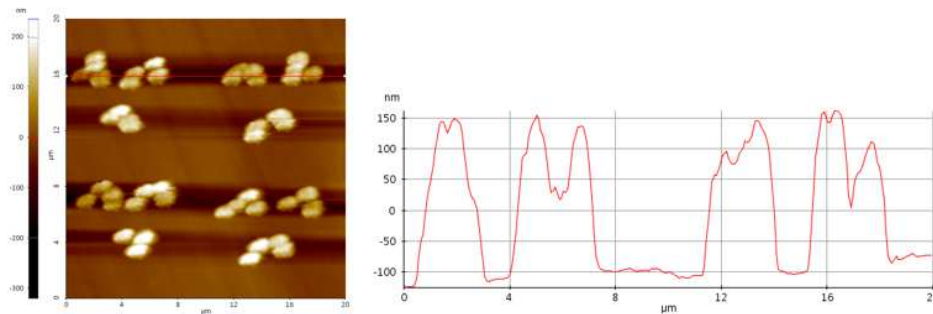
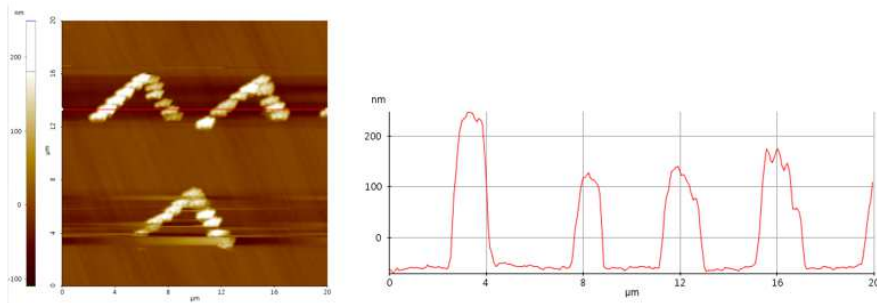


Figura 21. Patrón de escamas de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ en Acero 316L con línea de perfil de altura.



Los óxidos crecidos sobre aleación de Ti6Al4V, se muestran en las figuras 22 a la 25. Estos fueron obtenidos con un voltaje de anodización de -10V, a una velocidad de litografía de $0,08 \mu\text{m/s}$, entre un 50 y 60% de humedad relativa a temperatura ambiente.

Figura 22. Patrón con líneas de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ en Ti6Al4V con línea de perfil de altura

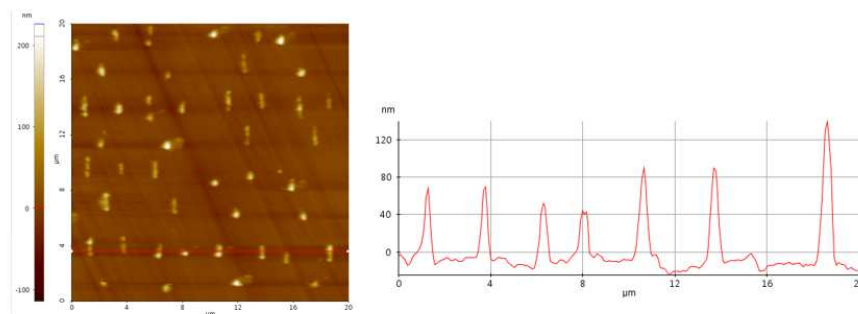


Figura 23. Patrón con líneas de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ en Ti6Al4V con línea de perfil de altura.

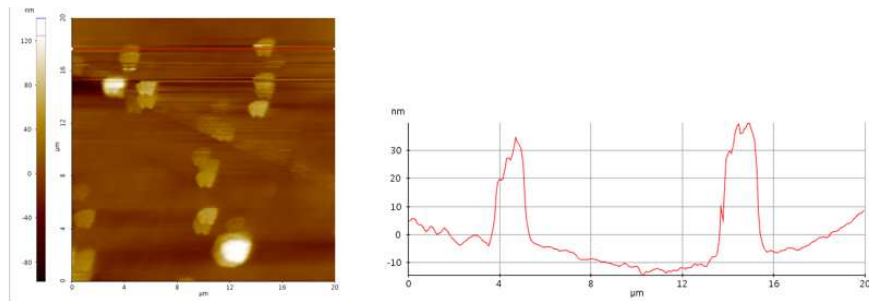


Figura 24. Patrón de escamas de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ en Ti6Al4V con línea de perfil de altura.

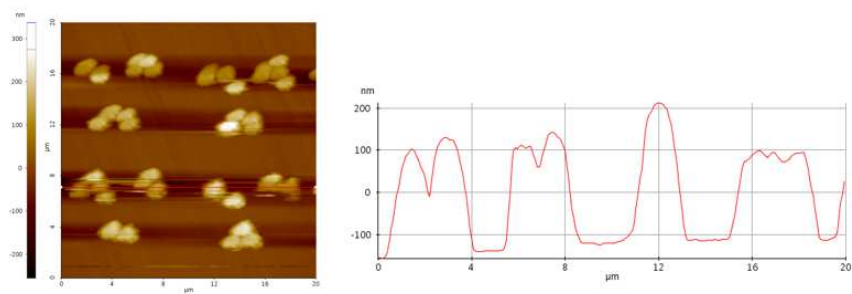
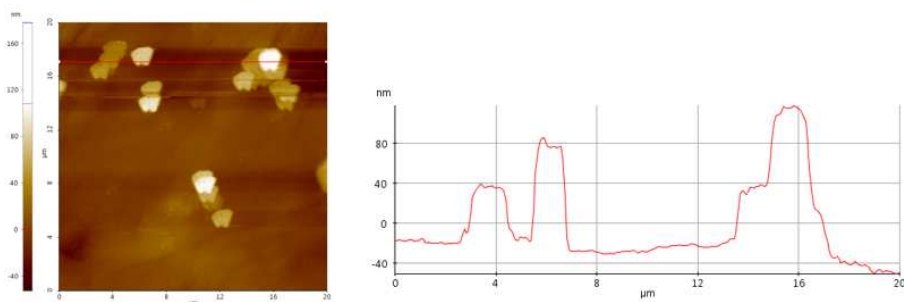


Figura 25. Patrón de escamas de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ en Ti6Al4V con línea de perfil de altura.



Las **Condiciones de nanolitografía LAO** para lograr el crecimiento de patrones nanolitográficos de los óxidos en los sustratos se resume en la Tabla 8.

Tabla 8. Condiciones de la nanolitografía en los sustratos

SUSTRATO	VELOCIDAD DE LITOGRAFÍA	VOLTAJE DE LA PUNTA	HUMEDAD RELATIVA DEL AIRE
ACERO ASTM F138	0,2 μ m/s	-10V	50-60%
TITANIO ASTM F136	0,08 μ m/s	-10V	50-60%

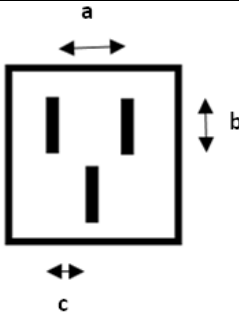
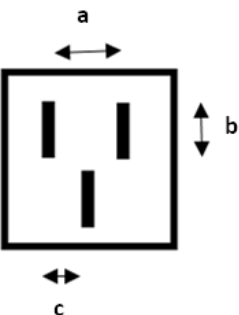
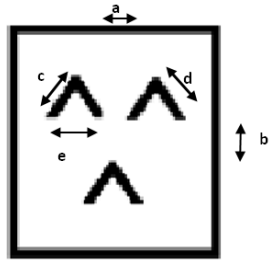
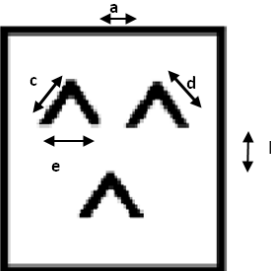
Dichas condiciones fueron encontradas mediante una matriz experimental que involucró para ambos sustratos, velocidades de litografía desde 0,01 μ m/s hasta 1 μ m/s; voltaje de la punta entre -1 V y -10 V y humedad relativa del aire entre un 30 y un 60%.

Como se muestra en la Tabla 8, el voltaje de la punta en ambos casos es de -10V, el cual corresponde al voltaje anódico máximo que logra el AFM; se decide trabajar con un valor fijo de -10V, sin embargo en el caso del acero 316L, se logra oxidar desde voltajes de -7V, y en el caso de Ti6Al4V, la oxidación apenas es aparente al voltaje de -10V.

Adicionalmente, para el análisis de la morfología de los patrones, tanto sobre Acero como sobre aleación de Titanio, fueron fijados en el software XEP el tamaño (Largo) y la ubicación (simetría en los diferentes tamaños), evaluando con esto el crecimiento (ancho y alto) de los patrones. Según las imágenes de AFM mostradas en la sección 5.2.1 y 5.2.2 desde la Figura 18 hasta la Figura 25, se evaluó la morfología promedio de los patrones, la cual se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Morfología de los patrones obtenidos, tanto en 316L como en Ti6Al4V.

PATRÓN	MORFOLOGÍA	ACERO 316L (ASTM F138)	Ti6Al4V (ASTM F136)
PL5	a (μ m)	2.1	2.1
	b (μ m)	1.8	1.8
	c (μ m)	1.1	1.1

	Ancho (μm)	0.52	0.52
	Alto (nm)	130	80
<p style="text-align: center;">PL20</p> 	a (μm)	7.9	7.9
	b (μm)	6.8	6.8
	c (μm)	3.9	3.9
	Ancho (μm)	0.52	0.52
	Alto (μm)	0.165	0.45
<p style="text-align: center;">PE5</p> 	a (μm)	0.6	0.6
	b (μm)	1.6	1.6
	c (μm)	1.7	1.7
	d (μm)	1.7	1.7
	e (μm)	1	1
	Ancho (μm)	0.52	0.52
	Alto (nm)	150	100
<p style="text-align: center;">PE20</p> 	a (μm)	5	5
	b (μm)	3.5	3.5
	c (μm)	5.2	5.2
	d (μm)	5.2	5.2
	e (μm)	3.2	3.2
	Ancho (μm)	0.52	0.52
	Alto (nm)	170	60

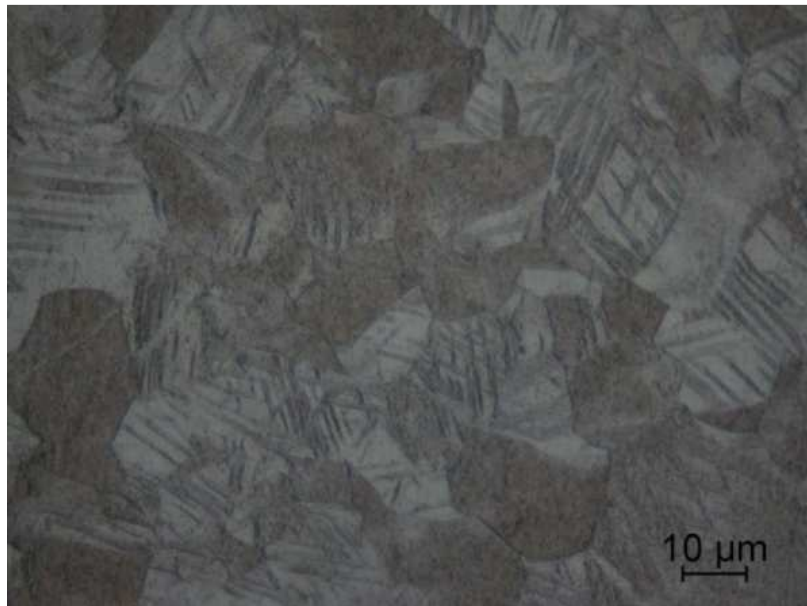
Con éstas configuraciones, se establecieron simetrías en el crecimiento de los patrones de óxidos en ambos sustratos (tanto de acero 316L y Ti6Al4V), excepto por la altura de crecimiento de estos, dado a que sobre 316L, las alturas de los patrones fueron en promedio entre 2 y 3 veces superior a las de la aleación de Titanio; como se puede ver en la Tabla 9. Una mayor diferencia en este efecto se observa en los patrones obtenidos a tamaños de 20umx20um.

