

# **ESTUDIO DE LA OSTEOINTEGRACIÓN EN SUPERFICIES CREADAS MEDIANTE PULSOS LÁSER PERIÓDICOS ULTRACORTOS**

**Alberto Agustín Jorge Mora**



**DIRECTORES**

Dr. JESÚS PINO MÍNGUEZ

Dr. DANIEL NIETO GARCÍA

**TUTOR**

Dr. JUAN SUÁREZ QUINTANILLA





---

# ESTUDIO DE LA OSTEOINTEGRACIÓN EN SUPERFICIES CREADAS MEDIANTE PULSOS LÁSER PERIÓDICOS ULTRACORTOS

---

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:  
Alberto Agustín Jorge Mora

Directores:

Dr. Jesús Pino Mínguez

Dr. Daniel Nieto García

Tutor:

Dr. Juan Suárez Quintanilla

Santiago, 2017



## **Informe de los directores de la tesis doctoral**

**El Dr. Jesús Pino Mínguez y el Dr. Daniel Nieto García**

Certifican:

Que **D. Alberto Agustín Jorge Mora**, licenciado en Medicina, ha realizado bajo nuestra supervisión y dirección el trabajo titulado **“Estudio de la osteointegración en superficies creadas mediante pulsos láser periódicos ultracortos”**.

Que este trabajo reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser defendido públicamente y optar al grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos este documento en Santiago de Compostela, a

Dr. Jesús Pino Mínguez

Dr. Daniel Nieto García



A mi familia





## Agradecimientos:

Me gustaría agradecer, en primer lugar, a mis directores y tutor, los Dres. Nieto García, Pino Mínguez y Suárez Quintanilla su dedicación, apoyo y guía a lo largo de estos años que han permitido llevar a cabo este trabajo.

En segundo lugar, quisiera agradecer al grupo de patología músculo-esquelética, y en especial a Rudy, su colaboración, consejo y comprensión, sin la que me habría sido imposible navegar por este nuevo mar que representa la investigación básica.

Quiero transmitir un agradecimiento especial a Ramiro Couceiro, a quién le debo junto al Dr. Pino mi introducción en la investigación básica, y quién me ha guiado en mis primeros pasos a través de esta nueva vocación en mi vida.

Por último, quiero dedicar este trabajo a toda mi familia y a las personas importantes en mi vida, en especial:

A mis padres, por enseñarme las recompensas del trabajo y el esfuerzo, y por despertar en mí el interés por la investigación y la docencia.

A mi mujer, Ana, por ayudarme y guiarme para poder mejorar como médico, marido y padre, y por ser el motor de una familia inmejorable ¡Gracias!

A nuestros hijos Sofía y Alberto, por todo su cariño cada día.



## Resumen

### Introducción:

Debido al envejecimiento de la población y la estandarización de los procedimientos quirúrgicos en Cirugía Ortopédica y Traumatología, las intervenciones con implantes son cada vez más frecuentes. Una de las principales complicaciones de estos implantes es el aflojamiento aséptico de los mismos. Los tratamientos con láser para la creación de superficies con estructuras periódicas creadas por pulsos ultracortos parecen ser una opción viable para mejorar la osteointegración de estos implantes.

### Objetivos:

Demostrar la superioridad de las propiedades biológicas de las superficies con estructuras periódicas creadas por pulsos ultracortos *in vitro*, mediante estudios de inflamación, proliferación y diferenciación osteoblástica. Asimismo, realizar una caracterización física de las nuevas superficies creadas.

### Material y métodos:

Creamos doce discos de titanio, doce de tantalio y doce de cermet, de los cuales la mitad serán tratados mediante un láser de pulsos ultracortos. Procedimos a la caracterización física de las superficies creadas. Posteriormente mediante un estudio *in vitro* cultivamos células mesenquimales humanas en estas superficies y estudiamos la inflamación, proliferación y diferenciación osteoblástica.

### Conclusiones:

La formación de superficies con estructuras periódicas creadas por pulsos ultracortos en metales y en el cermet escogido, favorecen *in vitro* la diferenciación osteoblástica de células mesenquimales sin incrementar la inflamación. El tratamiento con láser genera una estructura periódica con unas características específicas en función del metal/material empleado, que puede generar una mejor respuesta osteointegradora.

## Resumo

### Introdución:

Debido ó incremento da idade da poboación e a estandarización dos procedementos en Cirurxía Ortopédica e Traumatoloxía, as cirurxías con implantes son cada vez mais frecuentes. Unha das principais complicacións destes implantes e o afrouxamento aséptico dos mesmos. Os tratamentos con láser para a creación de superficies con estruturas periódicas xeradas por láser con pulsos ultracurtos parecen ser unha opción viable para a mellora da osteointegración destes implantes.

### Obxectivos:

Demostrar a superioridade das propiedades biolóxicas das superficies con estruturas periódicas xeradas por pulsos ultracurtos *in vitro*, mediante estudos de inflamación, proliferación e diferenciación osteoblástica. Tamén realizar unha caracterización física das novas superficies xeradas.

### Material e métodos:

Creamos doce discos de titanio, doce de tantalio e doce de cermet, dos que a metade serán tratados mediante un láser de pulsos ultracurtos. Procedemos á caracterización física das superficies xeradas. Posteriormente, mediante un estudio *in vitro* con células mesenquimais humanas estudiamos a inflamación, proliferación e diferenciación osteoblástica. Posteriormente mediante un estudio *in vitro* cultivamos células mesenquimais humanas en estas superficies e estudiamos a inflamación, proliferación e diferenciación osteoblástica.

### Conclusións:

A formación de superficies con estruturas periódicas xeradas por láser con pulsos ultracurtos en metais e no cermet escollido, favorecen *in vitro* a diferenciación osteoblástica de células mesenquimais sen incrementar a inflamación. O tratamento con láser xerara unha estrutura periódica cunhas características específicas en función do metal/material escollido, que pode xerar a unha mellor resposta osteointegradora.

## Abstract

### Introduction:

Because of the progressive aging of our population and the standardization of surgical procedures in Orthopaedic Surgery and Trauma, the use of implants is more common. One of the main and more frequent complication is aseptic loosening of implants. The use of laser treatment to create laser induced periodic surface structures seems to be an optimal option to increase osteointegration in these implants.

### Objectives:

To demonstrate the superiority of the biological properties of laser induced periodic surface structures *in vitro*, in terms of inflammation, proliferation and osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. We will also perform the physical characterization of these new surfaces.

### Material and methods:

We create twelve titanium, twelve tantalum and twelve cermet discs. Half of them have been treated with laser to create laser induced periodic surface structures. Then we proceed with the physical characterization. Afterwards with an *in vitro* culture of these discs we have determined inflammation, proliferation and osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. Afterwards we cultured *in vitro* mesenchymal stem cells in these surfaces and we study proliferation, inflammation and Osteoblastic differentiation.

### Conclusions:

Formation of laser induced periodic surface structures in titanium, tantalum and in the cermet chosen, favours *in vitro* the differentiation of mesenchymal stem cells to osteoblasts without increasing inflammation. The use of femtosecond laser pulses creates a periodic structure that is specific of the implant used, that can generate a better osteointegration response.



## Índice

<b>Agradecimientos:</b> .....	<b>9</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>11</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>12</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>13</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>19</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>29</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>31</b>
<b>Importancia de los biomateriales en cirugía ortopédica y traumatología</b> .....	<b>31</b>
<b>Biocompatibilidad e interfaz biomaterial-tejido</b> .....	<b>33</b>
<b>Adhesión celular a biomateriales</b> .....	<b>34</b>
<b>El titanio como biomaterial</b> .....	<b>38</b>
<b>El tantalio como biomaterial</b> .....	<b>40</b>
<b>Los cermetes como biomateriales</b> .....	<b>42</b>
<b>Tratamientos de superficie en biomateriales</b> .....	<b>43</b>
Tratamientos químicos.....	44
Implantación iónica.....	44
Silanización y película de Langmuir-Blodgett.....	45
Autoformación de monocapas.....	45
Impresión por microcontacto.....	45
Coberturas.....	46
Texturización .....	47
<b>Desarrollo del láser</b> .....	<b>48</b>
<b>Interacción radiación láser-materia</b> .....	<b>49</b>
Absorción de la radiación láser en metales .....	49
Ablación láser .....	50
<b>Formación de estructuras periódicas inducidas por láser en superficie</b> .....	<b>51</b>
Excitación de plasmones de superficie .....	53
Auto-organización .....	55
Interferencia.....	55

<b>Respuesta celular a estructuras periódicas modificadas por láser</b> .....	<b>56</b>
<b>Justificación y objetivos</b> .....	<b>59</b>
<b>Material y métodos</b> .....	<b>61</b>
<b>Materiales</b> .....	<b>62</b>
<b>Equipo Láser</b> .....	<b>64</b>
Estación de trabajo .....	64
Dispositivo galvanométrico.....	67
<b>Caracterización Física</b> .....	<b>68</b>
Microscopio electrónico de barrido .....	68
Microscopio de fuerza atómica .....	71
Microscopio óptico .....	72
Microscopio confocal.....	74
<b>Ángulo de contacto</b> .....	<b>76</b>
<b>Estudio in vitro de respuesta celular</b> .....	<b>78</b>
<b>Obtención de células mesenquimales</b> .....	<b>78</b>
<b>Cultivo celular sobre superficie</b> .....	<b>80</b>
<b>Variables celulares a estudiar</b> .....	<b>80</b>
Ensayo MTT/Proliferación .....	81
Niveles de interleuquina 6 .....	82
Niveles de factor de necrosis tumoral Alfa .....	83
La producción extracelular de colágeno .....	84
Niveles de fosfatasa alcalina.....	85
Niveles de osteocalcina.....	85
Niveles de osteopontina.....	86
Lectura mediante láser confocal de fluorescencia.....	88
<b>Estudio estadístico</b> .....	<b>89</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>91</b>
<b>Proliferación mediante ensayo MTT</b> .....	<b>91</b>
Titanio .....	92
Tantalio.....	92
Cermet.....	93
<b>Niveles de interleuquina 6</b> .....	<b>94</b>
Titanio .....	95
Tantalio.....	95
Cermet.....	96

<b>Niveles de factor de necrosis tumoral alfa .....</b>	<b>97</b>
Titanio.....	98
Tantalio.....	98
Cermet.....	99
<b>La producción extracelular de colágeno .....</b>	<b>100</b>
Titanio.....	100
Tantalio.....	101
Cermet.....	102
<b>Niveles de fosfatasa alcalina .....</b>	<b>103</b>
Titanio.....	104
Tantalio.....	104
Cermet.....	105
<b>Niveles de osteocalcina.....</b>	<b>106</b>
Titanio.....	107
Tantalio.....	107
Cermet.....	108
<b>Niveles de osteopontina .....</b>	<b>109</b>
Titanio.....	110
Tantalio.....	110
Cermet.....	111
<b>Fabricación de estructuras periódicas inducidas por láser .....</b>	<b>112</b>
Parámetros láser .....	112
Caracterización morfológica .....	113
<b>Discusión .....</b>	<b>131</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>147</b>
<b>Comunicaciones a congresos, cursos y publicaciones .....</b>	<b>149</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>151</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>157</b>



## Índice de figuras

Figura 1: Imagen obtenida del diario ABC, en la que se muestra un estudio radiológico mediante radiología simple del clavo hallado por el Dr. Jackson en la momia. ....	31
Figura 2: a) Aflojamiento aséptico protésico de cadera, b) Aflojamiento aséptico protésico de rodilla. ....	33
Figura 3: Ángulo de contacto y su relación con la hidrofilia de la superficie y su impacto en diferentes superficies. En la imagen superior (A) vemos como se define el ángulo de contacto. En la imagen inferior (B) vemos como la creación de diferentes patrones en superficie modifica la hidrofilia de la superficie, el ángulo en superficies hidrofílicas es agudo mientras que en las hidrofóbicas es obtuso .....	36
Figura 4: Imagen quirúrgica de un acetábulo de metal trabecular desarrollado por Zimmer (Zimmer, Trabecular Metal Technology, Inc., Parsippany, NJ, USA). En el cuadrante inferior y derecho podemos ver el aspecto microscópico de la estructura con su porosidad (imagen microscópica obtenida de <a href="http://www.zimmer.com">www.zimmer.com</a> ). ....	41
Figura 5: Compactación del polvo de cerámica tras el tratamiento con calor y presión, obsérvese la creación de poros vacíos centrales. ....	42
Figura 6: Imagen ampliada de la superficie del cermet de zirconio con niobio. ....	43
Figura 7: Vástago de la prótesis Corail (Depuy International Ltd, Leeds, UK) con recubrimiento de plasma de hidroxiapatita en superficie. ....	46
Figura 8: Esquema tomado de Matsugati modificado donde se ve la orientación de la matriz extracelular, lo que genera la orientación celular (Copyright Elsevier, permiso de reproducción número 4102090725043). ....	48
Figura 9: Diferencias en el proceso de ablación entre láser de pulso corto y ultracorto. La flecha amarilla con contorno rojo representa el haz de energía y su longitud la duración del impulso. Podemos ver la generación de diferentes tipos de plasma y ablación de superficie. ....	51
Figura 10: Topografía de LIPSS. ....	52
Figura 11: Onda generada por los polaritones. ....	53
Figura 12: A) Salto de frecuencia y B) demostración de las dos posibles ondas creadas, con la misma longitud de onda, pero diferente frecuencia y energía. ....	55
Figura 13: Muestra la creación de LIPSS en la espira de un tornillo de titanio de cortical de 3,5 mm fabricado por Synthes. ....	56

Figura 14: Imagen obtenida de Matsugaki y colaboradores en la que muestra a la izquierda la isotropía con una organización de la matriz extracelular de colágeno en la superficie lisa y la anisotropía sobre LIPSS (Copyright Elsevier, permiso de reproducción número 4102090725043). .....	58
Figura 15: Imagen que muestra un disco de cermet previo al tratamiento con LIPSS.....	62
Figura 16: Disco de cermet una vez tratado creadas las LIPSS. Nótese el cambio en la respuesta a la luz de la superficie.....	64
Figura 17: A la izquierda imagen de un láser empleado, a la derecha esquema de montaje.....	65
Figura 18: Fotografía donde se identifican los componentes del sistema galvanométrico y la óptica del láser. ....	68
Figura 19: Fotografía del equipo Zeiss FESSEM-ULTRA Plus.....	69
Figura 20: Muestra el esquema de funcionamiento de un microscopio de fuerza atómica.....	71
Figura 21: Muestra el microscopio de fuerza atómica Agilent 5500 AFM.....	72
Figura 22: Muestra la fotografía del microscopio óptico Nikon MM-400.....	73
Figura 23: Esquema de funcionamiento de un microscopio confocal. El haz rojo converge en el pinole, los haces azul y verde al estar en planos focales diferentes no convergen en el pinole y no llegan al sensor.....	74
Figura 24: Fotografía del microscopio confocal SENSO FAR 2300 Plus.....	75
Figura 25 Muestra el cálculo del ángulo de contacto, así como los vectores de las fuerzas de interfase responsables del mismo.....	76
Figura 26: Muestra el dispositivo CAM 200 empleado.....	77
Figura 27: Imagen de microscopía óptica que muestra las células mesenquimales tras alcanzar la confluencia.....	80
Figura 28: Muestra el microscopio confocal láser CLSM-SP2, Leica.....	89
Figura 29: Diagrama de barras para las medias del estudio MTT con su desviación estándar para el titanio.....	92
Figura 30: Diagrama de barras para las medias del estudio MTT con su desviación estándar para el tantalio.....	93
Figura 31: Diagrama de barras para las medias del estudio MTT con su desviación estándar para el cermet.....	93
Figura 32: Diagrama de barras de las medias del estudio de Interleucina 6 con su desviación estándar para el titanio.....	95

Figura 33: Diagrama de barras para las medias del estudio de IL- 6 con su desviación estándar para el tantalio.....	96
Figura 34: Diagrama de barras para las medias del estudio de Interleucina 6 con su desviación estándar para el cermet.....	96
Figura 35: Diagrama de barras para las medias del estudio del factor de necrosis tumoral alfa con su desviación estándar para el titanio.....	98
Figura 36: Diagrama de barras para las medias del estudio del factor de necrosis tumoral alfa con su desviación estándar para el tantalio.....	99
Figura 37: Diagrama de barras para las medias del estudio del factor de necrosis tumoral alfa con su desviación estándar para el cermet.....	99
Figura 38: Diagrama de barras para las medias del estudio de la producción de matriz extracelular con su desviación estándar para el titanio.....	101
Figura 39: Diagrama de barras para las medias del estudio de la producción de matriz extracelular con su desviación estándar para el tantalio. ....	101
Figura 40: Diagrama de barras para las medias del estudio de la producción de matriz extracelular con su desviación estándar para el cermet.....	102
Figura 41: Diagrama de barras para las medias del estudio de la producción de fosfatasa alcalina con su desviación estándar para el titanio.....	104
Figura 42: Diagrama de barras para las medias del estudio de la producción de fosfatasa alcalina con su desviación estándar para el tantalio. ....	105
Figura 43: Diagrama de barras para las medias del estudio de la producción de fosfatasa alcalina con su desviación estándar para el cermet.....	105
Figura 44: Diagrama de barras para las medias del estudio de la producción de osteocalcina con su desviación estándar para el titanio.....	107
Figura 45: Diagrama de barras para las medias del estudio de la producción de osteocalcina con su desviación estándar para el tantalio.....	108
Figura 46: Diagrama de barras para las medias del estudio de la producción de osteocalcina con su desviación estándar para el cermet.....	108
Figura 47: Diagrama de barras para las medias del estudio de la producción de osteopontina con su desviación estándar para el titanio.....	110
Figura 48: Diagrama de barras para las medias del estudio de la producción de osteopontina con su desviación estándar para el tantalio.....	111
Figura 49: Diagrama de barras para las medias del estudio de la producción de osteopontina con su desviación estándar para el cermet.....	111

Figura 50. Muestra los parámetros láser empleados en la creación de las LIPSS. ....	112
Figura 51: Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido de titanio. Las imágenes A, C Y E muestran una superficie lisa a 5.000, 10.000 y 40.000 aumentos respectivamente, mientras que las B, D y F muestras LIPSS creadas en titanio a 5.000, 10.000 y 40.000 aumentos.....	113
Figura 52: Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido de tantalio. Las imágenes A, C Y E muestran las LIPSS a 10.000, 20.000 y 40.000 aumentos respectivamente, mientras que las B, D y F muestras la superficie lisa en el tantalio a 10.000, 20.000 y 40.000 aumentos.....	115
Figura 53: Se muestra a 10.000 aumentos el periodo generado en LIPSS en titanio y tantalio. A y B LIPSS en tantalio y, B y C LIPSS en titanio.....	116
Figura 54: Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido del cermet. Las imágenes A, C, E y G muestran una superficie lisa a 500, 5.000, 25.000 y 70.000 aumentos respectivamente, mientras que las B, D, F y H muestras LIPSS creadas en el cermet a 500, 5.000, 40.000 y 70.000 aumentos.....	117
Figura 55: Muestra la transición entre el metal y la cerámica con más detalle. En el centro de la imagen vemos las LIPSS sobre el metal y en la periferia unas estructuras que recuerdan a los nanopilares.....	118
Figura 56: Imagen obtenida por microscopía de fuerza atómica a una superficie pulida a la izquierda y a la derecha una estructura periódica inducida por láser en tantalio. En la zona inferior una gráfica demuestra la rugosidad de cada superficie. ....	119
Figura 57: Comportamiento de la gota al contacto con en el titanio antes y después del tratamiento mediante LIPSS.....	121
Figura 58: Vemos el comportamiento del cermet tratado con diferentes potencias de láser: a) el control sin tratar, b) 50 mW, c) 100 mW y d) 200 mW. El tratamiento con 50mw disminuye la hidrofobicidad mientras que los tratamientos de mayor potencia claramente la incrementan.....	122
Figura 59: Muestra los datos medios obtenidos para el ángulo de contacto del cermet mediante el tratamiento con diferentes potencias de láser.....	123
Figura 60: Imagen de microscopía óptica que muestra la orientación de las células mesenquimales a 10 aumentos adheridas en la zona de transición entre el metal y la cerámica en los cermets. En la parte inferior y derecha se puede apreciar una polarización celular que no se observa a nivel superior. Esta polarización aparece en las zonas donde hemos creado LIPSS.....	124
Figura 61: Imágen de microscopía óptica en la que se aprecia a 20 aumentos la transición entre la cerámica y el metal en el cermet. En la parte superior las células se orientan en	

una misma dirección (las LIPSS) como indica la flecha bidireccional, mientras que en la parte inferior ese comportamiento no existe (la cerámica sin LIPSS) como indica la flecha multidireccional.....	125
Figura 62: Imágenes de microscopía óptica a 20 aumentos en la que se aprecia la polarización celular en LIPSS en una superficie de tantalio, con un eje mayor muy superior al menor. ....	126
Figura 63: Imagen de microscopía óptica a 20 aumentos en la que volvemos a ver la polarización celular generada por las LIPSS en titanio. ....	127
Figura 64: En esta imagen de microscopía óptica a 20 aumentos vemos cómo las células en una superficie pulida no se orientan de forma uniforme. ....	127
Figura 65: Imágen de microscopía óptica a 20 aumentos donde vemos las células adheridas sobre una superficie lisa de tantalio sin una orientación específica.....	128
Figura 66: Imagen de microscopía confocal donde vemos la orientación celular generada por las LIPSS en una superficie metálica.....	129
Figura 67: Muestra los resultados obtenidos por años el número de publicaciones para los términos “(femtosecond) AND laser” en el motor de búsqueda Pubmed con base Medline.....	131
Figura 68: Muestra los resultados obtenidos por años el número de publicaciones para el término “LIPSS” en el motor de búsqueda Pubmed con base Medline.....	132
Figura 69: Vemos magnificada a 5.000 aumentos la cerámica en una zona de transición, y se aprecia el aumento de volumen en superficie y la caracterización física generada por la transformación en la cerámica en relación a la superficie metálica.....	133
Figura 70: Muestras un diagrama de barras para los resultados obtenidos en las superficies de titanio y tantalio en los ensayos de diferenciación osteoblástica y ECM.....	137
Figura 71: Muestra las nanogotas generadas durante el fenómeno de ablación.....	140
Figura 72: Podemos ver la superficie del cermet de Zirconia/Niobio a 500 aumentos obtenido por SEM, y vemos que la misma está compuesta principalmente por cerámica, con pequeñas zonas de metal intercaladas que se ven más claras.....	142
Figura 73: Podemos ver la superficie del cermet de Zirconia/Niobio tratado a 500 aumentos, y vemos que la misma está compuesta principalmente por cerámica, con pequeñas zonas de metal intercaladas que se ven más claras. Se aprecia una sobrelevación de la zona cerámica en relación al metal.....	143
Figura 74: Vemos mediante SEM el cermet a 500, 1.000 y 10.000 aumentos tratado con 3 potencias diferentes.....	144



## Índice de Tablas

Tabla 1: Clasificación ASTM de las categorías de titanio y su comparación con el hueso .....	39
Tabla 2: Relación entre la longitud de onda de los plasmones y los colores absorbidos y complementarios (reflejados).....	54
Tabla 3: Especificaciones del láser empleado para la generación de LIPSS.....	65
Tabla 4: Especificaciones del microscopio electrónico de barrido Zeiss FESEM ULTRA Plus.....	70
Tabla 5: Muestras las especificaciones del microscopio de fuerza atómica Agilent 5500 AFM.....	72
Tabla 6: Especificaciones del microscopio óptico Nikon MM-400.....	73
Tabla 7: Especificaciones del microscopio confocal SENSOFAR 2300.....	75
Tabla 8: Muestra las especificaciones del CAM 200 empleado.....	77
Tabla 9: Valores MTT: Valores medios, con desviación estándar (DE) y error de la media, así como valores superior e inferior para el intervalo de confianza al 95% para el valor real de la media para el ensayo MTT. SM: Material liso, LIPSS: Material tratado con láser.....	91
Tabla 10: Valores medios, con desviación estándar (DE) y error de la media, así como valores superior e inferior para el intervalo de confianza al 95% para el valor real de la media del ensayo de IL-6. SM: Material liso, LIPSS: Material tratado con láser.....	94
Tabla 11: Valores medios, con desviación estándar (DE) y error de la media, así como valores superior e inferior para el intervalo de confianza al 95% para el valor real de la media del TNF-alfa. SM: Material liso, LIPSS: Material tratado con láser.....	97
Tabla 12: Valores medios, con desviación estándar (DE) y error de la media, así como valores superior e inferior para el intervalo de confianza (IC) al 95% para los valores del valor real de la media de la producción de matriz extracelular de colágeno. SM: Material liso, LIPSS: Material tratado con láser. ....	100
Tabla 13: Valores medios, con desviación estándar (DE) y error de la media, así como valores superior e inferior para el intervalo de confianza (IC) al 95% para el valor real de la media de fosfatasa alcalina. SM: Material liso, LIPSS: material tratado con láser.....	103
Tabla 14: Valores medios, con desviación estándar (DE) y error de la media, así como valores superior e inferior para el intervalo de confianza (IC) al 95% para el valor real de la media de osteocalcina. SM: Material liso, LIPSS: Material tratado con láser. ....	106

Tabla 15: Valores medios, con desviación estándar (DE) y error de la media, así como valores superior e inferior para el intervalo de confianza (IC) al 95% para el valor real de la media de osteopontina. SM: Material liso, LIPSS: Material tratado con láser..... 109

Tabla 16: Valores obtenidos por la MFA para las superficies de titanio y tantalio tanto liso como rugosos. En las LIPSS se especifican las características de las estructuras periódicas. .... 120

Tabla 17: Valores medios del ángulo de contacto para las diferentes superficies metálicas estudiadas..... 120



## Índice de Esquemas

Esquema 1: Muestra el desarrollo esquemático del trabajo de investigación en sus tres fases. ....	61
Esquema 2: Muestra el diseño del estudio, con el reparto de los discos en función de su tratamiento. ....	63





## Abreviaturas

$\mu\text{m}$ : Micrómetro

Å: Angstrom

AFM: Microscopía de fuerza atómica

Al: Aluminio

ASTM: American Society for Testing and Materials

BIC: Contacto implante-hueso

cc: Centímetro cúbico

$\text{cm}^2$ : Centímetro cuadrado

COT: Cirugía Ortopédica y Traumatología

D-MEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DE: Desviación estándar

DMSO: Dimetil sulfóxido

ECM: Matriz extracelular de colágeno

EDX: Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

FA: Fosfatasa alcalina

GPa: Giga pascales

H: Hidrógeno

HA: Hidroxiapatita

IC: Intervalo de confianza

IL-6 Interleucina 6

K: grados Kelvin

KHz: Kilohercio

KV: Kilovoltio

LIPSS: Superficies con estructuras periódicas inducidas por láser.

mL: Mililitro

mm: Milímetro

MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

Nb: Niobio

nm: Nanómetro

O: Oxígeno

°C: Grado centígrado

OSC: Osteocalcina

OSP: Osteopontina

PEEK: Polietereetercetona

Rpm: Revoluciones por minuto

s: Segundo

SEM: Microscopía electrónica de barrido

Si: Silicio

SM: Superficie lisa

Ta: Tantalio

Ti: Titanio

TNF-alfa: Factor de necrosis tumoral alfa.

V: Vanadio

Zr: Zirconia



## Introducción

### Importancia de los biomateriales en cirugía ortopédica y traumatología

La evolución de la cirugía ortopédica y la traumatología siempre ha estado ligada al desarrollo de tecnología que permitiesen el control de las estructuras óseas.

Recientemente el equipo dirigido por el doctor Richard Jackson de la Universidad de Brigham Young, en Estados Unidos, descubrió en una momia egipcia, de 3.000 años de antigüedad (siglos XVI-XI a.C.), un clavo de 23 centímetros de longitud de hierro fijado con resina al hueso a nivel de la rodilla para conseguir una artrodesis de la misma (figura 1). Esto nos da una idea de la larga relación que mantienen los biomateriales con la Cirugía Ortopédica y Traumatología.



Figura 1: Imagen obtenida del diario ABC, en la que se muestra un estudio radiológico mediante radiología simple del clavo hallado por el Dr. Jackson en la momia.

Podemos confirmar que muchos de los grandes avances en COT se produjeron por el desarrollo de nuevos materiales. Uno de los mejores ejemplos es el del desarrollo de la sustitución total de cadera. Sir John Charnley mediante el desarrollo del polimetil-metacrilato como método de fijación de los implantes al hueso y la aplicación de nuevos pares de fricción como son el metal-polietileno de

alta densidad, consiguió que el reemplazo de cadera se convirtiese en un procedimiento común de los servicios de ortopedia de todo el mundo, con resultados duraderos y reproducibles a 30 años (1).

Esta evolución ha favorecido que en los Servicios de Cirugía Ortopédica y Traumatología en países desarrollados se empleen biomateriales en mayor parte de las intervenciones que se realizan. Si a esto sumamos que los procedimientos en los Servicios de Cirugía Ortopédica y Traumatología son cada vez más frecuentes, nos haremos una idea de la importancia que tienen estos biomateriales.

Cuando hablamos de la artroplastia de rodilla y cadera, sabemos que en 2005 se realizaron en España más de 19.000 artroplastias primarias de cadera y más de 32.000 artroplastias primarias de rodilla (2). En el caso de las fracturas de cadera nos encontramos con una tasa de 722 fracturas cada 100.000 habitantes en mujeres y de 284 cada 100.000 habitantes en varones, siendo la inmensa mayoría de fracturas intervenidas y fijadas o sustituidas por implantes. En Estados Unidos en 2002 se implantaron 250.000 prótesis de cadera, 250.000 prótesis de rodilla, 910.000 implantes dentales y el mercado de los biomateriales movió más de 9.000 millones de dólares (3).

Por todo lo mencionado, se explica que el campo de los biomateriales genere interés en diferentes ámbitos: Para la industria se ha convertido en una fuente importante de beneficios, para los investigadores supone un campo de desarrollo sin fin, y para los profesionales suponen una herramienta esencial sin la que no podríamos desempeñar nuestro trabajo.

La búsqueda de la mejora de estos implantes es esencial, con el fin de disminuir las complicaciones que surgen con el paso del tiempo tras insertar un material inerte en el cuerpo, ya que, a día de hoy, podemos decir que las cirugías de revisión por el gran volumen que representan, son ya el presente de la cirugía. Las mismas, en muchos casos, no dejan de ser el resultado final de un fracaso terapéutico (figura 2), por la incapacidad del material de mantener una reacción osteoblástica frente a una fibroblástica a medida que pasa el tiempo, lo que lleva al aflojamiento del material y dolor en el paciente, dando lugar a las imágenes típicas de osteolisis y aflojamiento aséptico (4, 5).



Figura 2: a) Aflojamiento aséptico protésico de cadera, b) Aflojamiento aséptico protésico de rodilla.

### Biocompatibilidad e interfaz biomaterial-tejido

Biocompatibilidad es un término derivado del prefijo bio- (del griego βίος, “vida, ser vivo”) y de la palabra compatibilidad (“capacidad de estar con”). Por ello podemos decir que la biocompatibilidad de un material es la capacidad de este para desarrollar una función beneficiosa para ese tejido, sin producir efectos adversos en el mismo. Centrándonos ya en los ser humanos, el término se aplica a materiales utilizados en medicina que pueden ser implantados en nuestro organismo. Estos materiales biocompatibles son los que definimos como biomateriales.

Cuando hablamos de biomateriales nos encontramos con diferentes reacciones entre el huésped y el material. Si el material no induce ningún tipo de respuesta, estaremos ante un material bioinerte (como ejemplo tenemos el PEEK). Cuando este material se reabsorbe permitiendo su reemplazo por tejido, nos encontraremos ante un material biodegradable o bioreabsorbible (como por

ejemplo el fosfato tricálcico). Por último, si este material genera una reacción de unión/relación con tejido que le rodea nos encontraremos ante un material bioactivo (como ejemplo tenemos el metal trabecular).

Si nos centramos en el tejido óseo, entendemos por biomaterial bioactivo aquel que tiene capacidad osteointegradora, es decir, aquel que consigue una unión biológica con el hueso. Con esto excluimos las uniones mecánicas que producen ciertos materiales como puede ser un tornillo de fijación de material inerte. Esta unión directa del material al tejido óseo se produce por las propiedades de superficie, que son las responsables finales del efecto biológico del mismo (6).

Cuando un biomaterial entra en contacto con un organismo vivo, éste reacciona a través de su superficie por diferentes mecanismos: El primero es la disolución del material en el medio extracelular, causante en muchos casos de la toxicidad y la otra es mediada por la superficie topográfica del implante (7, 8).

Si nos centramos en los metales, en lo referente a la solución o reacción química del biomaterial con el organismo, se crea un fenómeno específico dependiente de cada biomaterial en el que se forman 3 capas diferenciables: La primera es el propio metal, la segunda es la capa de interfaz tejido-metal y la tercera el tejido (6).

#### Adhesión celular a biomateriales

La adhesión celular a la superficie de los biomateriales es un proceso complejo que está mediado por la adsorción de componentes de adhesión de la matriz extracelular. La célula usa receptores de superficie de la familia de las integrinas presentes en su membrana celular para adherirse a los componentes de la matriz extracelular adheridos a la superficie del biomaterial. Estas proteínas que encontramos en la matriz extracelular son múltiples, como ejemplos tenemos la albúmina, el colágeno, la laminina, el fibrinógeno, la fibronectina, vitronectina o las gamma globulinas. Tiene pues sentido decir que la adhesión celular va a estar condicionada a las proteínas de la matriz extracelular adheridas a la superficie del biomaterial (8).

De esta forma en función de las características de la superficie, unas proteínas u otras verán favorecida su adsorción y, en consecuencia, determinadas células se adherirán mejor o peor al biomaterial. La forma en la que las células reaccionarán

a esta superficie dependerá de las propiedades químicas de la superficie (hidrofobicidad, dureza, etc.), de la microestructura (porosidad, tamaño de poro, área efectiva, etc.) y de las propiedades mecánicas del material (módulo de elasticidad, etc.).

La humectancia es una de las propiedades que más van a influir en la adhesión y en la respuesta celular. Se mide a través del ángulo de contacto entre una gota de agua y la superficie del material (figura 3). A menor ángulo de contacto, más hidrofílica es la superficie. Sabemos que cada célula presenta un ángulo óptimo en superficies lisas para que se produzca su adherencia. Cuando incrementamos el ángulo de contacto de  $0^\circ$  a  $106^\circ$  disminuimos la adherencia de los osteoblastos al material, mientras que los fibroblastos presentan su máxima adherencia con ángulos de contacto entre  $60^\circ$  y  $80^\circ$ . De esta forma basándonos en los extremos del ángulo de contacto ( $0^\circ$  y  $180^\circ$ ) podemos definir dos superficies que son la expresión máxima de los mismo, las superficies superhidrofílicas (en las que una gota de agua se expande hasta sus límites) y las superficies superhidrofóbicas (con un ángulo de contacto próxima a  $180^\circ$  y sobre la que no se produciría adherencia). Estos fenómenos ocurren en situaciones ideales, en las que tenemos una superficie lisa y la interacción con el líquido de superficie es constante. Cuando nos encontramos ante superficies rugosas vemos que la situación de equilibrio no existe, y el equilibrio está en constante cambio. Además, sobre estas superficies rugosas cambian la relación del líquido con la superficie y las propiedades superhidrofóbicas que a priori no favorecen la adherencia, pueden actuar de forma contraria. Esta situación paradójica es especialmente llamativa tras el desarrollo de superficies nanométricas con estructuras periódicas (LIPSS). Gracias a estas propiedades, con los procesos industriales actuales podemos generar superficies superhidrofóbicas con gran adherencia, lo que a priori parece sin sentido. Esta situación es la que se da en algunas superficies con patrones nanométricos como las LIPSS. Este comportamiento característico se llama el efecto pétalo de rosa, que es el mismo que vemos cuando las gotas de agua se depositan sobre una hoja de rosa, y se aprecia cómo las mismas no se expanden por la hidrofobicidad, pero no pierden su adherencia, y no se caen ni desprenden incluso al encontrarse suspendidas contra la acción de la gravedad (9).

Además de influir en la adherencia, la hidrofilia de la superficie puede modificar la siembra celular sobre ella, impidiendo o mejorando la dispersión celular y pudiendo incrementar la actividad metabólica de las células que hay en la superficie (8).

Como mencionábamos al principio, otro de los determinantes de la adhesión celular es la matriz extracelular presente. Las proteínas en esta matriz son las primeras en entrar en contacto con un nuevo material implantado, e inmediatamente se adhieren a la superficie del mismo. La adherencia de estas proteínas estará estrechamente ligada también a la hidrofobicidad de la superficie, y es lo que en último punto determinará el tipo de célula que se adherirá, y como bien dijimos al principio, la calidad de esta adherencia (8).

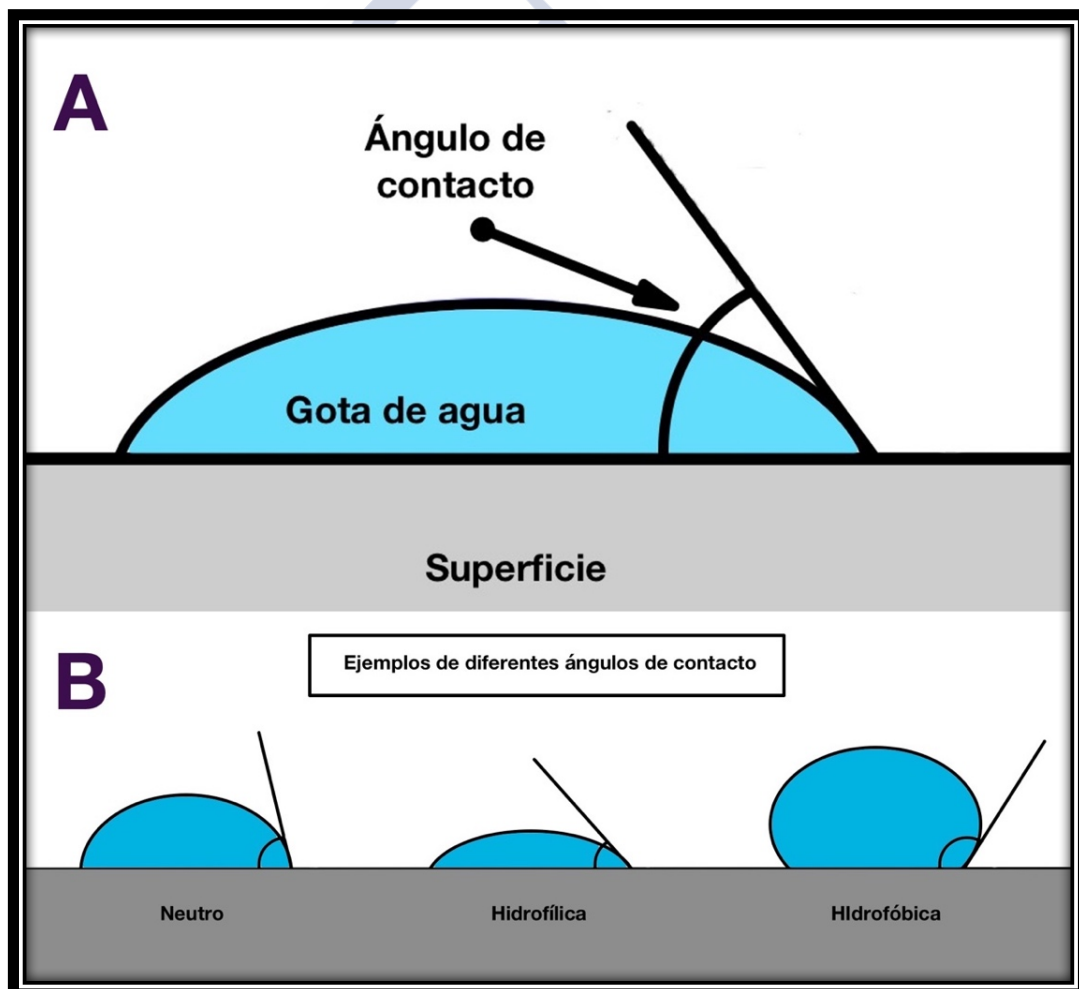


Figura 3: Ángulo de contacto y su relación con la hidrofilia de la superficie y su impacto en diferentes superficies. En la imagen superior (A) vemos como se define el ángulo de contacto. En la imagen inferior (B) vemos como la creación de diferentes patrones en superficie modifica la hidrofilia de la superficie, el ángulo en superficies hidrofílicas es agudo mientras que en las hidrofóbicas es obtuso

A parte de la hidrofobicidad y las proteínas presentes en el entorno de contacto del material, la carga iónica de la superficie modifica de forma importante la adhesión celular. Cambiando la carga iónica de superficie en los materiales cambiamos la respuesta celular a los mismos. De esta forma hidrogeles con cargas negativas favorecen la diferenciación condral en comparación con los que tienen cargas positivas o neutras. Las neuronas parecen adherirse mejor a superficies cargadas positivamente, de forma parecida a cómo se comportan los osteoblastos, que se adhieren y siembran mejor sobre éstas.

Cuando modificamos una superficie añadiendo a la misma grupos funcionales podemos cambiar carga e hidrofobicidad a la vez. Por ello si añadimos grupos amino (-NH<sub>2</sub>) a la superficie aportamos hidrofilia y carga positiva lo que optimiza la adherencia osteoblástica a la superficie (8).

La rugosidad o textura de la superficie es otro de los parámetros que va a modular la respuesta celular en contacto con la superficie. Los cambios en la rugosidad van a modificar la adherencia, morfología celular, proliferación y la diferenciación fenotípica. En lo referente a la diferenciación osteoblástica existe suficiente evidencia que respalda que éstos se desarrollan mejor sobre una superficie rugosa que una lisa (10-12). Cuando hablamos de rugosidad tenemos que diferenciar la escala en la que se presenta la misma. Si hablamos de topografías con surcos que van de 100 micras a milímetros le llamaremos macro-rugosidades, de 100 micras a 100 nanómetros micro-rugosidades, y menos de 100 nanómetros nano-rugosidades. No existe suficiente evidencia a favor de un patrón de superficie en concreto que optimice la respuesta osteoblástica al entrar en contacto con la misma u optimice la diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos. El mismo patrón puede incrementar la expresión de osteocalcina, pero disminuir la proliferación celular. En este sentido como veremos más adelante las LIPSS han supuesto un cambio revolucionario, ya que favorecen la proliferación y la diferenciación osteoblástica, así como su adhesión (8, 10).

La porosidad de los materiales favorece la adhesión y diferenciación celular, si estos son de tamaño adecuado. Resulta interesante ver como cada tipo celular tiene afinidad por un tamaño de poro determinado. Esto nos puede ayudar a guiar el crecimiento celular sobre estructuras tridimensionales. Los osteoblastos parecen tener predilección por tamaños de poro entre los 100 y 150 micrómetros,

las células endoteliales por poros menores de 80 micrómetros y las células fibroblásticas por tamaños de 150 a 300 micrómetros (13).

### El titanio como biomaterial

El titanio es un elemento de la tabla periódica con número atómico 22, empleado como elemento predominante en aleaciones para su uso como biomaterial. Fue descubierto en 1791 por William Gregor en Gran Bretaña, tras estudiar un metal gris plata que había encontrado. Posteriormente en 1975 el químico Martin Kalprotz de dio el nombre de titanio en referencia a los titanes presentes en la mitología griega. Es el noveno elemento más abundante de la corteza terrestre. Se extrae principalmente del rutilo (metal compuesto por óxido de titanio).

Presenta grandes ventajas, ya que comparado con otros metales ampliamente extendidos en COT como el acero, presenta una densidad menor, una resistencia intrínseca a la corrosión mayor y un comportamiento mecánico más próximo al del hueso.

Pese a que su uso industrial se inició en 1946 tras desarrollar Justin Kroll un proceso para producirlo comercialmente, su utilización como aleación en ortopedia en pacientes humanos no se produjo hasta finales de la década de los 60, aunque ya vemos estudios publicados en animales a principios de la década de los 50 (14), que demuestran unas propiedades biológicas y mecánicas favorable para el tratamiento de las fracturas. Asimismo, el titanio es el principal componente de los implantes dentales dado su comportamiento mecánico, principalmente gracias a su resistencia a la fatiga. Como gran inconveniente destaca su baja resistencia al desgaste, lo que implica que no pueda ser usado para superficies en fricción (15).

Cuando trabajamos con este metal en estado puro, encontramos sustancias en muy baja proporción (elementos intersticiales) que van a modificar las propiedades del mismo. De esta forma categorizamos al titanio puro en cuatro grados (tabla 1) según la American Society for Testing Material (ASTM) en función de la concentración de estas "impurezas". La graduación varía principalmente en función de la cantidad de Oxígeno (O), siendo el titanio grado 1 el que tiene la menor cantidad de O, la menor resistencia mecánica pero la mayor ductilidad, y siendo el grado 4 el que tiene el mayor porcentaje de O, la mayor resistencia y la

menor ductilidad. Es este último el que se emplea con más frecuencia junto al de grado 3 en implantes y material de osteosíntesis en aleaciones. En esta clasificación de la ASTM se ha incluido la aleación Ti6AL4V como grado 5, siendo la más empleada en ortopedia por sus óptimas propiedades (tabla 1).

Tabla 1: Clasificación ASTM de las categorías de titanio y su comparación con el hueso

<b>Grado</b>	<b>O (máx.)</b>	<b>Tensión máxima (MPa)</b>	<b>Elong (%)</b>	<b>Módulo elasticidad</b>
<b>1 CP-Ti</b>	0.18	240	24	103-107
<b>2 CP- Ti</b>	0.25	345	20	103-107
<b>3 CP- Ti</b>	0.35	450	18	103-107
<b>4 CP- Ti</b>	0.40	550	15	103-107
<b>5 Ti6AL4V</b>	-	860	10	117-120
<b>Bone</b>	-	150-400	10-40	10-40

Como ya dijimos previamente la aleación más empleada como biomaterial es Ti6AL4V, especialmente para aquellos casos en los que exista una alta demanda mecánica. Esta aleación se genera por procesos termomecánicos. Variando las características y tiempos del proceso podemos variar las propiedades del material. Podemos destacar de esta aleación de titanio las siguientes ventajas:

- **Alta resistencia a la corrosión:** Tras la implantación de una estructura de titanio en un organismo vivo o tras su contacto directo con oxígeno, se genera de forma pasiva y rápida una capa de óxido de titanio de 5-10 nm ( $\text{TiO}_2$ , proceso de pasivación). Esta capa protectora es muy estable a lo largo de toda la superficie del implante, y genera una barrera que evita la corrosión en la superficie del implante (16). Esta resistencia es plena a compuestos básicos incluso en caliente, a ácidos orgánicos, y a ácido sulfúrico o clorhídrico en dilución. La resistencia a ácidos disminuye con la temperatura, y cuando estas son muy elevadas, se producen fácilmente reacciones con el nitrógeno, oxígeno, hidrógeno, boro u otros no metales. La resistencia del titanio a la corrosión se puede ver incrementada o disminuida por tratamientos de superficie o cambios en la aleación. De esta forma las aleaciones con niobio y zirconio favorecen la aparición de una

capa pasiva inerte protectora que no libera iones tóxicos como sucede con el aluminio o el vanadio.

- Buen módulo de elasticidad: A pesar de que el módulo de elasticidad del titanio es hasta 10 veces mayor que el del hueso cortical (10-20GPa), es muy inferior al que presentan otros biomateriales como el acero o las aleaciones de cromo-cobalto (110 frente a 220 y 200). Incluso podemos conseguir modificar este módulo de elasticidad disminuyéndolo, modificando la aleación (Ti-13Nb-13Zr) o aumentando la fase beta durante su proceso de fabricación para acercarlo más al del hueso.
- Resistencia al fracaso por fatiga: La microestructura en fase alfa más beta, evita la aparición de defectos (llamados “crack”) en superficie aumentando la resistencia a la fatiga del material. Esta ventaja favoreció su empleo en otros campos como la ingeniería aeroespacial.

A pesar de sus múltiples ventajas frente a otros biomateriales metálicos como el acero o las aleaciones de cromo-cobalto, no puede emplearse en zonas de fricción por unas propiedades tribológicas no favorables. El titanio es muy susceptible al desgaste. Por este motivo no puede emplearse en zonas móviles o como superficie en pares de fricción.

### El tantalio como biomaterial

El tantalio es un elemento químico de la tabla periódica con número atómico 73, al igual que el titanio es un metal de transición con un color azul grisáceo. Fue descubierto en 1802 por Anders Ekeberg. Se obtiene de la tantalita, y en la naturaleza generalmente se encuentra como coltán (suma columbita y tantalita). Se emplea mucho en la fabricación de condensadores electrónicos y en equipos de transferencia de calor de la industria química, en especial en situaciones de riesgo de corrosión. También se emplea en aleaciones para incrementar la resistencia a la corrosión de los metales (como por ejemplo el acero).

Es muy resistente a los ácidos, excepto al fluorhídrico. Se oxida ante soluciones alcalinas. El oxígeno reacciona muy bien con él en caliente. De forma parecida a lo que le ocurre al titanio, se genera en su superficie una capa de óxidos, de forma casi inmediata al entrar en contacto con él (17).

Una de las grandes ventajas del tantalio para su uso en COT es la posibilidad de crear una estructura tridimensional muy porosa. Cuando conseguimos con el tantalio esta disposición, hablamos de metal trabecular (figura 4. Zimmer, Trabecular Metal Technology, Inc., Parsippany, NJ, USA), que consiste en un biomaterial de poro con celda abierta de 500 micras con una estructura semejante al hueso trabecular (17). Este material se genera mediante la vaporización del tantalio sobre una estructura tridimensional de poros dodecaédricos de carbono, lo que genera una cobertura del 100% de 50 micras de grosor. Esta configuración es superior al resto de biomateriales en términos de osteointegración por su alta porosidad, generando creación de hueso en su interior, incluso angiogénesis en su interior, por ello se habla de “osteoincorporación” (18). Además, biomecánicamente esta estructura tridimensional aproxima su módulo de elasticidad al del hueso esponjoso (su módulo de elasticidad se encuentra entre el hueso trabecular y cortical, de 3 GPa).

Como punto negativo el tantalio tiene malas propiedades tribológicas y un módulo de elasticidad inadecuado para su uso como implante.

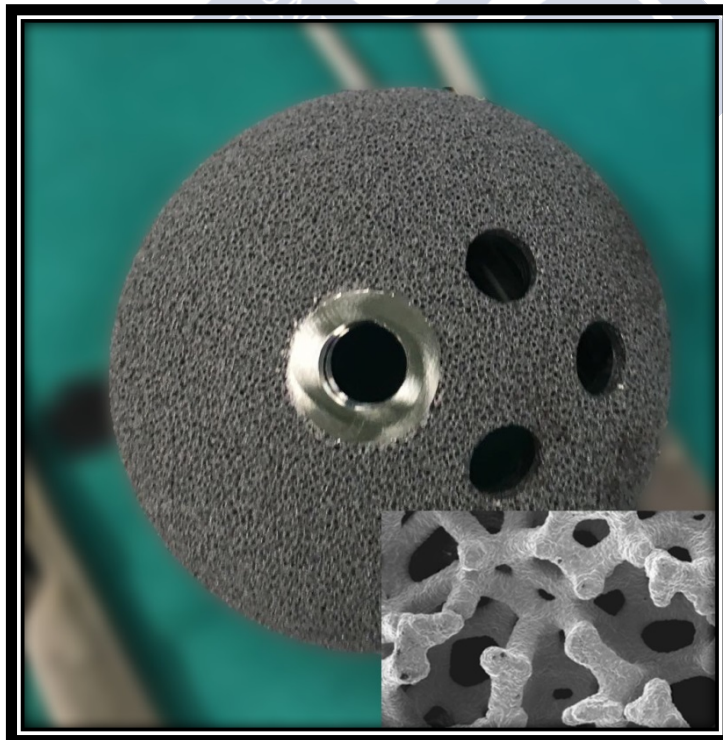


Figura 4: Imagen quirúrgica de un acetábulo de metal trabecular desarrollado por Zimmer (Zimmer, Trabecular Metal Technology, Inc., Parsippany, NJ, USA). En el cuadrante inferior y derecho podemos ver el aspecto microscópico de la estructura con su porosidad (imagen microscópica obtenida de [www.zimmer.com](http://www.zimmer.com)).

## Los cermets como biomateriales

Las cerámicas son biomateriales, generados por calor a partir de compuestos metálicos y no metálicos (ejemplo: alúmina  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Se generan por aplicación de altas temperaturas y presiones a un polvo formado por sus componentes básicos. El tamaño de ese polvo y la relación temporal entre presión y temperatura van a influir en la generación de la cerámica. Así creamos una estructura compactada con pequeños espacios en su interior (figura 5).

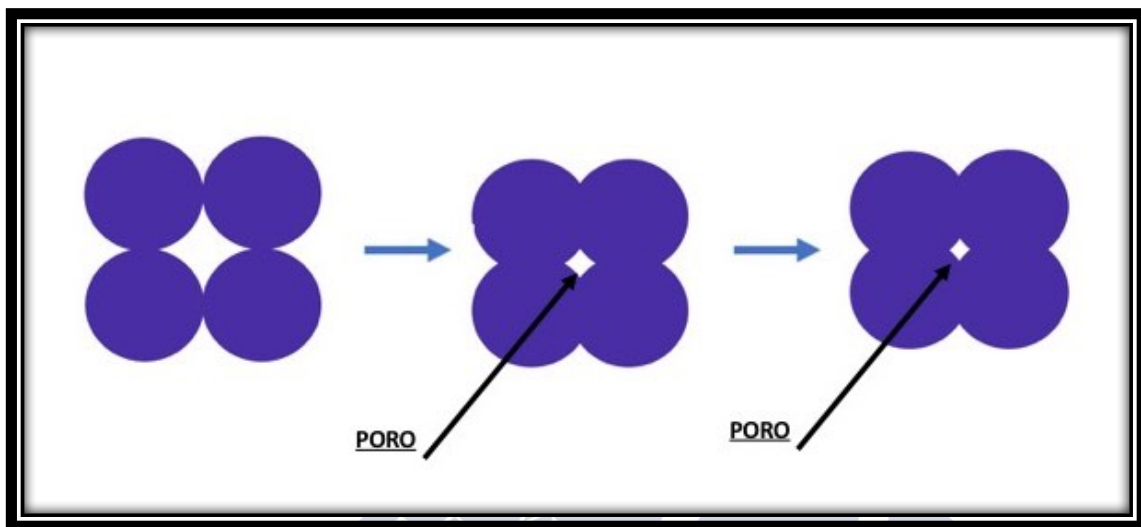


Figura 5: Compactación del polvo de cerámica tras el tratamiento con calor y presión, obsérvese la creación de poros vacíos centrales.

Esto da lugar a un material muy duro, con unas propiedades compresivas excelentes, muy resistente al desgaste y la corrosión, pero frágil. Para evitar este gran inconveniente se decidió añadir determinados metales con el fin de cubrir los poros que aparecían entre las partículas de polvo fusionadas. De esta forma conseguimos una sinergia entre las propiedades de la cerámica y las propiedades de los metales incluido, evitando defectos como la fragilidad y favoreciendo su osteointegración.

Uno de estos nuevos biomateriales es el cermet generado a partir de la cerámica  $\text{ZrO}_2$  y Nb (figura 6). Este nuevo biomaterial presenta las siguientes propiedades (19):

- “Aging free”: Evitamos la pérdida de propiedades que sufren las cerámicas al estar sometidas a bajas temperaturas.

- Una mayor resistencia a la rotura, ya que el metal incluido evita la propagación de la rotura (“crack”) que hace a las cerámicas tan frágiles.
- Mejores propiedades tribológicas. Ya de por sí las cerámicas muestran una resistencia excelente al desgaste, pero si a ello añadimos que tapamos los poros o irregularidades con el metal añadido generamos menor resistencia a la fricción.
- Módulo de elasticidad mejorado, próximo a las aleaciones de titanio grado 5 (135GPa)
- Osteointegración semejante a la del niobio puro

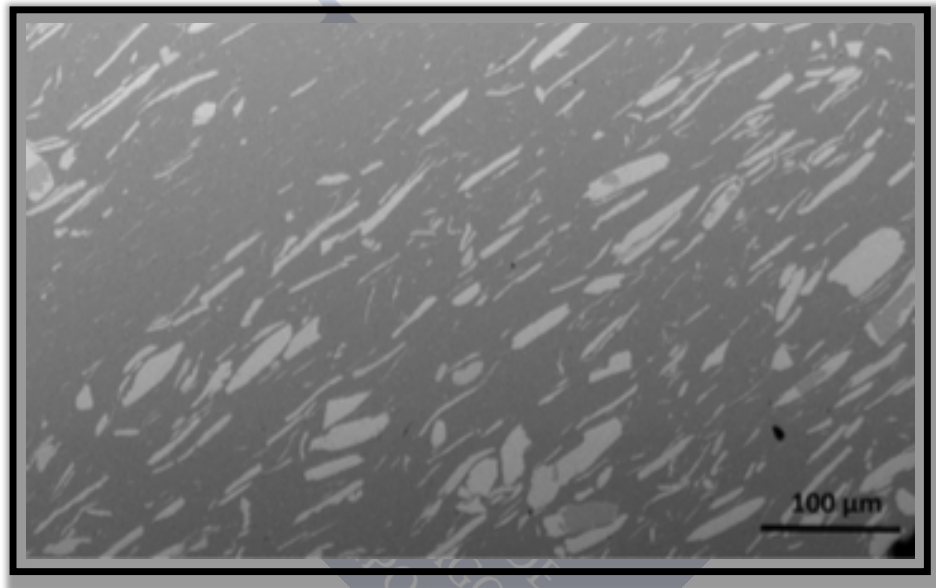


Figura 6: Imagen ampliada de la superficie del cermet de zirconio con niobio.

### Tratamientos de superficie en biomateriales

Como ya presentamos previamente, no encontramos ningún material que presente unas cualidades óptimas para su uso como biomaterial en su estado nativo. Así el oro tiene la ventaja de su protección frente a la oxidación que chocan con sus propiedades tribológicas. Al titanio le pasa algo parecido. Las aleaciones de cromo-cobalto que son muy superiores en su uso para superficies de fricción presentan un módulo de elasticidad que se aleja de la que buscamos. Por todo ello intentamos constantemente mejorar las propiedades de estos metales, con el fin de potenciar aquellas que limitan su función como biomaterial.

Dentro de estas modificaciones, las que afectan a la superficie del material nos van a dar la posibilidad de controlar la interacción del mismo con el huésped. De esta forma podremos modificar la corrosión del material, la oxidación, el desgaste, la degradación y la integración.

La industria ha mostrado un interés creciente en el desarrollo de procesos enfocados a la manipulación de estas superficies. La ingeniería de superficie es una de las ramas con más potencial en el desarrollo de biomateriales (20).

#### Tratamientos químicos

Mediante la aplicación de diferentes sustancias químicas podremos cambiar la superficie de los biomateriales. Como ejemplo aplicado al titanio, con un tratamiento ácido disminuimos el espesor de la capa protectora de óxido y los contaminantes. Si en cambio aplicamos un tratamiento alcalino (NaOH) se crea una capa submicrométrica de gel de titanato sódico con mayor bioactividad que la superficie no tratada. Podemos también aplicar peróxido de hidrógeno con el fin de aumentar la oxidación y porosidad de la capa externa, lo que también mejora sus propiedades bioactivas (21).

#### Implantación iónica

Este procedimiento consiste en acelerar iones de un material determinado bajo un campo eléctrico, e impactarlo contra el sólido que se quiere modificar. De esta forma podemos cambiar las propiedades superficiales del metal. Es una técnica muy empleada en la modificación de semiconductores y en el tratamiento final de superficies metálicas industriales.

La implantación de iones en la superficie de biomateriales puede mejorar la dureza, desgaste, corrosión, ductilidad y bioreactividad. Como ejemplo tenemos el tratamiento con iridio del Ti-6Al-4V con el fin de mejorar su resistencia a la corrosión (20). También podemos incorporar iones de plata para favorecer la adherencia celular y limitar el crecimiento de determinadas bacterias.

### Silanización y película de Langmuir–Blodgett

La silanización consiste en añadir moléculas de silano a la superficie del metal. Esta unión se consigue a través de los grupos hidroxilo. El grupo silano ( $\text{SiH}_4$ ) puede ser modificado para dar diferentes propiedades a la superficie a tratar, principalmente favoreciendo la adhesión celular. Su uso en industria también está muy extendido, así la creación de parabrisas atérmicos con una película de silicio es frecuente en automoción.

El procedimiento por el cual creamos una película de Langmuir–Blodgett es sencillo. Consiste en crear una capa tras realizar una inmersión de un sólido en un líquido orgánico. Con cada inmersión incrementamos el grosor de la película. Las moléculas del surfactante en estas capas están muy ordenadas pudiendo llegar a crear una membrana que recubre todo el implante. El problema de estas membranas es su falta de estabilidad y la tendencia a la rotura en determinadas circunstancias.

### Autoformación de monocapas

Es un mecanismo de tratamiento de superficies semejante al anterior, pero aquí en vez de crearse las membranas por la tensión superficial, creamos una capa ordenada por fuerzas de van der Waals tras la aplicación de una energía externa.

De esta forma podemos crear grupos funcionales como anhídros, perfluoruros, fosfatos, etilenglicol, etc. en superficie en función del interés que tengamos.

### Impresión por microcontacto

Mediante este tratamiento podemos crear patrones en un micromolde de silicona por fotolitografía, aplicar un elastómero de silicona creando un cuño de impresión. Este se impregnan con proteínas, silanos o polímeros y se aplica a la superficie a tratar (3).

## Coberturas

El tratamiento mediante cobertura con determinados materiales es un proceso de los más extendidos en COT para favorecer la osteointegración de implantes. Para ello, las cerámicas biológicas basadas en calcio y fósforo se emplean en tratamientos de recubrimiento para incrementar la adhesión de células que se diferenciarán a osteoblastos.

Otras cerámicas como el zirconio o la alúmina se emplean en tratamientos de superficie para favorecer las propiedades tribológicas de otros materiales como el titanio.

Para realizar el depósito de estos materiales sobre el metal, existen diferentes técnicas que pueden ser químicas, físicas o por fenómenos galvánicos. Uno de los más extendidos para la creación de implantes ortopédicos es la adherencia mediante la creación de plasmas (20).

Mediante un spray de plasma lo que hacemos es enviar partículas del material que va a cubrir la superficie en polvo a muy alta temperatura y a mucha velocidad. Esto lo conseguimos calentando polvo de cerámica y acelerándolo bajo un arco voltaico que permita su recubrimiento. Los compuestos se enfrían al chocar contra la superficie y cristalizan creando una capa adherida al sólido (figura 7). El problema es que estas capas adheridas no están realmente integradas y pueden liberarse del metal con el paso del tiempo, llevándonos a aflojamientos asépticos si hablamos de artroplastias (22, 23).



Figura 7: Vástago de la prótesis Corail (Depuy International Ltd, Leeds, UK) con recubrimiento de plasma de hidroxiapatita en superficie.

Actualmente las superficies tratadas mediante esta técnica han demostrado los mejores resultados en estudios de osteointegración precoz. Además, la misma se consigue de forma rápida y predecible (10).

### Texturización

Con la texturización lo que hacemos es modificar la forma de la superficie del material con el fin de modificar sus relaciones con el medio en el que se encuentran. Al realizar estas modificaciones podemos cambiar las propiedades tribológicas, mecánicas y químicas en la superficie del material (20), pero quizás lo que más nos interese es poder cambiar la forma en la que la superficie interactúa con las proteínas y células del medio en el que se encuentra, cambiando sus propiedades osteointegradoras.

Desde el punto de vista de la respuesta celular, al cambiar una superficie pulida por una rugosa, favorecemos la adhesión celular y su diferenciación a osteoblastos, y escogiendo patrones determinados podemos favorecer o impedir esta reacción (12). De esta forma creando modificaciones en la escala celular ( $>100\mu\text{m}$ ) favorecemos la adherencia de células precursoras de osteoblastos, pero no podemos controlar la orientación de la matriz extracelular para crear un patrón anisotrópico como el que aparece en el tejido óseo.

Recientemente se ha modificado la superficie de biomateriales con láser de alta potencia, con pulsos de femtosegundos de duración, lo que genera modificaciones de superficie en el espectro nanométrico. Estos tratamientos con láser crean patrones periódicos en función de las propiedades del haz de luz que favorecen la respuesta celular, y consiguen que la matriz extracelular se oriente con patrón específico, y sobre ésta, las células se adhieren con un patrón anisotrópico que recuerda más al tejido óseo vivo (11, 24). De esta forma la matriz extracelular se orienta en función del dibujo/patrón periódico creado por el láser y las fibras de actina se adhieren al mismo de forma anisométrica de la misma forma que lo hacen en el hueso vivo. La figura 8 representa un esquema realizado por Matsugati y colaboradores (24) en el que podemos ver la orientación tridimensional de las estructuras.

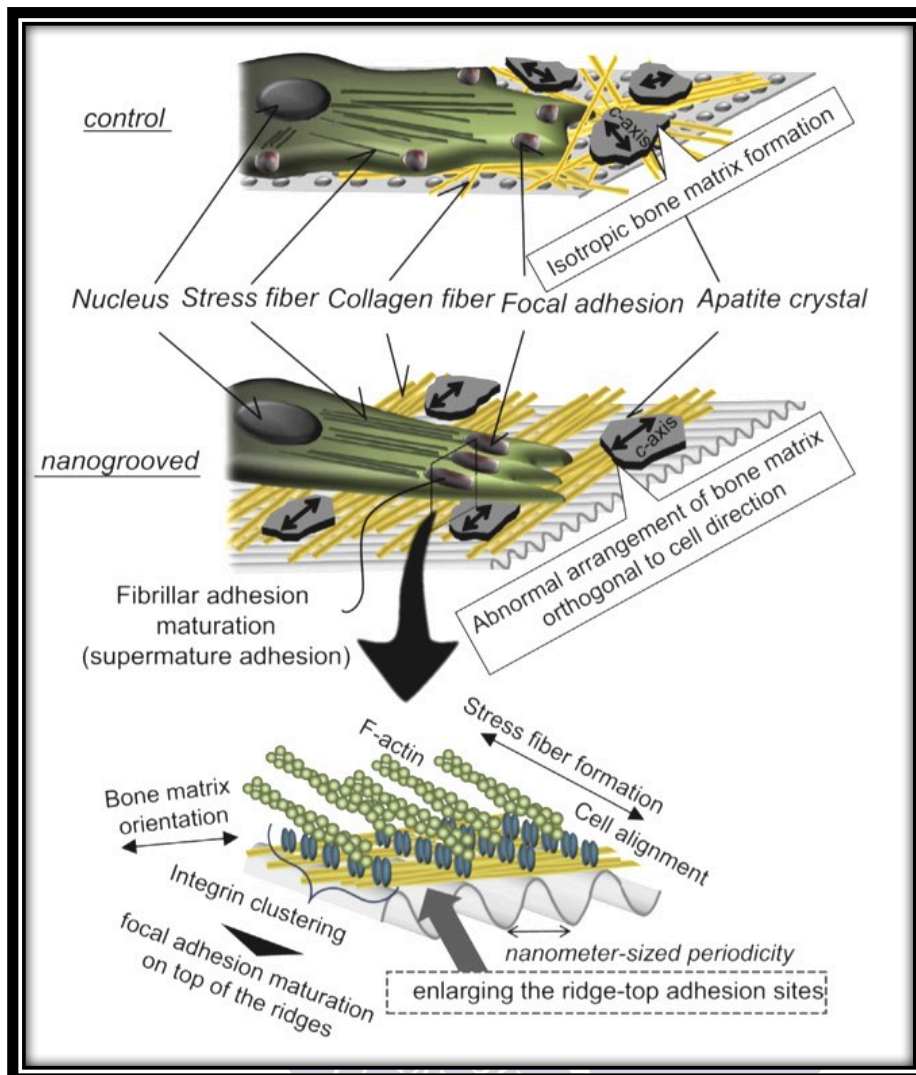


Figura 8: Esquema tomado de Matsugati modificado donde se ve la orientación de la matriz extracelular, lo que genera la orientación celular (Copyright Elsevier, permiso de reproducción número 4102090725043).

### Desarrollo del láser

La generación de LIPSS es un proceso que depende de procesos ópticos no lineales generados por un haz de energía. Para poder comprender la generación de estos fenómenos tenemos que remontarnos al desarrollo de la teoría de dos fotones, desarrollada por una estudiante de doctorado María Göppert hacia el final de la década de los años 20 (25), que con sus teorías postuló las bases de los procesos ópticos no lineales. En estos momentos el láser aún no se había desarrollado, y no existían en esa época haces de luz con las características adecuadas para demostrar las propiedades ópticas no lineales descritas. Hubo que esperar hasta 1960 para que el Dr. T. Harold Maiman desarrollase el primer láser funcional

(26), y permitiese la demostración de las teorías ópticas no lineales en los años sucesivos. Tras su creación, los experimentos con láseres aumentaron y se probó el efecto de los haces de láser en diferentes materiales y tejidos. En 1965 Birnbaum (27) descubrió que en semiconductores tratados con láser se observaba un daño en la superficie, y sobre la misma se generaban estructuras periódicas (LIPSS) que él definió como “ripples”. Desde entonces su desarrollo ha sido exponencial, y los tratamientos láser aprovechando las propiedades ópticas no lineales ha llegado a muchos procedimientos industriales como la producción de computadores, y a la ingeniería biomédica, donde tenemos como ejemplo la cirugía ocular o la modificación de stents cardiacos (28).

### Interacción radiación láser-materia

El láser es una fuente de luz que se distingue por sus propiedades únicas: coherencia, monocromaticidad, direccionalidad y alta potencia. Por ello cuando un haz láser alcanza a la materia, los fenómenos que se producen son únicos. La luz al interactuar con la materia puede reflejarse, propagarse o absorberse. La forma en la que actuará vendrá en relación a la reflectividad del material. En el caso de los metales, ésta será baja si empleamos un láser con una longitud de onda corta y se incrementará de forma drástica si esta longitud de onda supera la frecuencia de plasma del metal (dada por la frecuencia de oscilación de las cargas libres en el metal). Por encima de este punto la absorción de luz por el material es elevada.

#### Absorción de la radiación láser en metales

La absorción de luz por los metales es la suma de dos procesos. Por un lado, nos encontramos con la absorción lineal que obedece la ley de Beer-Lambert y que básicamente viene a establecer una relación empírica entre la absorción y la luz en función de las propiedades del material atravesado. Pero al trabajar con láser de pulsos de femtosegundos de duración la absorción por mecanismos no lineales cobra importancia. Dentro de éstos hablamos de la impactación iónica y de la fotoionización.

El procedimiento de impactación iónica consiste en la creación de dos electrones libres como el resultado del impacto de un electrón excitado por un fotón contra otro electrón del medio.

El procedimiento de fotoionización ocurre por la absorción de fotones por parte de los electrones del medio, lo que hace que su energía se dispare por encima de la de ionización.

Una vez excitados los electrones se crea una cantidad de energía que va a ser disipada de dos formas: Se puede generar el fenómeno fotoeléctrico cuando la energía de los electrones es suficiente para liberarlos. Si no consiguen desprenderse, el equilibrio energético lo alcanzan colisionando con electrones de su entorno. Ambos procesos van a dar lugar a la creación de calor.

En los pulsos-ultracortos que generamos el material va a sufrir en superficie cambios drásticos de temperatura ( $10^3$ - $10^{10}$  K/s) mientras la estructura permanece a temperatura constante.

#### Ablación láser

El proceso de ablación generado por el láser sobre la superficie del material es el resultado de la acumulación de energía por los procedimientos explicados con anterioridad. Este procedimiento es específico de los láseres que generan pulsos de duración ultracorta, y se diferencian completamente de los que generan pulsos de duración corta.

Los pulsos del láser crean en la superficie intensas presiones, cambios de densidad y altas temperaturas que generan la eyección de parte del material en la superficie. El corto tiempo de acción del láser en los pulsos ultracortos, impide que dé tiempo a que se genere un plasma que pueda interactuar con el haz del láser, a diferencia de lo que ocurre con los pulsos cortos, en los que durante la fase final del impulso el haz del láser choca de forma directa contra el plasma generado. De esta forma optimizamos la energía aplicada (29). Esto podemos verlo muy bien en la ilustración que muestra la figura 9. En el pulso ultracorto el aumento brusco de temperatura en un periodo ínfimo, genera cambios límite en la presión y densidad del material en relación al de su entorno, lo que genera su eyección a diferencia de

lo que ocurre en el pulso corto donde el aumento de temperatura es más progresivo y permite una mayor adaptación progresiva del material.

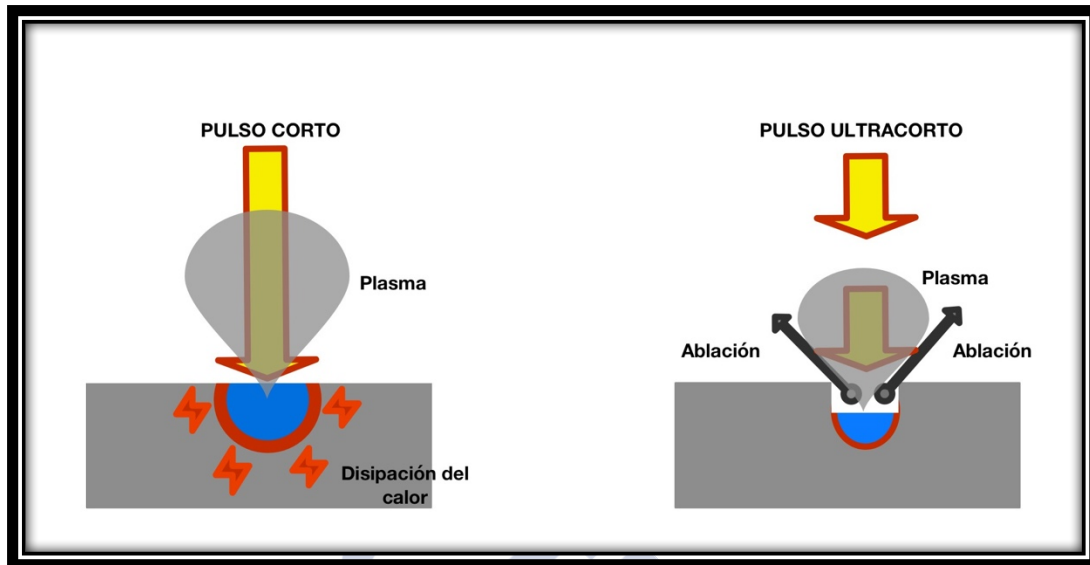


Figura 9: Diferencias en el proceso de ablación entre láser de pulso corto y ultracorto. La flecha amarilla con contorno rojo representa el haz de energía y su longitud la duración del impulso. Podemos ver la generación de diferentes tipos de plasma y ablación de superficie.

Podemos entonces decir que la ablación en superficie es el resultado de un proceso fotoquímico, fototérmico y fotomecánico. Podemos ver pues reacciones químicas (creación de nanoburbujas de gas metal y vaporización) como resultado de la actuación de los fotones de luz, aumento térmico (lo que genera estrés termoelástico) por el mismo proceso y cambios físicos que generan ablación mecánica (el material aumenta de tamaño por los cambios de temperatura, pero esta expansión es rápida y sin cambios en la periferia, lo que da lugar a la expulsión del material por aumento de presión y temperatura, aunque también podemos encontrar fenómenos de delaminación y fragmentación en la superficie).

### Formación de estructuras periódicas inducidas por láser en superficie

El resultado de aplicar un láser de pulsos ultracortos sobre una superficie va a generar una texturización de la misma siguiendo los principios que hemos explicado hasta el momento. Este resultado es la formación de una estructura periódica en la superficie o LIPSS. La creación de LIPSS se ha conseguido en

diferentes tipos de superficie como son los metales, los polímeros, semiconductores y vidrio entre otros. Esta texturización de la superficie va a tener unas características determinadas por la propia superficie, las propiedades del láser y la incidencia y configuración del mismo. De esta forma la textura creada presentará una rugosidad periódica, con un periodo determinado que en el caso de los metales será próximo a la longitud de onda del láser, y su orientación va a ser perpendicular a la dirección de polarización del láser. Esta superficie presentará también una rugosidad y profundidad dependiente de estas mismas propiedades (figura 10).

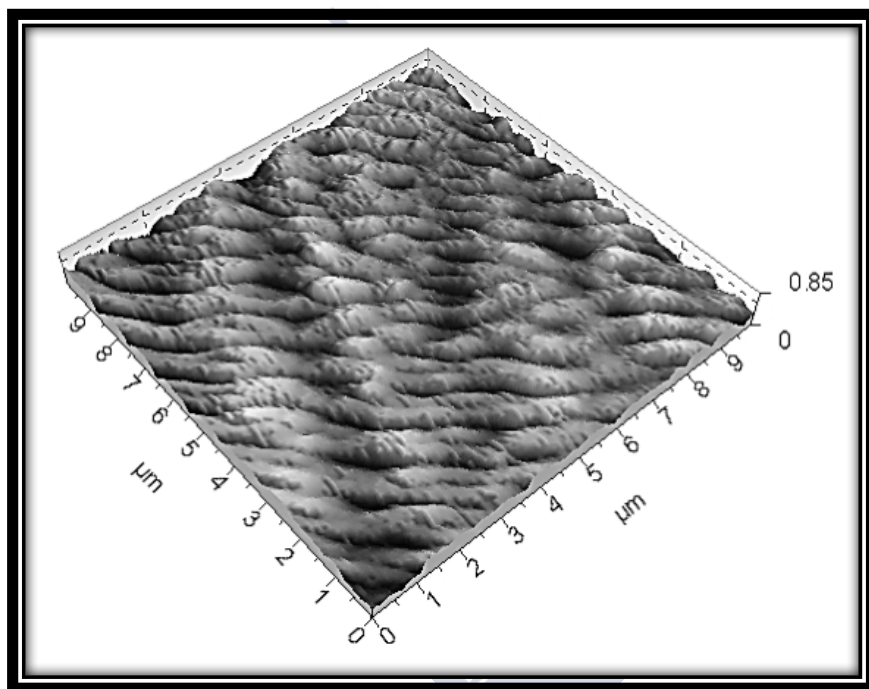


Figura 10: Topografía de LIPSS.

Pese a que se comprenden los fenómenos de interacción entre el láser y el metal, y se conocen bien los fenómenos de ablación en la superficie, todavía no se está seguro de cómo se generan las LIPSS con esa estructura tan característica que las diferencia del resto de superficies tratadas con láser. Para tratar de explicar este fenómeno surgen teorías como la excitación de plasmones de superficie, la auto-organización y la interferencia que explicamos a continuación.

## Excitación de plasmones de superficie

En la superficie de transición entre un metal y un dieléctrico (como el aire) aparecen electrones deslocalizados que son los plasmones de superficie. Estas quasipartículas se diferencian de las que se encuentran en la estructura del metal en que tienen una energía menor. Estos plasmones de superficie ante cualquier excitación (luz) crean siempre campos electromagnéticos en la superficie que es lo que llamamos polaritón. Este fenómeno da lugar a la creación de ondas que se propagan en la superficie sin pérdida óhmica como ocurriría en otro conductor (figura 11) aunque se atenúan por la dispersión/absorción de energía por el metal. La aparición de polaritones es muy dependiente de la superficie y su forma.

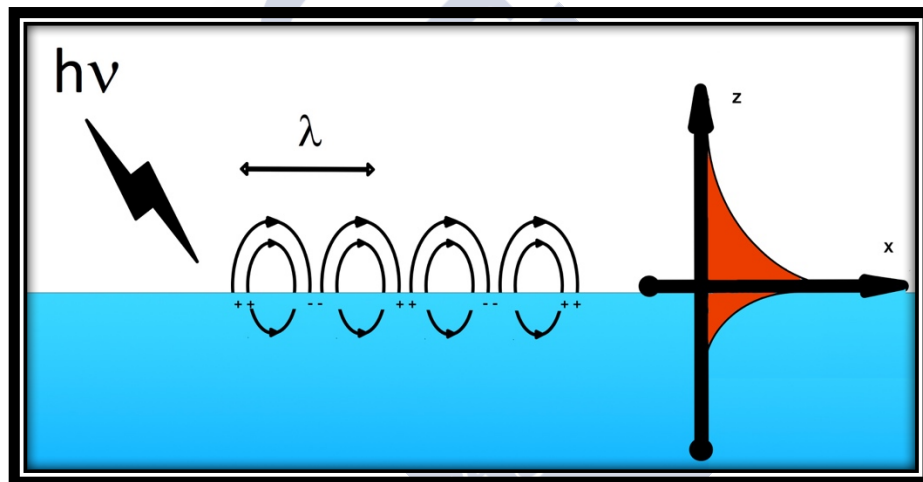


Figura 11: Onda generada por los polaritones.

Las oscilaciones creadas en los plasmones responsables de las ondas de propagación tienen una frecuencia que es dada por la siguiente ecuación:

$$\omega_p = \sqrt{\frac{n_e e^2}{m \epsilon_0}} \quad (1)$$

donde  $\omega_p$  es la frecuencia del plasma en Hertzios,  $n_e$  es la densidad de electrones libres ( $m^{-3}$ ),  $e$  es la carga de los electrones (C),  $m$  es la masa efectiva de los

electrones ( $Kg$ ) y  $\epsilon_0$  es la permeabilidad del espacio ( $F\ m^{-1}$ ). Para la mayoría de los metales el valor de  $\omega_p$  es alto en la frecuencia del ultravioleta o ultravioleta profundo.

Cuando la luz aplicada sobre la superficie entra en resonancia con la frecuencia de los plasmones de superficie se genera un aumento importante del campo eléctrico en el área de la estructura, ya que estas frecuencias de energía se absorben por acoplamiento entre las frecuencias de la onda incidente y la oscilación del polaritón. Ocurre también que las frecuencias no absorbidas de un determinado color son transmitidas. Esto nos permite por ejemplo controlar el color de la superficie de los metales (tabla 2).

Tabla 2: Relación entre la longitud de onda de los plasmones y los colores absorbidos y complementarios (reflejados).

Longitud de onda (nm)	Color Absorbido	Color Complementario
650-780	rojo	azul-verde
595-650	naranja	azul verdoso
560-595	amarillo-verde	púrpura
500-560	verde	rojo púrpura
490-500	verde azulado	rojo
480-490	azul verdoso	naranja
435-480	azul	amarillo
380-435	violeta	amarillo-verde

Se puede generar también lo que se conoce como salto de frecuencia en las superficies periódicas en los metales. Este salto se produce en la mitad de la longitud de onda de la superficie (figura 12). En un cristalino sólido con una superficie periódica encontramos dos posibles ondas de propagación creadas por plasmones de superficie, ambas con la misma longitud de onda, pero diferente frecuencia por la diferente carga en superficie. Una siempre tendrá más energía como se muestra en la figura 10. Aquellos plasmones que presenten una frecuencia entre  $w_+$  y  $w_-$  no serán capaces de propagarse porque se encontrarán en el salto de frecuencia, o banda de stop.

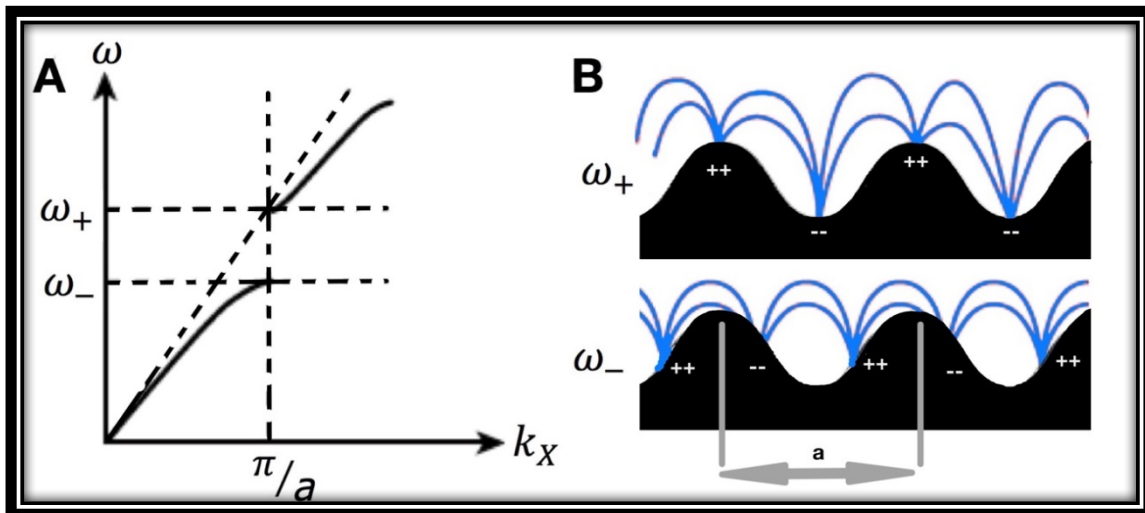


Figura 12: A) Salto de frecuencia y B) demostración de las dos posibles ondas creadas, con la misma longitud de onda, pero diferente frecuencia y energía.