En resumen, el crecimiento de los óxidos sobre Acero fue de 153,7 nm, con una desviación estándar de 12 nm; para el caso de la aleación de titanio fue de 71,25 nm con una desviación estándar de 20.72 nm. Esta diferencia se debe a que en las muestras de Ti6Al4V, los patrones en tamaño de 5x5 µm crecen más en altura que en los patrones en tamaño 20x20 µm; sin embargo, para el acero 316L, el crecimiento de los patrones fue más regular en ambos tamaños.

Adicionalmente, el crecimiento de los óxidos en ambos sustratos no se dio en líneas continuas, sino que fue constituido por formas lineales punteadas, atribuyéndose este fenómeno a factores como la rugosidad de la superficie antes de la nanolitografía, dado a que hay picos y valles que hacen que la punta (cantiléver del AFM) quede más cerca o más lejos de la superficie.

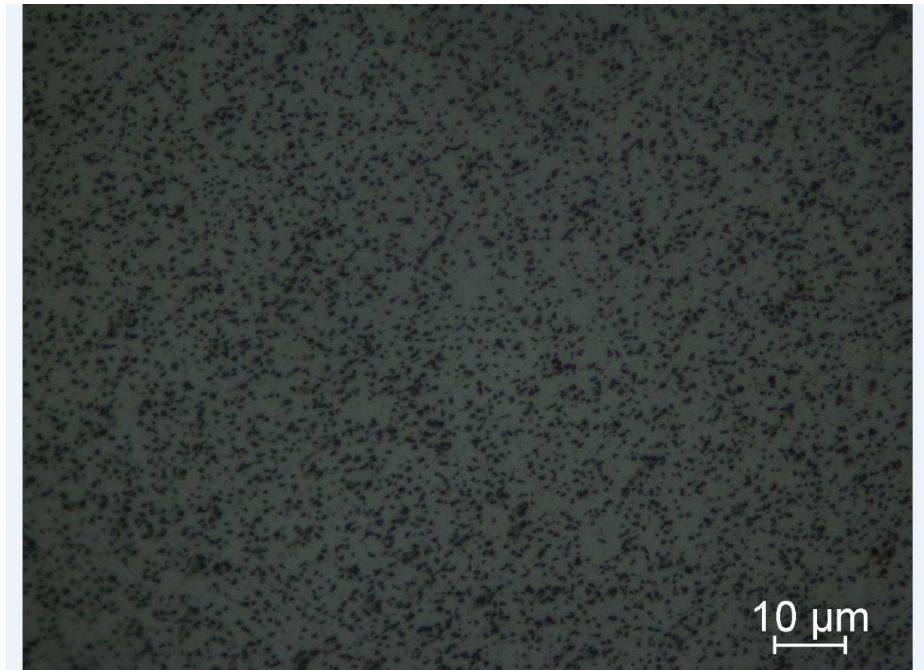
En el caso del acero, el tamaño de los granos en la microestructura es superior al de las características de los patrones obtenidos; como se muestra en la Figura 26; sin embargo para el caso del Ti6Al4V que se muestra en la Figura 27, el grano promedio es más pequeño que los patrones; por tal razón no se puede atribuir las irregularidades (en altura y continuidad) de los óxidos formados a la presencia de diferentes fases en ambas aleaciones. Dichas metalografías (Figura 26 y Figura 27) se obtuvieron con la preparación de superficie descrita en la sesión 3.2.1, luego se les realizó un ataque ácido para revelar el límite de grano.

Figura 26 Metalografía del Acero AISI-SAE 316L.



En esta Figura se observan granos definidos de la fase austenítica. Cambios en la coloración de diferentes granos en esta imagen, pueden ser atribuidos a un sobre ataque ácido de la superficie.

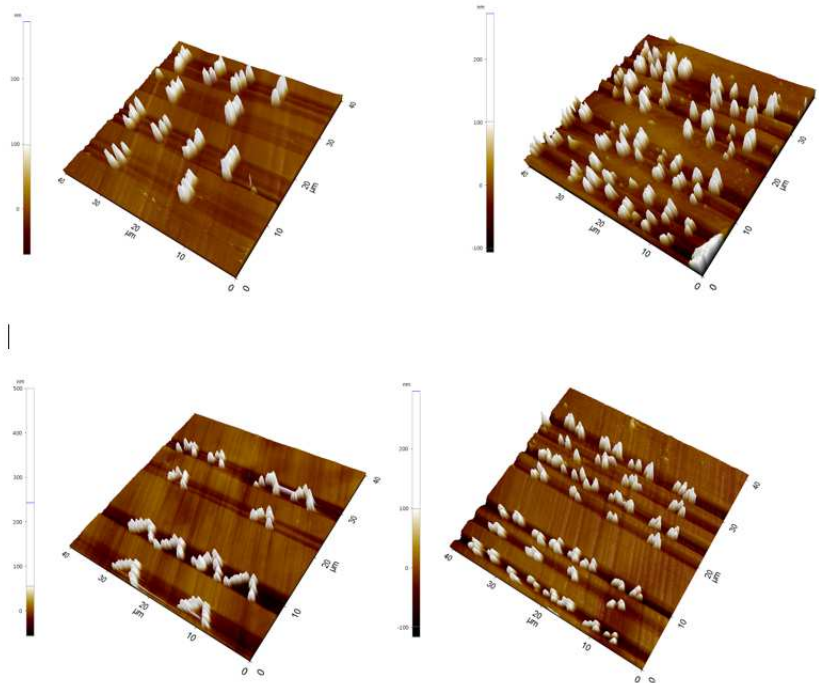
Figura 27. Metalografía de la aleación de Ti6Al4V.



Se puede observar la composición metalográfica presente en el material de estudio, con una estructura bifásica ($\alpha+\beta$); en la que se puede apreciar una fase beta (color oscura), contenida en una matriz de fase alfa (color claro).

En la Figura 28 se muestran imágenes tridimensionales de algunas de las áreas patronadas. Estas fueron obtenidas en el modo no contacto del microscopio de fuerza atómica.

Figura 28. Imágenes tridimensionales de algunos de los patrones.



Con el fin de analizar la rugosidad de las superficies antes y después de la nanolitografía por oxidación anódica local, se calculó el cambio en la rugosidad promedio de las superficies. Para esto se obtuvo una media de 50 medidas de diferentes perfiles (lineales) de las rugosidades de los sustratos antes del patronamiento, luego se comparó con la rugosidad de las superficies patronadas en áreas de $40 \times 40 \mu\text{m}^2$. Los resultados se muestran en las Tabla 10 y Tabla 11.

Tabla 10. Rugosidad en la superficie de Acero 316L antes y después de la nanolitografía por oxidación anódica.

PATRÓN	RUGOSIDAD Ra (nm) antes de LAO	RUGOSIDAD Ra (nm) después de LAO
Patrón de líneas de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$	4.9	29.2
Patrón de líneas de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$	5.7	16.17
Patrón de escamas de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$	4.9	20.3
Patrón de escamas de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$	5.4	18.2

Tabla 11. Rugosidad en la superficie de Ti6Al4V antes y después de la nanolitografía por oxidación anódica.

PATRÓN	RUGOSIDAD Ra (nm) antes de LAO	RUGOSIDAD Ra (nm) después de LAO
Patrón de líneas de $5 \times 5 \mu m^2$	4.2	23.2
Patrón de líneas de $20 \times 20 \mu m^2$	4.7	10.4
Patrón de escamas de $5 \times 5 \mu m^2$	5.1	25
Patrón de escamas de $20 \times 20 \mu m^2$	4.8	15.5

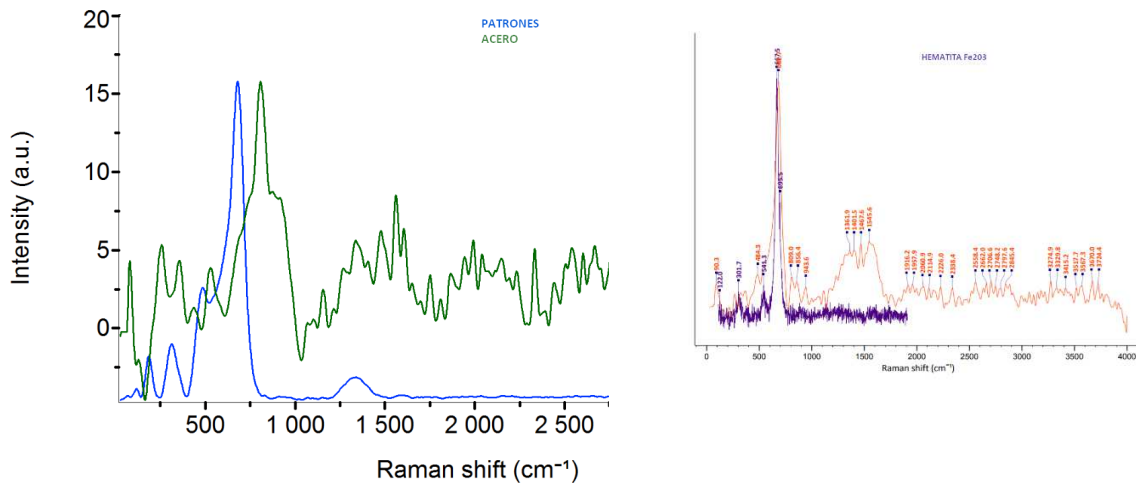
Se tiene entonces que la rugosidad promedio tras el proceso de pulido manual y con paño con suspensión de partículas de alúmina de $0,05 \mu m$ fue de 5,2 nm para del Acero 316L o ASTM F138 y de 4,7 nm para el Ti6Al4V o ASTM F136. Luego de la nanolitografía para el caso del acero, la rugosidad promedio fue de 20.96 nm con una desviación estándar de 4.97 nm y para el titanio fue de 18,52 nm con una desviación estándar de 5.97 nm.