### Auto-organización

La auto-organización es el resultado de la evolución desde un estado inestable creado por el proceso de ablación. Esta inestabilidad es el resultado de la competición entre la erosión por el haz y la difusión atómica en superficie. Este proceso es similar al que genera las dunas del desierto.

La aplicación del láser genera un defecto tras un proceso termodinámico que una vez generado tiende a alisarse por la tensión en superficie. Para entenderlo mejor, el láser inicialmente inestabiliza la superficie y genera una ablación en la misma que da lugar a la rugosidad, después la tensión superficial intentaría volver lisa la superficie por un proceso de difusión, y lo que consigue es suavizarla. La relajación de la superficie es más rápida que cualquier proceso termodinámico por lo que la auto-organización es posible.

### Interferencia

Los pequeños defectos de superficie hacen que cuando el haz del láser incida sobre la superficie éste se disperse con dirección tangencial, con lo que la onda se propaga por la superficie. Las LIPSS aparecen por la interferencia con múltiples defectos. Las interferencias generadas en múltiples puntos interfieren entre ellas dando lugar a repeticiones periódicas.

### Respuesta celular a estructuras periódicas modificadas por láser

Como hemos explicado previamente, cualquier modificación en la superficie del material va a tener como objetivo modificar la relación del compuesto con el medio en el que es introducido, y en el caso concreto de los materiales empleados en COT lo que buscamos es favorecer la osteointegración.

Los efectos celulares generados por las superficies periódicas creadas con láser pueden ser sumados a otros tratamientos empleados, como puede ser el aumento de la superficie en contacto mediante la creación de estrías en el material o dibujos en la escala milimétrica (figura 13).



Figura 13: Muestra la creación de LIPSS en la espira de un tornillo de titanio de cortical de 3,5 mm fabricado por Synthes.

El objetivo final pues de todas estas modificaciones será tener una superficie que optimice el BIC (bone to implant contact), es decir, el hueso en contacto y adherido al implante. El resultado de esta mejoría se va a traducir en una mayor osteointegración, una mayor fuerza de torque a la retirada del material y en una teórica mayor supervivencia del implante a largo plazo, que es lo que nos ayudará a disminuir el número de cirugías de revisión en nuestros pacientes.

Por estudios en superficies de titanio, sabemos que el tratamiento con láser mediante la generación de LIPSS va a mejorar el BIC en comparación con superficies lisas de forma estadísticamente significativa, como demostró *in vivo* Coathup et al (10). Esta modificación con láser favorecía de forma equiparable al tratamiento mecánico con arena la adherencia de los osteoblastos en relación con superficies lisas. A diferencia de lo que ocurre con los plasmas de HA, el tratamiento laser presenta la gran ventaja de que evitaba los defectos observados en la interfaz entre la capa adherida de HA y el titanio. A conclusiones semejantes llegó Shah et al (30), demostrando que el tratamiento con láser favorecía de forma semejante al tratamiento mecánico la osteointegración, pero destacaba que la adhesión de osteoblastos era de una forma más favorable, lo que podía ser la causa de una fuerza mayor de torque a la retirada de los implantes tratados con láser.

Son múltiples los estudios *in vitro* que nos muestran la mayor diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos, en LIPSS. Las células mesenquimales al encontrarse sobre LIPSS se diferencian con mayor facilidad a osteoblastos que sobre superficies pulidas, y la adherencia es superior (11, 24, 31, 32).

Pero lo que marca una clara diferencia de las LIPSS en relación a otros tratamientos de texturización de superficie en biomateriales, y que puede ser el condicionante de su superioridad frente a los demás es la forma en la que las células se adhieren a ellas. Cuando una superficie lisa o tratada mecánicamente (por ejemplo con arena), entra en contacto con osteoblastos o células mesenquimales que se diferenciarán a osteoblastos, éstas generan una matriz extracelular de colágeno que se adhiere mediante un patrón isotrópico, lo que hace que la célula no pueda orientarse y tenga un aspecto redondeado sin polarizarse (32), en cambio cuando entran en contacto con una superficie periódica creada por láser, estas células se polarizan, y ya que la matriz extracelular que generan se organiza mediante una distribución anisotrópica como la que muestra en el hueso nativo. En vez de adquirir una forma circular, las células se orientan con un eje mayor más largo o con forma triangular en función del tipo de láser empleado. Esto da lugar a la polarización de estas células como demuestra Matsugaki y colaboradores (figura 14) (24, 32).

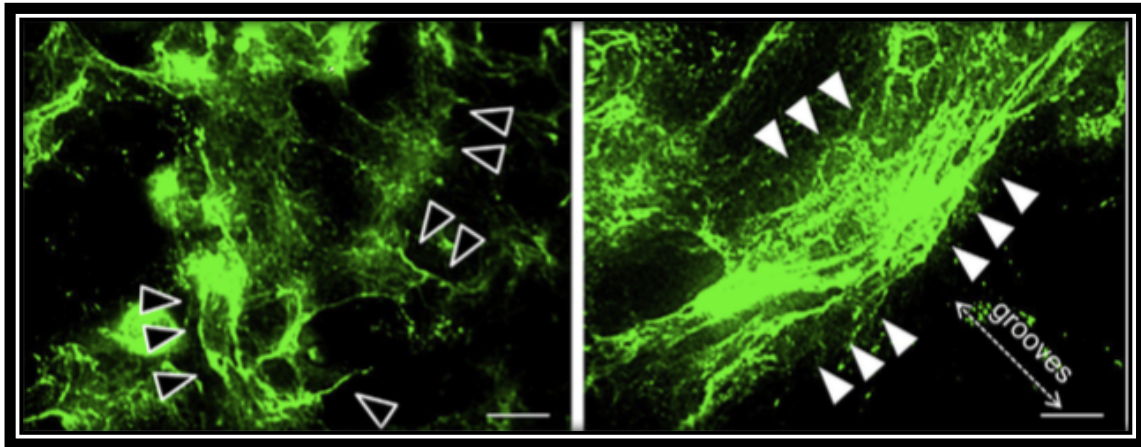


Figura 14: Imagen obtenida de Matsugaki y colaboradores en la que muestra a la izquierda la isotropía con una organización de la matriz extracelular de colágeno en la superficie lisa y la anisotropía sobre LIPSS (Copyright Elsevier, permiso de reproducción número 4102090725043).

El tratamiento con el láser va a generar una estructura periódica (semejante a surcos) con unos parámetros de profundidad, y un periodo en el espectro nanométrico. Es importante que estos valores obtenidos sean los adecuados, ya que cuando la profundidad de las ondas generadas no alcanza los la profundidad de 20 nm (33), o una anchura de al menos 75 nm (34), no es distinguido por las proteínas del medio y su adherencia se produce de la misma forma que en una superficie lisa ya que no alcanzamos la distancia entre los clústeres de integrinas que favorecen la adhesión, y la célula no distingue la existencia de una gap (34). Si estas estructuras por otro lado exceden un tamaño determinado, abandonamos el patrón nanométrico para ver cambios en espectro micrométrico. Cuando esto sucede se pierde el incremento de diferenciación osteoblástica que genera el patrón nanométrico, lo que va a afectar a la osteointegración (35).

Sabemos por trabajos realizados sobre aleaciones de platino y acero inoxidable que las LIPSS generadas con láser de femtosegundos de duración con una longitud de onda de 1.030 nm y 515 nm no sólo van a afectar a la función osteoblástica, sino que el resto de líneas celulares también van a modificar su actitud. Los monocitos por ejemplo presentan una gran afinidad por superficies lisas mientras que limitan su adherencia en las superficies texturizadas. En cambio los fibroblastos no se adhieren a superficies lisas y frente a las LIPSS vemos que forma una monocapa (36).

## Justificación y objetivos

Los aflojamientos en cirugía ortopédica y traumatología son una de las principales causas de fracaso en cirugía electiva protésica (37-39), así como en la implantología dental (40). Los implantes disponibles a día de hoy presentan tratamientos de superficie que no consiguen tasas de osteointegración óptimas y durabilidad a largo plazo. Los tratamientos de superficie laser estándar usados hasta la fecha no consiguen igualar los resultados de osteointegración en términos de BIC (contacto hueso implante), conseguidos por los tratamientos mediante plasma de hidroxiapatita. Si hablamos de resultados a largo plazo, los plasmas de hidroxiapatita que tan buen comportamiento presentan en fases iniciales, parecen fracasar por desprendimiento del mismo.

Con nuestro estudio buscamos evitar las limitaciones de los tratamientos de superficie actuales, con el fin de demostrar que la generación de LIPSS favorece la osteointegración en diferentes materiales sin tener que aplicar un tratamiento de cobertura como el plasma de hidroxiapatita. Esperamos conseguir un buen índice de osteointegración inicial, sin esperar complicaciones a largo plazo (por no existir interfaz entre materiales).

La generación de LIPSS es un procedimiento industrializado que puede ser fácilmente trasladable a la industria biomédica para tratar la superficie de implantes.

Nosotros hemos diseñado un experimento *in vitro* con los siguientes objetivos:

1. Demostrar que la generación de LIPSS es viable en materiales diferentes al titanio o acero, utilizables en COT como son los cermets y el tantalio.
2. Realizar un estudio físico exhaustivo de las superficies creadas en los diferentes materiales.
3. Comparar la diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos sobre los diferentes biomateriales donde hemos creado LIPSS
4. Demostrar la superioridad de los LIPPSS frente a las superficies pulidas en términos de diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos.
5. Estudiar los cambios generados por fenómenos de transformación en los cermets al intentar crear LIPSS sobre su superficie.

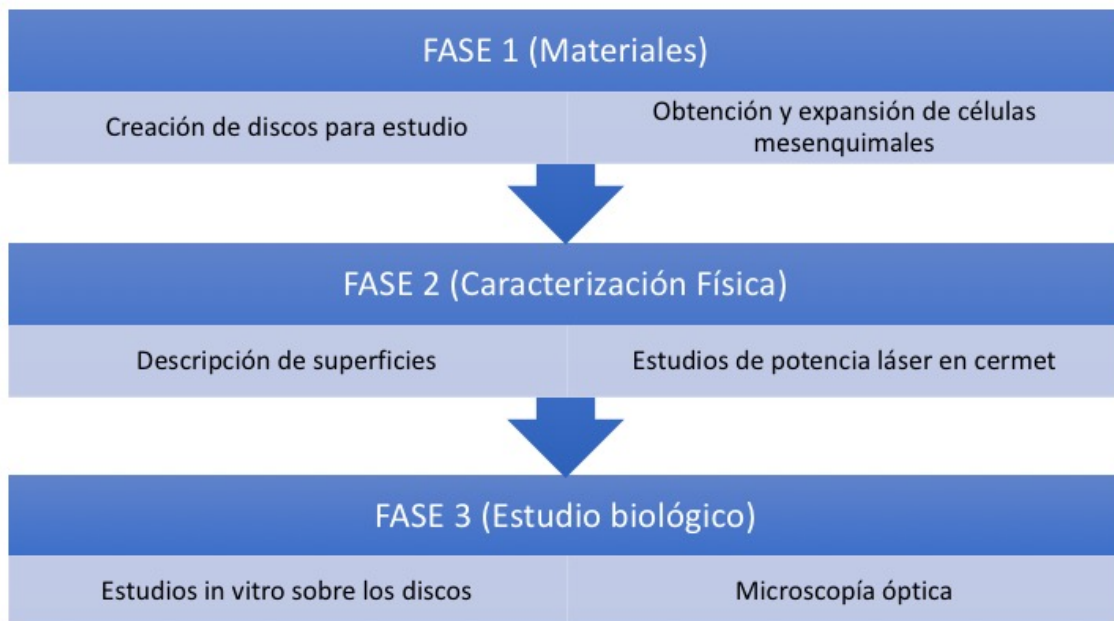


## Material y métodos

En el diseño de nuestro proyecto de investigación diferenciamos tres fases. En la primera de ellas, describimos los materiales empleados y cómo tratamos los mismos (esquema 1). Para ello se describen los discos empleados, se explica el tratamiento láser que van a recibir, y se aclara cómo van a ser preparados para su uso.

En la segunda fase procedemos a realizar una caracterización física de los discos creados (esquema 1), y en especial, estudiamos el comportamiento de la superficie de los cermetes ante diferentes intensidades de láser para crear LIPSS en ellos.

En la tercera fase realizamos el estudio biológico, explicamos cómo se ha realizado la obtención de células mesenquimales humanas, cómo se expanden y cómo se preparan para ser cultivadas sobre los discos, para sobre éstos cultivar las células mesenquimales, y observar su respuesta biológica con diferentes ensayos que se describen más adelante de forma detallada.



Esquema 1: Muestra el desarrollo esquemático del trabajo de investigación en sus tres fases.

## Materiales

Para el trabajo generamos 154 discos. Utilizamos cuatro grupos de 36 discos (144 en total) para los ensayos biológicos, uno para cada punto de control temporal: 12 de titanio (Ti), 12 de tantalio (Ta) y 12 de un cermet de zirconia/niobio. Las dimensiones de los discos empleados son 6,75 mm (+/- 0,02 mm) de diámetro, 1,5 mm (+/- 0,02mm) de grosor. Estos discos se emplearon para los ensayos biológicos y para los de microscopía. Para la caracterización física generamos 2 discos de cada material (uno tratado y otro sin tratar). A mayores, generamos 4 discos extras del cermet (figura 15), para la caracterización física mediante ángulo de contacto y SEM tratados a diferentes potencias (esquema 2).

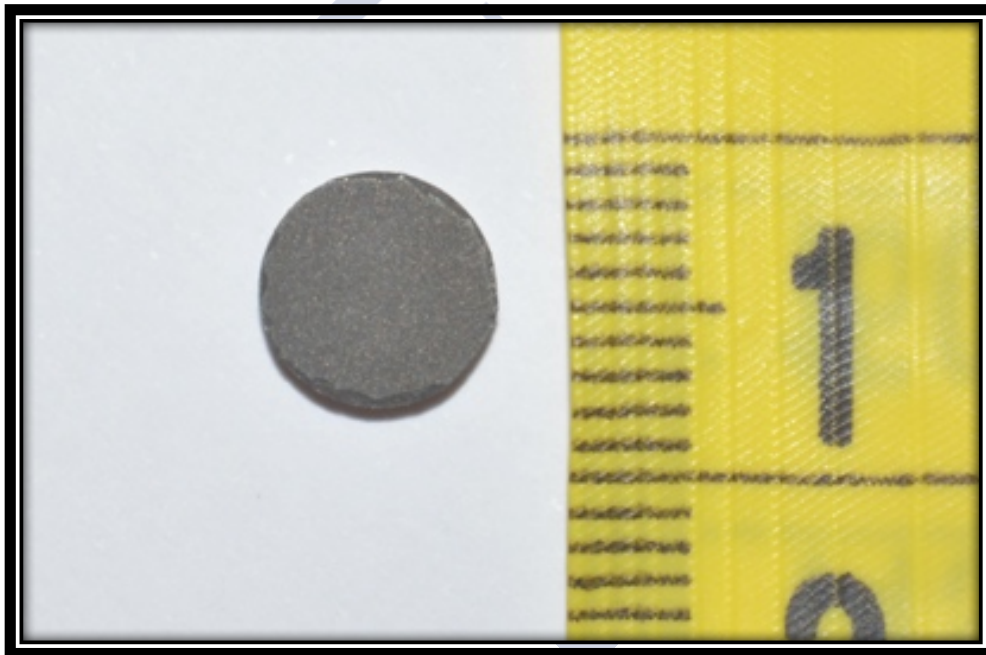
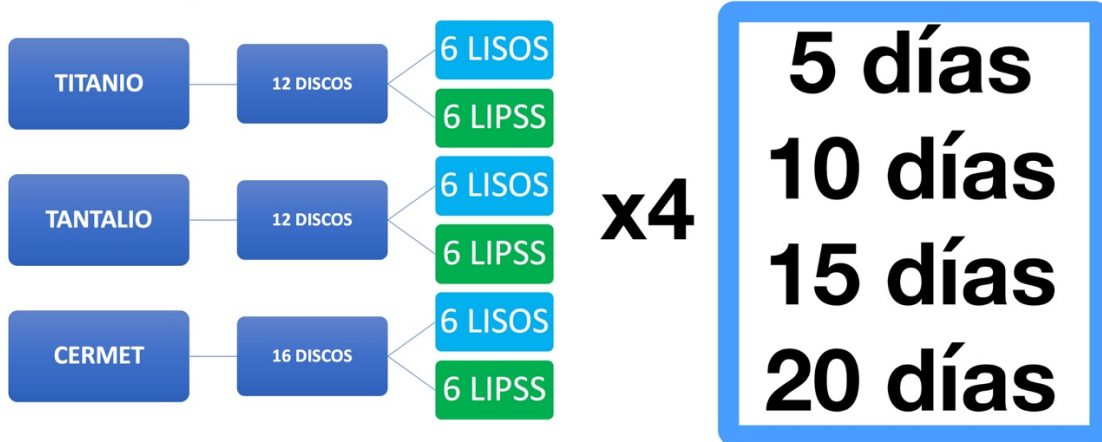
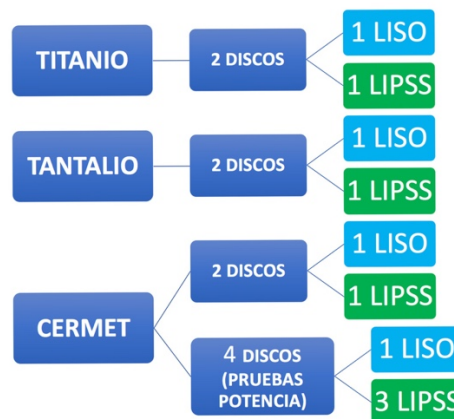


Figura 15: Imagen que muestra un disco de cermet previo al tratamiento con LIPSS.

## Estudio biológico



## Caracterización



Esquema 2: Muestra el diseño del estudio, con el reparto de los discos en función de su tratamiento.

El titanio empleado es titanio categorizado como tipo V de la ASM. El tantalio empleado es puro. Los cermets de óxido de zirconia/niobio son generados por un proceso estandarizado ya empleado con anterioridad y descrito por J. F. Bartolomé y colaboradores (19, 41).

Una vez obtenidos todos los discos procedimos al tratamiento mecánico de las superficies con el fin de pulir las mismas para poder aplicar de forma ulterior el resto de procedimientos (Logitech PM2A polisher, Romanel-sur-Morges, Switzerland). De los 12 discos de cada grupo, mantuvimos 6 inalterados como control (disco de superficie pulida). En los otros 6 aplicamos un tratamiento láser,

que explicaremos más adelante en detalle, para modelar la superficie dándole rugosidad a los mismos.

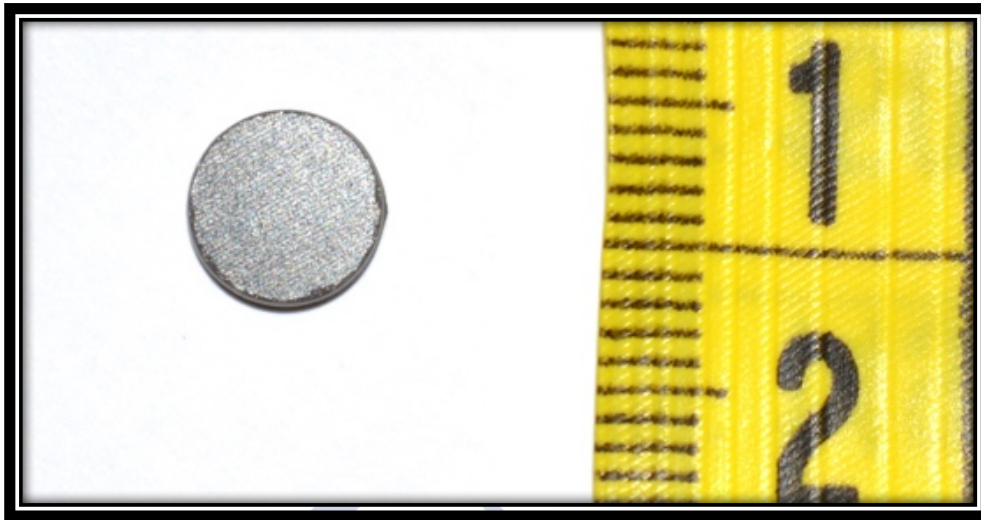


Figura 16: Disco de cermet una vez tratado creadas las LIPSS. Nótese el cambio en la respuesta a la luz de la superficie.

Los materiales empleados son limpiados con un baño de ultrasonidos y posteriormente esterilizados en autoclave (Selecta Autotester) a 121°C durante 30 minutos.

A partir de este momento trabajamos siempre en una cámara de flujo laminar vertical en condiciones de esterilidad.

### Equipo Láser

#### Estación de trabajo

Los experimentos de ablación láser realizados se llevaron a cabo usando un láser de cristales de tungstato de potasio dopado con iterbio (Yb:KYW) amplificador regenerativo de pulsos (Amplitude Systems S-pulse HP) que genera pulsos de una duración aproximada de 500 fs. El haz generado por el láser se aproxima a una distribución Gaussiana con un valor para  $M^2$  (ratio de propagación del haz del láser) menor de 1,2. Las especificaciones del láser se simplifican en la tabla 3:

Tabla 3: Especificaciones del láser empleado para la generación de LIPSS.

Amplitude systems s-pulse HP (fs)	
Fuente láser	Yterbio
Longitud de onda	1.030 nm
Duración de pulso	500 fs
Energía por pulso	1 mJ
Tasa de repetición	1 pulso - 300 kHz
M <sup>2</sup>	<1.2

El láser para generación de pulsos de femtosegundos de duración está constituido por la cabeza del láser, la caja interfaz, una toma de corriente, lentes, un sistema de coordenadas XYZ y un galvanómetro, tal como se simplifica en la figura 17.

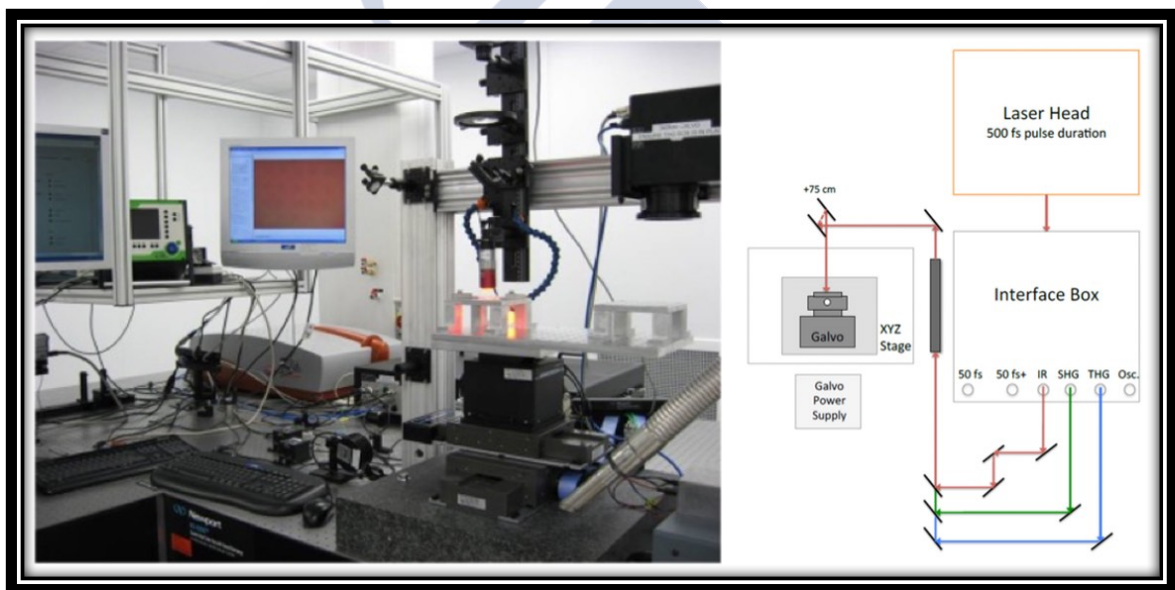


Figura 17: A la izquierda imagen de un láser empleado, a la derecha esquema de montaje.

Estos parámetros son los empleados en todas las superficies en las que se realizó el estudio biológico. A mayores realizamos un experimento sobre el cermet con el fin de caracterizar los cambios físicos que aparecen en las cerámicas tratadas con láser a diferentes potencias. Para ello empleamos los otros 4 discos de cermet restante, y con el mismo tratamiento láser, pero a diferentes potencias (control no tratado, 0,05 W, a 0,1

W y a 0,2 W) producimos cambios en la superficie. La fluencia láser utilizada en cada caso se calculó por medio de la siguiente ecuación:

$$F = \frac{2E}{\pi\omega_0^2} \quad (2)$$

donde E es la energía por pulso y  $\omega_0$  representa el radio de la huella del láser sobre el material.

Los cálculos para determinar la fluencia umbral aplicada ( $\phi_{th}$ )  $\omega_0$  se obtienen de acuerdo con el método de Liu y colaboradores (42, 43). La fluencia espacial ( $\phi_r$ ) para un haz gaussiano viene dada por la ecuación 3:

$$\phi(r) = \phi_0 e^{-2r^2/\omega_0^2} \quad (3)$$

donde  $\phi_0$  es la fluencia de pico en el haz, r es la distancia desde el centro del haz y  $\omega_0$  es el radio del haz gaussiano ( $1/e^2$ ). La fluencia máxima y la energía del pulso,  $E_p$ , están relacionadas por (ecuación 4):

$$\phi_0 = \frac{2E_p}{\pi\omega_0^2} \quad (4)$$

la fluencia pico está relacionada con el diámetro del área ablacionada (ecuación 5):

$$D^2 = 2\omega_0^2 \ln\left(\frac{\phi_0}{\phi_{th}}\right) \quad (5)$$

donde  $D^2$  es el diámetro máximo de la zona ablacionada. Es posible determinar el radio del haz usando el valor para  $\omega_0$  obtenido de representar  $D^2$  frente al logaritmo de la energía del pulso. Una vez que se calcula  $\omega_0$ , los valores de fluencia se pueden encontrar usando la ecuación 5. Al representar  $D^2$  en función del logaritmo natural de la fluencia láser aplicada y extrapolar la línea  $D^2$  a cero, se

puede calcular  $\phi_{th}$  (37,38). Los diámetros representativos de las áreas ablacionadas se midieron usando un microscopio óptico cinco veces para determinar un valor medio.

#### Dispositivo galvanométrico

Empleamos un dispositivo con espejos galvanométricos para centrar el haz del láser sobre un punto. El sistema consta de una cámara adaptada con un anclaje específico, un galvanómetro y lentes como se muestra en la figura 18. El haz del láser entra en el sistema y accede al primer punto donde se encuentra la cámara que en su adaptador tiene un sistema de lentes y obturadores que permiten el enfoque. La cámara (Infinity 2-1C, Lumenera®) está alojada sobre el objetivo y permite visualizar el haz que viaja en dirección al galvanómetro (hurrySCAN® II 14, Scanlab®) posicionada en un sistema de carriles que permiten su movilización en los tres planos del espacio (Aerotech Inc.). El galvanómetro no es más que un conjunto de dos espejos que permiten orientar el haz del láser en los planos X e Y (cada espejo controla un plano) del espacio, esto lo consiguen ya que son espejos de ultrarrápido posicionamiento ante mínimas corrientes eléctricas (lo que da agilidad al sistema) y tienen en su superficie un tratamiento específico para reflejar completamente el haz que incide sobre ellos con una longitud de onda concreta (o rango de longitudes de onda). A la salida del galvanómetro nos encontramos con una lente telecéntrica (F-Theta Ronar, Qioptiq®), con una longitud focal de 100mm, que permite el enfoque y la colimación del láser. Todo el procedimiento está autorregulado y controlado por un software específico (WinLase® Laser Marking Software Suite) a través de una controladora.

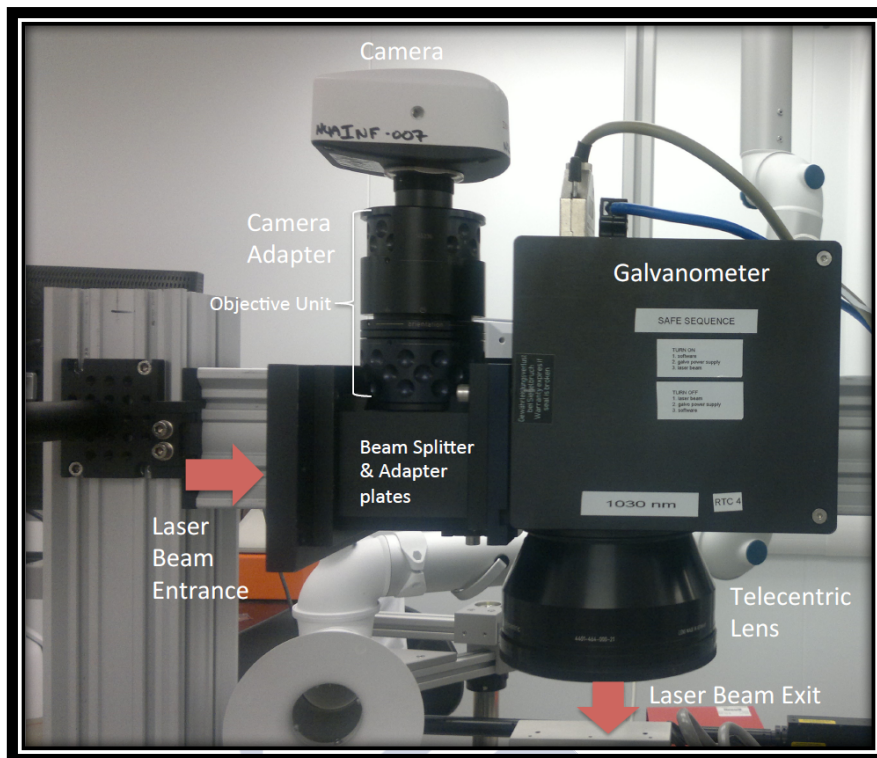


Figura 18: Fotografía donde se identifican los componentes del sistema galvanométrico y la óptica del láser.

### Caracterización Física

Ahora describimos los dispositivos empleados para la caracterización física de las nuevas superficies.

#### Microscopio electrónico de barrido

Un microscopio electrónico de barrido (Scanning Electron Microscope, SEM) permite tomar imágenes de una muestra mediante un escaneo con un haz de electrones de alta energía, que permite captar estructuras con una resolución de 3 Angstroms. El haz de electrones interactúa con los átomos de la muestra, produciendo señales que contienen información acerca de su composición química, la topografía de la superficie y otras propiedades como la conductividad eléctrica. Esta información generada por los electrones se puede procesar para generar una imagen de la superficie estudiada.

El problema que presenta el estudio con SEM es que las muestras tienen que ser sombreadas con oro, oro-paladio, iridio o carbono (Sputtering), lo que impide su utilización posterior con otro fin. Las muestras además deben ser sólidas para su procesamiento.

La determinación de la composición química de una muestra por medio de un SEM, se basa en la técnica analítica de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX). Se trata de una forma de microscopía de fluorescencia de rayos X, que se basa en las interacciones entre la radiación electromagnética y la materia. Sus capacidades de caracterización se deben al principio fundamental de que cada elemento tiene una estructura atómica única, por lo que los rayos X emitidos son característicos del elemento en concreto; permitiendo identificar de forma única un elemento de otro.

Empleamos un microscopio Zeiss FESSEM-ULTRA Plus (figura 19) para tomar imágenes de las microestructuras fabricadas, permitiendo realizar un análisis de las características morfológicas de las mismas.

La tabla 4 muestra las especificaciones del equipo SEM Zeiss FESEM-ULTRA Plus empleado en nuestro estudio.



Figura 19: Fotografía del equipo Zeiss FESSEM-ULTRA Plus.

Tabla 4: Especificaciones del microscopio electrónico de barrido Zeiss FESEM ULTRA Plus

Especificaciones	
Resolución	0,8 nm a 30 kV (modo STEM) 0,8 nm a 15 kV 1,6 nm a 1 kV
Aumento	2-1.000.000x (modo SE) 10-1.000.000x (detector ESB)
Voltaje de aceleración	2,02 kV – 30 kV
Sonda de corriente	Configuración 1: 4 pA – 20 nA Configuración 2: 12 pA- 100 nA
Detectores	-Detector EsB® con rejilla de filtrado (0-1500 V) -Detector SE in-lens de alta eficiencia -Detector de cámara Everhart-Thornley -Detector integrado AsB®
Cámara	Dimensiones: 330 mm (Ø) x 270 mm (h) 3 puertos EDS 35° TOA Cámara CCD con iluminación IR
Sistema de vacío	Sistema de bombeado en seco completo, compuesto por una bomba auxiliar Bomba turbomolecular y bomba iónica, controladas automáticamente Modo silencioso para apagar la bomba auxiliar
Platina	5 ejes motorizados Eucentric, controlados mediante el software SmartSEM® Movimiento: X/Y=130 mm Z=50 mm T= -3 a 70° R=360° continuo
Procesado de imagen	Resolución hasta 3.072x2.304 pixel

## Microscopio de fuerza atómica

El microscopio de fuerza atómica es un dispositivo que emplea principios mecánicos y ópticos para estudiar superficies detectando diferencias en el rango nanométrico. De forma esquemática (figura 20) podemos decir que el sistema se basa en una punta de unas micras de longitud y unos 100 Angstrom de diámetro, que sondea la superficie (este sondaje se puede hacer por contacto o sin contacto). Este dispositivo está conectada a una palanca de unas 100-200 micras que conectan el sistema a un mecanismo piezoeléctrico. El montaje va registrando los cambios en superficie con múltiples pasadas y genera una imagen tridimensional.

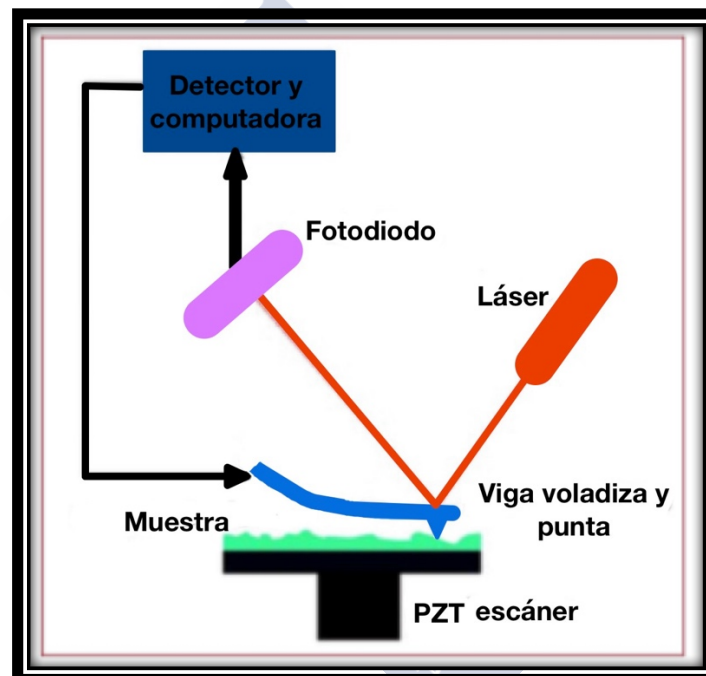


Figura 20: Muestra el esquema de funcionamiento de un microscopio de fuerza atómica.

El modelo empleado en nuestro estudio es el Agilent 5500 AFM (figura 21). El escaneo realizado emplea un sensor por contacto (Nanosensors TM PPP-CONTR-10, resonance frequency 6-21 kHz, tip height 10-15  $\mu\text{m}$ , force constant 0,02-0,77 N/m). Realizamos el estudio por áreas de 10 micras cuadradas a una velocidad de 0.5 líneas/s con una resolución de 1.024. La rugosidad se calculó con el software Pocolmage Advanced (Agilent Technologies), y el periodo y profundidad de las LIPSS se estableció con el software Gwyddion®.

La tabla 5 resume las especificaciones del modelo empleado.

Tabla 5: Muestras las especificaciones del microscopio de fuerza atómica Agilent 5500 AFM.

Especificaciones	
Estudio de grandes superficies	
Rango del escaneo	90 $\mu$ m in XY, 8-12 $\mu$ m in Z
Ruido	<5Å in XY, <0,5Å in Z
Estudio de pequeñas superficies	
Rango del escaneo	8 $\mu$ m in XY, 2 $\mu$ m in Z
Ruido	<0,2Å in Z



Figura 21: Muestra el microscopio de fuerza atómica Agilent 5500 AFM.

### Microscopio óptico

El microscopio óptico empleado fue un microscopio óptico Nikon MM-400 (figura 22). El mismo se empleó de forma reiterada durante las fases de cultivo y expansión de las células mesenquimales, para confirmar su correcto crecimiento. Debido a las características de los discos empleados en el estudio (no permiten el paso de luz), este microscopio no permite ver las células adheridas a los mismos.

En la tabla 6 se presentan las especificaciones del microscopio óptico Nikon MM-400.



Figura 22: Muestra la fotografía del microscopio óptico Nikon MM-400.

Tabla 6: Especificaciones del microscopio óptico Nikon MM-400.

Especificaciones		
Movimiento eje Z		Manual (doble cara burdo/rueda enfoque fino)
Cabezal óptico		Tubo binocular Y-TB, tubo trinocular LV-TI3, inclinación del tubo ocular trinocular LV-TT2
Escala lineal en eje Z		Incorporada
Ocular		CFI10x (campo nº 22), CFI10x CM (campo nº 22)
Objetivo		CFI60 LU Plan Fluor EPI series CFI60 LU Plan Fluor BD series CFI60 LPLAN EPI CR series
Escala		6x4, 4x4, 03L, 2x2
Fuente de luz	Diascópica	Iluminador LED diascópico (estándar), 12V-500W
	Episcópica	Iluminador LED blanco LV-EPI LED Iluminador EPI LV-U EPI2A universal motorizado, Iluminador LV-U EPI FA universal con ayuda de enfoque
Máxima altura de la muestra		150 mm

## Microscopio confocal

La microscopia confocal es una técnica óptica de imagen que permite incrementar la resolución y el contraste, además de reconstruir imágenes tridimensionales. Tiene la ventaja frente a la microscopía fotónica clásica de que no depende del grosor de la muestra para obtener una buena imagen, ya que nos permite mediante un “pinhole” o colimador eliminar la luz desenfocada que aparece en los especímenes gruesos que generaría la microscopía clásica con un único plano focal (figura 23). La luz proveniente de las regiones localizadas por encima o por debajo del plano focal que no converge en el “pinhole”, no es detectada por el fotomultiplicador. Con el uso de técnicas de fluorescencia podemos ver los osteoblastos adheridos a la superficie del material pese a estar en planos diferentes.

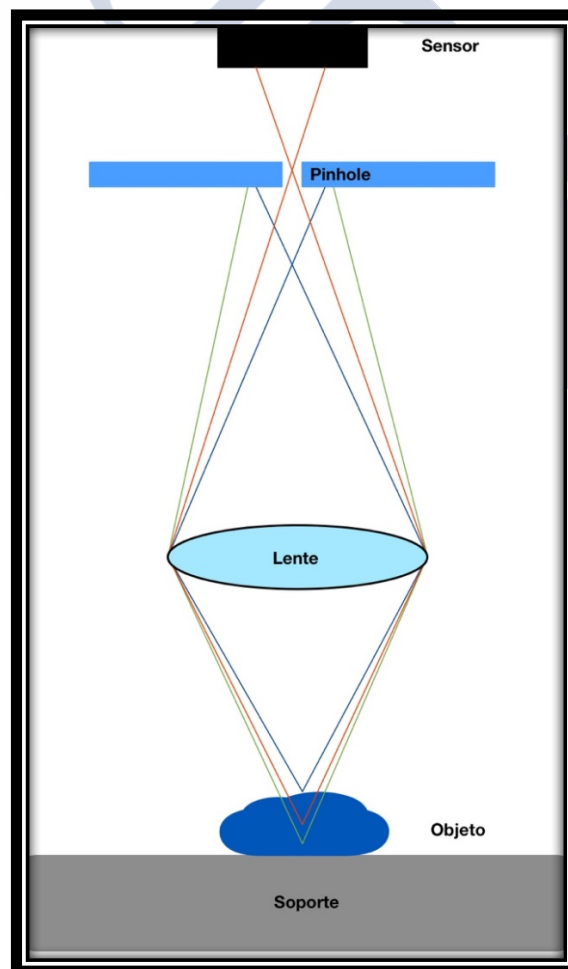


Figura 23: Esquema de funcionamiento de un microscopio confocal. El haz rojo converge en el pinhole, los haces azul y verde al estar en planos focales diferentes no convergen en el pinhole y no llegan al sensor.

En este trabajo se ha empleado un microscopio confocal SENSO FAR 2300 Pl $\mu$ 8 (figura 24) para el estudio tridimensional óptico de la superficie. Este instrumento es un perfilómetro óptico de no-contacto que usa un sensor de doble tecnología.

La tabla 7 muestra las especificaciones de este microscopio confocal, en función del objetivo seleccionado.

Para el estudio celular empleamos un microscopio confocal diferente que se describe más adelante.



Figura 24: Fotografía del microscopio confocal SENSO FAR 2300 Pl $\mu$ s.

Tabla 7: Especificaciones del microscopio confocal SENSO FAR 2300.

Objetivos	5XEPI	10XEPI	20XEPI	50XEPI	100XEPI
Distancia de trabajo [mm]	23,5	17,3	4,5	1,0	1,0
Apertura numérica	0,15	0,3	0,45	0,8	0,9
Campo de visión [ $\mu$ m]	2546x1909	1273x955	637x437	253x190	123x92
Muestreo espacial [ $\mu$ m]	3,32	1,66	0,83	0,33	0,17
Máxima inclinación	8,5°	14°	21°	42°	51°
Repetibilidad RMS [nm]	<100	<50	<20	<4	<3
Tiempo de adquisición:					
Imagen confocal [s]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Topografía [ $\mu$ m/s]	8-512	4-256	2-128	0,4-25,6	0,4-25,6

## Ángulo de contacto

Para estudiar la hidrofobicidad de la nueva superficie creada empleamos un medidor del ángulo de contacto o ángulo de humectancia. El dispositivo está formado por una superficie de apoyo donde se deposita la estructura a estudiar. Sobre ella se deposita una gota de una sustancia líquida, como el agua, que es la que empleamos en nuestro estudio. Enfocando el comportamiento de esta gota sobre la superficie hay una cámara que captura la imagen de la superficie con la gota encima. La gota forma con la superficie un ángulo de contacto (figura 25) que se cuantifica con la ayuda del software del propio dispositivo.