5.2.2. Caracterización fisicoquímica de los patrones sobre ASTM F136 (Acero 316L)

- **Espectroscopia Raman sobre las superficies de Acero 316L, antes y después del patronamiento.**

En la figura 29 se presenta el espectro RAMAN para el acero 316L y los patrones crecidos sobre éste; con el fin de obtener información de los compuestos químicos formados tras el proceso de nanolitografía LAO. Además se muestra el espectro de la base de datos empleada para la respectiva comparación

Figura 29. a) Espectros Raman realizado sobre el Acero 316L y sobre los patrones crecidos. b) espectro correspondiente a hematita de la base de datos

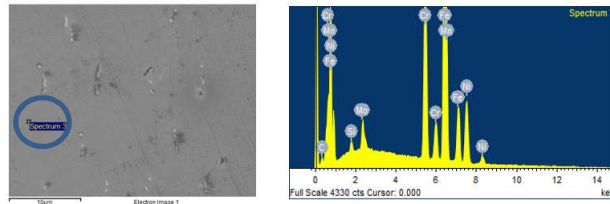


El espectro Raman de la Figura 29 con el láser del Raman ubicado en los patrones, muestra un pico característico a $667,5 \text{ cm}^{-1}$, el cual está referenciado al espectro del Óxido Férrico Fe_2O_3 en sistema cristalino trigonal (Figura 29b). Un desplazamiento a la derecha de este pico característico en la toma espectral realizada sobre la superficie del acero 316L, corresponde a efectos de amorficidad del óxido de hierro formado.

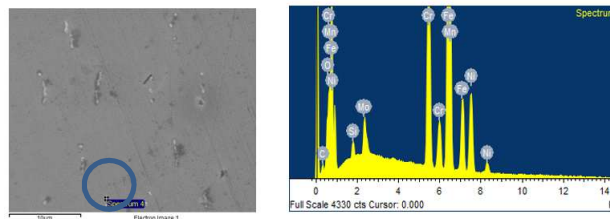
- **Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X: EDS sobre las superficies de Acero 316L, antes y después del patronamiento.**

En la figura 30 se presentan los resultados de la técnica EDS para las superficies patronadas (b), la cual genera un histograma con la composición elemental del sitio donde se realiza el espectro. Dado a que la composición elemental de las superficies y los óxidos crecidos son iguales en los diferentes tipos de patrones, se muestran solo los resultados de uno de ellos. En la figura 30a se muestra el espectro de rayos X de energía dispersa obtenido en la superficie sin patronar del acero 316L.

Figura 30. Resultados de EDS para la superficie de acero 316L patronada.



a. Espectro EDS-X sobre la superficie sin patrón.



b. Espectro EDS-X sobre la superficie en el patrón.

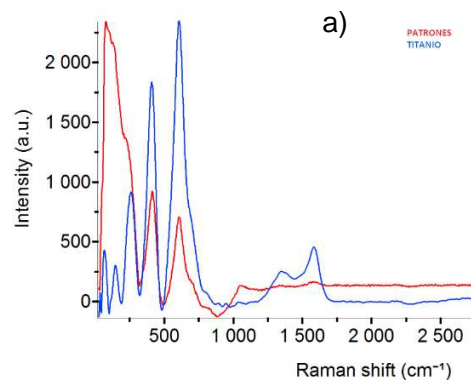
Mediante la técnica de EDS, se observan cambios importantes en el balance de composición elemental entre la superficie patronada y la superficie sin patronar, respecto al incremento en la composición de oxígeno en las muestras patronadas.

- **Espectroscopia Raman sobre las superficies de Ti6Al4V antes y después del patronamiento.**

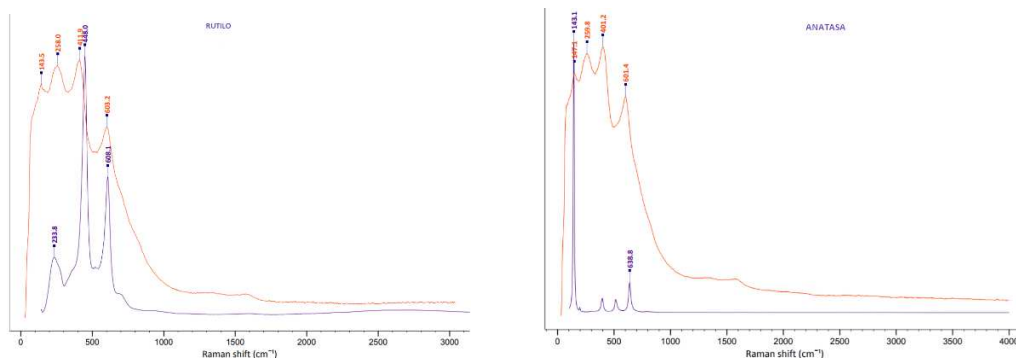
En la figura 31 se presenta los espectros Raman para la aleación Ti6Al4V y los patrones crecidos, con el fin de obtener información de los compuestos químicos formados tras el proceso de nanolitografía LAO.

Figura 31, a) Espectros Raman de la aleación de Ti6Al4V y los patrones crecidos.

b) espectros correspondientes a hematita y rutilo (base de datos)



b)

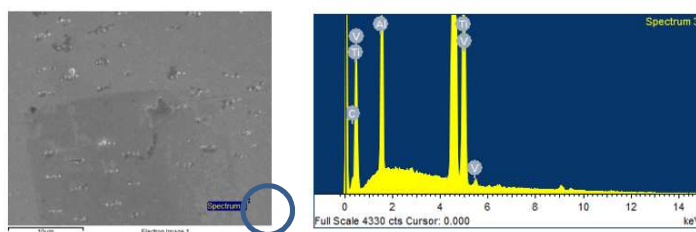


En estos espectros Raman, el espectro Raman, en los patrones, se observan picos correspondientes a la presencia de Óxido de Titanio TiO_2 en sus formas cristalinas octaédrica y tetragonal de anatasa (143 cm^{-1}) y rutilo (448 cm^{-1}), respectivamente. Sobre la superficie de la aleación sin los patrones, el espectro obtenido coincide con la forma cristalina de rutilo, con un grado menor de cristalinidad que en los patrones (dado por la observación del ancho de los picos característicos).

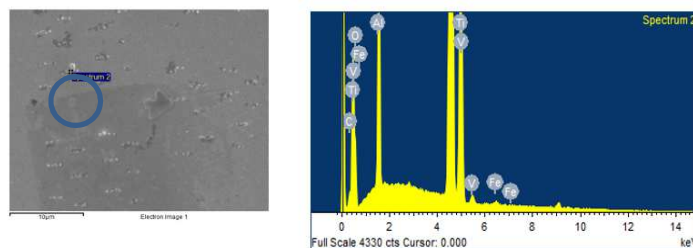
- **Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X: EDS sobre las superficies de Ti6Al4V, antes y después del patronamiento.**

Los resultados de EDS en los diferentes patrones son iguales pues su composición es la misma, por lo tanto se muestran solo los resultados de uno de ellos.

Figura 32. Resultados de EDS-X para la superficie de Titanio patronada



a. Espectro EDS-X sobre la superficie sin patrón.



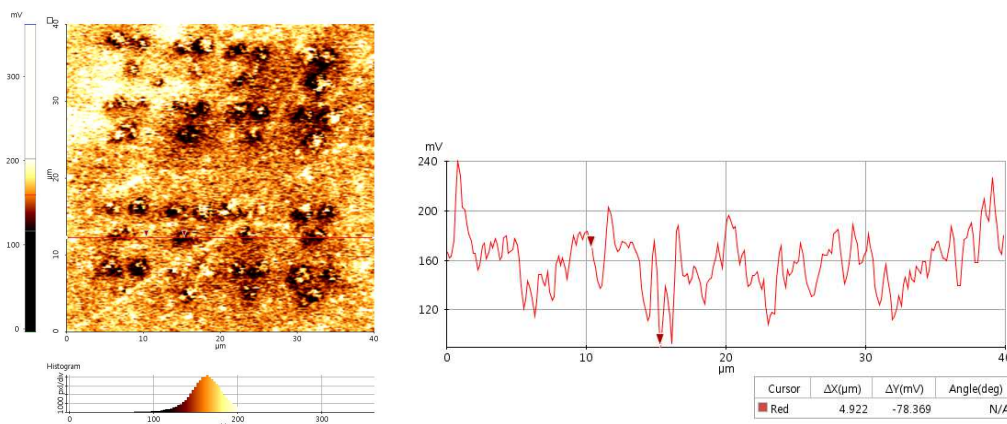
b. Espectro EDS-X sobre la superficie en el patrón.

Mediante la caracterización por EDS, fue posible determinar un incremento significativo del elemento oxígeno en los patrones, comparado con la muestra sin patronar.

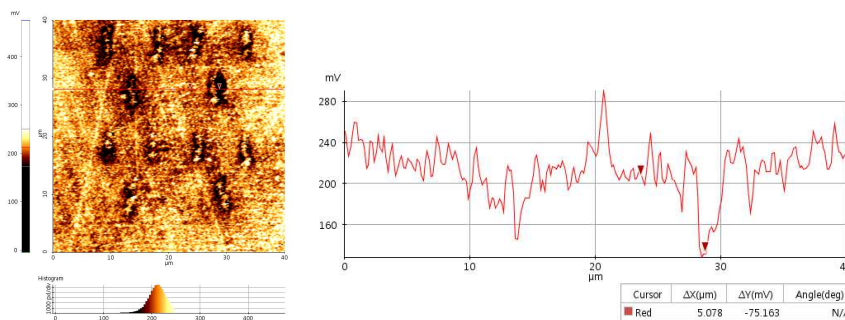
▪ **Análisis de superficie por *Scanning Kelvin Probe Microscopy*: SKPM sobre las superficies de Acero después del patronamiento.**

Este análisis fue realizado, tanto para las muestras de acero AISI SAE 316L, como en las muestras de Ti6Al4V. En la figura 33 se presentan Algunos resultados de la técnica SKPM realizada en muestras de acero 316L patronadas, con el fin de analizar de una forma indirecta, el cambio en la energía superficial de los patrones con respecto a la superficie pulida; en las imágenes se muestra un mapa, en donde las partes más oscuras corresponden a los patrones que indican menor potencial de superficie.

Figura 33. Potencial de superficie del Acero patronado.



a. SKPM para Patrón de líneas de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$

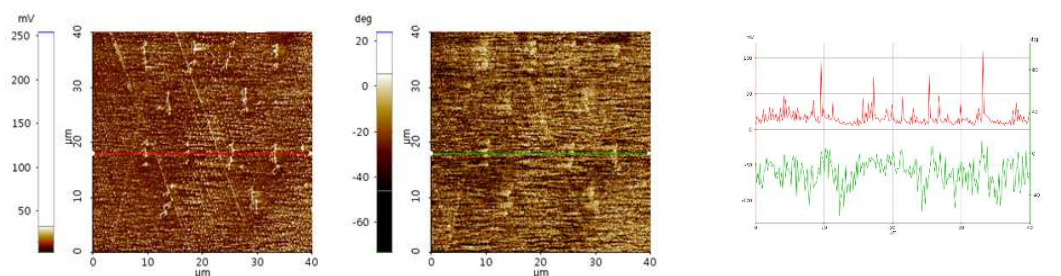


b. SKPM para Patrón de líneas de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$

▪ **Electrostatic Force Microscopy: EFM sobre las superficies de Acero 316L después del patronamiento.**

En la figura 34 se muestran imágenes de amplitud y fase generadas por el modo de fuerza electrostática en el AFM, donde se muestran imágenes de los patrones que mostraron los mejores resultados, según su morfología y su potencial de superficie. Los resultados se muestran en la 34a y 34b.

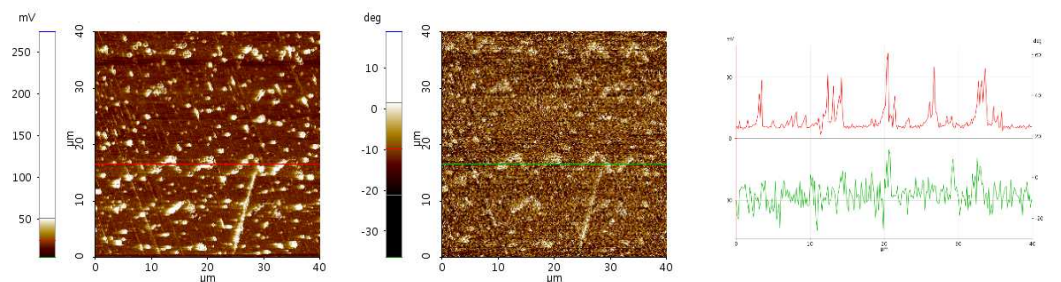
Figura 34. Amplitud y fase de fuerzas electrostáticas sobre Acero.



Statistics

Region	Min(mV)	Max(mV)	Mid(mV)	Mean(mV)	Rpv(mV)	Rq(mV)	Ra(mV)	Rz(mV)	Rsk	Rku
Whole	2.523	400.809	201.666	14.076	398.286	10.454	5.790	325.263	8.457	164.134

a



Statistics

Region	Min(mV)	Max(mV)	Mid(mV)	Mean(mV)	Rpv(mV)	Rq(mV)	Ra(mV)	Rz(mV)	Rsk	Rku
Whole	4.103	274.753	139.428	23.895	270.650	13.812	7.987	247.308	4.429	36.040

b

La **caracterización eléctrica**, la cual constó de análisis SKPM y EFM, representa uno de los resultados más importantes para el presente trabajo dado a que está ampliamente establecido que la carga superficial de los materiales empleados como implantes, tiene una influencia definida en la diferenciación de las células osteoclasticas y la posterior aparición de células osteoblasticas que conducen a la formación de hueso [30]. En los

histogramas de la Figura 33 (SKPM sobre las superficies de Acero después del patronamiento), se puede observar de las gráficas y los perfiles de potencial de superficie que para los sustratos analizados, se presentó un promedio de 230 mV, sin embargo para los patrones fue de 160 mV (Histogramas de la SKPM sobre **las superficies de Acero después del patronamiento**).

Este análisis fue realizado, tanto para las muestras de acero AISI SAE 316L, como en las muestras de Ti6Al4V. En la figura 33 se presentan Algunos resultados de la técnica SKPM realizada en muestras de acero 316L patronadas, con el fin de analizar de una forma indirecta, el cambio en la energía superficial de los patrones con respecto a la superficie pulida; en las imágenes se muestra un mapa, en donde las partes más oscuras corresponden a los patrones que indican menor potencial de superficie.

Figura); con un potencial positivo; sin embargo, el cambio de potencial de superficie tras la obtención de los óxidos patronados presentó un valor negativo, como se muestra en la Tabla 12.

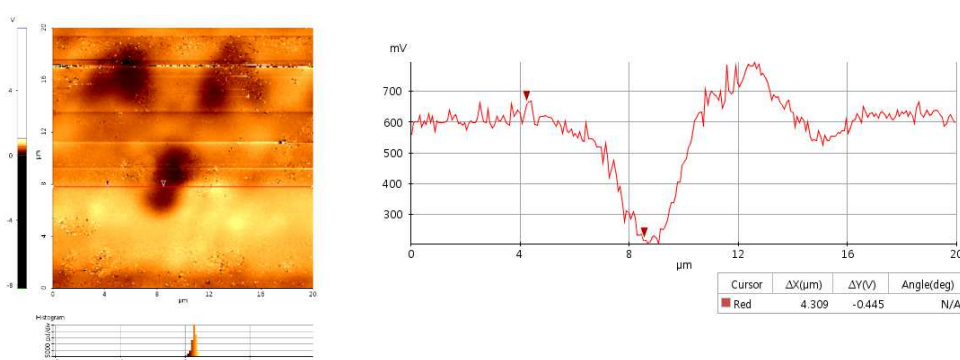
Tabla 12. Cambio de Potencial de Superficie (PS) para los patrones sobre Acero.

PATRÓN	$\Delta PS = (PS)_{PATRONES} - (PS)_{SUPERFICIE}$ (mV)
Patrón de escamas de $5 \times 5 \mu m^2$	-78.369
Patrón de escamas de $20 \times 20 \mu m^2$	-75.163
Patrón de líneas de $5 \times 5 \mu m^2$	-60.404
Patrón de líneas de $20 \times 20 \mu m^2$	-81.676

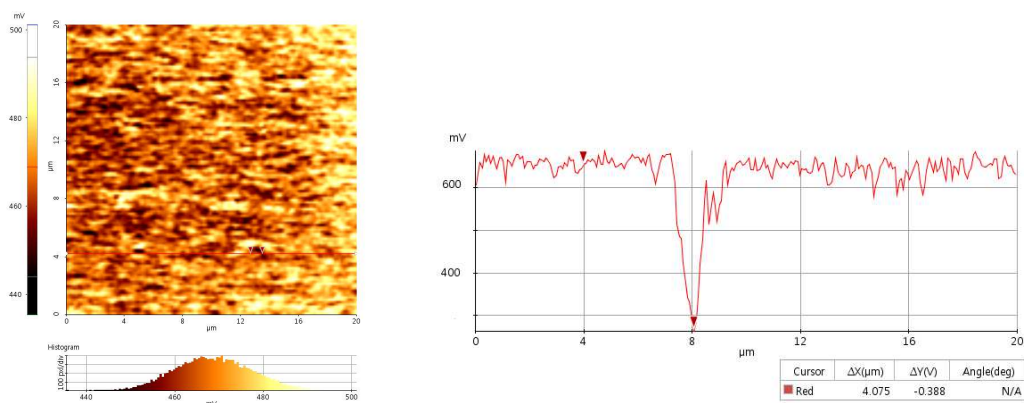
- **Scanning Kelvin Probe Microscopy: SKPM sobre las superficies de Ti6Al4V después del patronamiento.**

En la figura 35 se presentan los resultados de la técnica SKPM con la cual se caracterizaron las superficies de Ti6Al4V patronadas, con el fin de analizar el cambio en la energía superficial de los patrones con respecto a la superficie pulida; en las imágenes se muestra un mapa, en donde las partes más oscuras corresponden a los patrones e indican menor potencial de superficie.

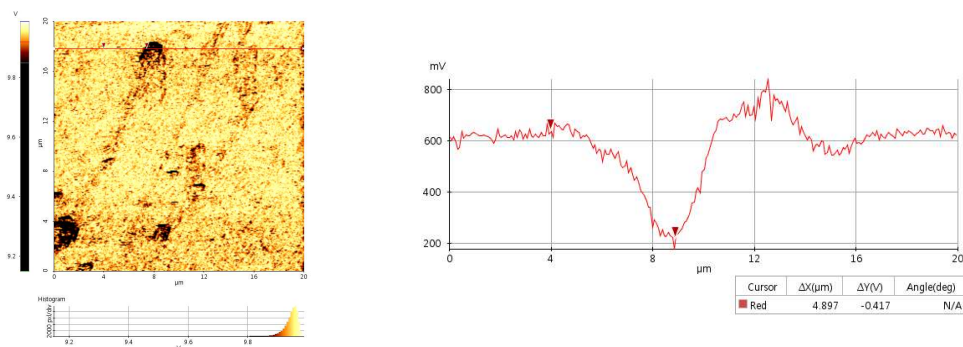
Figura 33. Potencial de superficie del Titanio patronado



a. SKPM para Patrón de escamas de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$



b. SKPM para Patrón de escamas de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$

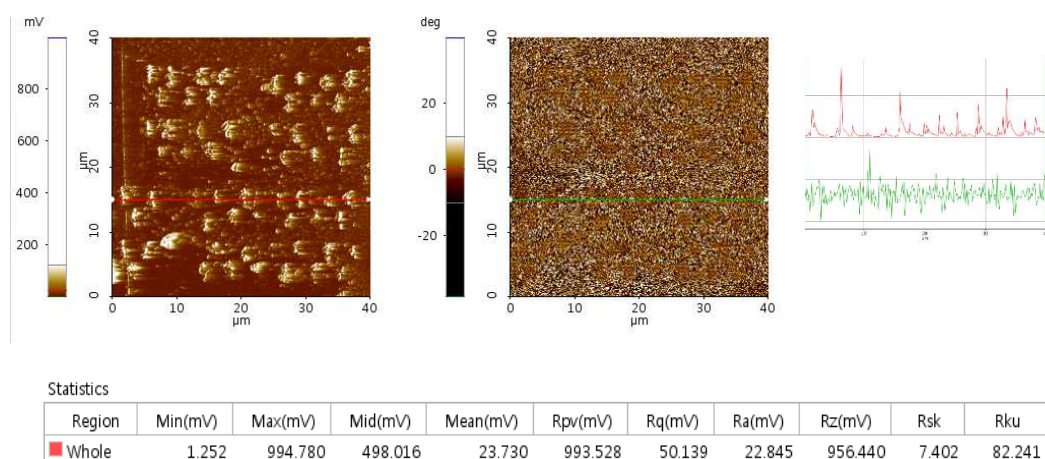


c. SKPM para Patrón de líneas de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$

- **Electrostatic Force Microscopy: EFM sobre las superficies de T6Al4V después del patronamiento.**

En la figura 36 se muestran imágenes de amplitud y fase generadas por el modo de fuerza electrostática en el AFM, según su morfología y su potencial de superficie. Los resultados se muestran en la Figura 6.