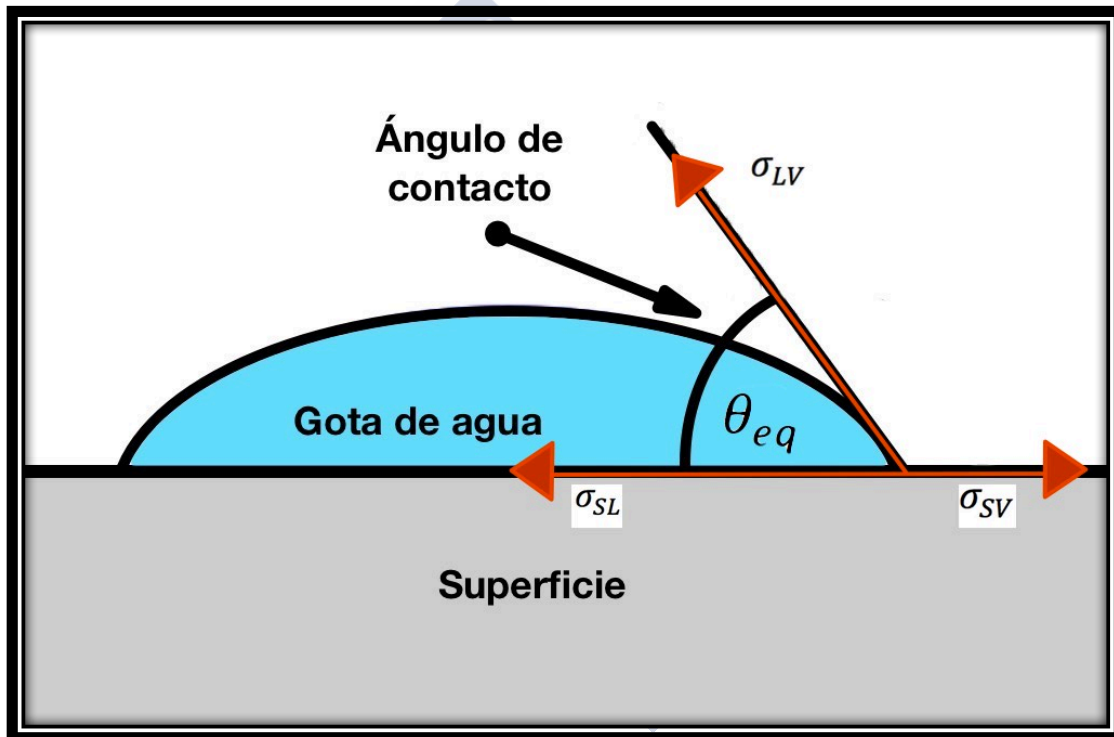


Figura 25 Muestra el cálculo del ángulo de contacto, así como los vectores de las fuerzas de interfase responsables del mismo.

En nuestro caso empleamos un KSV Instruments CAM200 como el que podemos ver más abajo (figura 26). Con este dispositivo podemos obtener imágenes de 512x480 correspondientes a un área de 5,7 x 5,4 mm<sup>2</sup>, en intervalos de 10 a 1000 ms. Las especificaciones completas las vemos en la tabla 8.

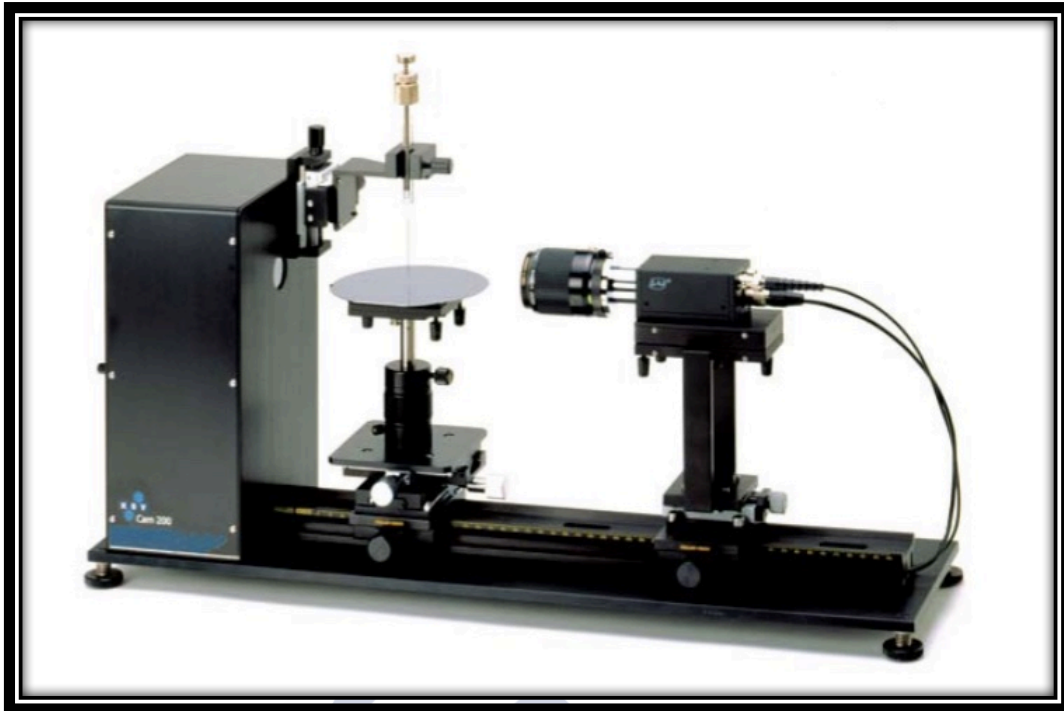


Figura 26: Muestra el dispositivo CAM 200 empleado.

Tabla 8: Muestra las especificaciones del CAM 200 empleado

CAM 200 (KSV NIMA)		
Sensor CCD	512x480	
Ángulo de contacto	5°-180°	Error 0,1°
Tensión superficial	0,001-999mN/m	Error 0,01mN/m
Intervalos de tiempo	10-1.000ms	

El dispositivo nos permite obtener y comparar imágenes obtenidas en diferentes materiales o superficies. Empleamos este dispositivo para valorar las diferencias generadas en el cermet de zirconia/niobio a diferentes potencias láser. El objetivo es ver cómo la modificación de la cerámica con tratamientos láser de alta potencia puede llegar a desestructurar la parte cerámica del mismo, y cómo esto afecta a la hidrofobicidad de la superficie.

Para poder estudiar con fidelidad este ángulo de humectancia sobre la superficie tiene que darse una situación de equilibrio (no pueden existir reacciones entre la superficie, el líquido que empleamos y el ambiente). Empleamos la ecuación de Young (ecuación 6) para el equilibrio en medios no reactivos.

$$\cos \theta_{eq} = (\sigma_{SV} - \sigma_{SL}) / \sigma_{LV} \quad (6)$$

En la ecuación  $\sigma_{SV}$ ,  $\sigma_{SL}$  y  $\sigma_{LV}$  representan las tensiones de interfase entre sólido-gas, sólido líquido y líquido-gas respectivamente (el resultado del ángulo de contacto va a ser dependiente tanto del material que queremos estudiar, como del líquido empleado para su cálculo y del gas circundante que es el resultado del ambiente y una discreta evaporación del líquido empleado, como se ve en la figura 24. Como emplearemos el mismo líquido para todos los test, no veremos cambios entre las pruebas, en la interfase líquido-gas, y todos los cambios obtenidos serán dependientes de los cambios en el sólido (ya que el ambiente gaseoso y el líquido son los mismos).

#### Estudio in vitro de respuesta celular

A partir de este punto resumimos la obtención de células mesenquimales, la expansión de las mismas y su cultivo sobre las nuevas superficies. Asimismo, detallamos el instrumental empleado para la visión directa del crecimiento celular sobre las superficies.

#### Obtención de células mesenquimales

Obtuvimos células mesenquimales de médula ósea de cresta ilíaca de pacientes del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología, ingresados para cirugía electiva, siempre menores de 65 años previo consentimiento informado y aceptación por parte de éstos. Se aplicaron protocolos validados por el comité de ética y se cumplió la anonimización de los datos cumpliendo con las normativas de protección de datos.

Las células se obtuvieron todas por el mismo mecanismo. Tras preparar el campo estéril y en condiciones de asepsia procedimos a realizar una punción con trocar de biopsia. Conectamos al trocar una jeringa de 50 cc precargada con 10 cc de una combinación de suero fisiológico y heparina sódica al 50% con el fin de evitar trombos, hemólisis y optimizar la extracción celular. Introducimos de 3-5 cc de la

mezcla en la cresta y tras esperar 5 segundos comenzamos con la aspiración del contenido medular. Esta técnica permite crear un sistema manual de baja presión, para evitar la hemólisis celular durante la extracción que hemos experimentado con otras técnicas empleadas con anterioridad en otros proyectos. Tras la extracción el contenido se almacenó en tubos con citrato y se procedió a su inmediato transporte al laboratorio.

En el laboratorio aplicamos un protocolo de gradiente de Ficol-Histopaque (Sigma Aldrich) para aislar las células mesenquimales de las muestras como el descrito por Yeo y colaboradores (13). El método consiste en verter la médula ósea lentamente en un tubo de 15 mL Falcon, donde tenemos preparado de Ficol para obtener una relación 1:1. De forma rauda procedemos a aplicar un centrifugado de las muestras a 200 rpm durante 30 minutos. Este proceso crea un gradiente en el que los glóbulos rojos se precipitan en el fondo del tubo, la grasa se queda en las capas más superficiales y aparece una interfase en la zona media donde encontramos las células mesenquimales. El aspirado es pipeteado en un tubo nuevo, en el mismo es lavado con D-MEM y centrifugado a 1.500 rpm durante 3 minutos formándose un pellet rico en células mesenquimales.

Las células son ahora liberadas en medio (D-MEM, 20% suero bovino fetal y gentamicina) y se cultivan 2 semanas a 37 °C con una concentración de CO<sub>2</sub> del 5% hasta alcanzar una confluencia del 90% (figura 27).

Una vez alcanzada la confluencia deseada se procede a tripsinizar las células para poder ser empleadas para cultivo sobre los nuevos materiales. Para conocer la densidad celular empleamos un hemocitómetro (cámara de Neubauer).

Una vez finalizado el proceso obtenemos una densidad celular de 25.000 células por cm<sup>2</sup>.

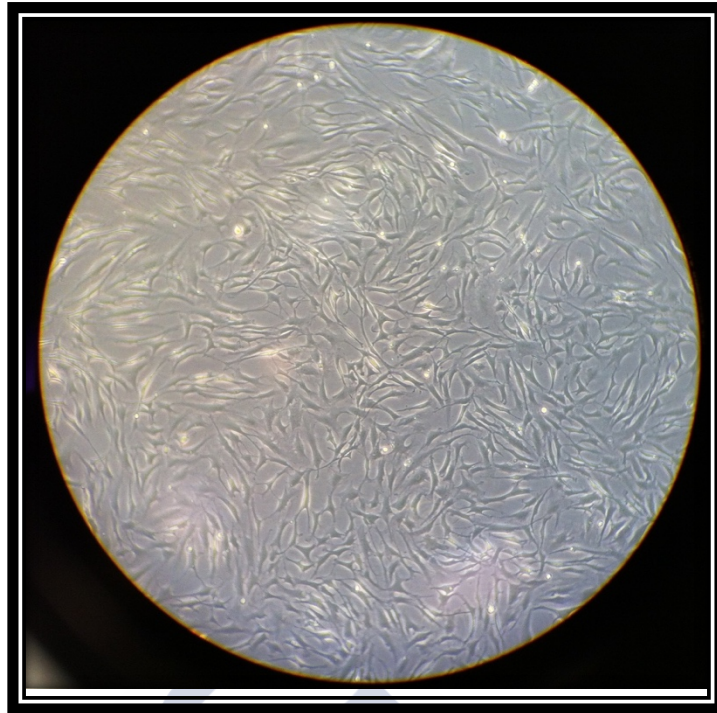


Figura 27: Imagen de microscopía óptica que muestra las células mesenquimales tras alcanzar la confluencia.

### Cultivo celular sobre superficie

Introducimos los discos de forma individual en placas de cultivo con medio (D-MEM, 20% suero bovino fetal y gentamicina) y añadimos las células mesenquimales con una concentración de 25.000 células por  $\text{cm}^3$ . Las células se incubaron en los discos durante 5,10,15 y 20 días (cuatro puntos de control temporal) con unas condiciones de concentración de  $\text{CO}_2$  del 5% y  $37^\circ\text{C}$  de temperatura en una cámara. Obtuvimos las muestras para estudio siguiendo los protocolos de los ensayos y del estudio de proliferación celular.

### Variables celulares a estudiar

En los discos procedimos a estudiar:

- Proliferación mediante ensayo MTT.
- Niveles de interleuquina 6 (IL-6).
- Niveles de factor de necrosis tumoral alfa ( $\text{TNF } \alpha$ ).
- La producción extracelular de colágeno.
- Niveles de fosfatasa alcalina (FA).

- Niveles de osteocalcina.
- Niveles de osteopontina.
- Lectura mediante láser confocal de fluorescencia y microscopía óptica.

Para realizar las mediciones escogimos 4 puntos temporales (5, 10, 15 y 20 días). Empleamos un grupo de 12 discos de cada material para cada punto de control (6 tratados y 6 sin tratar). En esos intervalos detuvimos el crecimiento, procedimos a la lisis celular y recogimos el sobrenadante para realizar los diferentes análisis que se describen más adelante. En todo momento comparamos los resultados obtenidos por técnicas de ELISA entre materiales rugosos frente a los lisos. El estudio entre ambas superficies para cada tipo de material se realiza al mismo tiempo para minimizar errores.

Una vez finalizados los estudios mediante ensayos de inmunofluorescencia, procedimos a la limpieza y nueva esterilización de los discos para el estudio de proliferación (estudio de MTT), para lo que realizamos un nuevo cultivo sobre los discos con los mismos puntos de control.

Una vez finalizado el experimento con los discos, lisamos las células adheridas a los mismos, limpiamos por ultrasonidos los discos y los esterilizamos en autoclave como se indicó previamente. Procedimos después al cultivo mediante una gota sobre cada disco con una concentración celular de 25.000 células por  $\text{cm}^2$ . La gota se mantiene en la superficie por tensión superficial. La cultivamos durante 2 días con unas condiciones de concentración de  $\text{CO}_2$  del 5% y  $37^\circ\text{C}$  de temperatura en una cámara. Al finalizar revisamos con microscopía los resultados. En este momento procedimos a realizar las lecturas mediante láser confocal.

#### Ensayo MTT/Proliferación

Como los estudios de proliferación impiden su uso para otro método, procedimos a realizar los mismos en último lugar. Una vez finalizados el resto de ensayos por ELISA, lisamos el remanente de las células adheridas a los mismos, limpiamos por ultrasonidos los discos y los esterilizamos en autoclave para este estudio.

Para calcular la proliferación celular aplicamos un ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (44). Para ello empleamos el

protocolo comercializado por Sigma-Aldrich, que resulta ser un método preciso y fiable.

1. Una vez cultivadas las células sobre el material, en el punto de control procedemos a retirar el medio y añadir la solución de MTT siguiendo las recomendaciones del fabricante.
2. Dejamos las células con la solución en cultivo toda la noche.
3. La mañana siguiente retiramos la solución, y disolvemos los cristales de formazán en una cantidad equivalente de volumen a la de medio original empleada de dimetil sulfóxido (DMSO) mediante agitación durante 15 minutos.
4. Ponemos en una gradilla de pocillos 50 microlitros de la solución y cuantificamos mediante espectrofotometría la absorción a 570 nm a través de un lector automatizado (Perkin Elmer) y calculamos el valor medio que es el que se muestra como resultado.

#### Niveles de interleuquina 6

Para estudiar las diferencias en los valores de IL-6 empleamos el kit desarrollado por eBioscience. El protocolo del fabricante se describe a continuación:

1. Igualar la temperatura de los reactantes y las muestras a la temperatura ambiente (18-25°C). El pocillo con los anticuerpos lo usamos inmediatamente tras retirarlo del congelador a -20°C.
2. Diseñamos una gradilla para las muestras por duplicado de cada material y momento. Sumamos las referencias y el control vacío por duplicado.
3. Añadimos agua destilada a las referencias y el control vacío según las etiquetas de cada uno. Añadimos 100 microlitros a las muestras.
4. Añadimos 50 microlitros de las muestras a cada pocillo y lo mezclamos.
5. Cubrimos todo con una película adhesiva y lo incubamos entre 18 y 25 °C durante 3 horas en un agitador a 400 rpm.
6. Retiramos la película adhesiva. Lavamos los pocillos 6 veces con 400 microlitros de buffer de lavado que aspiramos en su totalidad tras 10-15 segundos de espera sin manipular la superficie de los pocillos.

7. Añadimos 100 microlitros de solución sustrato TMB en todos los pocillos.
8. Incubamos los pocillos entre 18 y 25 °C durante 10 minutos protegiéndolos de la exposición directa a la luz. El momento óptimo para detener la incubación lo buscamos cuando el valor de referencia 1 alcanza una OD de 0,9-0,95 medido por el lector ELISA a 620 nm.
9. Detendremos la reacción añadiendo en el momento 100 microlitros de la solución de Stop en los pocillos. En este momento procederemos a leer los resultados.
10. Leemos la absorbancia en cada pocillo con un espectrofotómetro usando 450 nm de longitud de onda primaria.
11. Calculamos los resultados de acuerdo a las recomendaciones del fabricante para detección de errores.

#### Niveles de factor de necrosis tumoral Alfa

Para estudiar las diferencias en los valores de TNF-alfa empleamos el kit desarrollado por eBioscience. Los niveles de IL-6 y TNF-alfa se elevan en procesos inflamatorios, en nuestro caso se elevaría ante materiales no biocompatibles que iniciasen una respuesta inmune. El protocolo del fabricante se describe a continuación:

1. Igualar la temperatura de los reactivos y las muestras a la temperatura ambiente (18-25°C). El pocillo con los anticuerpos lo usamos inmediatamente tras retirarlo del congelador a -20°C.
2. Diseñamos una gradilla para las muestras por duplicado de cada material y momento. Sumamos las referencias y el control vacío por duplicado.
3. Añadimos agua destilada a las referencias y el control vacío según las etiquetas de cada uno. Añadimos 100 microlitros a las muestras.
4. Añadimos 50 microlitros de las muestras a cada pocillo y lo mezclamos.
5. Cubrimos los pocillos y los incubamos entre 18 y 25 °C durante 3 horas en un agitador a 400 rpm.

6. Retiramos la película cobertura. Lavamos los pocillos 6 veces con 400 microlitros de buffer de lavado que aspiramos en su totalidad tras 10-15 segundos de espera sin manipular la superficie de los pocillos.
7. Añadimos 100 microlitros de solución sustrato TMB en todos los pocillos.
8. Incubamos los pocillos entre 18 y 25 °C durante 10 minutos protegiéndolos de la exposición directa a la luz. El momento óptimo para detener la incubación lo buscamos cuando el valor de referencia 1 alcanza una OD de 0,9-0,95 medido por el lector ELISA a 620 nm.
9. Detendremos la reacción añadiendo en el momento 100 microlitros de la solución de Stop en los pocillos. En este momento procederemos a leer los resultados.
10. Leemos la absorbancia en cada pocillo con un espectrofotómetro usando 450nm de longitud de onda primaria.
11. Calculamos los resultados de acuerdo a las recomendaciones del fabricante para detección de errores.

La producción extracelular de colágeno

Para el estudio de la producción de matriz extracelular empleamos el kit de Thermo Fisher Scientific, Pierce™ BCA Protein assay. El aumento en su expresión es indicativo de la generación de matriz extracelular. Para la realización del mismo procedimos según las recomendaciones del fabricante:

1. Preparamos los valores de referencia para nuestras muestras.
2. Calculamos y preparamos la cantidad de reactivo necesario.
3. Pipeteamos 25 microlitros de cada referencia y muestra en su pocillo.
4. Añadimos 200 microlitros de reactivo.
5. Cubrimos y cultivamos 30 minutos a 37°C.
6. Dejamos enfriar las muestras hasta la temperatura de la habitación y medimos la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro.
7. Calculamos los resultados de acuerdo a las recomendaciones del fabricante para detección de errores.

### Niveles de fosfatasa alcalina

Para comparar la expresión de fosfatasa alcalina empleamos el kit LabAssay™ ALP de Wako. Los niveles de fosfatasa alcalina nos indican diferenciación celular hacia la estirpe osteoblástica sobretodo cuando se acompaña de otros marcadores como la osteocalcina y la osteopontina.

1. Inicialmente procedemos aplicamos a las muestras Lysis Buffer (Cell Signaling), las centrifugamos a 4°C y recogemos el sobrenadante para su proceso.
2. Disolvemos las tabletas de sustrato en solución buffer.
3. Creamos las soluciones de control con agua destilada.
4. Preparamos los pocillos por duplicado con el estándar, el control vacío y las muestras.
5. Agitamos durante un minuto con un agitador de placas, y lo cultivamos 15 minutos a 37°C.
6. Añadimos 80 microlitros de solución de Stop.
7. Agitamos nuevamente durante un minuto.
8. Procedemos a leer los niveles luminiscencia con un espectrofotómetro en la longitud de onda de los 405 nm.

### Niveles de osteocalcina

Para estudiar los niveles de osteocalcina empleamos los kits de ELISA de ThermoFisher Scientific Human Osteocalcin INSTANT ELISA™ Kit. Procedimos según las recomendaciones del fabricante. La osteocalcina es la mayor proteína extracelular no colágena en la matriz ósea.

1. Igualar la temperatura de los reactantes y las muestras a la temperatura ambiente (18-25°C). El pocillo con los anticuerpos lo usamos inmediatamente tras retirarlo del congelador a -20°C.
2. Diseñamos una gradilla para las muestras por duplicado de cada material y momento. Sumamos las referencias y el control vacío por duplicado.

3. Añadimos agua destilada a las referencias y el control vacío según las etiquetas de cada uno. Añadimos 100 microlitros a las muestras.
4. Añadimos 25 microlitros de las muestras a cada pocillo y lo mezclamos.
5. Cubrimos los pocillos y los incubamos entre 18 y 25 °C durante 3 horas en un agitador a 400 rpm.
6. Retiramos la película cobertura. Lavamos los pocillos 3 veces con 400 microlitros de buffer de lavado que aspiramos en su totalidad tras 10-15 segundos de espera sin manipular la superficie de los pocillos.
7. Añadimos 100 microlitros de solución sustrato TMB en todos los pocillos.
8. Incubamos los pocillos entre 18 y 25 °C durante 10 minutos protegiéndolos de la exposición directa a la luz. El momento óptimo para detener la incubación lo buscamos cuando el valor de referencia 1 alcanza una OD de 0,9-0,95 medido por el lector ELISA a 620 nm.
9. Detendremos la reacción añadiendo en el momento 100 microlitros de la solución de Stop en los pocillos. En este momento procederemos a leer los resultados.
10. Leemos la absorbancia en cada pocillo con un espectrofotómetro usando 450nm de longitud de onda primaria.
11. Calculamos los resultados de acuerdo a las recomendaciones del fabricante para detección de errores.

#### Niveles de osteopontina

Para estudiar los niveles de osteopontina empleamos los kits de ELISA de ThermoFisher Scientific Human Osteopontin Platinum ELISA. Procedimos según las recomendaciones del fabricante. La osteopontina también llamada sialoproteína I, es una proteína expresada en diferentes tejidos, pero en hueso afecta a la remodelación ósea y es expresada por los osteoblastos.

1. Preparamos los reactivos de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.
2. Diseñamos una gradilla para las muestras por duplicado de cada material y momento. Sumamos las referencias y el control vacío por

duplicado. Introducimos en una bolsa de aluminio con desecante a una temperatura entre 2-8 °C.

3. Lavamos los pocillos 2 veces con 400 microlitros de buffer de lavado que aspiramos en su totalidad tras 10-15 segundos de espera sin manipular la superficie de los pocillos.
4. Añadimos 100 microlitros de solución de dilución a todos los pocillos de control, y con una pipeta añadimos 100 microlitros de solución estándar con una concentración de 60 ng/mL, por lo que tras mezclar conseguimos una concentración de 30ng/mL, ahora vamos retirando 100 microlitros de estos primeros pocillos de control y los añadimos al siguiente, y repitiendo el procedimiento conseguimos una dilución controlada al 50% con cada paso.
5. Añadimos 100 microlitros de solución de dilución a los controles vacíos.
6. Añadimos 80 microlitros de solución de dilución a los pocillos donde van a ir las muestras.
7. Añadimos 20 microlitros de la muestra a cada pocillo donde van a ir, siempre por duplicado.
8. Cubrimos los pocillos y los incubamos entre 18 y 25 °C durante 2 horas en un agitador.
9. Preparamos el conjugado de biotina según las recomendaciones del fabricante.
10. Retiramos la película cobertura. Lavamos los pocillos 6 veces con 400 microlitros de buffer de lavado que aspiramos en su totalidad tras 10-15 segundos de espera sin manipular la superficie de los pocillos.
11. Añadimos 100 microlitros del conjugado de biotina en todos los pocillos.
12. Incubamos los pocillos cubiertos entre 18 y 25 °C cubiertos durante 1 hora en un agitador.
13. Preparamos la solución Streptavidin-HRP según las recomendaciones del fabricante.
14. Añadimos 100 microlitros de la solución Streptavidin-HRP en todos los pocillos.
15. Incubamos los pocillos cubiertos entre 18 y 25 °C cubiertos durante 1 hora en un agitador.

16. Retiramos la película cobertura. Lavamos los pocillos 6 veces con 400 microlitros de buffer de lavado que aspiramos en su totalidad tras 10-15 segundos de espera sin manipular la superficie de los pocillos.
17. Añadimos 100 microlitros de solución sustrato TMB en todos los pocillos.
18. Incubamos los pocillos entre 18 y 25 °C durante 10 minutos protegiéndolos de la exposición directa a la luz. El momento óptimo para detener la incubación lo buscamos cuando el valor de referencia 1 alcanza una OD de 0,9-0,95 medido por el lector ELISA a 620 nm.
19. Detendremos la reacción añadiendo en el momento 100 microlitros de la solución de Stop en los pocillos. En este momento procederemos a leer los resultados.
20. Leemos la absorbancia en cada pocillo con un espectrofotómetro usando 450nm de longitud de onda primaria.
21. Calculamos los resultados de acuerdo a las recomendaciones del fabricante para detección de errores.

Lectura mediante láser confocal de fluorescencia

Empleamos Calcein-AM y yoduro de propidio para teñir las células cultivadas sobre las placas una vez finalizado el cultivo. Procedimos a cultivar durante 48 horas las células con el preparado como mencionamos previamente, y posteriormente lavamos cuidadosamente con DMEM el material. Mediante el uso de un microscopio confocal láser (figura 28) (CLSM-SP2, Leica) visualizamos las células viables teñidas de verde fluorescente.



Figura 28: Muestra el microscopio confocal láser CLSM-SP2, Leica.

### Estudio estadístico

Para la realización de todo el estudio estadístico empleamos el software GraphPad Prism versión 6 (© 2017 GraphPad Software, Inc.).

Una vez obtenidos todos los resultados, iniciamos el estudio descriptivo de los mismos, y realizamos las gráficas para cada material con la media y desviación estándar.

Aplicamos un test de Kolmogorov-Smirnov para confirmar que éstos seguían una distribución normal.

En aquellos casos en los que las muestras mantenían una distribución normal aplicamos un test t-student para encontrar diferencias entre los discos lisos y los rugosos. Si las desviaciones estándar no son iguales, aplicamos entonces la corrección de Welch.

En los casos en los que la distribución de datos no se adaptó a una distribución normal, aplicamos tests no paramétricos (test de Mann-Whitney para muestras con distribución no gaussiana) para encontrar diferencias entre los discos lisos y los rugosos en cada material.

Se aceptó un valor de  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.



## Resultados

### Proliferación mediante ensayo MTT

La tabla 9 muestra el resumen de los resultados obtenidos en el ensayo de MTT, con la media y la desviación estándar. Asimismo, se dan los valores que representarían los límites del intervalo de confianza (IC) al 95% para el valor real de la media.

Tabla 9: Valores MTT: Valores medios, con desviación estándar (DE) y error de la media, así como valores superior e inferior para el intervalo de confianza al 95% para el valor real de la media para el ensayo MTT. SM: Material liso, LIPSS: Material tratado con láser.

<b>TITANIO</b>								
	<b>SM 5</b>	<b>LIPSS 5</b>	<b>SM 10</b>	<b>LIPSS 10</b>	<b>SM 15</b>	<b>LIPSS 15</b>	<b>SM 20</b>	<b>LIPSS 20</b>
<b>Media</b>	0,450	0,687	0,647	0,760	0,868	0,928	0,897	0,875
<b>DE</b>	0,027	0,015	0,033	0,009	0,019	0,045	0,029	0,019
<b>Error de la media</b>	0,011	0,006	0,014	0,004	0,008	0,018	0,012	0,008
<b>IC inferior 95%</b>	0,422	0,671	0,612	0,751	0,848	0,881	0,867	0,855
<b>IC superior 95%</b>	0,478	0,703	0,682	0,769	0,889	0,975	0,927	0,895
<b>TANTALIO</b>								
	<b>SM 5</b>	<b>LIPSS 5</b>	<b>SM 10</b>	<b>LIPSS 10</b>	<b>SM 15</b>	<b>LIPSS 15</b>	<b>SM 20</b>	<b>LIPSS 20</b>
<b>Media</b>	0,243	0,410	0,242	0,547	0,387	0,562	0,588	0,598
<b>DE</b>	0,020	0,024	0,010	0,014	0,020	0,012	0,015	0,016
<b>Error de la media</b>	0,008	0,010	0,004	0,006	0,008	0,005	0,006	0,007
<b>IC inferior 95%</b>	0,223	0,385	0,231	0,532	0,366	0,549	0,573	0,582
<b>IC superior 95%</b>	0,264	0,435	0,252	0,561	0,407	0,574	0,604	0,615
<b>CERMET</b>								
	<b>SM 5</b>	<b>LIPSS 5</b>	<b>SM 10</b>	<b>LIPSS 10</b>	<b>SM 15</b>	<b>LIPSS 15</b>	<b>SM 20</b>	<b>LIPSS 20</b>
<b>Media</b>	0,328	0,328	0,453	0,455	0,563	0,538	0,732	0,712
<b>DE</b>	0,008	0,010	0,010	0,012	0,020	0,029	0,012	0,008
<b>Error de la media</b>	0,003	0,004	0,004	0,005	0,008	0,012	0,005	0,003
<b>IC inferior 95%</b>	0,320	0,318	0,443	0,442	0,543	0,508	0,719	0,704
<b>IC superior 95%</b>	0,336	0,339	0,464	0,468	0,584	0,569	0,744	0,720

Titanio

Encontramos diferencias estadísticamente significativas a favor de las LIPSS a 5, 10 y 15 días. A los 20 días encontramos un comportamiento semejante de las LIPSS y las superficies lisas (figura 29).

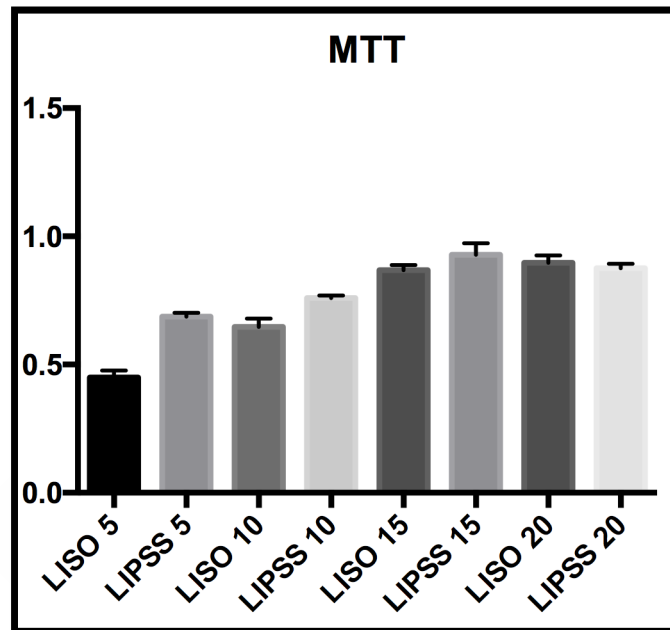


Figura 29: Diagrama de barras para las medias del estudio MTT con su desviación estándar para el titanio.

Tantalio

El comportamiento del tantalio es semejante al del titanio, encontramos a los 5, 10 y 15 días un comportamiento superior de las superficies en las que generamos LIPSS, y un valor mayor de proliferación celular a los 20 días sin significación estadística (figura 30).

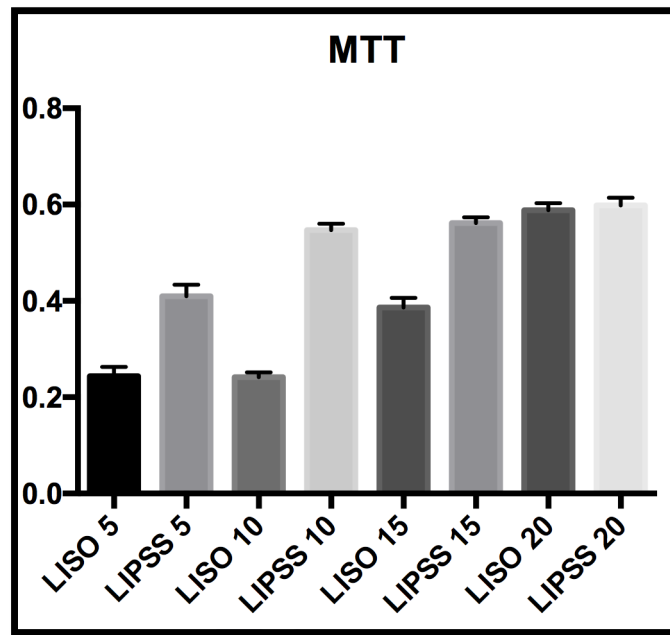


Figura 30: Diagrama de barras para las medias del estudio MTT con su desviación estándar para el tantalio.

Cermet

A diferencia de lo que ocurre con los metales, el tratamiento láser no modifica la proliferación celular sobre la biocerámica de forma estadísticamente significativa (figura 31) en ningún punto de control.

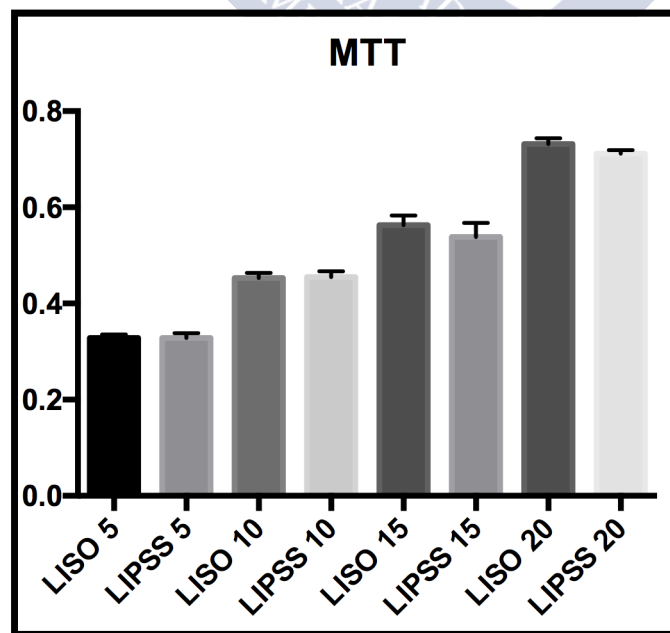


Figura 31: Diagrama de barras para las medias del estudio MTT con su desviación estándar para el cermet.

## Niveles de interleuquina 6

Los valores de la media y desviación estándar obtenidos para la IL-6 se muestran a continuación (tabla 10), con un diagrama de barras en cada material donde se esquematizan los resultados obtenidos para las medias con sus desviaciones estándar.

Tabla 10: Valores medios, con desviación estándar (DE) y error de la media, así como valores superior e inferior para el intervalo de confianza al 95% para el valor real de la media del ensayo de IL-6. SM: Material liso, LIPSS: Material tratado con láser.

<b>TITANIO</b>								
	<b>SM 5</b>	<b>LIPSS 5</b>	<b>SM 10</b>	<b>LIPSS 10</b>	<b>SM 15</b>	<b>LIPSS 15</b>	<b>SM 20</b>	<b>LIPSS 20</b>
<b>Media</b>	0,020	0,025	0,034	0,023	0,019	0,011	0,023	0,031
<b>DE</b>	0,001	0,002	0,001	0,002	0,001	0,002	0,002	0,005
<b>Error de la media</b>	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000	0,001	0,001	0,002
<b>IC inferior 95%</b>	0,019	0,023	0,033	0,021	0,018	0,009	0,021	0,026
<b>IC superior 95%</b>	0,021	0,028	0,036	0,025	0,020	0,014	0,025	0,035
<b>TANTALIO</b>								
	<b>SM 5</b>	<b>LIPSS 5</b>	<b>SM 10</b>	<b>LIPSS 10</b>	<b>SM 15</b>	<b>LIPSS 15</b>	<b>SM 20</b>	<b>LIPSS 20</b>
<b>Media</b>	0,012	0,015	0,044	0,034	0,030	0,021	0,023	0,032
<b>DE</b>	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002	0,001	0,002	0,002
<b>Error de la media</b>	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	0,000	0,001	0,001
<b>IC inferior 95%</b>	0,010	0,015	0,042	0,032	0,028	0,020	0,021	0,029
<b>IC superior 95%</b>	0,014	0,016	0,046	0,036	0,031	0,022	0,025	0,034
<b>CERMET</b>								
	<b>SM 5</b>	<b>LIPSS 5</b>	<b>SM 10</b>	<b>LIPSS 10</b>	<b>SM 15</b>	<b>LIPSS 15</b>	<b>SM 20</b>	<b>LIPSS 20</b>
<b>Media</b>	0,012	0,015	0,044	0,034	0,030	0,021	0,023	0,032
<b>DE</b>	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002	0,001	0,002	0,002
<b>Error de la media</b>	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	0,000	0,001	0,001
<b>IC inferior 95%</b>	0,010	0,015	0,042	0,032	0,028	0,020	0,021	0,029
<b>IC superior 95%</b>	0,014	0,016	0,046	0,036	0,031	0,022	0,025	0,034

## Titanio

Los valores de IL-6 indicativos de inflamación, son bajos en ambos tratamientos de superficie, y no encontramos una diferencia estadísticamente significativa a favor de ninguno de los materiales metálicos. Incluso vemos cómo en algún punto de control los valores de las LIPSS son más altos que las lisas (figura 32).

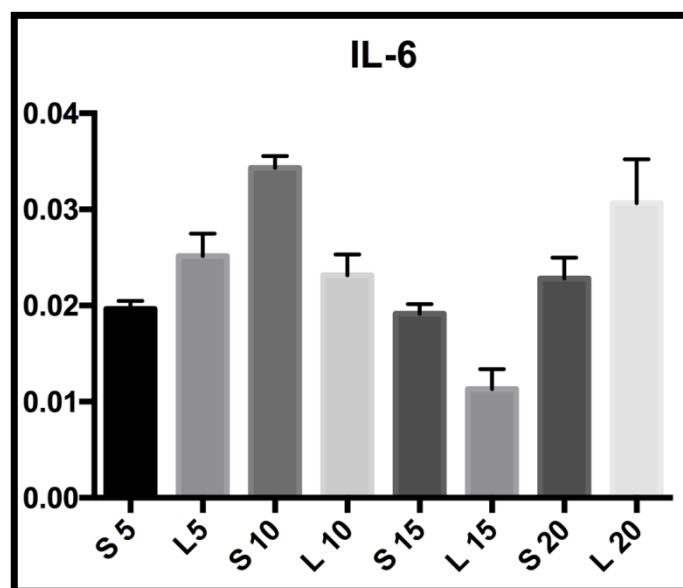


Figura 32: Diagrama de barras de las medias del estudio de Interleucina 6 con su desviación estándar para el titanio.

## Tantalio

Al igual que para con el titanio, en los compuestos de tantalio, los valores son muy bajos, incluso menores que los registrados en las superficies de titanio. En el tantalio las LIPSS sí parecen generar un aumento de IL-6 estadísticamente significativo, pero moviéndonos siempre en valores pequeños gracias a la biocompatibilidad de los metales empleados (figura 33).

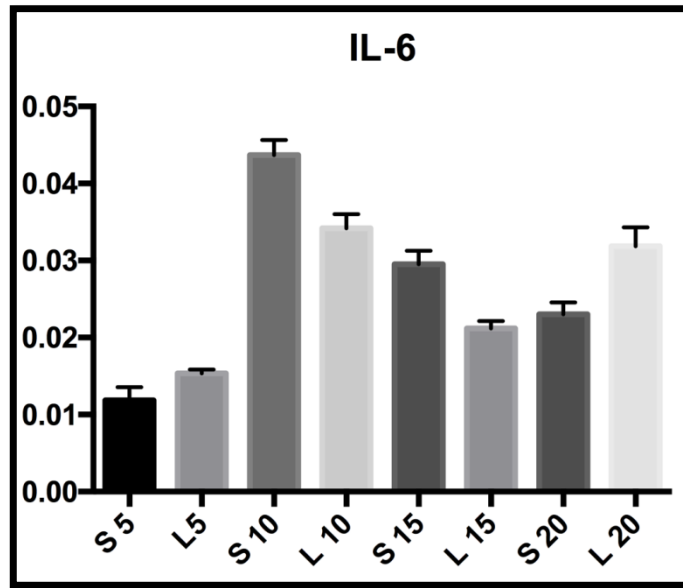


Figura 33: Diagrama de barras para las medias del estudio de IL- 6 con su desviación estándar para el tantalio.

Cermet

Al igual que ocurre con los metales, la cerámica prácticamente no induce respuesta inflamatoria medida a través de IL-6, y no existe diferencia estadísticamente significativa entre la superficie tratada y la lisa en ningún punto de control (figura 34).

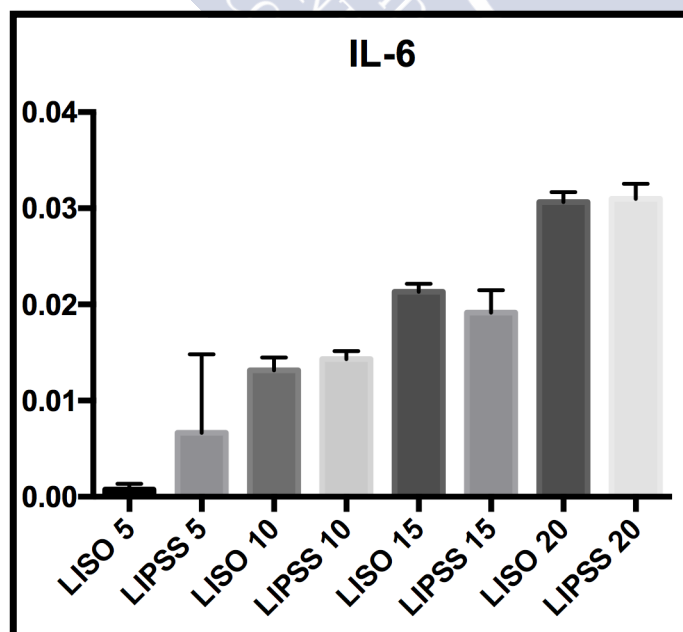


Figura 34: Diagrama de barras para las medias del estudio de Interleucina 6 con su desviación estándar para el cermet.

### Niveles de factor de necrosis tumoral alfa

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 11 que aparece a continuación y en las gráficas que muestran las medias con sus desviaciones estándar en cada uno de los materiales estudiados.

Tabla 11: Valores medios, con desviación estándar (DE) y error de la media, así como valores superior e inferior para el intervalo de confianza al 95% para el valor real de la media del TNF-alfa. SM: Material liso, LIPSS: Material tratado con láser.

<b>TITANIO</b>								
	<b>SM 5</b>	<b>LIPSS 5</b>	<b>SM 10</b>	<b>LIPSS 10</b>	<b>SM 15</b>	<b>LIPSS 15</b>	<b>SM 20</b>	<b>LIPSS 20</b>
<b>Media</b>	0,017	0,010	0,029	0,024	0,031	0,023	0,045	0,031
<b>DE</b>	0,001	0,000	0,001	0,003	0,001	0,002	0,002	0,002
<b>Error de la media</b>	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
<b>IC inferior 95%</b>	0,015	0,010	0,028	0,021	0,030	0,022	0,043	0,030
<b>IC superior 95%</b>	0,018	0,011	0,031	0,027	0,032	0,025	0,047	0,033
<b>TANTALIO</b>								
	<b>SM 5</b>	<b>LIPSS 5</b>	<b>SM 10</b>	<b>LIPSS 10</b>	<b>SM 15</b>	<b>LIPSS 15</b>	<b>SM 20</b>	<b>LIPSS 20</b>
<b>Media</b>	0,021	0,015	0,020	0,019	0,044	0,033	0,054	0,044
<b>DE</b>	0,002	0,001	0,002	0,001	0,004	0,001	0,003	0,005
<b>Error de la media</b>	0,001	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000	0,001	0,002
<b>IC inferior 95%</b>	0,019	0,014	0,017	0,018	0,040	0,032	0,050	0,038
<b>IC superior 95%</b>	0,024	0,016	0,022	0,020	0,047	0,034	0,057	0,049
<b>CERMET</b>								
	<b>SM 5</b>	<b>LIPSS 5</b>	<b>SM 10</b>	<b>LIPSS 10</b>	<b>SM 15</b>	<b>LIPSS 15</b>	<b>SM 20</b>	<b>LIPSS 20</b>
<b>Media</b>	0,032	0,032	0,045	0,045	0,047	0,047	0,050	0,050
<b>DE</b>	0,002	0,002	0,001	0,003	0,003	0,001	0,003	0,003
<b>Error de la media</b>	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
<b>IC inferior 95%</b>	0,030	0,030	0,044	0,042	0,044	0,046	0,048	0,048
<b>IC superior 95%</b>	0,034	0,034	0,047	0,048	0,050	0,049	0,053	0,053

## Titanio

Al igual que la IL-6 el TNF-alfa es un marcador de inflamación, y, de forma semejante a lo que sucede con la IL-6, los valores obtenidos tanto en superficies de titanio lisas como en LIPSS son bajos. Encontramos diferencias significativas desde el punto de vista estadístico en puntos de control a 5 y 10 días, que desaparecen a los 15 y 20 días (figura 35).

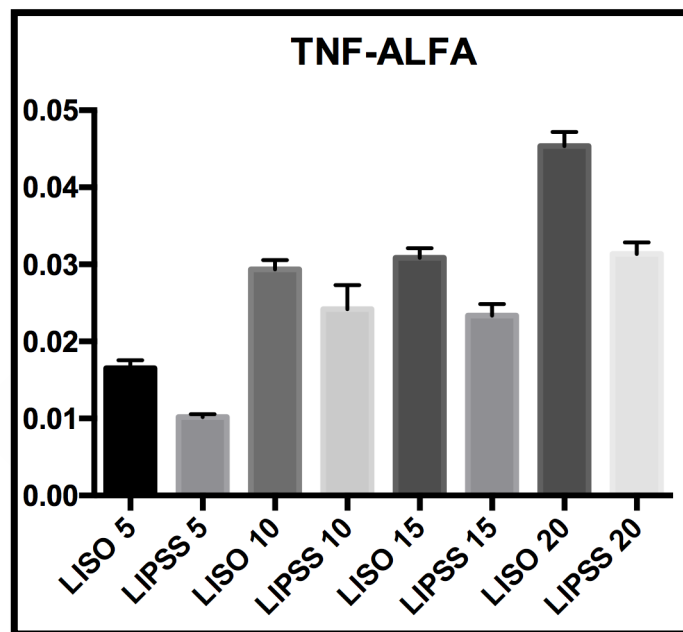


Figura 35: Diagrama de barras para las medias del estudio del factor de necrosis tumoral alfa con su desviación estándar para el titanio.

## Tantalio

El tantalio también muestra valores muy bajos de inflamación expresados por el TNF-alfa por la buena biocompatibilidad del material en ambas superficies, pero en este caso vemos discretas diferencias estadísticamente significativas a favor de las superficies tratadas con láser a 5, 15 y 20 días (figura 36).

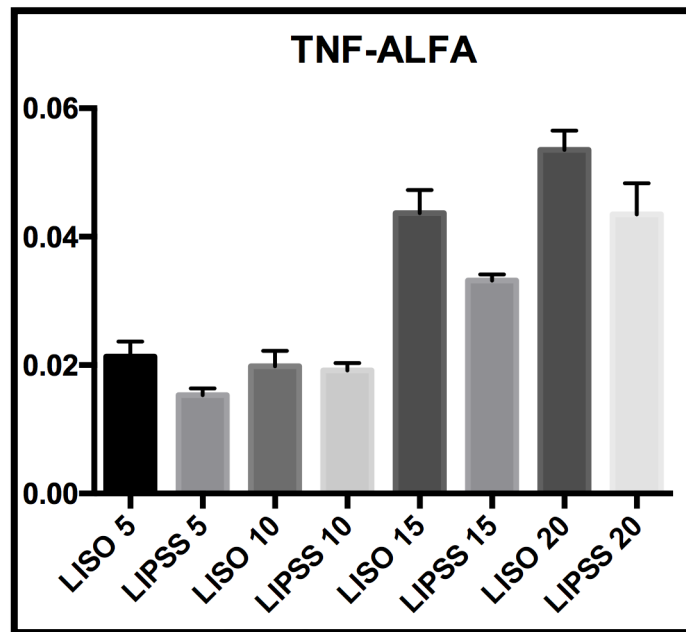


Figura 36: Diagrama de barras para las medias del estudio del factor de necrosis tumoral alfa con su desviación estándar para el tantalio.

Cermet

El comportamiento de la inflamación medida por la expresión de TNF-alfa es parecido al de la IL-6, donde vemos una expresión mínima de estos valores, y sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre las superficies (Figura 37).

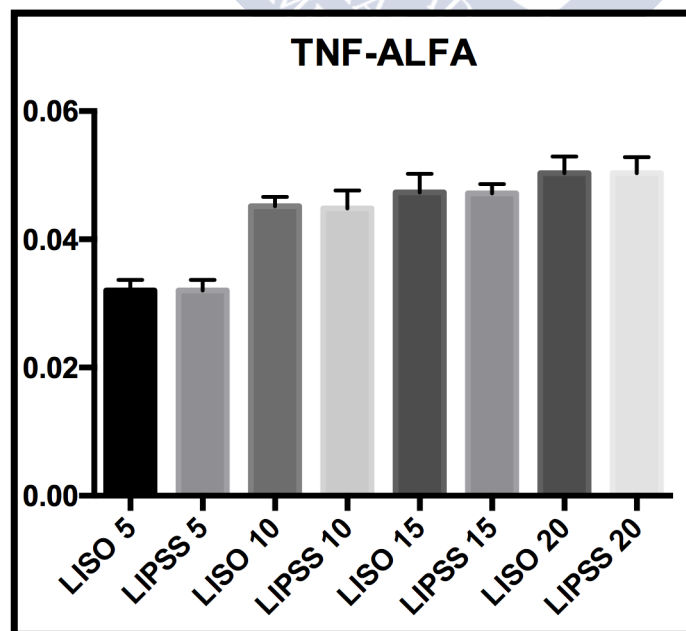


Figura 37: Diagrama de barras para las medias del estudio del factor de necrosis tumoral alfa con su desviación estándar para el cermet.

## La producción extracelular de colágeno

Los resultados obtenidos se muestran resumidos con los valores medios con sus intervalos de confianza al 95% en la siguiente tabla (tabla 12):

Tabla 12: Valores medios, con desviación estándar (DE) y error de la media, así como valores superior e inferior para el intervalo de confianza (IC) al 95% para los valores del valor real de la media de la producción de matriz extracelular de colágeno. SM: Material liso, LIPSS: Material tratado con láser.

TITANIO								
	SM 5	LIPSS 5	SM 10	LIPSS 10	SM 15	LIPSS 15	SM 20	LIPSS 20
Media	0,000	0,207	0,210	0,345	0,413	0,542	0,620	0,740
DE	0,000	0,008	0,009	0,033	0,026	0,012	0,023	0,006
Error de la media	0,000	0,003	0,004	0,013	0,011	0,005	0,009	0,003
IC inferior 95%	0,000	0,198	0,201	0,311	0,386	0,529	0,596	0,733
IC superior 95%	0,000	0,216	0,219	0,379	0,440	0,554	0,644	0,747
TANTALIO								
	SM 5	LIPSS 5	SM 10	LIPSS 10	SM 15	LIPSS 15	SM 20	LIPSS 20
Media	0,000	0,103	0,125	0,209	0,303	0,427	0,483	0,742
DE	0,000	0,005	0,014	0,091	0,015	0,015	0,014	0,023
Error de la media	0,000	0,002	0,006	0,037	0,006	0,006	0,006	0,009
IC inferior 95%	0,000	0,098	0,111	0,114	0,288	0,411	0,469	0,717
IC superior 95%	0,000	0,109	0,140	0,305	0,319	0,443	0,498	0,766
CERMET								
	SM 5	LIPSS 5	SM 10	LIPSS 10	SM 15	LIPSS 15	SM 20	LIPSS 20
Media	0,001	0,001	0,185	0,211	0,339	0,435	0,330	0,538
DE	0,001	0,001	0,014	0,008	0,050	0,059	0,015	0,030
Error de la media	0,000	0,000	0,006	0,003	0,020	0,024	0,006	0,012
IC inferior 95%	0,000	0,000	0,170	0,202	0,286	0,374	0,314	0,507
IC superior 95%	0,001	0,001	0,199	0,219	0,391	0,497	0,345	0,569

### Titanio

La expresión de colágeno como principal componente proteico de la matriz extracelular fue significativamente mayor en todos los puntos de control del estudio, con valores para las superficies tratadas con láser muy superiores (figura 38).

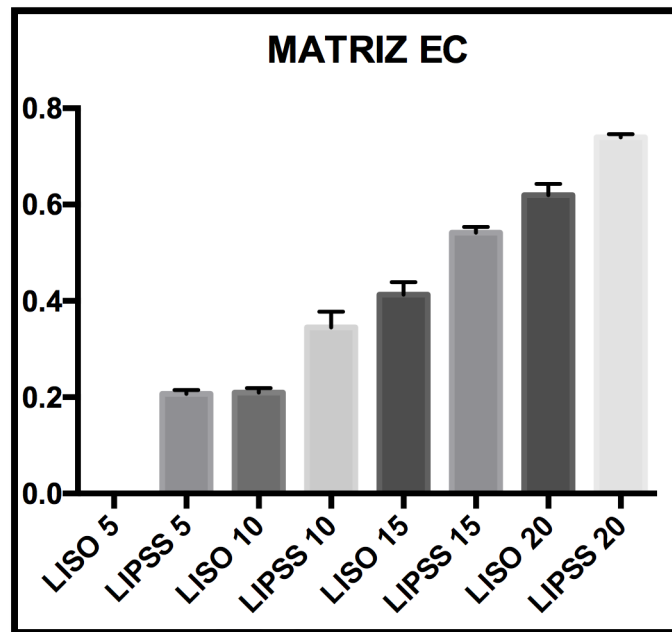


Figura 38: Diagrama de barras para las medias del estudio de la producción de matriz extracelular con su desviación estándar para el titanio.

#### Tantalio

En este caso las medias de los valores obtenidos en superficies de tantalio han sido superiores en todos los casos en superficies tratadas mediante láser, pero estas diferencias sólo se mostraron estadísticamente significativas en los días 5 y 15 (figura 39).

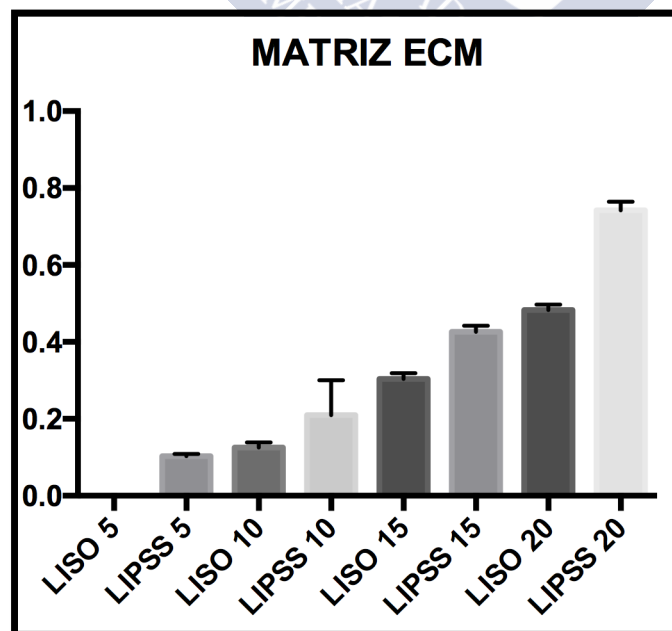


Figura 39: Diagrama de barras para las medias del estudio de la producción de matriz extracelular con su desviación estándar para el tantalio.

Cermet

La expresión de matriz extracelular muestra unos valores ligeramente inferiores a los obtenidos con los metales, pero vemos una diferencia estadísticamente significativa en la producción de proteínas de matriz extracelular en las LIPSS (figura 40).

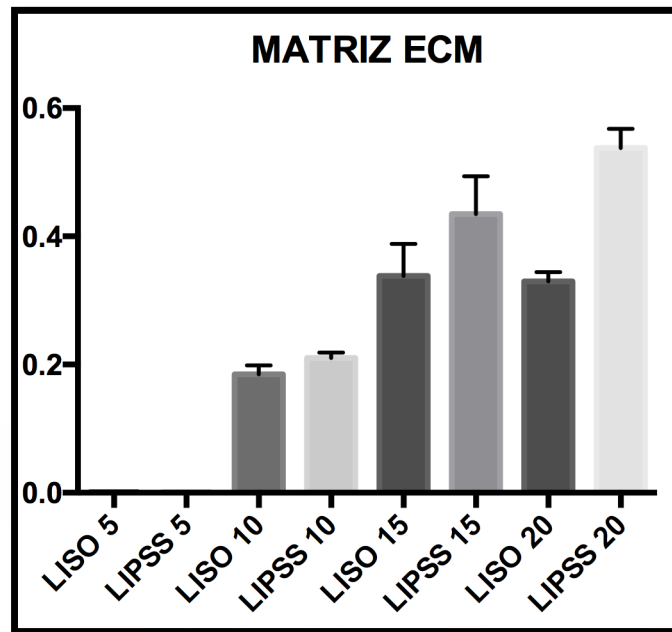


Figura 40: Diagrama de barras para las medias del estudio de la producción de matriz extracelular con su desviación estándar para el cermet.

## Niveles de fosfatasa alcalina

Los resúmenes de los valores obtenidos en el ensayo de fosfatasa alcalina se muestran a continuación.

Tabla 13: Valores medios, con desviación estándar (DE) y error de la media, así como valores superior e inferior para el intervalo de confianza (IC) al 95% para el valor real de la media de fosfatasa alcalina. SM: Material liso, LIPSS: material tratado con láser.

<b>TITANIO</b>								
	<b>SM 5</b>	<b>LIPSS 5</b>	<b>SM 10</b>	<b>LIPSS 10</b>	<b>SM 15</b>	<b>LIPSS 15</b>	<b>SM 20</b>	<b>LIPSS 20</b>
<b>Media</b>	0,645	0,783	0,713	0,853	0,907	0,878	1,100	1,495
<b>DE</b>	0,014	0,023	0,008	0,029	0,010	0,008	0,063	0,125
<b>Error de la media</b>	0,006	0,010	0,003	0,012	0,004	0,003	0,026	0,051
<b>IC inferior 95%</b>	0,631	0,759	0,705	0,822	0,896	0,870	1,034	1,364
<b>IC superior 95%</b>	0,660	0,808	0,722	0,884	0,918	0,886	1,166	1,626
<b>TANTALIO</b>								
	<b>SM 5</b>	<b>LIPSS 5</b>	<b>SM 10</b>	<b>LIPSS 10</b>	<b>SM 15</b>	<b>LIPSS 15</b>	<b>SM 20</b>	<b>LIPSS 20</b>
<b>Media</b>	0,445	0,593	0,513	0,657	0,758	0,775	0,795	0,770
<b>DE</b>	0,005	0,055	0,008	0,029	0,023	0,023	0,042	0,019
<b>Error de la media</b>	0,002	0,022	0,003	0,012	0,009	0,009	0,017	0,008
<b>IC inferior 95%</b>	0,439	0,536	0,505	0,627	0,734	0,751	0,751	0,750
<b>IC superior 95%</b>	0,451	0,651	0,522	0,687	0,783	0,799	0,839	0,790
<b>CERMET</b>								
	<b>SM 5</b>	<b>LIPSS 5</b>	<b>SM 10</b>	<b>LIPSS 10</b>	<b>SM 15</b>	<b>LIPSS 15</b>	<b>SM 20</b>	<b>LIPSS 20</b>
<b>Media</b>	0,411	0,828	0,429	0,907	0,487	0,942	0,528	0,880
<b>DE</b>	0,044	0,073	0,047	0,021	0,042	0,049	0,044	0,115
<b>Error de la media</b>	0,018	0,030	0,019	0,009	0,017	0,020	0,018	0,047
<b>IC inferior 95%</b>	0,365	0,751	0,380	0,885	0,442	0,891	0,482	0,760
<b>IC superior 95%</b>	0,458	0,904	0,478	0,930	0,532	0,993	0,575	1,001

## Titanio

El titanio muestra una capacidad osteoblástica importante, y ésta se incrementa en las LIPSS. Vemos que los valores de las superficies rugosas son superiores de forma estadísticamente significativa a 5, 10 y 20 días, alcanzando niveles hasta un 40% superiores en el último control (figura 41).

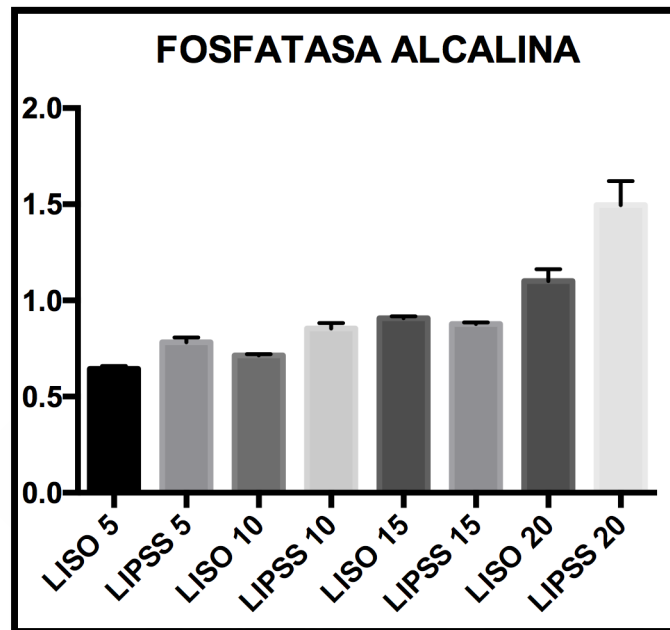


Figura 41: Diagrama de barras para las medias del estudio de la producción de fosfatasa alcalina con su desviación estándar para el titanio.

## Tantalio

El tantalio muestra menor expresión de fosfatasa alcalina que el titanio en todos los puntos del estudio. Cuando diferenciamos entre superficies lisas y LIPSS, vemos que las medias obtenidas en las LIPSS son más elevadas en todos los intervalos, pero sólo alcanzan significación estadística en los días 5 y 10 (Figura 42).

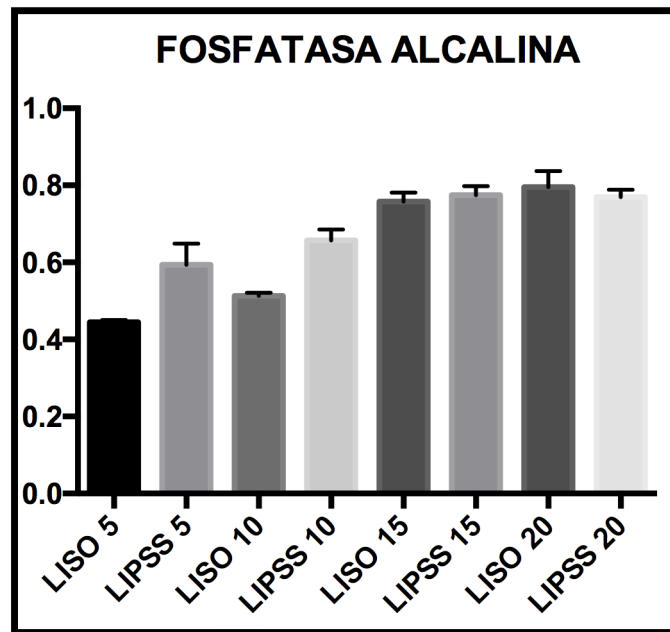


Figura 42: Diagrama de barras para las medias del estudio de la producción de fosfatasa alcalina con su desviación estándar para el tantalio.

#### Cermet

La creación de LIPSS y la rugosidad generadas por el láser en la superficie del cermet parecen incrementar la expresión de fosfatasa alcalina, encontrándose significación estadística a favor de las LIPSS en todos los puntos de control (Figura 43).

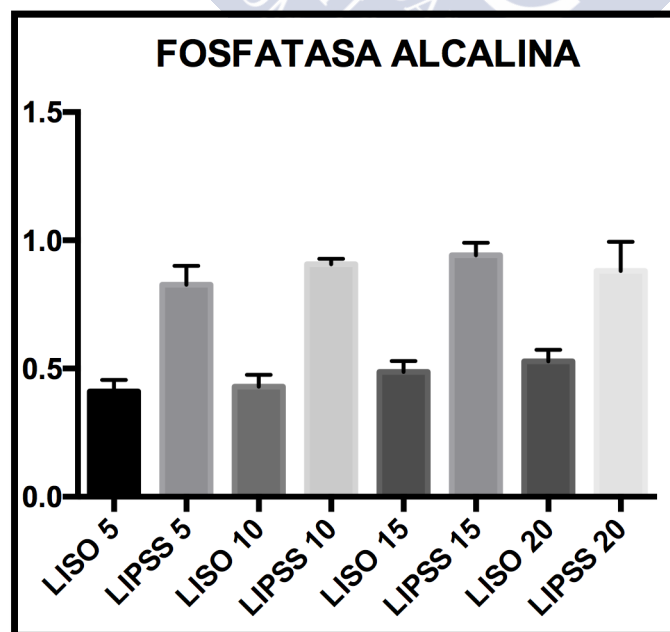


Figura 43: Diagrama de barras para las medias del estudio de la producción de fosfatasa alcalina con su desviación estándar para el cermet.

## Niveles de osteocalcina

La siguiente tabla (tabla 14) muestra los valores medios obtenidos en los ensayos de osteocalcina para los diferentes materiales.

Tabla 14: Valores medios, con desviación estándar (DE) y error de la media, así como valores superior e inferior para el intervalo de confianza (IC) al 95% para el valor real de la media de osteocalcina. SM: Material liso, LIPSS: Material tratado con láser.

<b>TITANIO</b>								
	<b>SM 5</b>	<b>LIPSS 5</b>	<b>SM 10</b>	<b>LIPSS 10</b>	<b>SM 15</b>	<b>LIPSS 15</b>	<b>SM 20</b>	<b>LIPSS 20</b>
<b>Media</b>	0,308	0,608	0,527	0,803	0,697	1,167	0,843	1,542
<b>DE</b>	0,013	0,034	0,019	0,016	0,014	0,082	0,019	0,022
<b>Error de la media</b>	0,005	0,014	0,008	0,007	0,006	0,033	0,008	0,009
<b>IC inferior 95%</b>	0,294	0,572	0,507	0,786	0,682	1,081	0,824	1,518
<b>IC superior 95%</b>	0,322	0,644	0,546	0,821	0,711	1,252	0,863	1,565
<b>TANTALIO</b>								
	<b>SM 5</b>	<b>LIPSS 5</b>	<b>SM 10</b>	<b>LIPSS 10</b>	<b>SM 15</b>	<b>LIPSS 15</b>	<b>SM 20</b>	<b>LIPSS 20</b>
<b>Media</b>	0,203	0,587	0,227	0,628	0,433	0,708	0,568	0,923
<b>DE</b>	0,005	0,010	0,012	0,016	0,019	0,008	0,012	0,029
<b>Error de la media</b>	0,002	0,004	0,005	0,007	0,008	0,003	0,005	0,012
<b>IC inferior 95%</b>	0,198	0,576	0,214	0,612	0,413	0,700	0,556	0,893
<b>IC superior 95%</b>	0,209	0,598	0,239	0,645	0,452	0,716	0,581	0,954
<b>CERMET</b>								
	<b>SM 5</b>	<b>LIPSS 5</b>	<b>SM 10</b>	<b>LIPSS 10</b>	<b>SM 15</b>	<b>LIPSS 15</b>	<b>SM 20</b>	<b>LIPSS 20</b>
<b>Media</b>	0,325	0,695	0,317	0,773	0,403	0,720	0,372	0,741
<b>DE</b>	0,016	0,042	0,041	0,047	0,053	0,043	0,035	0,061
<b>Error de la media</b>	0,007	0,017	0,017	0,019	0,021	0,017	0,014	0,025
<b>IC inferior 95%</b>	0,308	0,651	0,274	0,723	0,347	0,675	0,335	0,677
<b>IC superior 95%</b>	0,342	0,740	0,360	0,822	0,458	0,765	0,408	0,804

## Titanio

Al igual que ocurre con la fosfatasa alcalina, debido a las características intrínsecamente favorables del titanio y el tantalio, los resultados de osteocalcina son excelentes en todas las superficies, pero vemos que el tratamiento con láser genera un incremento en la producción de osteocalcina (mayor diferenciación osteoblástica) estadísticamente significativa en todos los puntos de control, mayor del 50% en el último control a 20 días (figura 44).

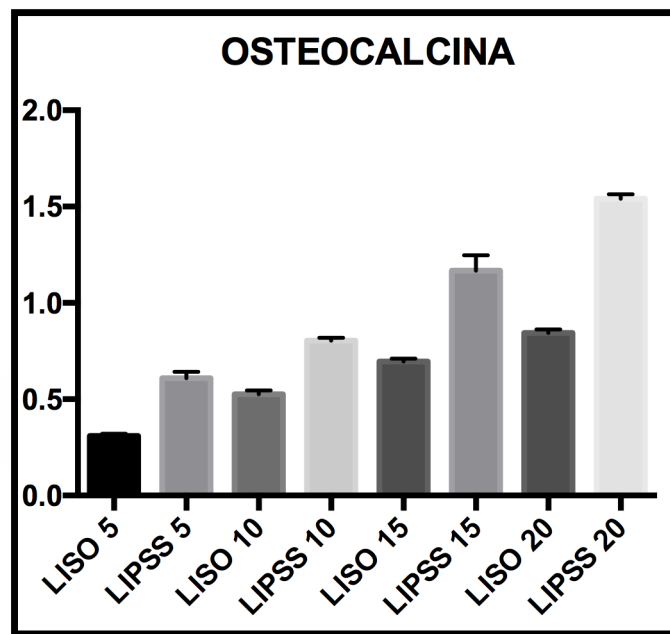


Figura 44: Diagrama de barras para las medias del estudio de la producción de osteocalcina con su desviación estándar para el titanio.

## Tantalio

Al igual que ocurre en la fosfatasa alcalina, los niveles de osteocalcina con superiores en todos los puntos de control, y, esta diferencia alcanza la significación estadística a 5, 10, 15 y 20 días (figura 45).

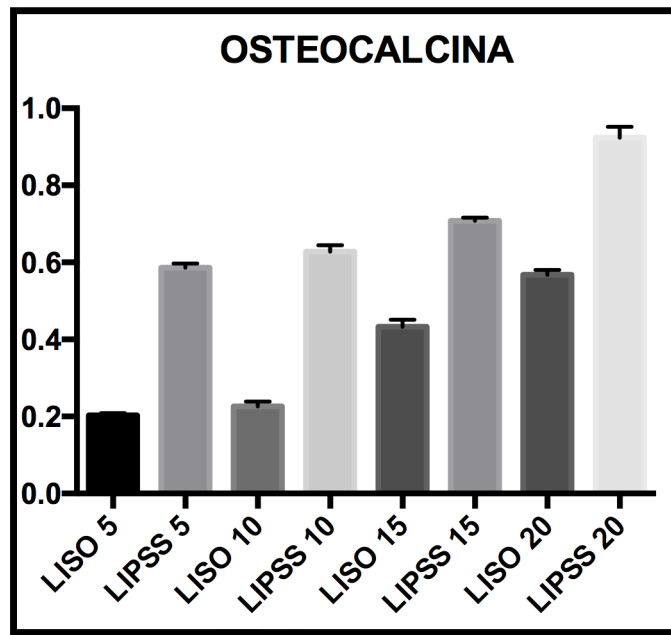


Figura 45: Diagrama de barras para las medias del estudio de la producción de osteocalcina con su desviación estándar para el tantalio.

Cermet

En este caso el comportamiento es semejante al visto en los registros de la fosfatasa alcalina, ya que el tratamiento con láser incrementa la expresión de osteocalcina por las células mesenquimales diferenciadas a osteoblastos de forma estadísticamente significativa en todos los puntos de control (figura 46).

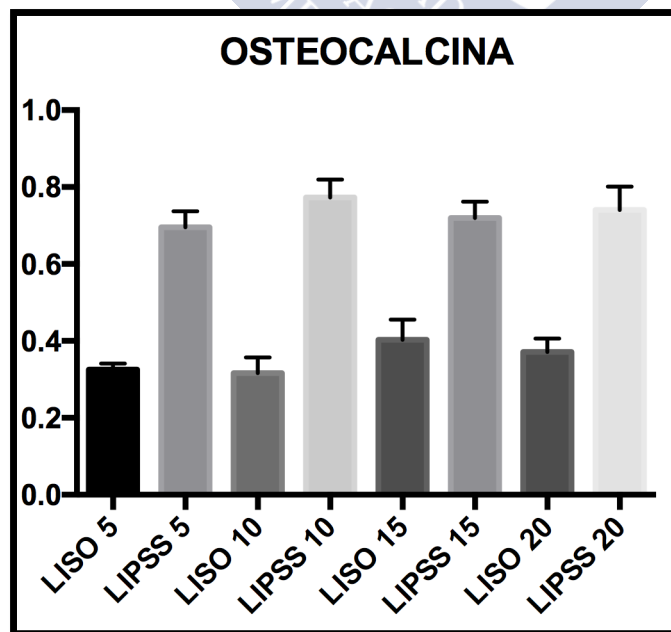


Figura 46: Diagrama de barras para las medias del estudio de la producción de osteocalcina con su desviación estándar para el cermet.

## Niveles de osteopontina

A continuación, se muestran los valores obtenidos para el ensayo de osteopontina.

Tabla 15: Valores medios, con desviación estándar (DE) y error de la media, así como valores superior e inferior para el intervalo de confianza (IC) al 95% para el valor real de la media de osteopontina. SM: Material liso, LIPSS: Material tratado con láser.

<b>TITANIO</b>								
	<b>SM 5</b>	<b>LIPSS 5</b>	<b>SM 10</b>	<b>LIPSS 10</b>	<b>SM 15</b>	<b>LIPSS 15</b>	<b>SM 20</b>	<b>LIPSS 20</b>
<b>Media</b>	0,418	1,050	0,545	1,385	0,628	1,542	0,782	1,745
<b>DE</b>	0,018	0,084	0,008	0,125	0,012	0,022	0,021	0,018
<b>Error de la media</b>	0,007	0,034	0,003	0,051	0,005	0,009	0,009	0,007
<b>IC inferior 95%</b>	0,399	0,962	0,536	1,254	0,616	1,518	0,759	1,727
<b>IC superior 95%</b>	0,438	1,138	0,554	1,516	0,641	1,565	0,804	1,763
<b>TANTALIO</b>								
	<b>SM 5</b>	<b>LIPSS 5</b>	<b>SM 10</b>	<b>LIPSS 10</b>	<b>SM 15</b>	<b>LIPSS 15</b>	<b>SM 20</b>	<b>LIPSS 20</b>
<b>Media</b>	0,312	0,738	0,405	0,833	0,410	0,920	0,618	1,067
<b>DE</b>	0,010	0,035	0,005	0,048	0,009	0,011	0,010	0,082
<b>Error de la media</b>	0,004	0,014	0,002	0,020	0,004	0,004	0,004	0,033
<b>IC inferior 95%</b>	0,301	0,702	0,399	0,783	0,401	0,909	0,608	0,981
<b>IC superior 95%</b>	0,322	0,775	0,411	0,884	0,419	0,932	0,629	1,152
<b>CERMET</b>								
	<b>SM 5</b>	<b>LIPSS 5</b>	<b>SM 10</b>	<b>LIPSS 10</b>	<b>SM 15</b>	<b>LIPSS 15</b>	<b>SM 20</b>	<b>LIPSS 20</b>
<b>Media</b>	0,327	0,620	0,380	0,664	0,526	0,695	0,479	0,688
<b>DE</b>	0,025	0,030	0,045	0,011	0,051	0,057	0,044	0,048
<b>Error de la media</b>	0,010	0,012	0,018	0,005	0,021	0,023	0,018	0,019
<b>IC inferior 95%</b>	0,301	0,589	0,333	0,652	0,472	0,635	0,433	0,638
<b>IC superior 95%</b>	0,354	0,651	0,427	0,676	0,580	0,755	0,526	0,738

## Titanio

Los resultados obtenidos para la osteopontina son semejantes a los de osteocalcina. Se observa una diferencia estadísticamente significativa a favor de las LIPSS y de magnitud en todos los puntos de estudio (figura 47).

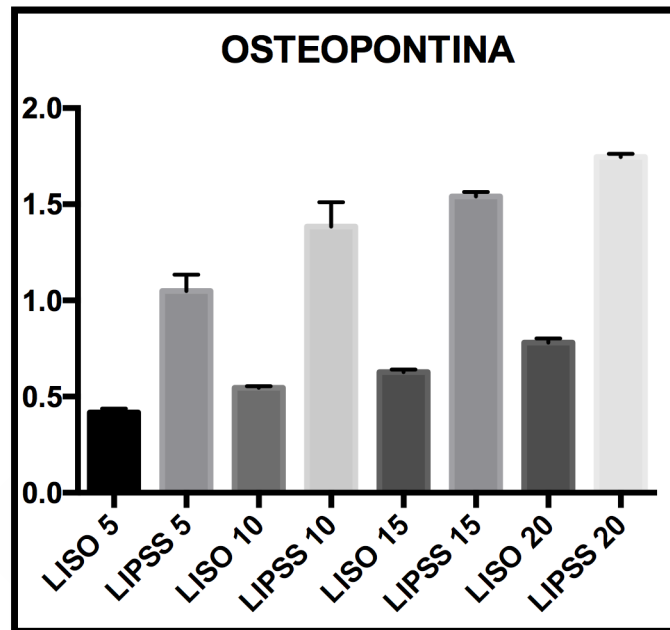


Figura 47: Diagrama de barras para las medias del estudio de la producción de osteopontina con su desviación estándar para el titanio.

## Tantalio

Al igual que ocurre con el titanio, las LIPSS generadas por láser aumentan la expresión de osteopontina en todos los puntos de control, con un incremento que ronda el 100% comparado con los valores obtenidos para la superficie lisa (figura 48)

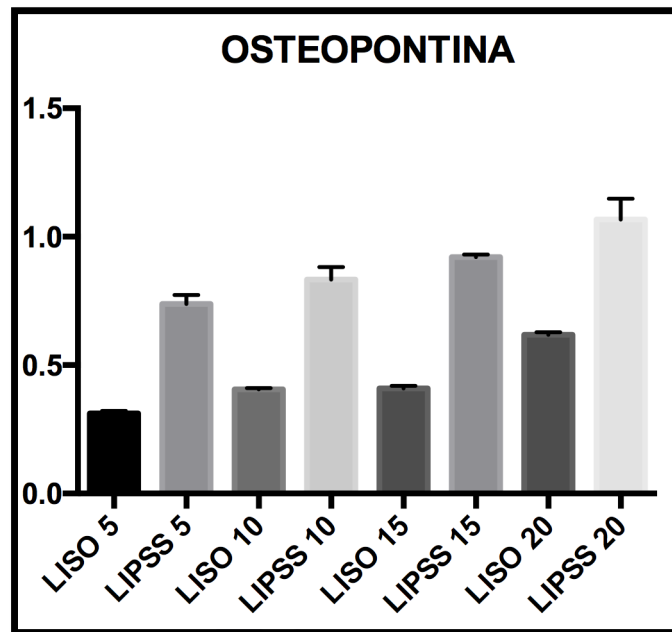


Figura 48: Diagrama de barras para las medias del estudio de la producción de osteopontina con su desviación estándar para el tantalio.

#### Cermet

De nuevo el tratamiento con láser eleva de forma estadísticamente significativa los valores de osteopontina en comparación con las superficies lisas. Los 3 estudios de diferenciación osteoblástica son estadísticamente superiores en la superficie generada por láser en el cermet (figura 49).

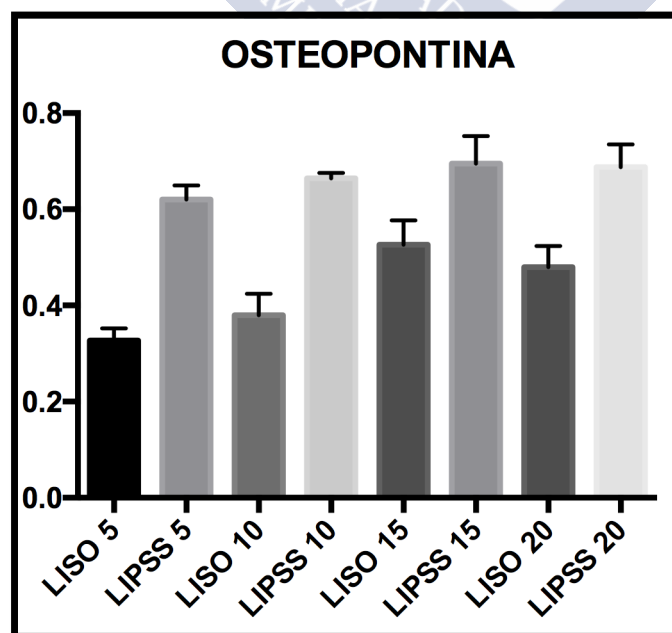


Figura 49: Diagrama de barras para las medias del estudio de la producción de osteopontina con su desviación estándar para el cermet

## Fabricación de estructuras periódicas inducidas por láser

### Parámetros láser

Los parámetros empleados en la configuración del láser se muestran en la figura 50. Éstos valores son los empleados en la superficie de los discos para el estudio biológico y poder comparar las LIPSS frente a las superficies lisas. Para estudiar cómo la potencia del láser modifica la superficie de los cermetos empleamos tres potencias de láser, a parte de un control sin tratar. Éstas potencias fueron de 0,05 W, 0,1 W y 0,2 W.