Figura 36. Amplitud y fase de fuerzas electrostáticas sobre Ti6Al4V (Patrón de líneas de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$).



De acuerdo a la anterior figura, se observa que para el sustrato se presentó un potencial promedio de 600 mV, y para los patrones, de 300 mV (Histogramas de la figura 35); es decir, como en el caso del Acero 316L, ambos presentaron un potencial positivo; sin embargo, el cambio de potencial de superficie tras la obtención de los óxidos patronados, mostró un valor negativo, como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13. Cambio de Potencial de Superficie para los patrones sobre Titanio.

PATRÓN	$\Delta\text{PS}=(\text{PS})_{\text{PATRONES}}-(\text{PS})_{\text{SUPERFICE}}$ (mV), PS (Potencial de Superficie)
Patrón de escamas de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$	-445
Patrón de escamas de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$	-388
Patrón de líneas de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$	-421
Patrón de líneas de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$	-417

Por lo tanto, el cambio de PS entre la superficie y los patrones representan un gradiente energético, lo que hace que la superficie patronada está fuera del equilibrio ($\Delta G \neq 0$) y por lo tanto se hace más reactiva, lo cual facilita reaccionar con el medio fisiológico, al cual sea

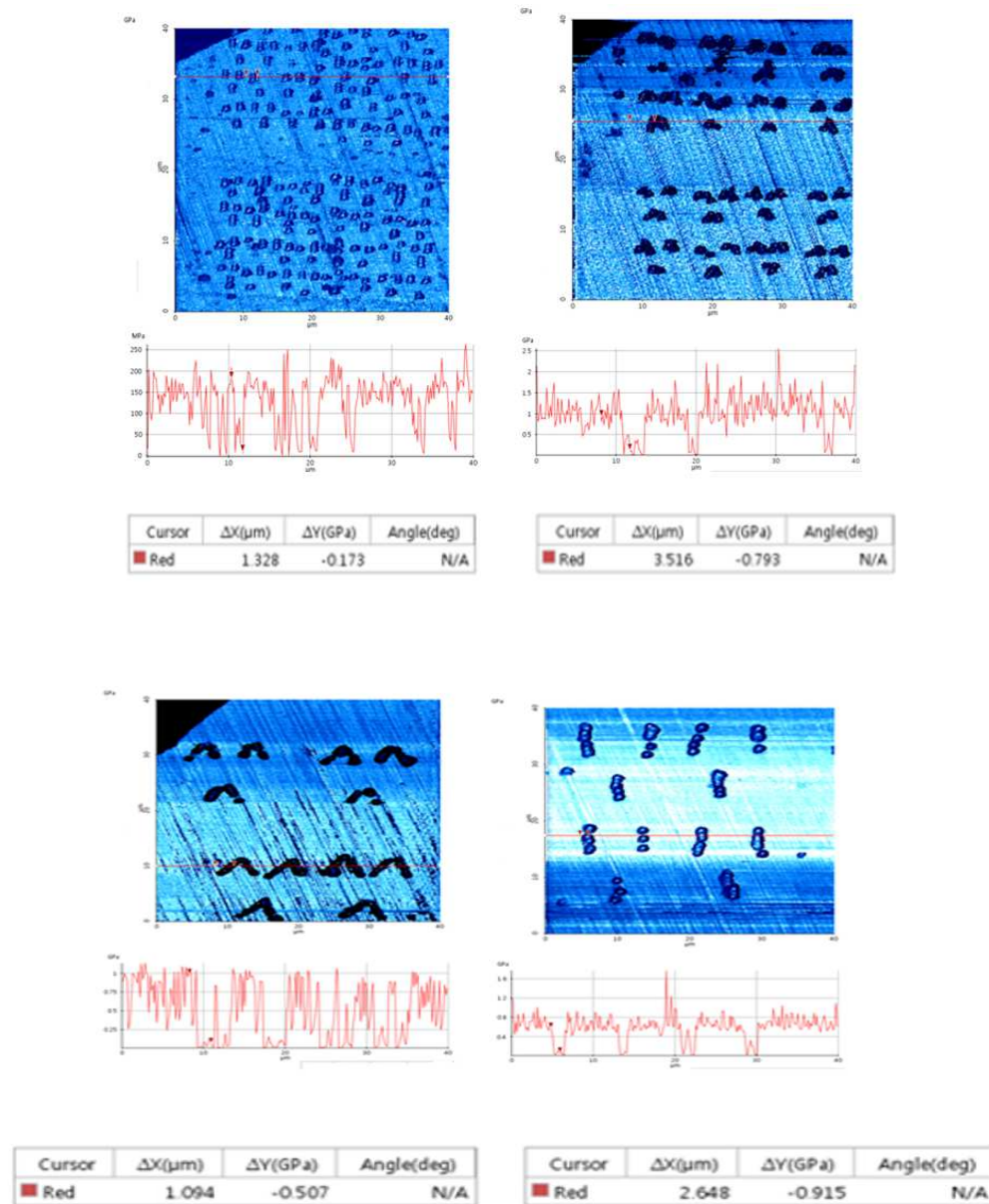
implantado; adicionalmente, tanto la superficie como los patrones, presentaron un potencial positivo de superficie. Estas diferencias de potencial, pueden ser consideradas afines con el potencial de osteoblastos, lo cual puede contribuir a la posterior formación de hueso, convirtiéndose además, en un punto de apoyo para la mineralización ósea, favoreciendo todos los procesos de osteointegración [4], [5], [30]

Las pruebas de **EFM**, de las cuales se reportan Amplitud y Fase, en el caso de las imágenes de amplitud, son un reflejo inverso de la topografía, debido a la señal eléctrica entre las interacciones entre la punta y la muestra; sin embargo, no corresponden al potencial de superficie (éste se puede observar en las imágenes de SKPM); no obstante, las imágenes de Fase evidencian una vez más las diferencias de composición en los diferentes sustratos después de realizada la nanolitografía, pues este módulo toma una línea de distancia constante entre la punta y la muestra, tal que sobrepase el régimen de las fuerzas de Van Der Waals y registre así las fuerzas electrostáticas; así pues cuando en la misma superficie hay diferencias en la composición, como en el caso de los patrones (Hematita para el acero, anatasa y rutilo para el caso del titanio) registra un cambio de fase.

- **Caracterización nanomecánica sobre las superficies de Acero 316L después del patronamiento.**

Los resultados de la caracterización mecánica de las superficies patronadas se realizaron mediante El AFM en el modo nanomecánico (Pin Point), el cual arroja resultados de topografía, rigidez, módulo de elasticidad, fuerza de adhesión y adhesión. Para tal fin se selecciona el módulo de elasticidad como variable de respuesta con el fin de analizar el cambio en el módulo de elasticidad de los patrones con respecto a la superficie pulida, para el caso del acero 316L se presentan en la Figura 37.

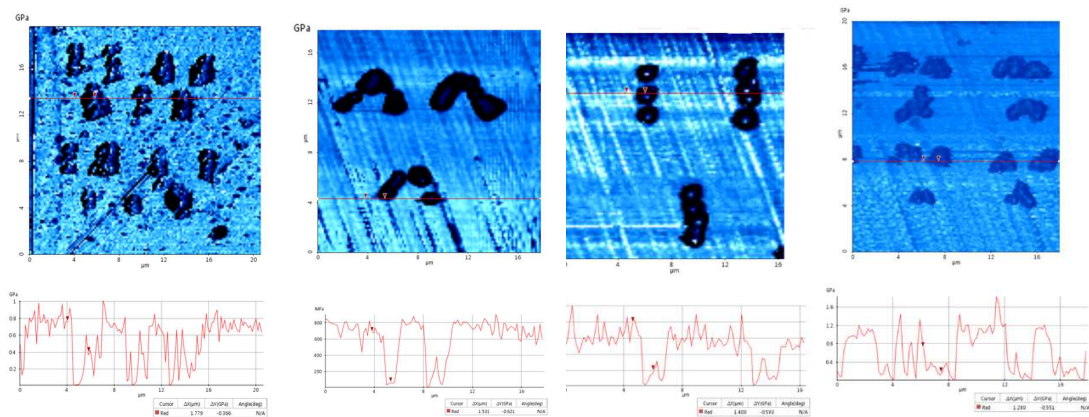
Figura 37. Módulo de Elasticidad de la superficie de Acero patronada, obtenida mediante el modo de Pin Point del AFM (PL5, PE5, PE20 y PL20).



- **Caracterización mecánica sobre las superficies de Ti6Al4V después del patronamiento.**

Los resultados de la caracterización mecánica realizada mediante el modo de Pin Point del AFM, de las superficies patronadas sobre Ti6Al4V se presentan en la Figura 3834.

Figura 3834. Módulo de Elasticidad de la superficie de Ti6Al4V patronada, obtenido mediante el modo de Pin Point del AFM (PL5, PE5, PE20 y PL20).



En estas imágenes se puede apreciar que los patrones tienen menor módulo de elasticidad que la superficie; se cuantifica la diferencia (Δ) de módulo de elasticidad entre la superficie y los óxidos crecidos y se obtiene, que tanto en el acero 316L y la aleación de titanio, el módulo de elasticidad es de aproximadamente un 15% menor que la superficie sin patronar. A pesar de la diferencia entre el sustrato y los óxidos patronados basados en el carácter iónico adquirido, este fenómeno se puede presentar por la posible porosidad de los óxidos formados y otros defectos intrínsecos de estos óxidos. Sin embargo, dados los valores obtenidos, comparados con materiales comparables en literatura, estas superficies patronadas cumplen con los requerimientos para ser una material manipulable quirúrgicamente [31] [32].

5.3. Resultados de Adhesión Celular y Citotoxicidad.

5.3.1. Adhesión Celular

Tras llevar a cabo el proceso de fijación celular descrito en la sesión 3.2.2 (Pruebas In Vitro, adhesión celular y citotoxicidad), se muestran algunas imágenes a dos diferentes aumentos, obtenidas con el microscopio electrónico de barrido (SEM) en la Figura 39, Figura 40 y Figura 351.

Figura 39. Adhesión celular sobre Patrón de escamas de $20 \times 20 \mu m^2$ en Acero AISI-SAE 316L.