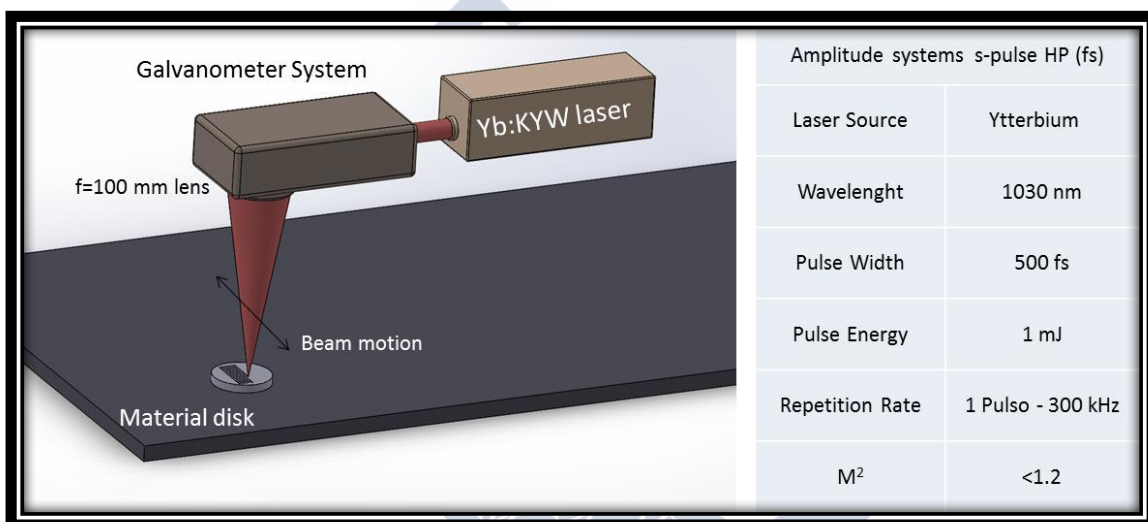


Figura 50. Muestra los parámetros láser empleados en la creación de las LIPSS.

### Frecuencia de repetición

La frecuencia de trabajo del láser es de 300 KHz.

### Duración de pulso

La duración del pulso es de 500 fs de duración.

### Número de pulsos

Aplicamos 50 pulsos de láser sobre la superficie a tratar.

## Energía aplicada

La energía que aplicamos por unidad de superficie fue de  $0,33 \text{ Jcm}^{-2}$ .

## Caracterización morfológica

### Imágenes Microscopio electrónico de barrido

Las siguientes imágenes (figura 51) muestran el contraste entre la superficie pulida y las estructuras periódicas generadas por láser mediante el microscopio electrónico de barrido.

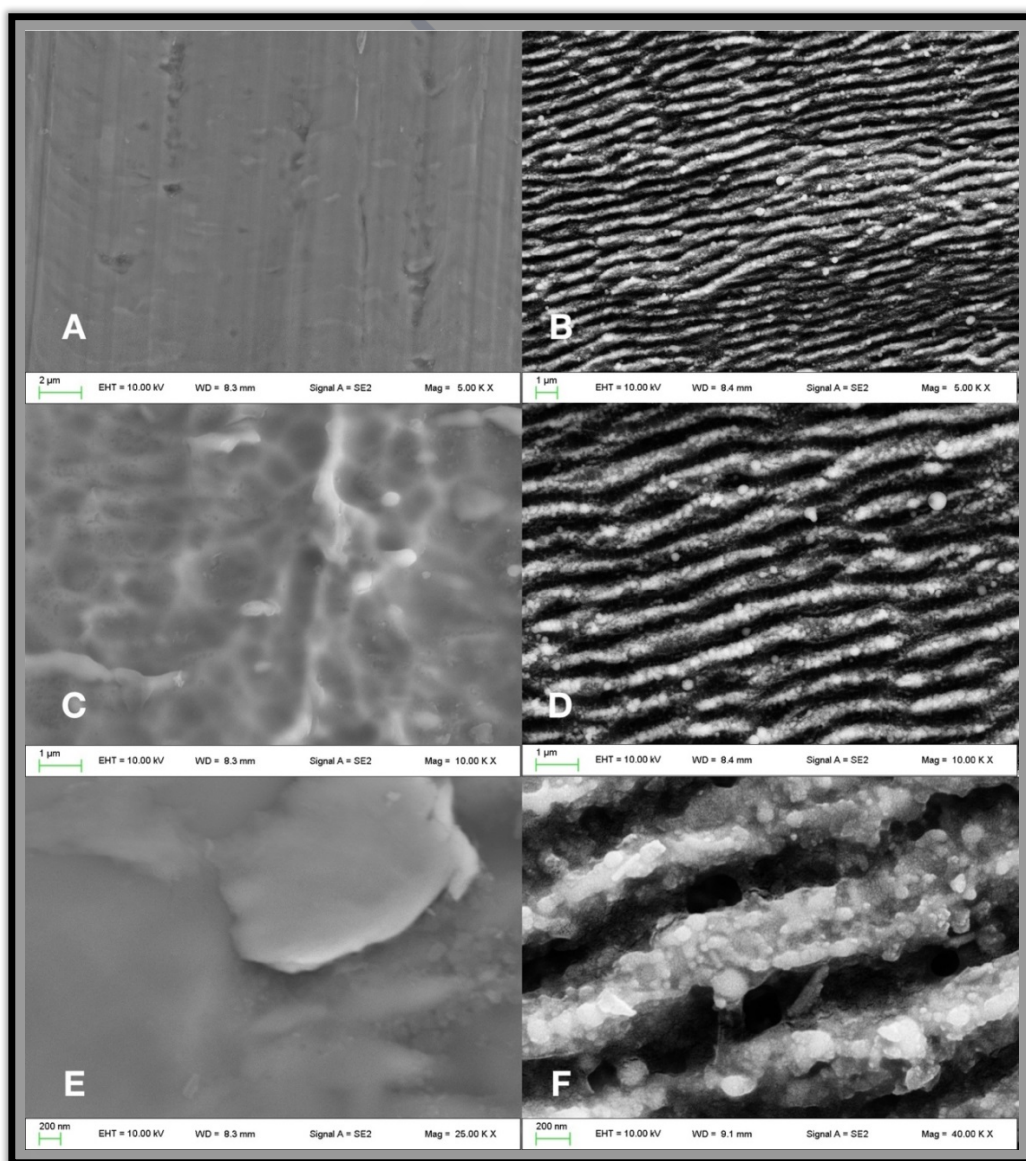


Figura 51: Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido de titanio. Las imágenes A, C Y E muestran una superficie lisa a 5.000, 10.000 y 40.000 aumentos respectivamente, mientras que las B, D y F muestran LIPSS creadas en titanio a 5.000, 10.000 y 40.000 aumentos.

En la imagen superior (figura 51) podemos ver a diferentes aumentos las dos superficies creadas sobre el titanio, donde objetivamos las diferencias existentes entre ambos tratamientos de superficie. Podemos ver cómo las diferencias entre las rugosidades de superficie se aprecian sobretodo en el momento en el que pasamos al espectro de los nanómetros, lo que nos da una idea del tamaño del patrón creado, ya que las ondas generadas tienen una frecuencia de 780 nm. Vemos que en la superficie a parte de las LIPSS se crean microesferas como resultado del depósito de gotas de material fundido tras el tratamiento láser (45). Estas estructuras que recuerdan un poco a la formación de nanopilares no van a condicionar la respuesta celular, ni van a ser determinantes en la osteointegración, ya que por el tamaño que representan no van a ser reconocidas por la célula (11, 32). Son estructuras secundarias en la creación de las LIPSS.



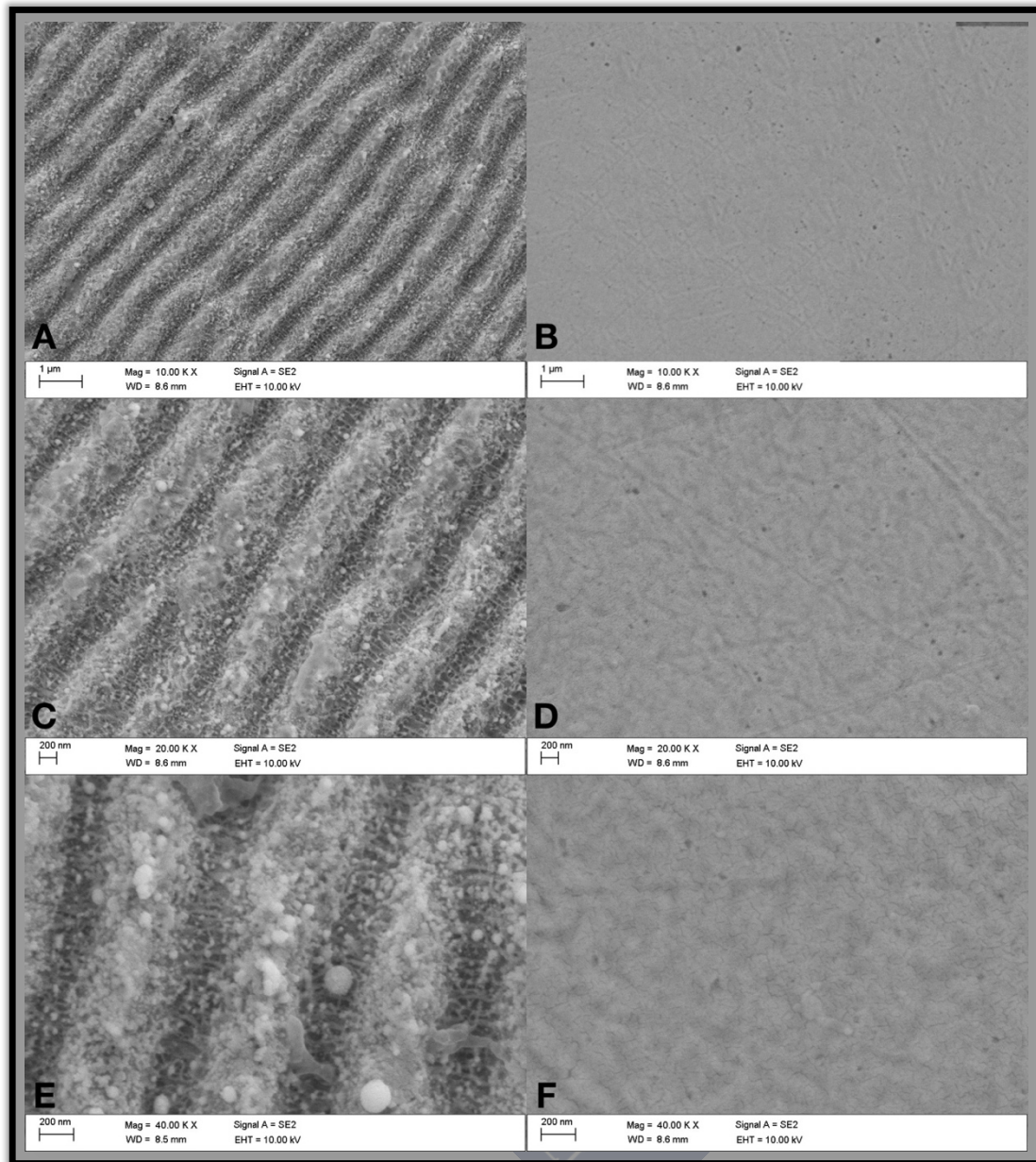


Figura 52: Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido de tantalio. Las imágenes A, C Y E muestran las LIPSS a 10.000, 20.000 y 40.000 aumentos respectivamente, mientras que las B, D y F muestran la superficie lisa en el tantalio a 10.000, 20.000 y 40.000 aumentos.

En la imagen superior (figura 52) podemos ver a diferentes aumentos las dos superficies creadas sobre el tantalio. Al igual que ocurre con las de titanio vemos la creación de microesferas en la superficie como resultado del depósito de gotas de material fundido tras el tratamiento láser (45).

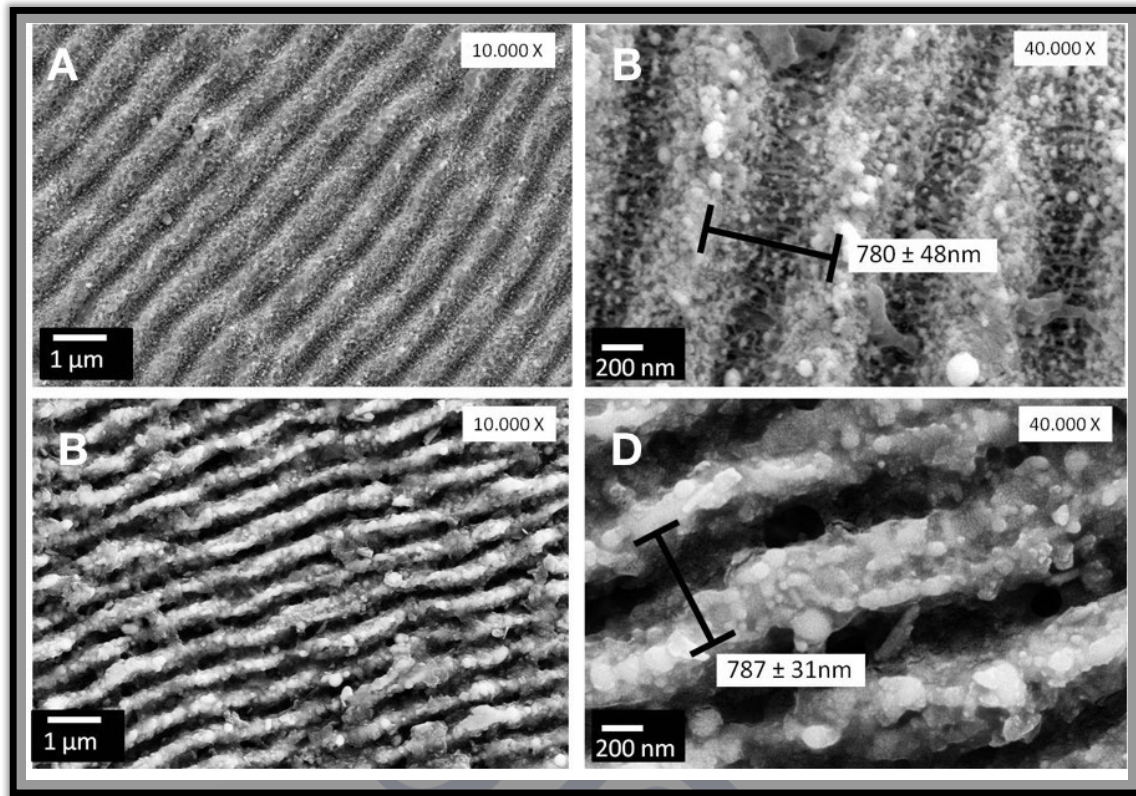


Figura 53: Se muestra a 10.000 aumentos el periodo generado en LIPSS en titanio y tantalio. A y B LIPSS en tantalio y, B y C LIPSS en titanio.

Podemos ver cómo existen diferencias en los periodos de las LIPSS del titanio y el tantalio (figura 53), y también en la profundidad, como demuestran los estudios con SEM y AFM. Estas variantes entre los materiales, será parcialmente responsables del diferente comportamiento entre el titanio y el tantalio.

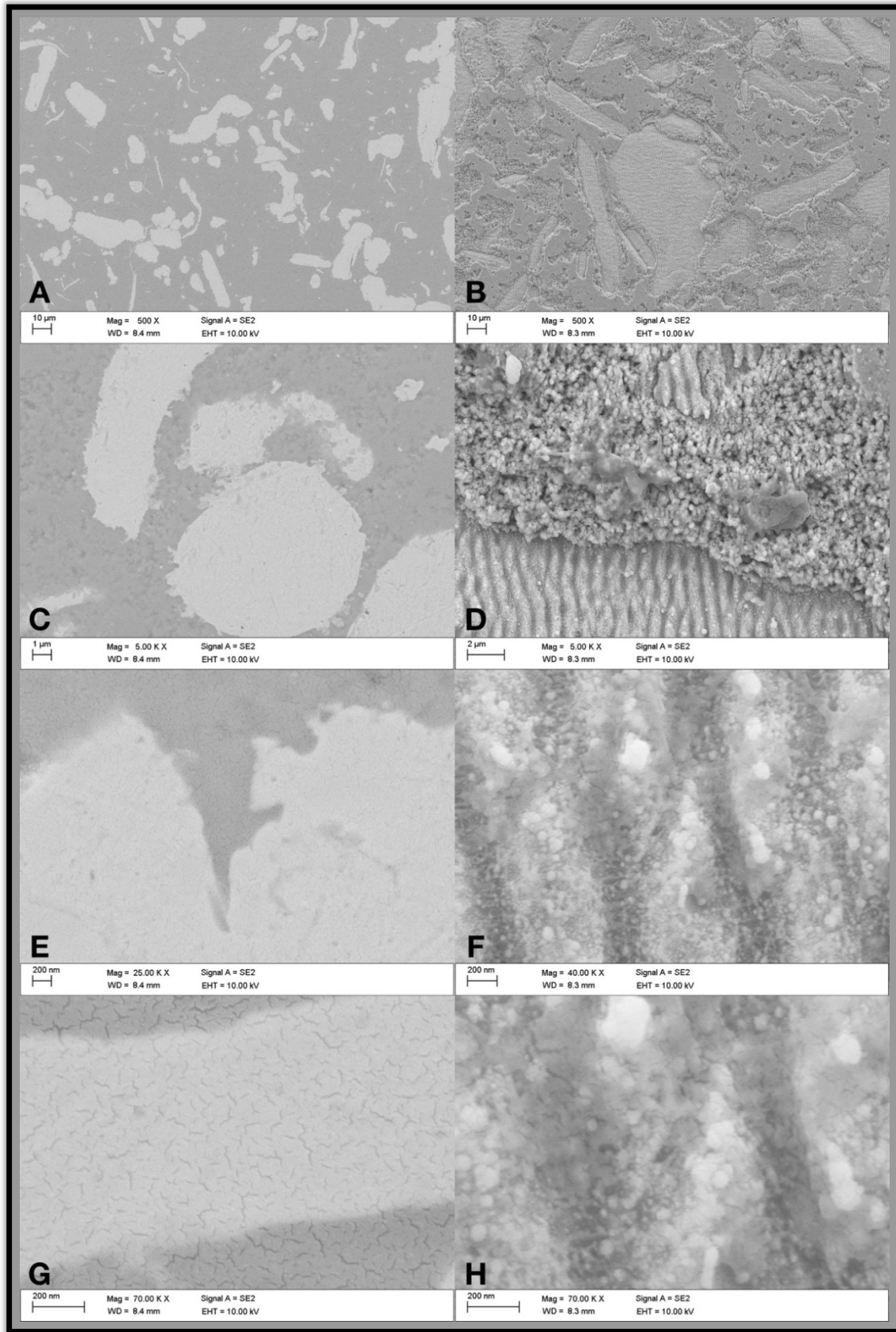


Figura 54: Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido del cermet. Las imágenes A, C, E y G muestran una superficie lisa a 500, 5.000, 25.000 y 70.000 aumentos respectivamente, mientras que las B, D, F y H muestran LIPSS creadas en el cermet a 500, 5.000, 40.000 y 70.000 aumentos.

Se evidencia la diferencia generada entre ambos tipos de tratamiento (figura 54). En las superficies pulidas existe una transición uniforme y una estructura homogénea mientras que en la superficie tratada con láser vemos cambios de transición entre materiales más abruptos (figura 55), como demuestra en mayor medida la imagen. De esta forma en la parte del metal nos encontramos con la creación de LIPSS al igual que ocurriría en el titanio o tantalio, pero en cambio en la zona de la cerámica se genera un patrón que recuerda a las nanopilares que se producen al modificar los parámetros del láser en metales (11, 32). Este cambio en la textura va a ser uno de los principales condicionantes de la respuesta celular a la superficie, lo que arrojará diferentes resultados de osteointegración de los cermets frente a los metales.

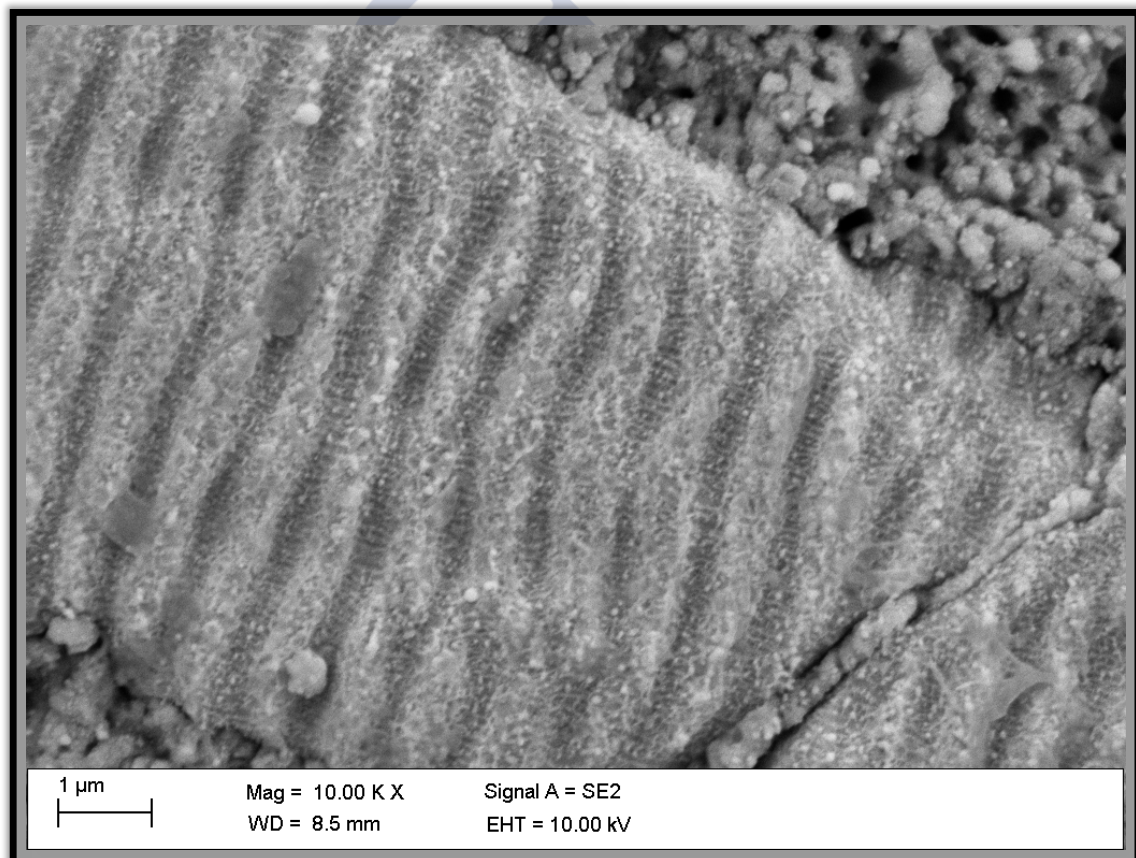


Figura 55: Muestra la transición entre el metal y la cerámica con más detalle. En el centro de la imagen vemos las LIPSS sobre el metal y en la periferia unas estructuras que recuerdan a los nanopilares.

### Imágenes y datos obtenidos mediante microscopio de fuerza atómica

Las siguientes imágenes (figura 56) muestran las diferencias encontradas mediante el estudio con microscopía de fuerza atómica. En la gráfica se muestran la profundidad de las superficies y el valor de la rugosidad (Ra). En la superficie lisa es bajo dado que no existe rugosidad en el material, sin alcanzar el punto óptimo que favorece la diferenciación osteoblástica (11, 46). Por debajo de diferencias de 70-75 nm las células no llegan a interpretar la topografía y la superficie puede llegar a favorecer la adipogénesis en vez de la osteogénesis (46). A efectos celulares el material se comporta como liso en el espectro nanométrico. En las LIPSS vemos además un periodo de las ondas generadas de  $780 \pm 48$  nm y una profundidad de los surcos de  $256 \pm 7$  nm (tabla 16).

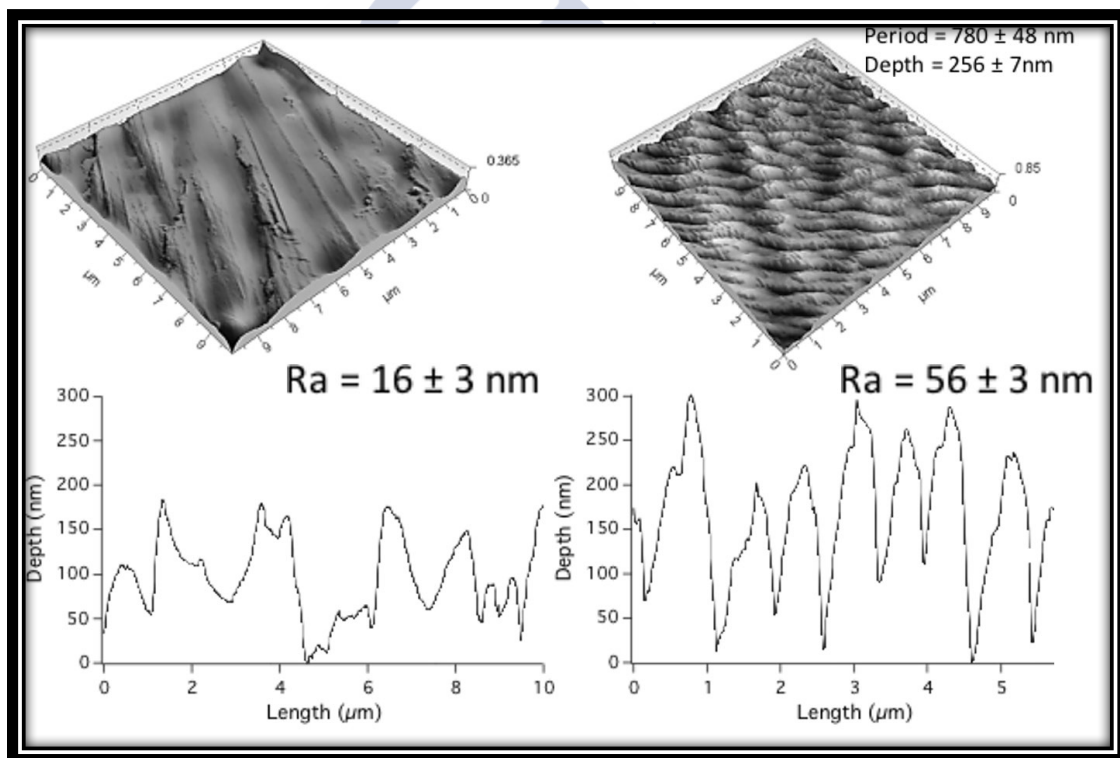


Figura 56: Imagen obtenida por microscopía de fuerza atómica a una superficie pulida a la izquierda y a la derecha una estructura periódica inducida por láser en tantalio. En la zona inferior una gráfica demuestra la rugosidad de cada superficie.

Tabla 16: Valores obtenidos por la MFA para las superficies de titanio y tantalio tanto liso como rugosos. En las LIPSS se especifican las características de las estructuras periódicas.

	<b>Tantalio</b>	<b>Titanio</b>
	<b>Superficie Pulida</b>	
<b>Rugosidad, Ra (nm)</b>	16 ± 3 nm	15 ± 3 nm
	<b>LIPSS</b>	
<b>Rugosidad, Ra (nm)</b>	56 ± 3 nm	49 ± 2 nm
<b>Periodo (nm)</b>	780 ± 48 nm	787±31nm
<b>Profundidad (nm)</b>	256 ± 7nm	250±12nm

#### Estudio mediante ángulo de contacto

Estudiamos cómo el tratamiento láser modifica la humectancia de la superficie del titanio y tantalio. Para ello realizamos la medición del ángulo de contacto en diferentes puntos de la muestra, y tomamos el valor medio de las diferentes mediciones a la izquierda y a la derecha. El valor final se acepta como media de los dos valores (tabla 17 y figura 57). Como ya explicamos en la introducción la manipulación con láser para generar LIPSS puede incrementar la hidrofobicidad a la vez que mejorar la adhesividad a través del fenómeno del pétalo de rosa.

Tabla 17: Valores medios del ángulo de contacto para las diferentes superficies metálicas estudiadas.

Material	Derecha	Izquierda	Media
Titanio liso	74	76	75
Tantalio liso	76	78	77
Titanio LIPSS	135	131	133
Tantalio LIPSS	132	128	130

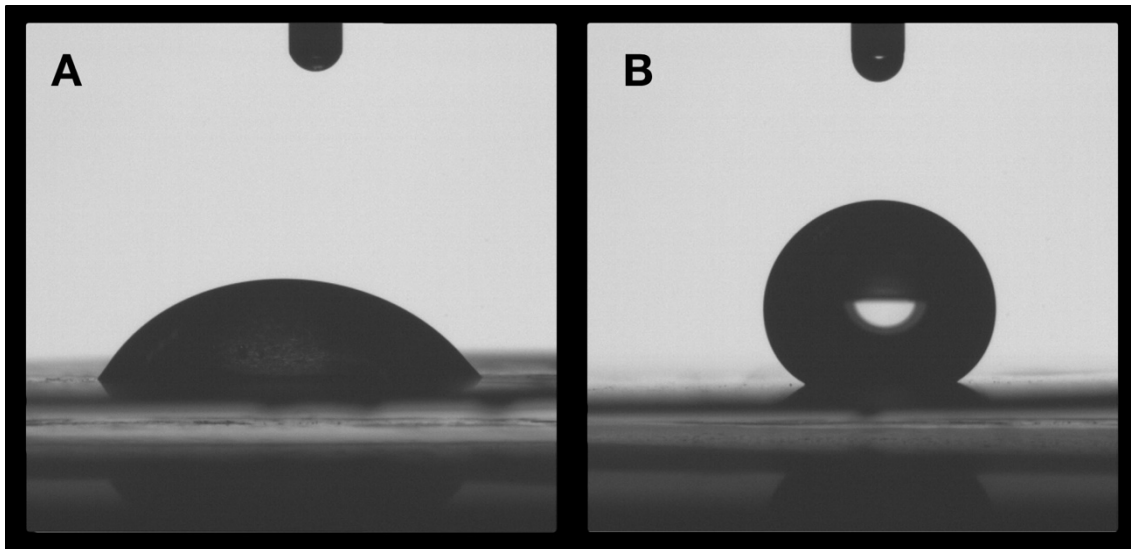


Figura 57: Comportamiento de la gota al contacto con en el titanio antes y después del tratamiento mediante LIPSS.

Realizamos un estudio mediante cálculo del ángulo de contacto para conocer cómo la modificación de la potencia láser va a afectar al cermet, por los fenómenos de transformación que genera en la superficie de los mismos. Para ello seleccionamos 4 discos. Uno como control, en otro aplicamos el láser a una potencia de 0,05 W, en otro una potencia de 0,1 W y en el último una potencia de 0,2 W. Tras tratar todos los discos con los mismos parámetros láser salvo la potencia vimos el comportamiento del cermet en términos de hidrofobicidad (figura 58 y 59).

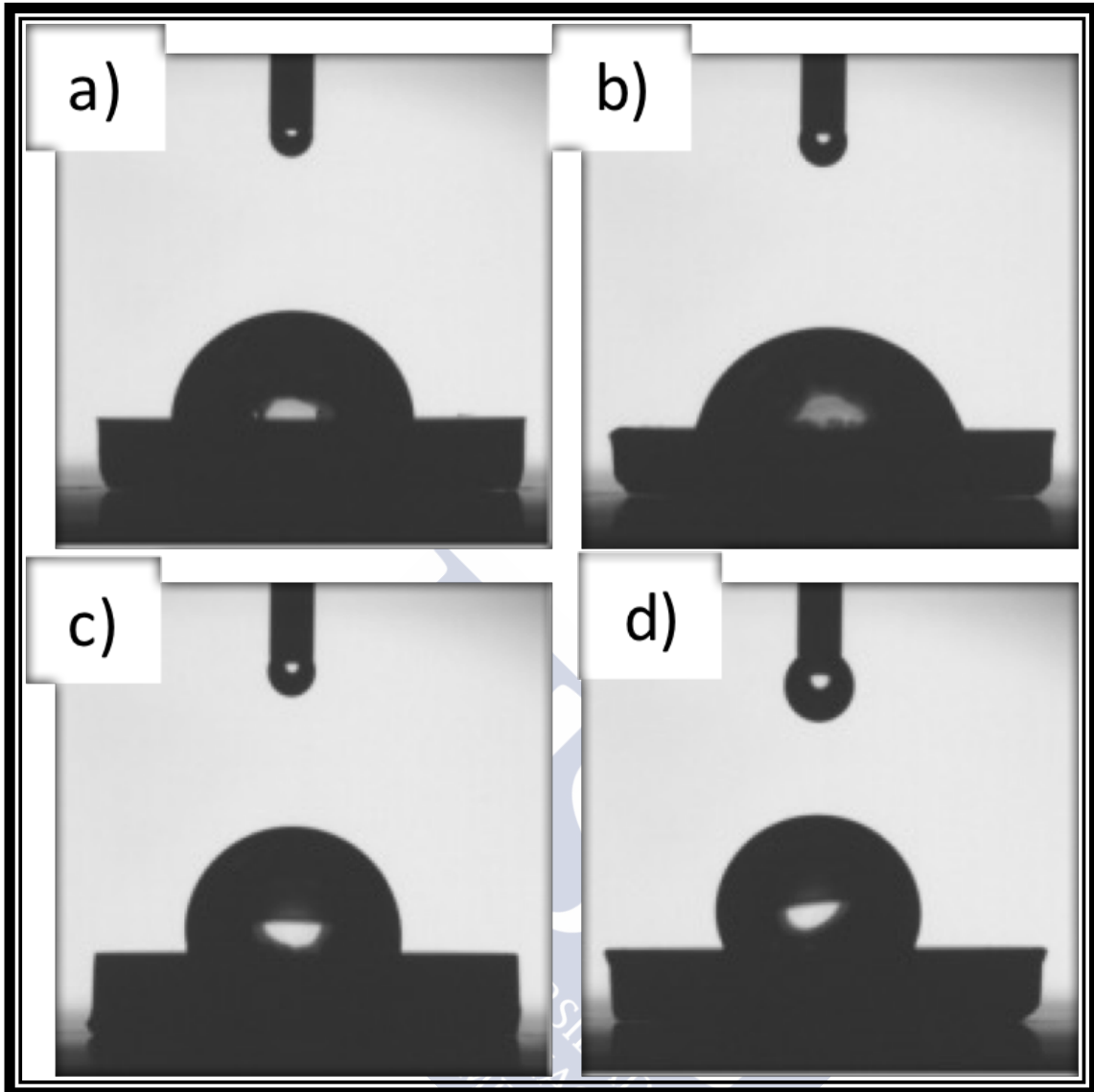


Figura 58: Vemos el comportamiento del cermet tratado con diferentes potencias de láser: a) el control sin tratar, b) 50 mW, c) 100 mW y d) 200 mW. El tratamiento con 50mw disminuye la hidrofobicidad mientras que los tratamientos de mayor potencia claramente la incrementan.





	Izquierda	Derecha	Media	
<b>ZrO<sub>2</sub>-NB 0.2W</b> <i>Sin tratar</i>	88.05	87.64	87.84	
			<b>87.84</b>	
	Izquierda	Derecha	Media	
<b>ZrO<sub>2</sub>-NB 0.05W</b>	74.67	70.11	72.39	
			<b>72.39</b>	
	Izquierda	Derecha	Media	
<b>ZrO<sub>2</sub>-NB 0.1W</b>	112.81	113.68	113.25	
	93.86	91.87	92.86	
	98.14	95.63	96.89	
	104.55	101.27	102.91	
			<b>101.48</b>	
	Izquierda	Derecha	Media	
<b>ZrO<sub>2</sub>-NB 0.2W</b> <i>Tratadas</i>	114.24	112.10	113.17	
	114.95	111.75	113.35	
			<b>113.26</b>	

Figura 59: Muestra los datos medios obtenidos para el ángulo de contacto del cermet mediante el tratamiento con diferentes potencias de láser.

### Imágenes de microscopía confocal

Aprovechando la fluorescencia celular inducida en las células mesenquimales estudiamos cómo éstas se comportaban sobre las LIPSS, y también estudiamos con detenimiento el comportamiento de las mismas en la zona de transición del cermet.

Tenemos que tener en cuenta que, a diferencia del cultivo celular en placas de cristal, el metal y la cerámica producen cierto grado de refringencia que va a interferir en la calidad de las imágenes obtenidas.

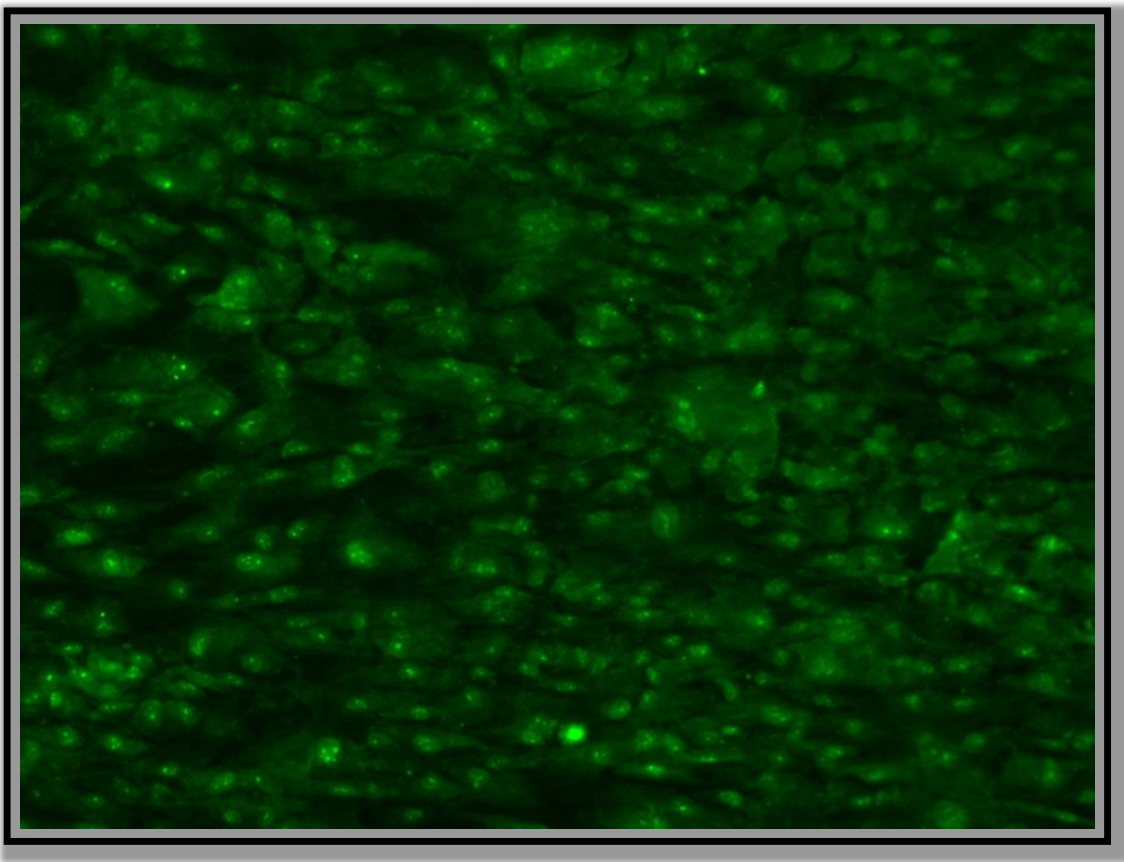


Figura 60: Imagen de microscopía óptica que muestra la orientación de las células mesenquimales a 10 aumentos adheridas en la zona de transición entre el metal y la cerámica en los cermets. En la parte inferior y derecha se puede apreciar una polarización celular que no se observa a nivel superior. Esta polarización aparece en las zonas donde hemos creado LIPSS.

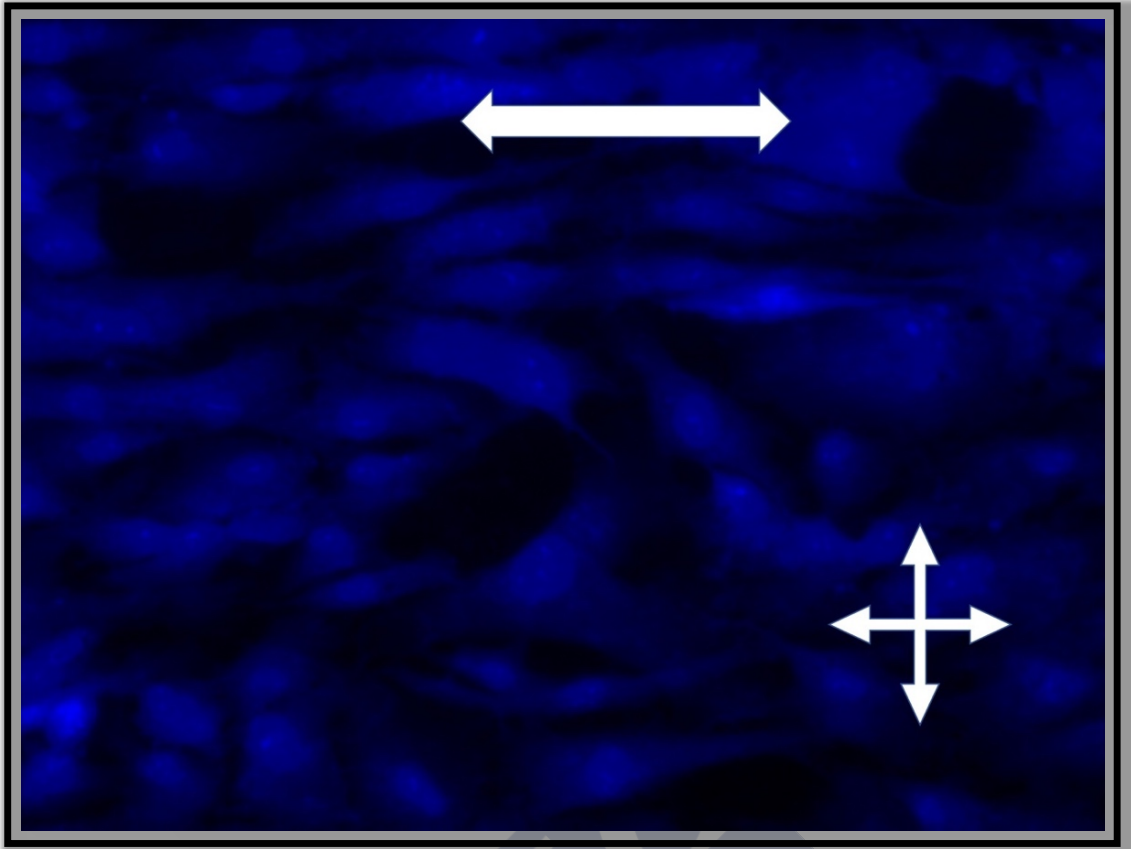


Figura 61: Imágen de microscopía óptica en la que se aprecia a 20 aumentos la transición entre la cerámica y el metal en el cermet. En la parte superior las células se orientan en una misma dirección (las LIPSS) como indica la flecha bidireccional, mientras que en la parte inferior ese comportamiento no existe (la cerámica sin LIPSS) como indica la flecha multidireccional.