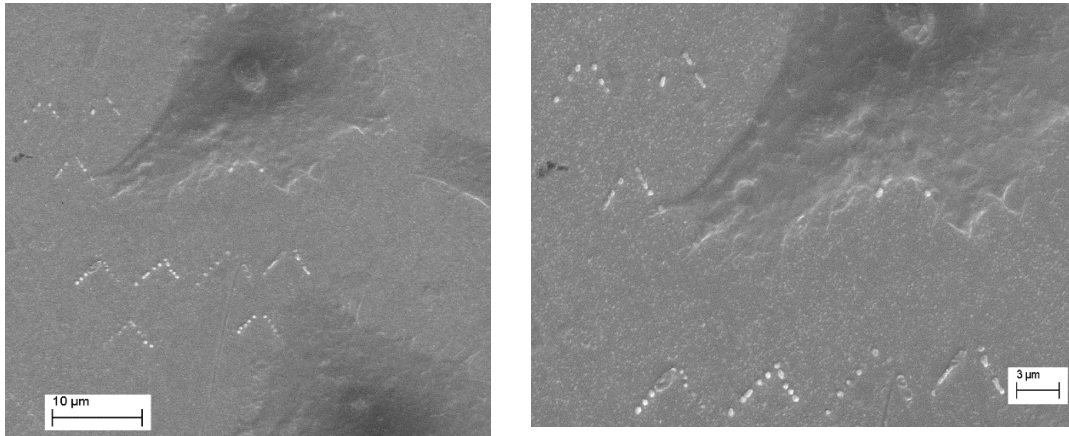


Figura 40. Adhesión celular sobre Patrón de escamas de $5 \times 5 \mu m^2$ en Acero AISI-SAE 316L.

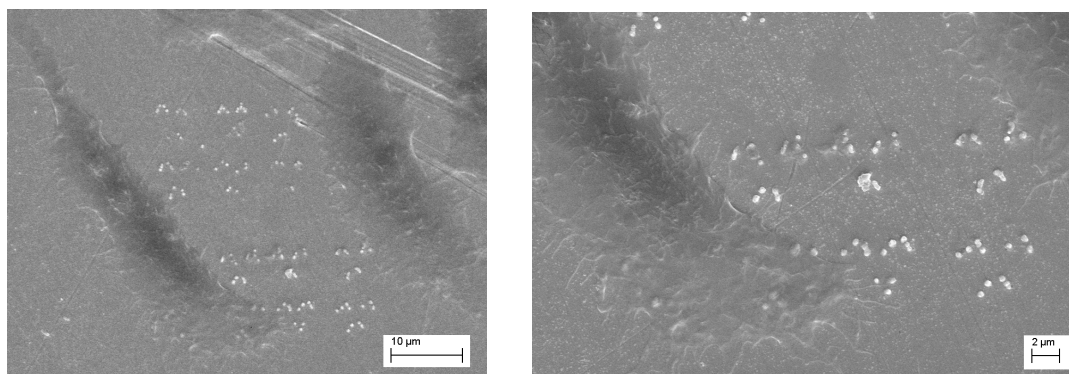
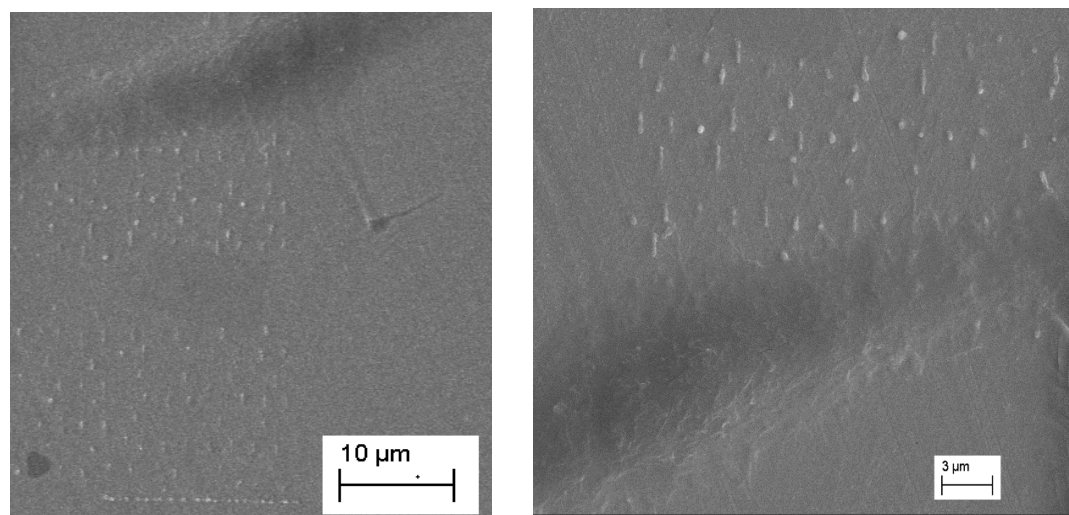


Figura 351. Adhesión celular en Patrón de líneas de $5 \times 5 \mu m^2$ en Ti6Al4V.



Siendo el objetivo de este análisis verificar el crecimiento celular sobre las zonas patronadas, se observa de las anteriores imágenes que se presentó adhesión celular sobre estas, aunque no fue posible establecer parámetros de referencia que permitan asegurar que efectivamente la adhesión se debe a la presencia de los patrones. Sin embargo, se debe partir que los iones metálicos presentes en óxidos bioactivos, como los formados en la estructura de los patrones y los elementos de fijación como el colágeno, transferidos del hidrogel, participan en muchos procesos químicos y biológicos importantes, favoreciendo la formación de nuevo tejido óseo desde el hueso hacia el implante y viceversa. En este orden de ideas, se puede observar que las células formadas observadas en SEM, se asocian a las estructuras fabricadas y se desarrollan correctamente, especialmente en la superficie del acero con patrones 20x20 μm . En este tamaño de patrones, las células desarrolladas presentaron morfológicamente filopodios, los cuales son elementos de las células que se desarrollan en una fase madura de expresión celular y son los encargados de unirse biomiméticamente a superficies bioactivas, desde el punto de vista bioeléctrico, al igual que sirven de puentes de comunicación con otras células; de acuerdo a esto, los terminales de los filopodios se conectan con las estructuras patronadas de escamas y líneas de óxidos. En términos generales, estas superficies patronadas implantadas en el cuerpo, podrían intervenir positivamente en algunas funciones fisiológicas como la promoción de la reparación tisular, la osteosíntesis, osteointegración, osteoconducción, entre otras. [31]. [33].

Otra observación es que las células pueden reconocer y responder a texturas, organizadas en patrones definidos a nanoescala, dado que existen estructuras en las células cuyo tamaño es equivalente en esa escala jerárquica de tamaño, funcionando cada estructura de óxido formado litográficamente como señalizadores o “antenas” de atracción celular. Sin embargo la información obtenida no fue suficiente para realizar un conteo o densidad celular.

En la **¡Error! La autoreferencia al marcador no es válida.**² se puede observar una imagen tomada con el microscopio óptico acoplado al microscopio de fuerza atómica AFM, en la cual se aprecian indentaciones realizadas intencionalmente para marcar una zona específica de análisis morfológico y topográfico sobre una superficie de acero patronada

con PE20 y en la Figura 373 se observa la misma zona de esta superficie, después del proceso de adhesión y fijación celular.

Figura 362. Superficie patronada antes del crecimiento celular.

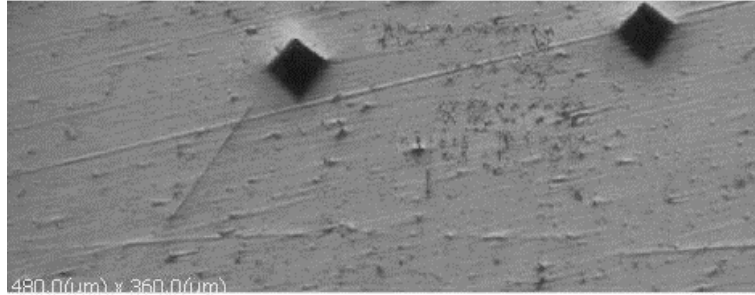
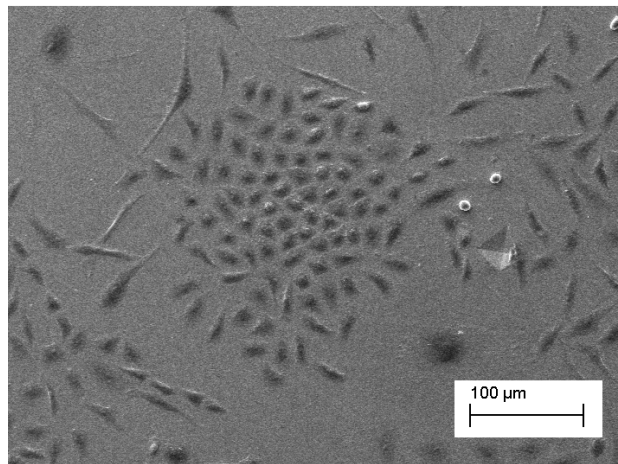
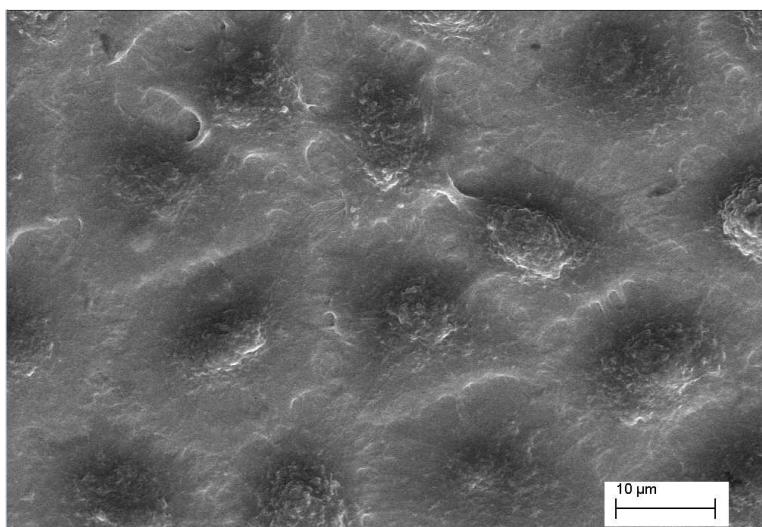


Figura 373. Superficie patronada después del crecimiento celular.



En estas imágenes se aprecia, luego de la adhesión celular, la formación aglomerada de células en una cantidad superior al existente en el resto de la superficie, demostrando un resultado positivo que reflejan un incremento de la adhesión y proliferación celular como consecuencia de la presencia de topografías de patrones regulares. En la Figura 384, se observa una imagen de la morfología de las células sobre esta misma superficie, con un tiempo de crecimiento celular de 3 días.

Figura 384. Células adheridas a la superficie.



Se observa un mayor desarrollo celular con células adheridas y proliferadas entre sí y con la superficie, lo cual es un indicativo de una cobertura celular en un nivel superior para promoción de la formación de hueso maduro.

5.3.2. Citotoxicidad

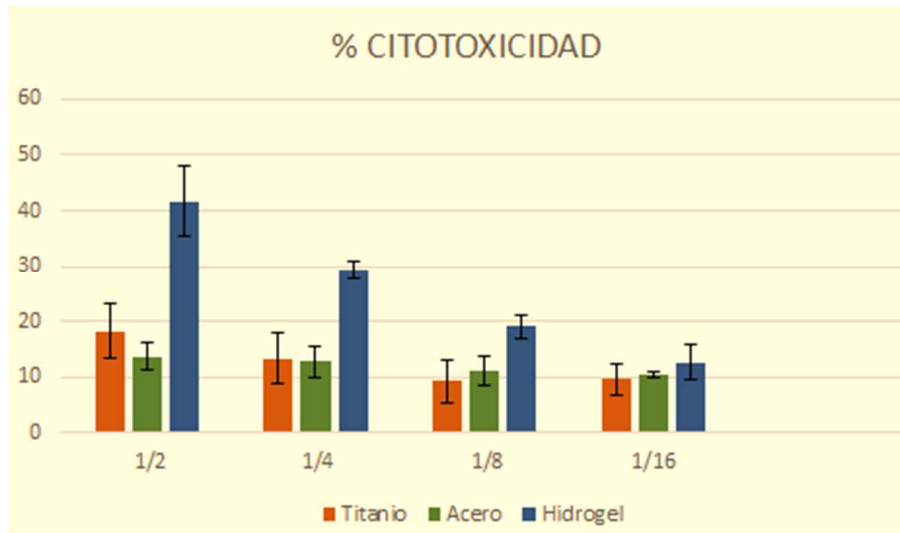
Los resultados de citotoxicidad tras llevar a cabo el procedimiento descrito en la sesión 3.2.2; se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14. Rango de citotoxicidad para el Acero 316L PE20, Ti6Al4V PE20 y el Hidrogel con colágeno a concentraciones de 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 de sobrenadante.

MATERIAL	% RANGO DE CITOTOXICIDAD			
	1/2	1/4	1/8	1/16
Ti6Al4V PE20	18,24±4,80	13,33±4,51	9,15±4,02	9,62±2,79
Acero 316L PE20	13,58±2,51	12,68±2,80	11,11±2,76	10,21±0,53
Hidrogel con colágeno	41,61±6,35	29,39±1,49	19,10±2,07	12,52±3,16

Los resultados de la Tabla 14, se representan gráficamente en la Figura 395.

Figura 395. Análisis de Citotoxicidad para el Acero 316L PE20, Ti6Al4V PE20 y el Hidrogel con colágeno



Dado a que los resultados son para todos los materiales en las diferentes concentraciones menores al 50%, indica que ninguno de los materiales o combinaciones de los mismos, presentan riesgo de citotoxicidad In Vitro, sin embargo el hidrogel presenta una citotoxicidad de 41,61% en la concentración de 1/2, siendo ésta la más alta; y en general, como se puede apreciar en la Figura 395, el hidrogel presentó la citotoxicidad más alta en las diferentes concentraciones; sin embargo, estos valores indican que no representa riesgo como implante en el cuerpo humano. Los valores de citotoxicidad resultantes de esta evaluación, fueron similares a los obtenidos en probetas de Ti6Al4V y acero 316L sin ningún tipo de tratamiento superficial. Tanto para las superficies de acero tratadas, como de aleación de titanio, los valores de citotoxicidad fueron similares.

6. CAPÍTULO 6: DISCUSIÓN GENERAL DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

6.1. Discusión general

En esta investigación, se logró evaluar nano y microestructuras en forma ordenada (patrones) de óxido metálico, que fueron fabricadas haciendo uso de la técnica de nanolitografía por oxidación anódica local del AFM, sobre dos superficies comúnmente usadas como materiales de implantes quirúrgicos, las cuales son; el Acero AISI-SAE 316L grado quirúrgico, designado bajo la norma ASTM F138 y una Aleación de Ti6Al4V, designado bajo la norma ASTM F136; en ambos casos se utilizó un voltaje de anodización de -10V y humedad relativa del aire entre 50 y 60%, y con velocidades de nanolitografía de 0,2 $\mu\text{m/s}$ y 0,08 $\mu\text{m/s}$ para el Acero y la aleación de Titanio, respectivamente; con lo cual se concluyó que el tiempo de permanencia anódica, entre la punta del cantilever y la superficie fue mayor para la aleación de Titanio que para el acero, lo cual dificultó alcanzar la oxidación anódica localizada en este material, dado que la velocidad de nanolitografía y el tiempo de permanencia son inversamente proporcionales. Dos tipos de formas y tamaños fueron propuestos: líneas ordenadas en forma simétrica y líneas entrecruzadas en forma de escamas de 5x5 μm y 20x20 μm .

Sobre las superficies patronadas se depositó un hidrogel previamente obtenido mediante fotoreticulación, el cual contenía colágeno (ingrediente bioactivo) en forma de micelas atrapadas físicamente en una red tridimensional de polietilenglicol; las cuales se pretende se liberen después de implantado el material compuesto. De la caracterización mecánica de dicho hidrogel se obtiene que es un material manipulable quirúrgicamente dado sus condiciones fisicomecánicas.

Después de obtenidas estas nano y microestructuras, se caracterizaron topográfica, morfológica, química, eléctrica y mecánicamente; de la caracterización topográfica y morfológica (la cual se realizó haciendo uso de un AFM en el modo de contacto) se concluyó que el crecimiento de los óxidos sobre el acero 316L tuvo un promedio de 153,7 nm en

tamaño y para el caso de los óxidos crecidos sobre la aleación de Titanio Ti6Al4V, un promedio de 71.25 nm, siendo además más homogéneas las nano y microestructuras crecidas sobre el acero, respecto a las nano y microestructuras crecidas sobre la aleación de Titanio.

De la caracterización química de los patrones, la cual fue realizada mediante las técnicas complementarias de espectroscopia Raman y EDS, se concluyó que los patrones obtenidos presentaron principalmente compuestos de óxido férrico (Hematita) y de dióxido de Titanio en dos fases cristalinas (Rutilo y Anatasa) para el Acero 316L y el Ti6Al4V, respectivamente. Estos compuestos, generalmente para el caso del Ti6Al4V son biocompatibles y se ha demostrado que la presencia de las dos fases de TiO_2 , generan características energéticas que son compatibles con células de osteocitos, osteoclastos y osteoblastos; además, favorecen la formación de matriz extracelular, ya que en fluidos fisiológicos se ha demostrado que la presencia simultánea de estos dos tipos de óxidos, favorecen la formación de un compuesto intermedio de titanato de sodio amorfo, que sumado a la presencia del colágeno fijado con el hidrogel, tiene una tendencia altísima de unirse a iones de calcio y fósforo, además de proteínas. En cuanto a la presencia de hematita en los patrones creados sobre acero 316L, este compuesto, es un intermedio al óxido de cromo que generalmente se forma en este tipo de acero austenítico. Este óxido de hierro suele presentar una inestabilidad, relativa a la cantidad de vacancias de oxígeno que intervienen en su proceso de formación. Es sabido que el óxido de cromo no tiene un grado importante de compatibilidad y además si se disuelve es tóxico, por tanto el óxido de hierro en la forma de hematita y no de magnetita, que es más estable, no es conocido por ser altamente tóxico y podría ser un compuesto importante en la compatibilidad celular funcionando en conjunto con el colágeno fijado con el hidrogel. Estudios posteriores a este trabajo, serían necesarios para estudiar la tendencia a la formación de estos compuestos mediante la técnica de oxidación anódica localizada con AFM.

De la caracterización eléctrica se concluye que tanto las superficies sin patronar y los patrones (óxidos formados), presentaron un cambio de potencial negativo de superficie, lo cual, en términos de energía libre, corresponde a una superficie activa. Si se compara las superficies patronadas sobre Ti6Al4V con las superficies patronadas sobre acero 316L, se observa que la diferencia de potencial entre superficie y patrón fue mayor en la aleación de titanio. En este orden de ideas, es de esperarse que la energía libre en este material sea mayor, lo cual podría generar una situación energética desfavorable para la adhesión

celular, sin embargo está demostrado que cambios topográficos en la escala nano y micro en la aleación de titanio, generalmente favorecen la formación y anclaje óseo.

El análisis de la información obtenida de la caracterización nanomecánica, indicó que los óxidos formados en los patrones presentaron estructuras menos rígidas en un 15%, que los valores de rigidez medidos en la superficie metálica, tanto en el acero 316L como en la aleación de Ti6Al4V. Este resultado indica que los patrones de óxido formados desde el punto de vista mecánico son más compatibles que los metales sin tratar ya que por lo general el hueso es menos rígido que los metales de acero 316L y Ti6Al4V, respectivamente. Es conocido que los tratamientos de formación de óxidos sobre metales favorecen la biocompatibilidad al evitar un fenómeno llamado *stress shielding* o apantallamiento de esfuerzos, que se refiere a la reducción de la densidad ósea como resultado de la eliminación del estrés que se genera típicamente en un hueso, por la presencia de un implante generalmente más rígido y más pesado que este. En otras palabras, el hueso se remodela en respuesta a las cargas biomecánicas bajo las cuales actúa de una manera fisiológica normal. Por lo tanto, si la carga en un hueso disminuye, por la presencia de un material con una relación Rigidez/peso alta, este se volverá menos denso y más débil.

La evaluación de adhesión y citotoxicidad permitieron establecer que las estructuras formadas sobre el acero 316L, generaron un mayor desarrollo celular en términos de adhesión y proliferación que las estructuras formadas sobre Ti6Al4V. Sin embargo, en ambos tipos de superficie se presentó adhesión celular y su toxicidad fue muy baja. En este último aspecto, la presencia del hidrogel para fijar el colágeno micelar sobre la superficie patronada, puede incrementar la toxicidad, pero no a valores que sean riesgosos en un virtual desempeño fisiológico como implante. Células con desarrollo de filopodios cuyos terminales dirigidos sobre las estructuras patronadas, tanto en el acero 316L como en la aleación de Ti6Al4V fueron identificados, confirmando la hipótesis de que estas estructuras de óxido formadas sobre estos tipos de aleaciones, pueden funcionar como señalizadores o antenas de focalización de células óseas. Se observó también que las formas truncadas ordenadas (escamas) se comportan mejor en términos de proliferación celular que líneas ordenadas.