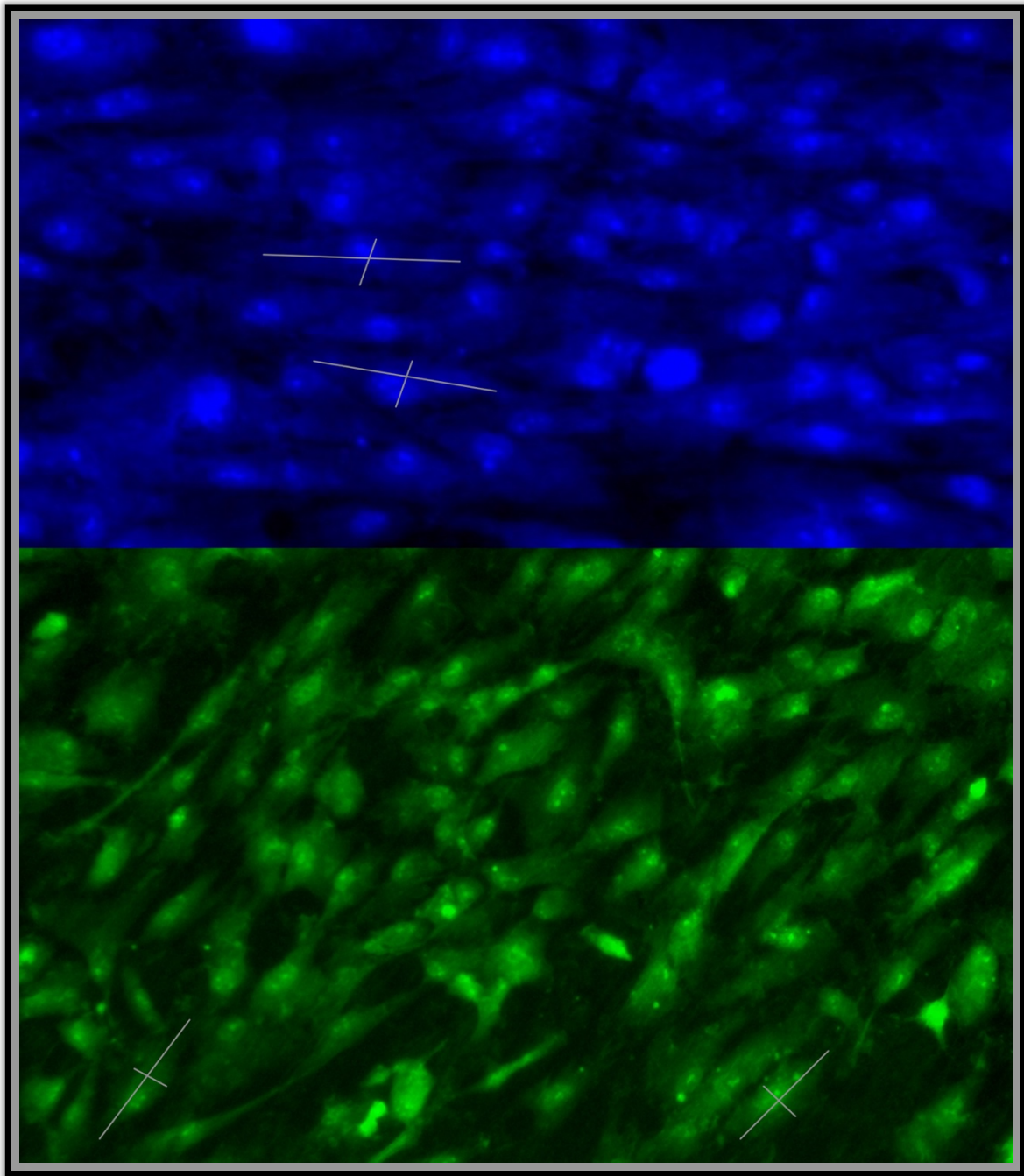


Figura 62: Imágenes de microscopía óptica a 20 aumentos en la que se aprecia la polarización celular en LIPSS en una superficie de tantalio, con un eje mayor muy superior al menor.

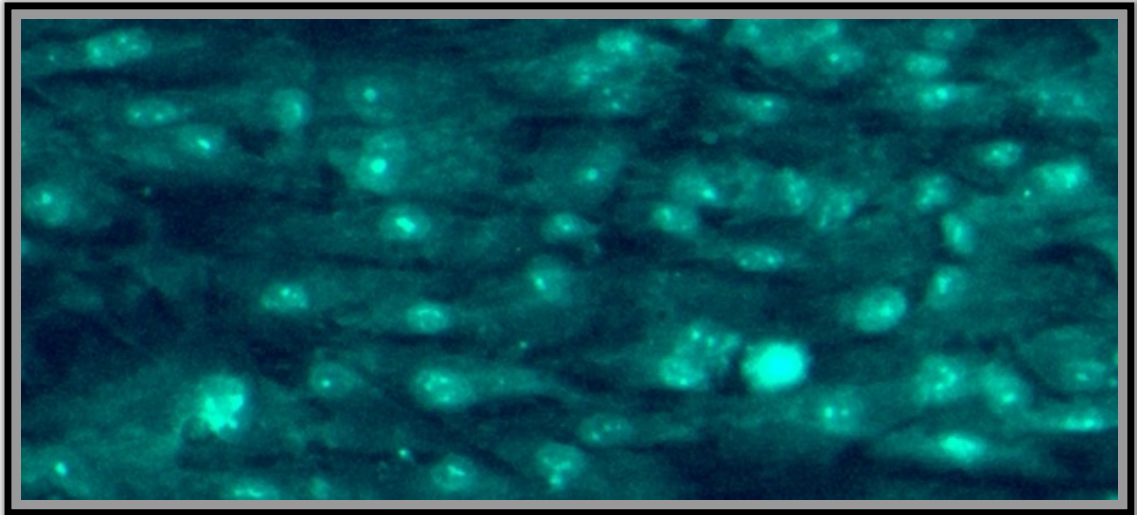


Figura 63: Imagen de microscopía óptica a 20 aumentos en la que volvemos a ver la polarización celular generada por las LIPSS en titanio.

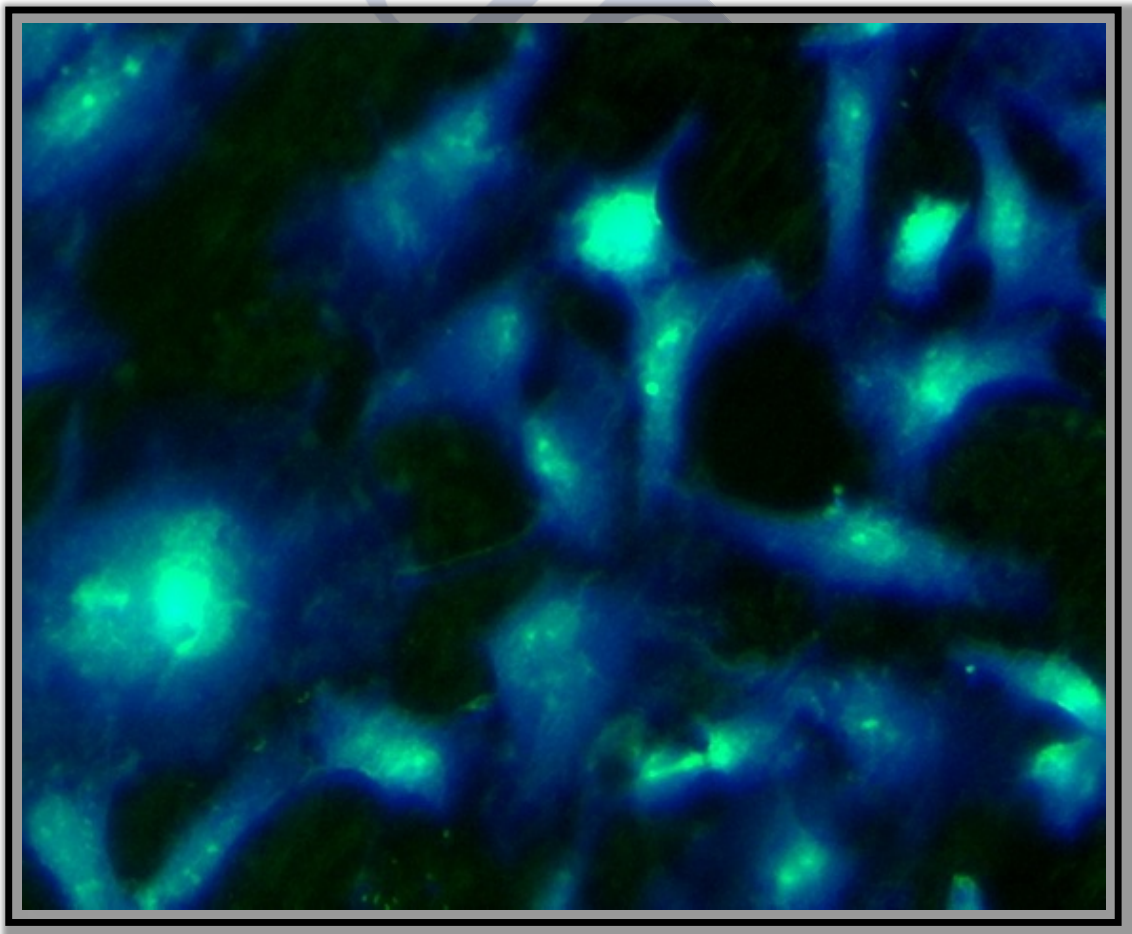


Figura 64: En esta imagen de microscopía óptica a 20 aumentos vemos cómo las células en una superficie pulida no se orientan de forma uniforme.

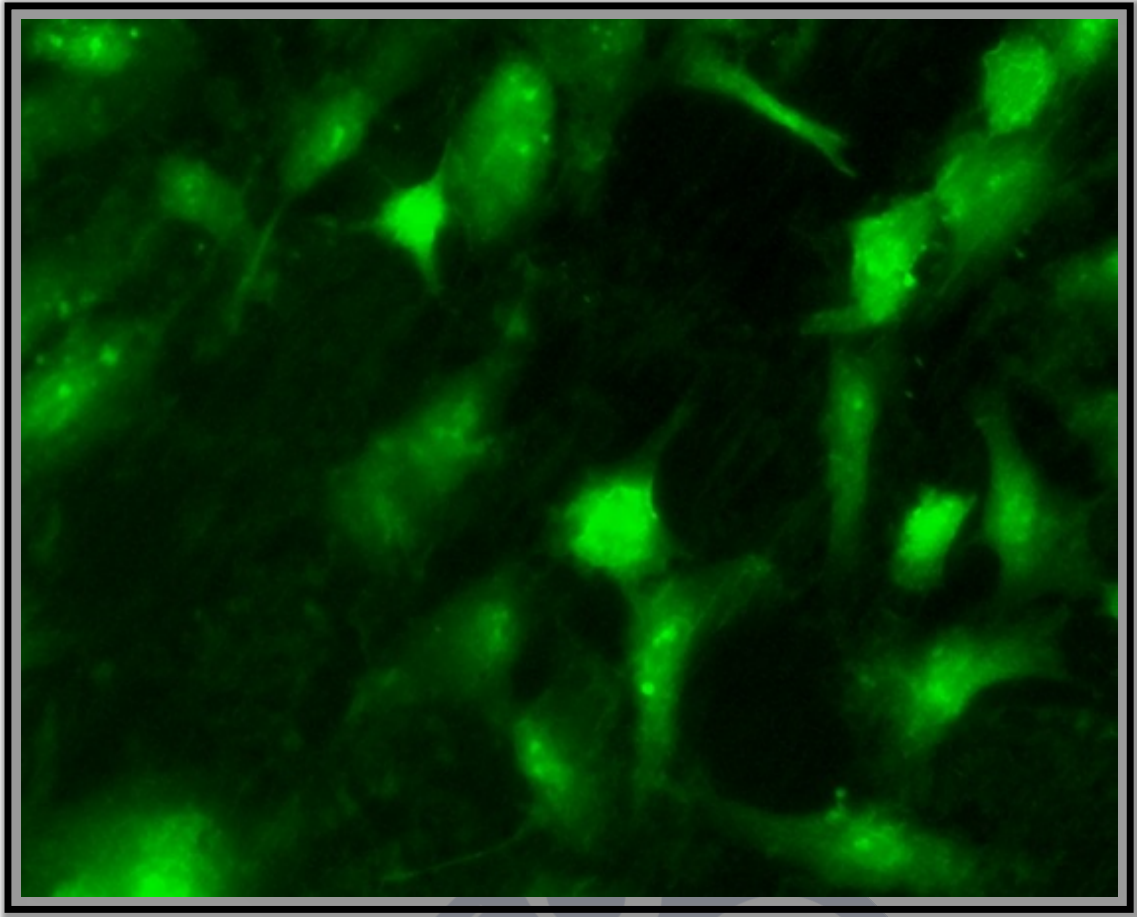


Figura 65: Imágen de microscopía óptica a 20 aumentos donde vemos las células adheridas sobre una superficie lisa de tantalio sin una orientación específica.

Las imágenes de microscopía óptica demuestran la polarización que generan las LIPSS en las células mesenquimales, alcanzando una orientación que asemeja a la del hueso vivo. En cambio, en las superficies lisas y en las que no se genera el LIPSS (cerámica tratada y no tratada) vemos que las células se esparcen y crecen sin un eje definido.

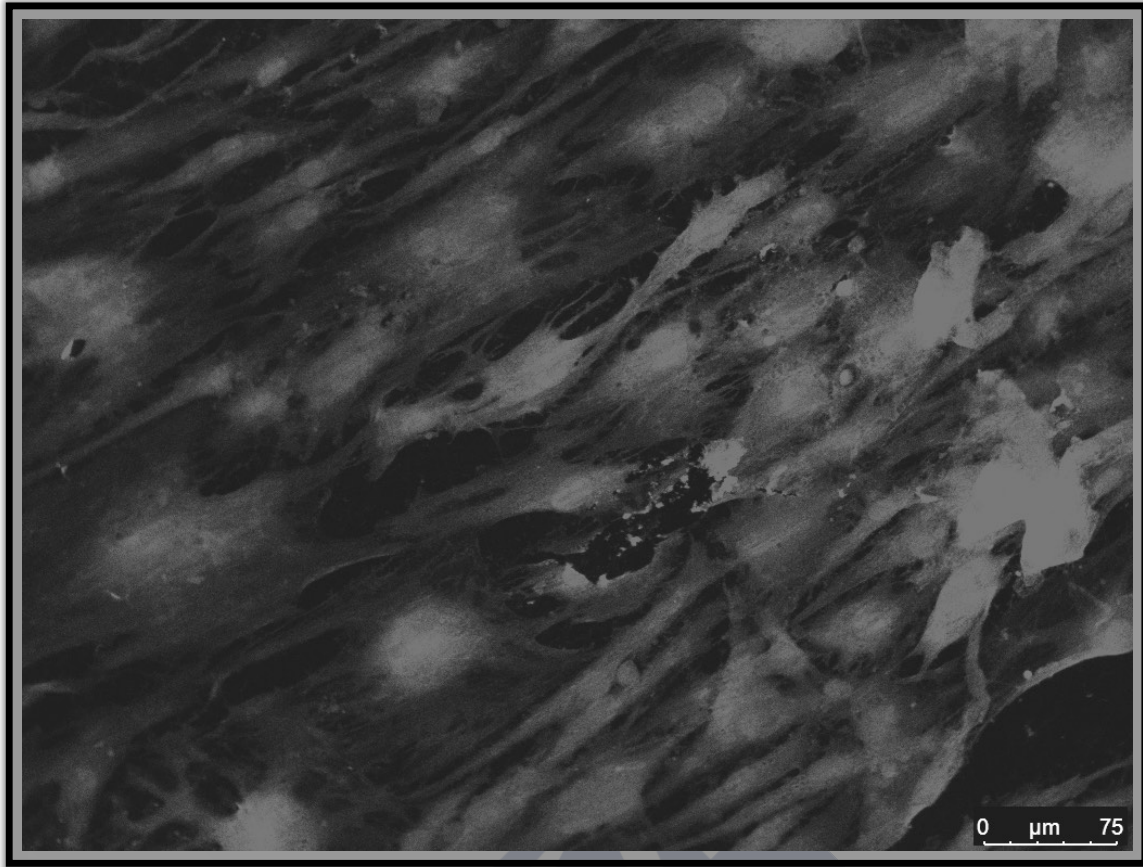
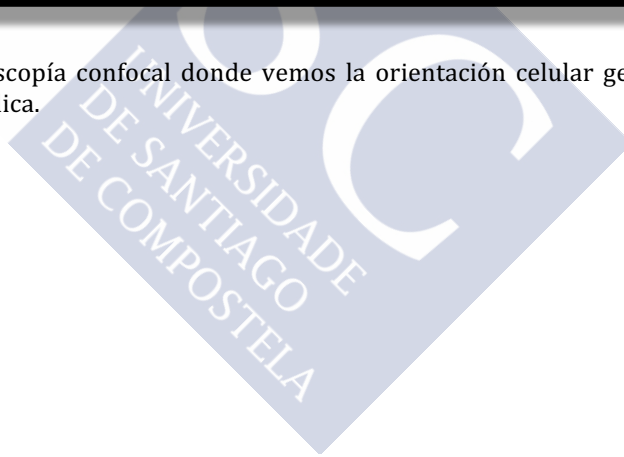


Figura 66: Imagen de microscopía confocal donde vemos la orientación celular generada por las LIPSS en una superficie metálica.





## Discusión

Cuando estudiamos la implantación del láser con pulsos ultracortos en el ámbito biomédico, vemos que lleva años empleándose, obteniendo casi 8.000 referencias cuando introducimos los términos “(femtosecond) AND laser” en el motor de búsqueda Pubmed con base Medline. Vemos también cómo la producción científica en esta materia aumenta de forma progresiva como muestra la gráfica inferior (figura 67).

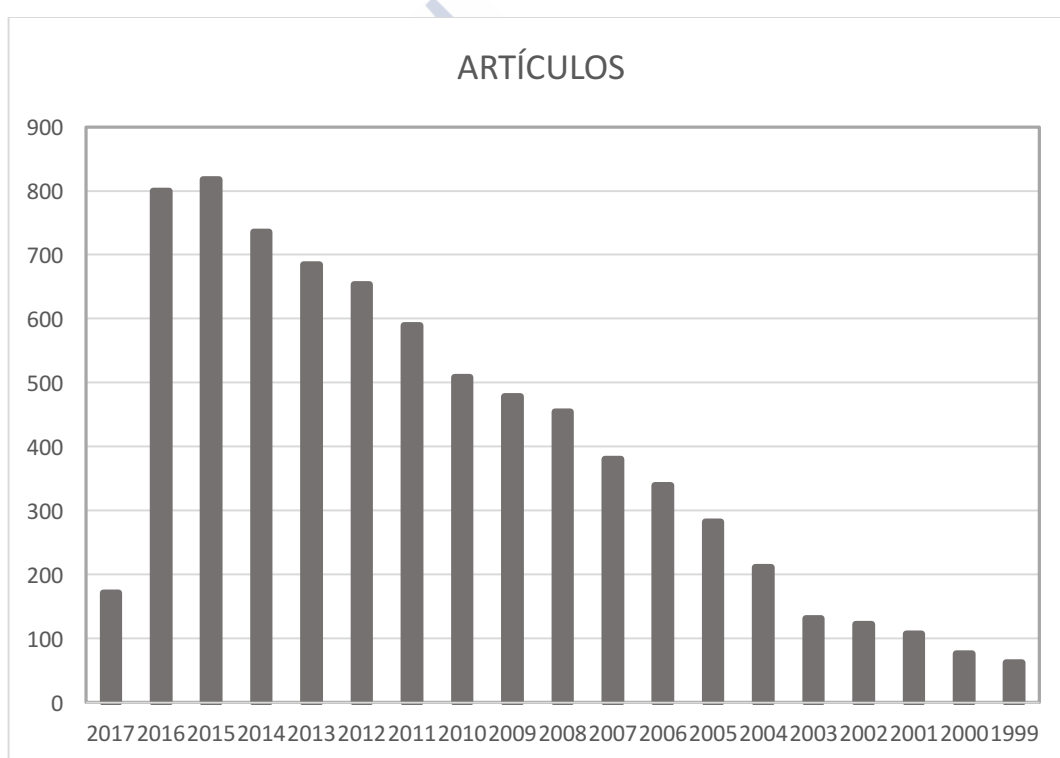


Figura 67: Muestra los resultados obtenidos por años el número de publicaciones para los términos “(femtosecond) AND laser” en el motor de búsqueda Pubmed con base Medline.

Cuando nos centramos en la aplicación de estos láser a los metales con fines biomédicos, mediante la creación de LIPSS, y buscamos el término “LIPSS” en el motor de búsqueda Pubmed obtenemos únicamente 52 referencias a mayo de 2017. Todas estas publicaciones son recientes, con un incremento de las mismas en los últimos años (figura 68), lo que nos indica el interés progresivo en estos tratamientos.

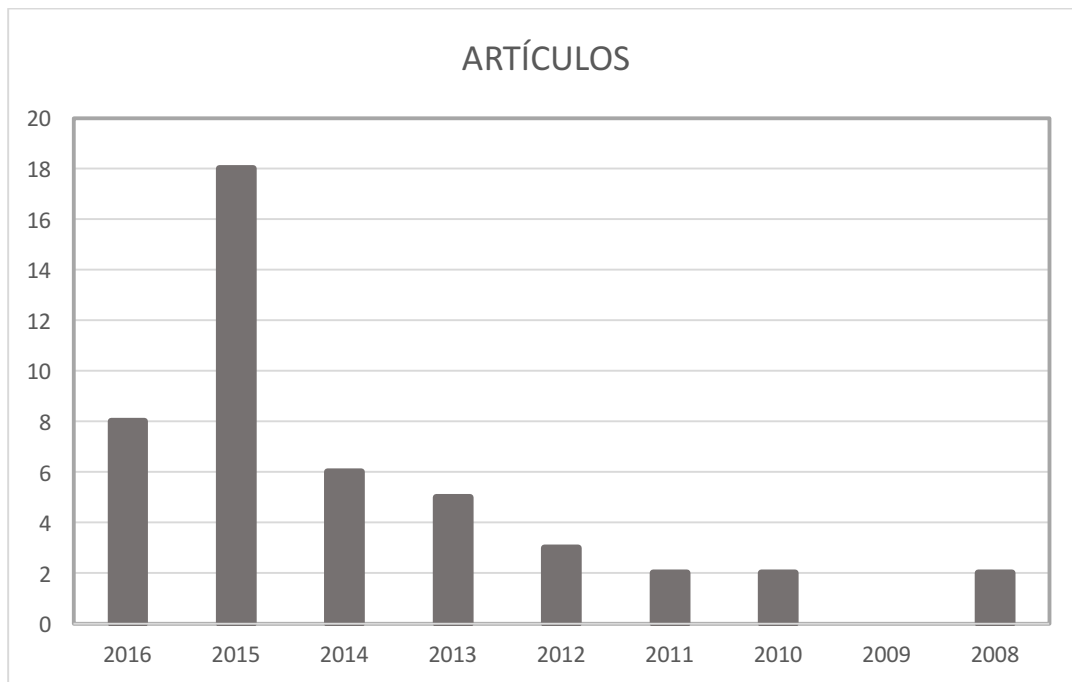


Figura 68: Muestra los resultados obtenidos por años el número de publicaciones para el término "LIPSS" en el motor de búsqueda Pubmed con base Medline.

La mayoría de estas publicaciones se centran en la creación de LIPSS en titanio (Ti6Al4V) para incrementar sus propiedades biológicas, aunque también vemos un interés creciente en su empleo en otros materiales para diferentes usos al ortopédico (modificación de stents para uso endovascular (36)) así como su uso con el fin de condicionar las propiedades tribológicas de las superficies metálicas. No tenemos constancia de su creación en tantalio y en un cermet para su caracterización física y el estudio del comportamiento biológico "in vitro" de las mismas.

Hemos estudiado la actividad celular a través del ensayo de reducción de la MTT, que es un reflejo de la actividad celular, o de su división o proliferación. El uso de este marcador en el estudio de superficies de biomateriales como el titanio, está ampliamente extendido (47). En nuestro caso hemos obtenido un incremento en el ensayo MTT para las superficies tratadas por láser tanto en titanio como en tantalio antes del día 20. En cambio, para el cermet no vemos esta diferencia, y los valores de MTT no muestran diferencias en ningún punto de control. Este diferente comportamiento puede tener su origen en la forma en la que el láser

actúa distinto en metales frente a la cerámica. En los metales la alta densidad de electrones libres favorece la creación de las LIPSS, en cambio en las cerámicas, esta alta densidad de electrones no se encuentra y da lugar a fenómenos de ablación y transformación, generando una estructura completamente diferente a la periódica creada en los metales. En el cermet encontramos pequeñas islas metálicas, y estas áreas van a desarrollar LIPSS sobre ellas, pero al constituir sólo parte de la superficie, el efecto alcanzado por las mismas no es de la cuantía de los metales y por ello no vemos diferenciación estadísticamente significativa. Además, como ya mencionamos antes, en la superficie de la cerámica dada la alta energía del láser se va a generar un fenómeno de transformación que lleva a la expansión de la cerámica cambiando sus propiedades que pueden influenciar negativamente en el comportamiento celular (figura 69).

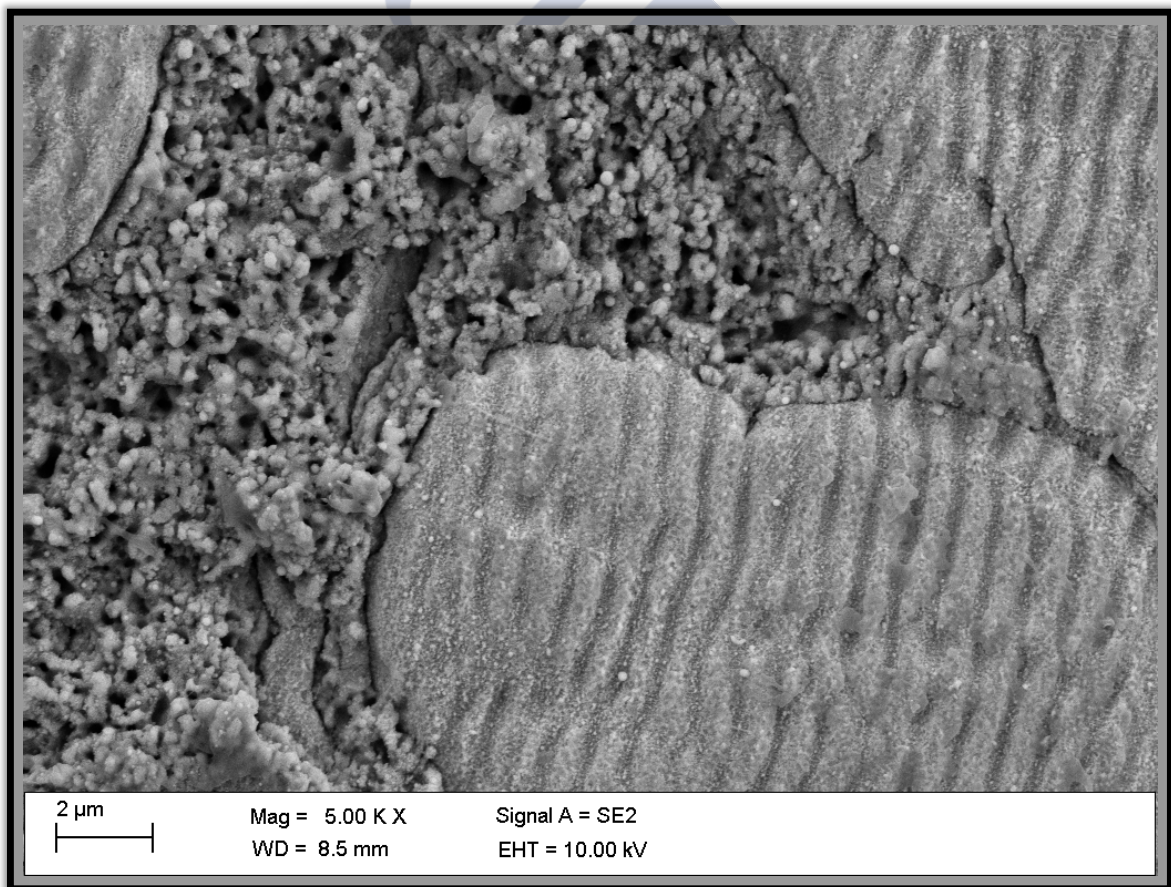


Figura 69: Vemos magnificada a 5.000 aumentos la cerámica en una zona de transición, y se aprecia el aumento de volumen en superficie y la caracterización física generada por la transformación en la cerámica en relación a la superficie metálica.

Estos cambios van a ser los responsables del comportamiento característico de los cermetos tratados. Posiblemente sea necesario adaptar la potencia del láser para evitar este fenómeno de transformación en los materiales en los que busquemos osteointegración, y aumentarlo en los que queremos el efecto contrario. Las figuras 58 y 59 muestra la imagen de microscopía electrónica de una superficie cerámica tratada con diferentes potencias de láser. A bajas potencias observamos como la hidrofobicidad se minimiza, pero a medida que aumentamos la potencia del láser ésta favorece la hidrofobicidad, lo que puede limitar la adhesión y proliferación celular.

Es también digno de mención el fenómeno que encontramos al día 20 del estudio, en el que las superficies pulidas y tratadas muestran valores semejantes en el ensayo MTT en metales. Este fenómeno creemos que se produce por la limitación física en la superficie del disco, lo que genera que las células en división en el momento que alcanzan la confluencia se inhiban, y además los procesos de división y de mayor actividad metabólica se producen en los primeros días de la diferenciación celular (48).

En los materiales tratados hemos estudiado la respuesta inflamatoria a través de dos citoquinas, la interleucina 6 y el factor de necrosis tumoral alfa. Cuando revisamos la bibliografía en busca del efecto de los cambios de superficie con la inflamación, vemos que hay varios trabajos que siembran células proinflamatorias con los macrófagos y demuestran que en superficies tratadas con láser en las que se generan patrones del espectro nanométrico, se generan menos citoquinas proinflamatorias, incluso llegando a producir IL-4 e IL-10 con efecto antiinflamatorio (49, 50). En nuestro caso no hemos cultivado células proinflamatorias, sino que hemos estudiado la respuesta de las células mesenquimales al nuevo material, y cómo estas generarían citoquinas proinflamatorias en respuesta al mismo. Hemos demostrado que las modificaciones de las superficies no alteran la respuesta de las células mesenquimales al metal, manteniendo niveles de inflamación casi indetectables. Si a ello sumamos el efecto antiinflamatorio que generará el patrón nanométrico en las células macrofágicas, conseguiríamos de forma neta disminuir la respuesta inflamatoria al implante. Esto puede llegar a tener repercusión en la tasa de infecciones, ya que parece ser que, asociado a la disminución de la respuesta

inflamatoria en las nanoestructuras, se asocia una disminución de la colonización por bacterias (35). Recientemente se está estudiando cómo los “debris” de titanio pueden condicionar un incremento de la respuesta inflamatoria, y la misma parece que es mediada por la interleucina 8, ya que encontramos valores parejos de interleucina 6 en estos estudios y valores del resto de marcadores proinflamatorios casi indetectables y sólo se elevan los de IL-8 (51). Esta inflamación mediada por IL-8 sería únicamente dependiente de las células mesenquimales y podría ser determinante en los aflojamientos a largo plazo. Sería interesante estudiar si a largo plazo la generación de LIPSS pueden llegar a disminuir la generación de “debris” y disminuir la reacción autoinflamatoria para no alterar la osteointegración de los implantes.

Ya hemos visto que la creación de un entorno favorable para los osteoblastos puede acelerar el desarrollo de los mismos. Cuando estudiamos la matriz extracelular, sabemos que el colágeno es su proteína principal y el estudio de las proteínas totales es un indicador indirecto pero muy fiable de la producción en la matriz extracelular de colágeno. Sabemos que la producción de colágeno a nivel celular alcanza un pico a los 3 días, pero que su secreción a la matriz extracelular no alcanza un pico hasta los 7 días (52). Una vez alcanzado este pico la producción decae. Esta matriz es el primer paso para el depósito de minerales y la maduración del tejido óseo. En nuestro caso hemos encontrado que la producción de matriz extracelular parece adelantarse en las superficies metálicas en las que hemos generado LIPSS, y se aprecia un claro incremento en las primeras dos semanas, de forma estadísticamente significativa. Posteriormente esta diferencia tiene una tendencia a desaparecer por la propia autolimitación en la creación de la matriz extracelular. El cermet en cambio muestra una generación más tardía en ambas superficies, quizás en relación a la menor proliferación observada, lo que limitaría temporalmente la producción de matriz extracelular. Estudios recientes demuestran además que la matriz extracelular va a presentar un comportamiento diferente sobre las LIPSS. Al entrar en contacto con las ondas periódicas generadas en la superficie del metal, la matriz extracelular se va a orientar, guiando a la célula y generando un patrón y una polarización celular (que vemos en las imágenes de microscopía óptica y confocal) (24). Este va a ser uno de los puntos diferenciales de las LIPSS en metales con el resto de tratamientos de superficie.

A la hora de estudiar la diferenciación osteoblástica buscamos un incremento en la expresión de fosfatasa alcalina que se vea respaldado por un aumento importante pasados 10 días en osteocalcina y osteopontina, que refuerzan la idea de que la diferenciación osteoblástica es mantenida y llevará a las células mesenquimales a diferenciarse a osteoblastos maduros (48). La osteopontina podemos encontrarla en pre-osteoblastos, pero la alta producción conjunta con osteocalcina ya es más indicativa de la presencia de osteoblastos maduros. En el caso de los metales estudiados, tanto el titanio como el tantalio demuestran un incremento de fosfatasa alcalina estadísticamente significativo en los primeros 10 días (el pico de fosfatasa alcalina se alcanza a los 7 días). El incremento de fosfatasa alcalina es más significativo cuando la diferenciación osteoblástica se continua con los incrementos de osteocalcina y osteopontina (figura 70). En nuestro caso esto ocurre de forma estadísticamente significativa en los 2 metales. Esto aporta evidencia de que la diferenciación se lleva hasta sus últimas fases, obteniéndose osteoblastos maduros sobre la superficie del metal. Las siguientes gráficas muestran un resumen de los resultados obtenidos en los ensayos de diferenciación osteoblástica para titanio y tantalio. Esto concuerda con hallazgos de otros autores que demuestran que con la creación de nanoestructuras en superficie favorecemos la diferenciación osteoblástica frente a la adipogénica de forma importante en células mesenquimales (32).

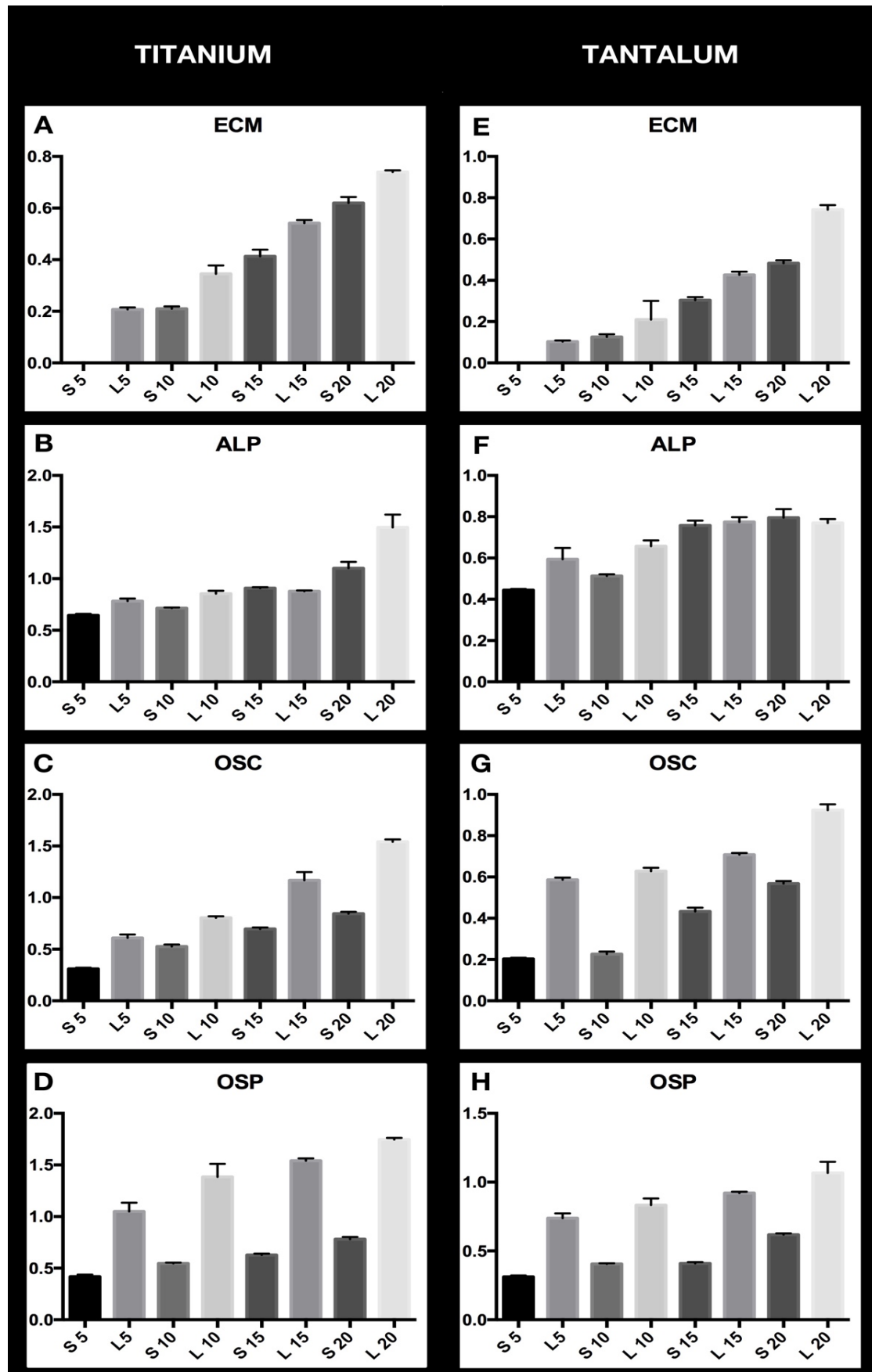


Figura 70: Muestran un diagrama de barras para los resultados obtenidos en las superficies de titanio y tantalio en los ensayos de diferenciación osteoblástica y ECM.

Cuando analizamos los resultados del cermet nos encontramos con resultados diferentes en relación a los metales. Podemos afirmar que sí que se produce de forma significativa un incremento de los patrones que indican diferenciación osteoblástica, pero el incremento con el tiempo es menos llamativo que en los metales. Este hecho puede volver a estar en relación con los fenómenos de transformación generados por el láser en la cerámica. Los mismos al disminuir la proliferación y adhesión celular, impiden el incremento exponencial que vemos en los metales. Es probable que el responsable final del aumento de la diferenciación osteoblástica en los cermets sea el propio metal de superficie, y la cerámica tenga un papel secundario en la diferenciación. Además, la respuesta parece ser más tardía, lo que concuerda con la teoría que afirma que un entorno favorable no sólo incrementa, sino que acelera la diferenciación celular, y en este caso, el entorno es menos favorable que el generado sobre los metales. El incremento de celularidad encontrado en los estudios de microscopía óptica de fluorescencia en la zona del metal, y la orientación celular, en comparación a la observada en la zona de la cerámica parecen confirmar estos hallazgos.

A la hora de revisar las imágenes obtenidas mediante el cultivo celular en los discos, nos encontramos con hallazgos que se superponen a los obtenidos por otros autores, en los que se demuestra una clara polarización celular, con un cociente entre eje mayor y menor que en algún caso llega a ser superior a 2 (24, 32). Las imágenes que obtuvimos mediante microscopía óptica y confocal concuerdan con estos hallazgos, y demuestran que, en las superficies periódicas creadas por láser de femtosegundos de duración en metales, se crea una polarización celular llamativa. Esta polarización como bien describieron Matsugati y colaboradores en 2015, está en relación a una adherencia ordenada de la matriz extracelular sobre las rugosidades generadas. Esta organización anisotrópica de la matriz extracelular permite a la célula orientarse y polarizarse. Ellos estudian además esta polarización con un control nanométrico de nanopilares, y ven cómo son las ondas generadas en el metal las responsables de esta orientación, y no la estructura nanométrica. Este efecto lo demuestran en Ti6Al4V y en una aleación de cromo-cobalto-molibdeno, y pese a pequeñas diferencias en los mismos, el comportamiento es semejante. Las diferencias al igual que nos ocurre a nosotros al tratar el titanio y tantalio, surgen en la formación de las ondas en superficie, cuyos

parámetros van a ser dependientes del metal al aplicar el mismo tratamiento. Por tanto, podemos afirmar que a la hora de generar nanoestructuras periódicas vamos a tener beneficios en términos de osteointegración por dos motivos: El primero, se basa en que la generación de estructuras periódicas favorece la orientación anisotrópica, ordenada, más fisiológica, y regulable por nosotros. La segunda está en relación a la creación de estructuras en el espectro nanométrico en superficie, que favorecen la diferenciación osteoblástica, y además van a disminuir la reacción inflamatoria y aumentar la proliferación celular.

Los resultados de la caracterización física a la hora de generar LIPSS van a ser muy dependientes de los parámetros láser y del material empleado. En nuestro caso la elección del titanio y del tantalio fue por su amplio uso en COT como sustituto óseo en biomateriales. A ello hemos añadido el cermet como una alternativa de futuro, pese a su actual escasa difusión clínica debido a su reciente desarrollo (19).

Como vemos en los estudios de AFM, el tratamiento láser genera un patrón estándar, que va a ser constante a lo largo de la superficie tratada. La orientación de las estructuras creadas lo podemos regular nosotros a través de la polarización del haz del láser. Podemos también optimizar los parámetros de las pulsaciones para variar las características de las ondas generadas. Dumas et al (53) describieron cómo cambiando los parámetros del láser generaban patrones diferentes, y demostraron que en su caso la polarización celular máxima se alcanzaba en las superficies en las que generaban ondas, pero en su caso estas “ripples” tenía una longitud de onda de 60 micras, aunque en su interior presentaban un patrón micrométrico de 600 nanómetros. Vemos también cómo Bonse et al (54) jugando con la polarización consiguen orientar las ondas a demanda. Albu et al (55) demuestran que variando los parámetros láser y los metales empleados, se cambian las características de las estructuras creadas. Vemos pues cómo las LIPSS podemos adaptarlas a nuestras necesidades y orientarlas a cada situación o material, aunque queda pendiente definir el patrón óptimo para ello.