6.2. Conclusiones

- La nanolitografía por oxidación anódica local (LAO) fue llevada a cabo con éxito en ambos sustratos con un voltaje de anodización de -10V y una humedad relativa entre un 50-60%; sin embargo la velocidad de nanolitografía es en el caso del Acero de 0,2 $\mu\text{m/s}$ y para el caso del Titanio de 0,08 $\mu\text{m/s}$.; adicionalmente, el crecimiento de los óxidos sobre el acero tuvo un promedio de 153,7 nm y para el titanio un promedio de 71.25 nm; por lo que se concluye que el acero es mucho más fácil de patronar que el Titanio y genera mejor rugosidad total sobre la superficie, reflejándose también en la adhesión celular, como un mejor inoculador celular con el más bajo índice de citotoxicidad. La caracterización química de los patrones sobre acero revela la presencia de Óxido Férrico Fe_2O_3 (Hematita), y sobre los patrones de titanio revela la presencia de Dióxido de Titanio en dos fases cristalinas (Anatasa y Rutilo).
- La obtención de un hidrogel fue llevada a cabo con éxito mediante la fotoreticulación; adicionalmente se evidenció que éste es capaz de sostener colágeno en forma micelar el cual actúa como factor de crecimiento celular. El módulo de elasticidad y dureza del hidrogel de 1.917 MPa y 0.328 MPa respectivamente, lo hacen un material manipulable para procedimientos quirúrgicos.
- De la caracterización eléctrica se puede concluir que el cambio de potencial de entre los sustratos y los patrones representan un gradiente energético, lo que hace que la superficie esté fuera del equilibrio ($\Delta G \neq 0$) y por tanto sea más reactiva para reaccionar con el medio al cual sea implantado.
- De la caracterización mecánica de los patrones, se puede concluir que los óxidos presentaron un menor módulo de elasticidad que la superficie; lo cual es favorable en términos de biocompatibilidad ya que permiten una mejor transferencia de cargas entre el hueso y el implante, permitiendo que el hueso alcance un estado de madurez superior o de condiciones normales.
- Se demostró que las células reconocen y responden a estas superficies biomiméticas que se organizan en patrones definidos a nanoescala ya que se puede apreciar el crecimiento celular sobre los patrones, también se concluye que hay mayor cantidad de células en las superficies en donde los patrones son de mayor tamaño (20x20 μm^2), por lo tanto la topografía y rugosidad interfieren directamente

con el crecimiento celular ya que funcionan como señalizadores o “antenas” de atracción celular. Adicionalmente, estas estructuras favorecen el anclaje de las células y el hueso formado a la superficie del implante metálico, ya que bajo esfuerzos de cizalla la presencia de “anclas” de óxido dificultan el desprendimiento celular o de separación del hueso adherido.

- Dado a que los resultados de citotoxicidad son para todos los materiales en las diferentes concentraciones de análisis menores al 50%, indica que ninguno de los materiales o combinaciones de los mismos, presentaron riesgo de citotoxicidad.

6.3. Recomendaciones

- Usar un amplificador de voltaje acoplado al AFM, con el fin de obtener óxidos de mayor tamaño sobre el Titanio para poder realizar el análisis por tamaño de patrones así como por sustratos, puesto que con las condiciones más críticas del AFM, el crecimiento de los patrones sobre titanio es de tan solo el 46% con respecto al crecimiento sobre acero.
- La investigación deja buenos resultados a nivel científico, sin embargo para que pueda ser escalado a nivel industrial se hace necesario un mecanismo de nanolitografía en paralelo, que permita optimizar los tiempos y áreas de patronamiento para que sea ingenierilmente viable.

7. Bibliografía

- [1] M. Talha, C. K. Behera, and O. P. Sinha, "A review on nickel-free nitrogen containing austenitic stainless steels for biomedical applications," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 7, pp. 3563–3575, 2013.
- [2] J. Melke, S. Midha, S. Ghosh, K. Ito, and S. Hofmann, "Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering," *Acta Biomater.*, vol. 31, pp. 1–16, 2016.
- [3] R. Gilbert Triplett and O. Budinskaya, "New Frontiers in Biomaterials," *Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.*, vol. 29, no. 1, pp. 105–115, 2017.
- [4] S. Bauer, P. Schmuki, K. von der Mark, and J. Park, "Engineering biocompatible implant surfaces. Part I: Materials and surfaces," *Prog. Mater. Sci.*, vol. 58, no. 3, pp. 261–326, 2012.
- [5] K. von der Mark and J. Park, "Engineering biocompatible implant surfaces. Part II: Cellular recognition of biomaterial surfaces: Lessons from cell-matrix interactions," *Prog. Mater. Sci.*, vol. 58, no. 3, pp. 327–381, 2012.
- [6] L. Chang, L. Tian, W. Liu, and X. Duan, "Formation of dicalcium phosphate dihydrate on magnesium alloy by micro-arc oxidation coupled with hydrothermal treatment," *Corros. Sci.*, vol. 72, pp. 118–124, 2013.
- [7] Y. Wang, B. Jiang, T. Lei, and L. Guo, "Dependence of growth features of microarc oxidation coatings of titanium alloy on control modes of alternate pulse," *Mater. Lett.*, vol. 58, no. 12–13, pp. 1907–1911, 2004.
- [8] H. G. Kang, S. K. Kim, and H. Lee, "The analysis of superconducting thin films modified by AFM lithography with a spectroscopic imaging technique," *Surf. Sci.*, vol. 600, no. 18, pp. 3673–3676, 2006.
- [9] C. Mar, A. Turp, and U. Polit, "Mallas macroporosas bioestables con aplicación en implantes protésicos y trasplante de células," 2015.
- [10] S. F. Amato and R. M. Ezzell, *Regulatory affairs for biomaterials and medical devices*. .
- [11] M. López García, "Estudio experimental en el cerdo del uso de implantes dentales ante situaciones de carga inmediata," pp. 119–120, 2007.

- [12] I. Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil, M. A. Alobera Gracia, M. Del Canto Pingarrin, and L. Blanco Jerez, "Bases fisiologicas de la regeneración osea I. Histologia y fisiologia del tejido oseo," *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal*, vol. 11, no. 1, pp. 32–36, 2006.
- [13] F. T. Mari and L. B. Jerez, "S íntesis, caracterización y aplicación en regeneración ósea de cementos de brushita fraguados con ácidos orgánicos, geles y coloides."
- [14] M. Altmann, J.-M. Cognet, L. Eschbach, B. Gasser, G. Richards, and P. Simon, "Materiales utilizados en la osteosíntesis," *EMC - Técnicas Quirúrgicas - Ortop. y Traumatol.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–8, 2009.
- [15] C. A. Martínez and A. Ozols, *Biomateriales utilizados en cirugía ortopédica como sustitutos del tejido óseo*, vol. 77, no. 2. Asociación Argentina de Ortopedia y Traumatología, 2012.
- [16] F. A. Shah, M. Trobos, P. Thomsen, and A. Palmquist, "Commercially pure titanium (cp-Ti) versus titanium alloy (Ti6Al4V) materials as bone anchored implants - Is one truly better than the other?," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 62, pp. 960–966, 2016.
- [17] G. Miranda, A. Araújo, F. Bartolomeu, M. Buciumeanu, O. Carvalho, J. C. M. Souza, F. S. Silva, and B. Henriques, "Design of Ti6Al4V-HA composites produced by hot pressing for biomedical applications," *Mater. Des.*, vol. 108, pp. 488–493, 2016.
- [18] American Society for Testing and Materials (ASTM), "F136-12a Standard Specification for Wrought Titanium-6Aluminum-4Vanadium ELI (Extra Low Interstitial) Alloy for Surgical Implant Applications (UNS R56401)," no. December 2002, pp. 6–10, 2013.
- [19] M. D. Pereda, K. W. Kang, R. Bonetto, C. Llorente, P. Bilmes, and C. Gervasi, "Impact of Surface Treatment on the Corrosion Resistance of ASTM F138-F139 Stainless Steel for Biomedical Applications," *Procedia Mater. Sci.*, vol. 1, pp. 446–453, 2012.
- [20] ASTM, "ASTM F138 Standard Specification for Wrought 18Chromium-

- 14Nickel-2.5Molybdenum Stainless Steel Bar and Wire for Surgical Implants (UNS S31673),” *Annu. B. ASTM Stand.*, pp. 71–74, 2008.
- [21] C. J. Brinker, “Dip coating,” *Chemical Solution Deposition of Functional Oxide Thin Films*. pp. 233–261, 2013.
- [22] J. Beltrán-Patiño, “Extracción y caracterización de quitosano del camarón titi y su aplicación en la liberación controlada de un fármaco,” *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 53, no. 9, pp. 1689–1699, 2013.
- [23] M. Jimenez Vargas, *Fisicoquímica Fisiológica*. .
- [24] M. E. Helgeson, S. C. Chapin, and P. S. Doyle, “Hydrogel microparticles from lithographic processes: Novel materials for fundamental and applied colloid science,” *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 16, no. 2, pp. 106–117, 2011.
- [25] DR. MIGUEL ARROYO, “Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones,” *Ars Pharm.*, pp. 1–17, 1998.
- [26] X. N. Xie, H. J. Chung, C. H. Sow, and A. T. S. Wee, “Nanoscale materials patterning and engineering by atomic force microscopy nanolithography,” *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 54, no. 1–2, pp. 1–48, 2006.
- [27] F. J. M. T, D. F. A. M, and A. D. C, “REVISTA COLOMBIANA DE FÍSICA, VOL. 38, No. 1, 2006 NANOLITOGRAFÍA POR OXIDACIÓN LOCAL DE PELÍCULAS DELGADAS DE NITRURO DE TITANIO USANDO EL MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA Francisco J. Martínez T., Diego F. Arias M., Alfonso Devia C.,” *Electrochim. Acta*, vol. 38, no. 1, pp. 105–108, 2006.
- [28] S. Mexicana, “Influencia del tiempo de gelificación sobre las propiedades estructurales , vibracionales y,” vol. 25, no. 4, pp. 203–208, 2012.
- [29] “Materiales polimericos y aplicaciones industriales.”
- [30] U. Study, O. N. The, E. F. F. E. C. T. S. O. F. Surface, C. On, and B. Formation, “Pergamon ULTRASTRUCTURAL STUDY ON THE EFFECTS OF SURFACE CHARGE ON BONE FORMATION,” vol. 40, no. 2, pp. 97–106, 1995.
- [31] Y. Wang, “Bioadaptability: An Innovative Concept for Biomaterials,” *J. Mater.*

Sci. Technol., vol. 32, no. 9, pp. 801–809, 2016.

- [32] T. A. Mahmood, K. De Groot, C. A. Van Blitterswijk, and F. Barre, “Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration : Instructive and smart functions,” vol. 59, pp. 38–71, 2008.
- [33] J. E. G. R, “ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD Y ADHESIÓN DE CÉLULAS HUMANAS DE OSTEOSARCOMA EN Ti6Al4V SUPERFICIALMENTE MODIFICADO Study of citotoxicity and adhesion of human osteosarcoma cell in Ti6Al4V superficially modified,” no. 36, 2007.