En nuestro caso, para los estudios biológicos y de ambos metales, optamos por un láser de iterbio de longitud de onda de 1.030nm, con un pulso de 500 fs de duración, con una energía de 0,33 Jcm<sup>-2</sup>, con una frecuencia de trabajo de 300 KHz y realizamos 50 pulsos sobre la superficie a tratar. Mediante la elección de estos

parámetros generamos tanto en titanio como en tantalio LIPSS con un periodo de 787 y 780 nm, una profundidad de 250 y 256 nm y una rugosidad de 49 y 56 nm respectivamente. Los parámetros obtenidos están dentro de los parámetros nanométricos adecuados para la osteointegración por varios motivos: sabemos que para que una célula reconozca una estructura, esta debe al menos tener una profundidad de 20 nanómetros y una anchura de 75 nanómetros, ya que las integrinas y proteínas de superficie no reconocerían el patrón, y consideran la superficie como lisa (33, 34). Por otro lado, un incremento excesivo en la profundidad y sobretodo en el periodo de las estructuras, que llegue a ser comparable al tamaño celular nos lleva a cambios en espectro macrométrico y a una pérdida de las ventajas de los patrones nanométricos (34, 35).

Hemos visto a la hora de crear las LIPSS que se generan estructuras secundarias, en relación a los fenómenos de ablación. Estas estructuras son nanogotas, que se quedan atrapadas durante los fenómenos de ablación. Las mismas no alcanzan un tamaño significativo para producir reacción celular, ya que tienen un tamaño que oscila entre los 10 y 30 nanómetros (figura 71)

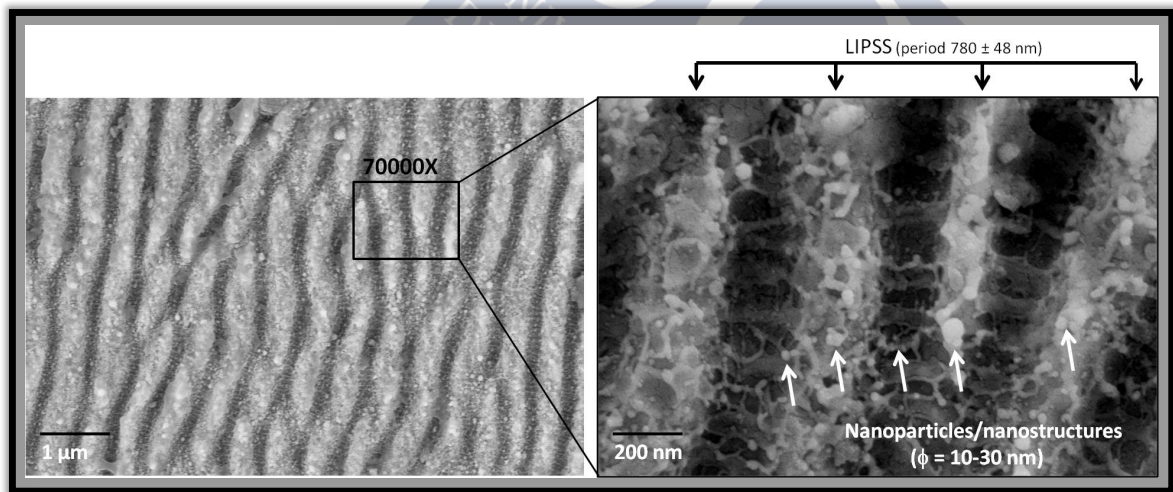


Figura 71: Muestra las nanogotas generadas durante el fenómeno de ablación.

Resultan llamativos los valores obtenidos para los ángulos de contacto en el titanio y tantalio. Como resumimos en la introducción un incremento del ángulo de contacto generalmente favorece la diferenciación osteoblástica y puede limitar su adherencia en superficies lisas. En nuestro caso hemos encontrado un claro

aumento del ángulo de contacto en metales tras la generación de LIPSS tanto en el titanio como en el tantalio, de forma comparable entre ambos. Esto es explicable por el diferente comportamiento de las superficies rugosas cuando estudiamos la humectancia. En estas superficies se dan diferentes fenómenos que pueden explicar una mayor adherencia celular pese a un incremento del ángulo de contacto. En primer lugar hay que destacar que existe suficiente evidencia que demuestra un incremento inicial del ángulo de contacto tras la generación de LIPSS, pero a medida que el tiempo transcurre y por cambios en la superficie del metal, el ángulo de contacto inicia un descenso paulatino (56). Además este ángulo de contacto incrementado en las LIPSS se puede llegar a modificar y mejorar cambiando los parámetros láser (57), o simplemente tratando la superficie del metal con luz UV (58). En estas superficies se da el fenómeno del pétalo de rosa, en el que una superficie a priori hidrofóbica con una adherencia disminuida, por la rugosidad existente, da lugar a un incremento de la adherencia de la superficie (9). Cuando hablamos de los cermets, como ya hemos visto con anterioridad, el comportamiento es completamente diferente al de los metales. En el cermet de zirconia/niobio que hemos empleado, nos encontramos con que el láser genera un fenómeno de transformación en la cerámica que va a modificar completamente la superficie del biomaterial. Como podemos ver en las imágenes pulidas del biomaterial (figura 72), nos encontramos con una superficie completamente lisa, en la que vemos un mar de cerámica con pequeñas islas metálicas de niobio que son las que le dan las características propias del cermet, y que favorecen una mayor osteointegración en comparación con las cerámicas.

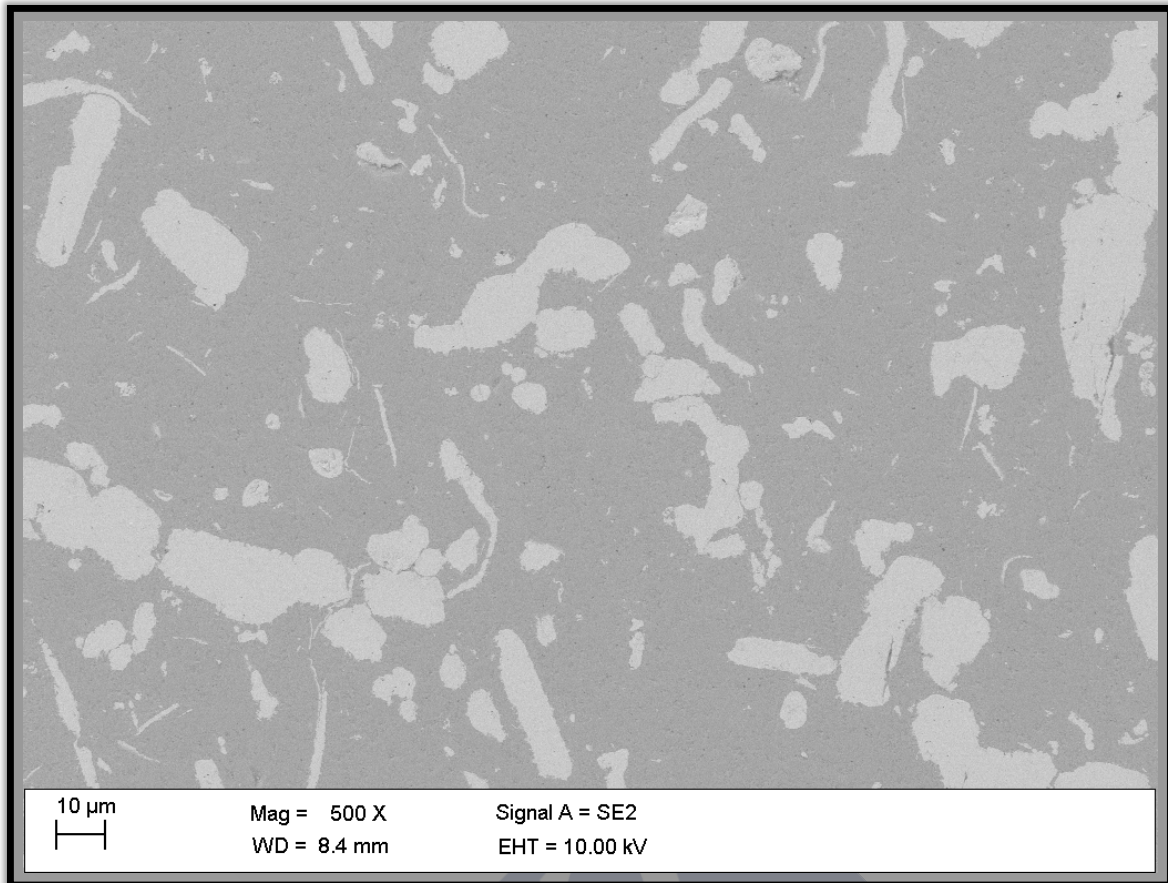


Figura 72: Podemos ver la superficie del cermet de Zirconia/Niobio a 500 aumentos obtenido por SEM, y vemos que la misma está compuesta principalmente por cerámica, con pequeñas zonas de metal intercaladas que se ven más claras.

Al aplicar nuestro láser a la superficie del biomaterial se generan 2 fenómenos diferentes en función de la zona que entra en contacto con el láser. La zona metálica reacciona generando LIPSS, mientras que, la zona de la cerámica por el aumento de temperatura y falta de presión da lugar a un fenómeno de transformación que lleva a la expansión de la cerámica en superficie y a la ablación de la misma (figura 73). Eso da lugar a las imágenes obtenidas por SEM.

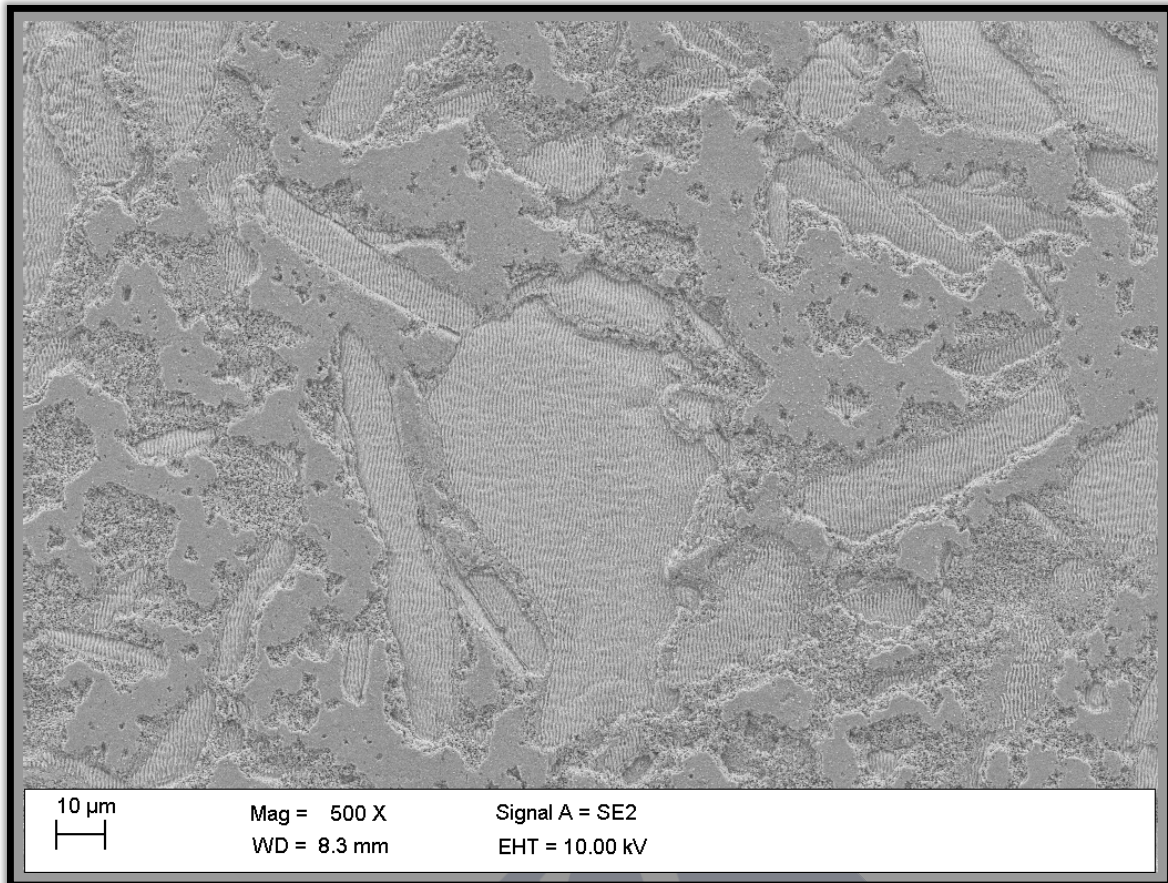


Figura 73: Podemos ver la superficie del cermet de Zirconia/Niobio tratado a 500 aumentos, y vemos que la misma está compuesta principalmente por cerámica, con pequeñas zonas de metal intercaladas que se ven más claras. Se aprecia una sobrelevación de la zona cerámica en relación al metal.

Estas modificaciones van a cambiar la respuesta celular al afectar de forma importante a la hidrofobicidad del biomaterial sin generar LIPSS en toda su estructura. De forma experimental realizamos un estudio para ver cómo la potencia láser afecta a la transformación de la cerámica del cermet y a la hidrofobicidad del mismo. Como muestran los resultados del ángulo de contacto, un tratamiento de muy baja potencia parece disminuir la hidrofobicidad de la superficie (Figura 58) pese a alterar la parte cerámica de forma importante.

En el momento que incrementamos la potencia y excedemos los 0,05 W, la hidrofobicidad se incrementa de forma importante, pasando de un valor de 72 grados, a 101 grados y 113 grados para las potencias de 0,1 y 0,2 W respectivamente, que exceden incluso los valores iniciales de 87 grados. A medida que incrementamos este ángulo disminuimos la adherencia osteoblástica. A

diferencia de lo que sucede en el titanio o tantalio, no se dan las mismas condiciones favorables para un incremento de adhesividad pese al aumento del ángulo de contacto (posibilidad de tratamiento con UV, disminución del ángulo de contacto con el tiempo, y control del fenómeno del pétalo de rosa), sobre todo con valores por encima de 100 grados (8), favoreciendo la diferenciación fibroblástica. Además, estos cambios, van a incrementar la respuesta celular macrofágica (lo que representa parte de la respuesta inflamatoria), ya que la misma se incrementa al aumentar el ángulo de contacto, y mejora con la hidrofilia del implante.

También podemos ver mediante ayuda del SEM cómo el cambio de potencia va a afectar al cermet (figura 74), incrementando el fenómeno de transformación al aumentar la expansión de la cerámica que rodea a las islas de metal en las que se generan las LIPSS.

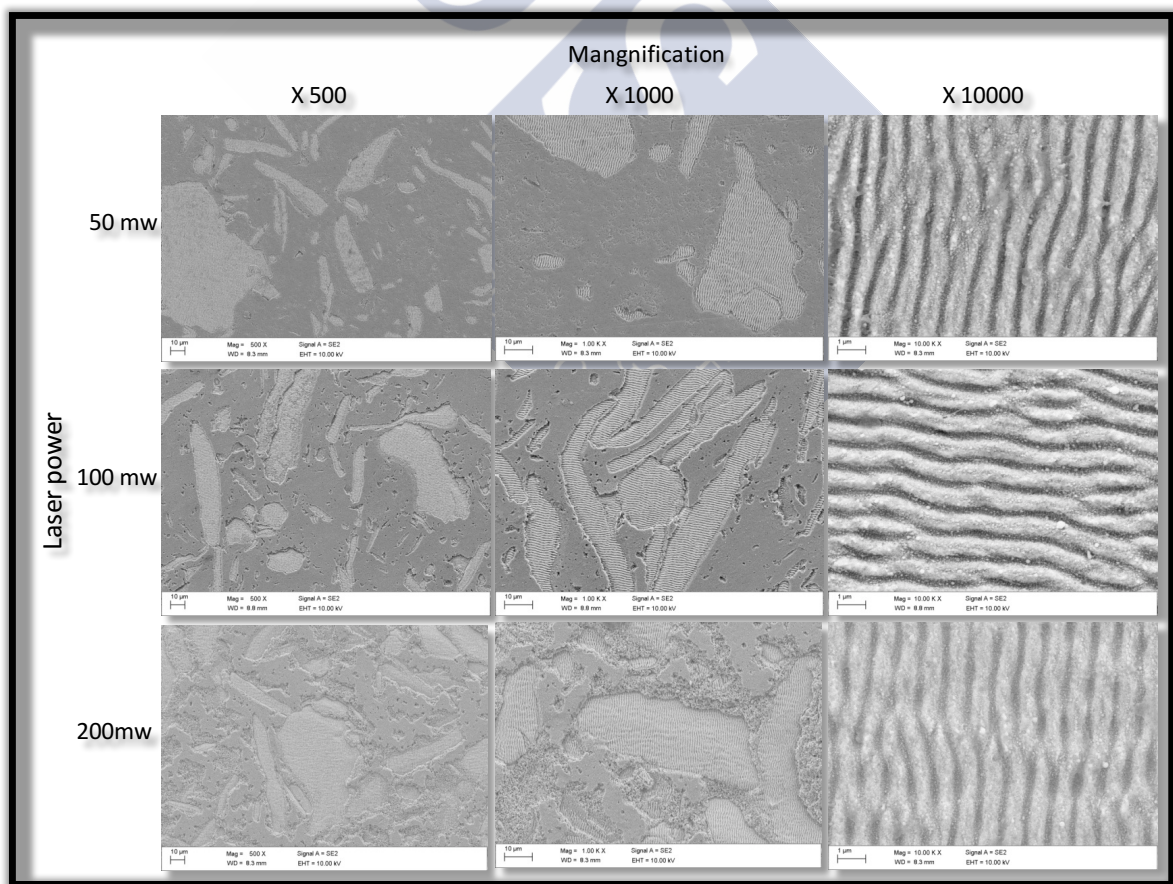


Figura 74: Vemos mediante SEM el cermet a 500, 1.000 y 10.000 aumentos tratado con 3 potencias diferentes.

Me gustaría concluir la discusión resaltando las limitaciones del estudio que hemos realizado en relación a la aplicabilidad de los láseres de pulsos ultracortos en biomateriales empleados en COT.

En primer lugar, los pulsos láser ultracortos empleados para la generación de LIPSS están muy desarrollados en metales, y su uso en otros materiales como los cermetes empleados aquí requieren de un mayor estudio. Las particularidades de las superficies metálicas son las que favorecen la generación de LIPSS, y estas propiedades difieren mucho de las vistas en las cerámicas. Queda pendiente estudiar en el campo macroscópico la capacidad de éstos láser para producir “cracks” en la parte cerámica debido a los fenómenos de transformación que lleven a la rotura de la cerámica por la generación de microgrietas, y cómo optimizar los parámetros láser para minimizar/eliminar dicho efecto.

En segundo lugar, este estudio está realizado “*in vitro*”, y son necesarios nuevos estudios “*in vivo*” para confirmar que los hallazgos aquí obtenidos son extrapolables al entorno clínico.

En tercer lugar, queremos destacar que queda un nuevo campo abierto al estudio de la “*aumentación*” en las LIPSS, mediante por ejemplo hidroxiapatita. Hay proyectos que intentan integrar moléculas de HA y otras cerámicas cálcicas mediante estos nuevos láseres en estructuras nanométricas por sinterización.

Por último y no menos importante, queda pendiente de definir cuál es el mejor patrón para favorecer la osteointegración y diferenciación osteoblástica. Nosotros hemos desarrollado un tratamiento que incrementa de forma importante las propiedades osteogénicas de la superficie, pero aún quedan por definir los parámetros óptimos de láser para cada material/situación.



## Conclusiones

1. Hemos demostrado que la generación de LIPSS es factible además de en titanio o acero, en otros metales como el tantalio.
2. Los láseres de pulsos ultracortos generan fenómenos de transformación en las cerámicas que van a limitar la respuesta celular.
3. La generación de LIPSS es dependiente del metal empleado y las propiedades del láser utilizado.
4. La generación de LIPSS en titanio y tantalio no incrementa la respuesta inflamatoria.
5. La generación de LIPSS en titanio y tantalio favorece la diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos frente a superficies pulidas.
6. La aplicación de láser sobre la superficie de los cermets genera fenómenos de expansión en la fracción cerámica, con las potencias láser estudiadas, que no se producen en la fracción metálica.
7. En conjunto, en las superficies de los cermets, tratadas con láser con los parámetros descritos, se generan fenómenos de transformación que limitan la proliferación celular, pero favorecen la diferenciación osteoblástica.



## Comunicaciones a congresos, cursos y publicaciones

### 1. Comunicaciones a Congresos:

- a. Comunicación oral 31 Congreso GEER 2017 (San Sebastián, España):
  - i. Título: Osteointegración en superficies de titanio modificadas con pulsos periódicos ultracortos (LIPSS).
  - ii. Autores: Jorge Mora, Alberto; Nieto García, Daniel; Rodolfo Gómez, Vaamonde; Pino Mínguez, Jesús.
- b. Comunicación oral a 11<sup>th</sup> Advanced Materials and Processing (Edimburgo, Escocia).
  - i. Título: LIPSS stimulate stem mesenchymal stem cells differentiation to osteoblasts in titanium and tantalum
  - ii. Autores: Jorge Mora, Alberto; Gómez Vaamonde, Rodolfo; Pino Mínguez, Jesús; Nieto García, Daniel.
- c. Comunicación oral International Conference on Biofabrication (Beijing, China).
  - i. Título: In vitro evaluation of laser induced periodic surface structures on new zirconia/niobium biocermet for hard tissue.
  - ii. Autores: Jorge Mora, Alberto; Nieto García, Daniel; Rodolfo Gómez, Vaamonde; Pino Mínguez, Jesús.

### 2. Cursos

- a. Curso: Revisión y actualizaciones del tratamiento de las fracturas de húmero proximal (Santiago de Compostela, España)
  - i. Título: El rol de los biomateriales en la reparación de fracturas de húmero.
  - ii. Autores: Jorge Mora, Alberto; Samer Amhaz; Nieto García, Daniel; Rodolfo Gómez, Vaamonde; Pino Mínguez, Jesús.

### 3. Publicaciones

- a. Capítulo de Libro (bajo corrección para publicación)

- i. Libro: Laser Ablation - From Mechanisms to Applications (open Access).
  - ii. Nombre capítulo: In vitro evaluation of laser induced periodic surface structures on new zirconia/tantalum biocermet for hard tissue replacement.
  - iii. Autores: Jorge-Mora, Alberto; Imaz Naroa, Nekane; Garcia-Lecina, Eva, Gómez-Vaamonde, Rodolfo; Alonso-Pérez, Ana; Pino-Minguez, Pino; Nieto García, Daniel
  - iv. Editorial: InTechOpen.
  - v. Editores: **Tatiana E. Itina** CNRS Research Director Université de Lyon, UJM-Saint-Etienne, France.
  - vi. ISBN: 978-953-51-5565-2.
- b. Artículo 1 (actualmente bajo revisión por los editores):
- i. Título: In vitro response of bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSC) on laser induced periodic surfaces structures for hard tissue replacement: Comparative between tantalium and titanium.
  - ii. Autores: Jorge-Mora, Alberto; Imaz Naroa, Nekane; Garcia-Lecina, Eva, Gerard O'connor, Gómez-Vaamonde, Rodolfo; Alonso-Pérez, Ana; Pino-Minguez, Pino; Nieto García, Daniel.
  - iii. Revista: Colloids and Surfaces B.
- c. Artículo 2
- i. Título: Estudio de viabilidad y adhesividad celular de osteoblastos a cementos óseos utilizados en técnicas de refuerzo vertebral, mezclados con hidroxiapatita a distintas concentraciones.
  - ii. Autores: Pino-Minguez, J. Jorge-Mora, A. Couceiro-Otero, R. Garcia-Santiago, C.
  - iii. Revista: Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología.
  - iv. PMID: 25312256

## Bibliografía

1. Goto E, Teranishi T, Tsuji M, Ando M. Long-term clinical results of Charnley total hip arthroplasty using a matte satin-finished stem: a 30-year average follow-up study. *J Orthop Sci.* 2014;19(6):959-64. PubMed PMID: 25104605.
2. Allepuz A, Serra-Sutton V, Espallargues M, Sarria A. Artroplastias de cadera y rodilla en el Sistema Nacional de Salud. *Rev Esp Ortop Traumatol.* 2009;53(05):290-9.
3. Ratner BD. *Biomaterials science : an introduction to materials in medicine.* 2nd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press; 2004. xii, 851 p. p.
4. Bozic KJ, Kamath AF, Ong K, Lau E, Kurtz S, Chan V, et al. Comparative Epidemiology of Revision Arthroplasty: Failed THA Poses Greater Clinical and Economic Burdens Than Failed TKA. *Clin Orthop Relat Res.* 2015 Jun;473(6):2131-8. PubMed PMID: 25467789.
5. Patel A, Pavlou G, Mujica-Mota RE, Toms AD. The epidemiology of revision total knee and hip arthroplasty in England and Wales: a comparative analysis with projections for the United States. A study using the National Joint Registry dataset. *Bone Joint J.* 2015;97-B(8):1076-81. PubMed PMID: 26224824.
6. Kasemo B, Lausmaa J. Material-tissue interfaces: the role of surface properties and processes. *Environ Health Perspect.* 1994 Oct;102 Suppl 5:41-5. PubMed PMID: 7882954.
7. Yaszemski MJ. *Biomaterials in orthopedics.* New York: M. Dekker; 2004. vi, 457 p. p.
8. Chang H, Wang Y, Eberli D. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering—Cells and Biomaterials.* InTech, Rijeka, Croatia. 2011:569-88.
9. Bhushan B, Nosonovsky M. The rose petal effect and the modes of superhydrophobicity. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 2010 28;368(1929):4713-28. PubMed PMID: 20855317.
10. Coathup MJ, Blunn GW, Mirhosseini N, Erskine K, Liu Z, Garrod DR, et al. Controlled laser texturing of titanium results in reliable osteointegration. *J Orthop Res.* 2017 Apr;35(4):820-828 PubMed PMID: 27306746.
11. Cunha A, Zouani OF, Plawinski L, Botelho do Rego AM, Almeida A, Vilar R, et al. Human mesenchymal stem cell behavior on femtosecond laser-textured Ti-6Al-4V surfaces. *Nanomedicine (Lond).* 2015;10(5):725-39. PubMed PMID: 25816876.
12. Fu J, Hu Y, Guo Z, Zhang Y, Hao Y, Li S. Effect of surface micro-topography of titanium material on the behaviors of rabbit osteoblast in vitro. *Appl Surf Sci.* 2008; 255(2):286-9.

13. Yeo C, Saunders N, Locca D, Flett A, Preston M, Brookman P, et al. Ficoll-Paque versus Lymphoprep: a comparative study of two density gradient media for therapeutic bone marrow mononuclear cell preparations. *Regen Med.* 2009 4(5):689-96. PubMed PMID: 19761394.
14. Leventhal GS. Titanium, a metal for surgery. *J Bone Joint Surg Am.* 1951;33-A(2):473-4. PubMed PMID: 14824196.
15. Narayan R. *Biomedical Materials.* 1 ed: Springer US; 2009. 566 p.
16. Shibata T, Zhu Y-C. The effect of film formation conditions on the structure and composition of anodic oxide films on titanium. *Corros Sci.* 1995;37(2):253-70.
17. Bencharit S, Byrd WC, Altarawneh S, Hosseini B, Leong A, Reside G, et al. Development and applications of porous tantalum trabecular metal-enhanced titanium dental implants. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2014;16(6):817-26. PubMed PMID: 23527899.
18. Shimko DA, Shimko VF, Sander EA, Dickson KF, Nauman EA. Effect of porosity on the fluid flow characteristics and mechanical properties of tantalum scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005;73(2):315-24. PubMed PMID: 15736288.
19. Bartolome JF, Moya JS, Couceiro R, Gutierrez-Gonzalez CF, Guitian F, Martinez-Insua A. In vitro and in vivo evaluation of a new zirconia/niobium biocermet for hard tissue replacement. *Biomaterials.* 2016;76:313-20. PubMed PMID: 26561930.
20. Kurella A, Dahotre NB. Review paper: surface modification for bioimplants: the role of laser surface engineering. *J Biomater Appl.* 2005;20(1):5-50. PubMed PMID: 15972362.
21. Xuanyong Liua PKC, Chuanxian Ding. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Mater Sci Eng R Rep.* 2004;47:49-121.
22. Rokkum M, Reigstad A, Johansson CB. HA particles can be released from well-fixed HA-coated stems: histopathology of biopsies from 20 hips 2-8 years after implantation. *Acta Orthop Scand.* 2002;73(3):298-306. PubMed PMID: 12143977.
23. Han CD, Shin KY, Lee HH, Park KK, Yang IH, Lee WS. The Results of Long-term Follow-up of Total Hip Arthroplasty Using Hydroxyapatite-coated Cups. *Hip Pelvis.* 2015;27(4):209-15. PubMed PMID: 27536628.
24. Matsugaki A, Aramoto G, Ninomiya T, Sawada H, Hata S, Nakano T. Abnormal arrangement of a collagen/apatite extracellular matrix orthogonal to osteoblast alignment is constructed by a nanoscale periodic surface structure. *Biomaterials.* 2015;37:134-43. PubMed PMID: 25453944.
25. Göppert M. Über die Wahrscheinlichkeit des Zusammenwirkens zweier Lichtquanten in einem Elementarakt. *Die Naturwissenschaften.* 1929;17(48):932-*¿?*.

26. Maiman TH. Stimulated Optical Radiation in Ruby. *Nature* 1960 Aug; 87: (sobran dos puntos):493-4.
27. Birnbaum M. Semiconductor Surface Damage Produced by Ruby Lasers. *J App Phys.* 1965;36(11):3688-9.
28. Konig K, Ostendorf A, editors. *Optically Induced Nanostructures: Biomedical and Technical Applications.* Berlin 2015.
29. Thys M, Desmet E. *Laser beams : theory, properties, and applications.* New York: Nova Science Publishers; 2011. xii, 533 p. p.
30. Shah FA, Johansson ML, Omar O, Simonsson H, Palmquist A, Thomsen P. Laser-Modified Surface Enhances Osseointegration and Biomechanical Anchorage of Commercially Pure Titanium Implants for Bone-Anchored Hearing Systems. *PLoS One.* 2016;11(6):e0157504. PubMed PMID: 27299883.
31. Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials.* 2005;26(17):3503-9. PubMed PMID: 15621240.
32. Dumas V, Guignandon A, Vico L, Mauclair C, Zapata X, Linossier MT, et al. Femtosecond laser nano/micro patterning of titanium influences mesenchymal stem cell adhesion and commitment. *Biomed Mater.* 2015 03;10(5):055002. PubMed PMID: 26334374.
33. Khang D, Choi J, Im YM, Kim YJ, Jang JH, Kang SS, et al. Role of subnano-, nano- and submicron-surface features on osteoblast differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2012;33(26):5997-6007. PubMed PMID: 22632766.
34. Lamers E, van Horssen R, te Riet J, van Delft F, Luttge R, Walboomers XF, et al. The influence of nanoscale topographical cues on initial osteoblast morphology and migration. *Eur Cels Mater.* 2010;20:329-43.
35. Miao X, Wang D, Xu L, Wang J, Zeng D, Lin S, et al. The response of human osteoblasts, epithelial cells, fibroblasts, macrophages and oral bacteria to nanostructured titanium surfaces: a systematic study. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:1415-30. PubMed PMID: 28260888.
36. McDaniel C, Gladkovskaya O, Flanagan A, Rochev Y, O'Connor GM. In vitro study on the response of RAW264.7 and MS-5 fibroblast cells on laser-induced periodic surface structures for stainless steel alloys. *RSC Adv.* 2015;5(53):42548-58.
37. Finnilla S, Moritz N, Svedstro ME, Alm JJ, Aro HT. Increased migration of uncemented acetabular cups in female total hip arthroplasty patients with low systemic bone mineral density. A 2-year RSA and 8-year radiographic follow-up study of 34 patients. *Acta Orthop.* 2016 ;87(1):48-54. PubMed PMID: 26569616.
38. Fitch DA, Ancarani C, Bordini B. Long-term survivorship and complication rate comparison of a cementless modular stem and cementless fixed neck

- stems for primary total hip replacement. *Int Orthop.* 2015;39(9):1827-32. PubMed PMID: 26156729.
39. Iamthanaporn K, Chareancholvanich K, Pornrattanamaneewong C. Revision primary total hip replacement: causes and risk factors. *J Med Assoc Thai.* 2015;98(1):93-9. PubMed PMID: 25775739.
  40. Romeo E, Storelli S. Systematic review of the survival rate and the biological, technical, and aesthetic complications of fixed dental prostheses with cantilevers on implants reported in longitudinal studies with a mean of 5 years follow-up. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23 Suppl 6:39-49. PubMed PMID: 23062126.
  41. Bartolomé JF, Gutiérrez-González CF, Pecharromán C, Moya JS. Synergistic toughening mechanism in 3Y-TZP/Nb composites. *Acta Mater.* 2007;55(17):5924-33.
  42. Liu X-L, Cheng W, Petrarca M, Polynkin P. Measurements of fluence profiles in femtosecond laser filaments in air. *Optics Letters.* 2016;41(20):4751-4.
  43. Liu JM. Simple technique for measurements of pulsed Gaussian-beam spot sizes. *Opt Lett.* 1982;7(5):196-8.
  44. Cabal B, Alou L, Cafini F, Couceiro R, Sevillano D, Esteban-Tejeda L, et al. A new biocompatible and antibacterial phosphate free glass-ceramic for medical applications. *Sci Rep.* 2014;4:5440. PubMed PMID: 24961911.
  45. Gottmann J, Shcherbakov IA, Wortmann D, Myllylä R, Priezhev AV, Wagner R, et al. Manufacturing of periodical nanostructures by fs-laser direct writing. *Proc. SPIE 7022, Advanced Laser Technologies 2007,* 702202..
  46. Lavenus S, Berreur M, Trichet V, Pilet P, Louarn G, Layrolle P. Adhesion and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on titanium nanopores. *Eur Cell Mater.* 2011;22:84-96; discussion PubMed PMID: 21870339.
  47. Gyorgyey A, Ungvari K, Kecskemeti G, Kopniczky J, Hopp B, Oszko A, et al. Attachment and proliferation of human osteoblast-like cells (MG-63) on laser-ablated titanium implant material. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33(7):4251-9. PubMed PMID: 23910340.
  48. Birmingham E, Niebur GL, McHugh PE, Shaw G, Barry FP, McNamara LM. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *Eur Cell Mater.* 2012;23:13-27. PubMed PMID: 22241610.
  49. Hotchkiss KM, Reddy GB, Hyzy SL, Schwartz Z, Boyan BD, Olivares-Navarrete R. Titanium surface characteristics, including topography and wettability, alter macrophage activation. *Acta Biomater.* 2016;31:425-34. PubMed PMID: 26675126.
  50. Ostberg AK, Dahlgren U, Sul YT, Johansson CB. Inflammatory cytokine release is affected by surface morphology and chemistry of titanium

- implants. *J Mater Sci Mater Med.* 2015;26(4):155. PubMed PMID: 25779512.
51. Haleem-Smith H, Argintar E, Bush C, Hampton D, Postma WF, Chen FH, et al. Biological responses of human mesenchymal stem cells to titanium wear debris particles. *J Orthop Res.* 2012;30(6):853-63. PubMed PMID: 22083964.
  52. Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res.* 1992;7(6):683-92. PubMed PMID: 1414487.
  53. Dumas V, Rattner A, Vico L, Audouard E, Dumas JC, Naisson P, et al. Multiscale grooved titanium processed with femtosecond laser influences mesenchymal stem cell morphology, adhesion, and matrix organization. *J Biomed Mater Res A.* 2012;100(11):3108-16. PubMed PMID: 22791663.
  54. Rosenfeld JBaJKSHaA. Femtosecond laser-induced periodic surface structures. *J Laser Appl.* 2012;24(4):042006.
  55. Albu C, Dinescu A, Filipescu M, Ulmeanu M, Zamfirescu M. Periodical structures induced by femtosecond laser on metals in air and liquid environments. *Appl Surf Sci* 2013;278:347-51.
  56. D.Krysciak SR, R. Hellmann. Time dependance of wettin behaviour after applying low spatial frecuncy LIPSS with three different wavelenghts on brass. International Multidisciplinary Scientific Conference. 2016. Apr 21-21 Hungary.
  57. Raimbault O, Benayoun S, Anselme K, Mauclair C, Bourgade T, Kietzig AM, et al. The effects of femtosecond laser-textured Ti-6Al-4V on wettability and cell response. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016 ;69:311-20. PubMed PMID: 27612718.
  58. Park KH, Koak JY, Kim SK, Heo SJ. Wettability and cellular response of UV light irradiated anodized titanium surface. *J Adv Prosthodont.* 2011;3(2):63-8. PubMed PMID: 21814613.



## Anexos

1. Protocolo de investigación aprobado por el comité de ética para la obtención de células mesenquimales

### **PROTOCOLO PARA ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN:**

#### **PORTADA**

1. **TÍTULO:** ESTUDIO IN VITRO DE LIPPS

2. **CÓDIGO DE PROTOCOLO:** 2.0

3. **INVESTIGADORES PRINCIPALES:**

a. ALBERTO A. JORGE MORA

4. **INVESTIGADORES COLABORADORES**

a. **Jesús Pino Mínguez**

b. **Rodolfo Gómez Bahamonde**

5. **PROMOTOR**

a. ALBERTO A. JORGE MORA

## Tabla de contenido

<b>Tabla de contenido</b>	<b>158</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>159</b>
<b>INFORMACIÓN GENERAL:</b>	<b>160</b>
<b>ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO</b>	<b>160</b>
<b>OBJETIVOS:</b>	<b>161</b>
<b>TIPO DE ESTUDIO:</b>	<b>161</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS:</b>	<b>161</b>
<b>ASPECTOS ÉTICO-LEGALES:</b>	<b>165</b>
<b>MEMORIA ECONÓMICA:</b>	<b>166</b>
<b>COMPROMISO DE PUBLICACIÓN DE LOS RESULTADOS:</b>	<b>167</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA:</b>	<b>167</b>
<b>CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS:</b>	<b>168</b>

## RESUMEN

- a. TÍTULO: ESTUDIO IN VITRO DE LIPSS
- b. INVESTIGADORES PRINCIPALES Y COLABORADORES:
  - i. ALBERTO JORGE MORA
  - ii. JESÚS PINO MÍNGUEZ
  - iii. RODOLFO GÓMEZ BAHAMONDE
- c. PROMOTOR:
  - i. ALBERTO JORGE MORA
- d. CENTROS DEL ESTUDIO:
  - i. COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERISTARIO DE SANTIAGO
  - ii. FUNDACIÓN RAMÓN DOMÍNGUEZ
- e. RESPONSABLES DE LA MONITORIZACIÓN DE PACIENTES
  - i. ALBERTO JORGE MORA (Especialista en Cirugía Ortopédica)
- f. CONDICIÓN A ESTUDIO:
  - i. estudio in vitro del comportamiento de células mesenquimales de superficies creadas por LIPSS
- g. OBJETIVO PRINCIPAL:
  - i. Demostrar la utilidad de las nuevas LIPSS (superficies con patrones periódicos inducidos por láser) in vitro, empelando estudios de viabilidad celular y diferenciación a osteoblastos de células mesenquimales humanas.
- h. OBJETIVOS SECUNDARIOS:
  - i. Demostrar que las LIPSS crean una respuesta inflamatoria igual o menor a las superficies no tratadas.
- i. VARIABLE PRINCIPAL DE VALORACIÓN:
  - i. Valores de osteocalcina y osteopontina. Estudio de proliferación celular.
- j. POBLACIÓN EN ESTUDIO
  - i. Sería necesario obtener células mesenquimales de cresta ilíaca de pacientes jóvenes (menores de 40 años) sanos sometidos a cirugía electiva en el Servicio de cirugía ortopédica y traumatología. Previsiblemente se obtendrán de 10.
- k. DURACIÓN DE LA INTERVENCIÓN:
  - i. 24 meses
- l. CALENDARIO Y FECHA PREVISTA DE FINALIZACIÓN DEL ESTUDIO:
  - i. Mayo de 2019

## INFORMACIÓN GENERAL:

- a. TÍTULO: ESTUDIO IN VITRO DE LIPSS
- b. INVESTIGADOR PRINCIPAL Y COLABORADORES:
  - ALBERTO JORGE MORA (Investigador Principal)
  - JESÚS PINO MÍNGUEZ
  - RODOLFO GÓMEZ BAHAMONDE
- c. CENTROS DEL ESTUDIO:
  - COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE SANTIAGO
  - FUNDACIÓN RAMÓN DOMÍNGUEZ
- d. RESPONSABLES DE LA MONITORIZACIÓN DE PACIENTES
  - ALBERTO JORGE MORA (Especialista en Cirugía Ortopédica)

## ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

En España se realizan más de 4.000 artroplastias de cadera o rodilla al año, y tratamos 722 fracturas de cadera por cada 100.000 habitantes y año(1). Esto nos da una idea de la importancia clínica y económica que tienen los implantes en cirugía ortopédica. Por ello la mejora de éstos es crucial de cara a aumentar la supervivencia de los mismos, disminuir el número de procedimientos a los que sometemos a nuestros pacientes y minimizar los costes económicos que genera la implantación de estos componentes.

Los tratamientos de superficie van encaminados a mejorar la osteointegración de los implantes y en último caso su supervivencia. Podemos considerar que de todos los tratamientos de superficie, el plasma “coating” con hidroxiapatita es el patrón oro (2). Pero este tratamiento no es inocuo, y se producen desprendimientos de la cobertura con el paso del tiempo ya que se genera una zona de transición sensible al desprendimiento(3).

Recientemente la creación de LIPSS ha demostrado unos resultados prometedores en el campo de la osteointegración, pero aún está pendiente de demostrar cuál es el mejor patrón o si es aplicable a múltiples materiales(4-9).

Nosotros crearemos mediante láser, diferentes tipos de LIPSS en nuevos materiales, con modificaciones no testadas hasta la fecha. Buscamos optimizar la osteointegración de estos materiales. Las modificaciones creadas por LIPSS son fácilmente extrapolables a la industria y suponen un mínimo incremento de los costes de producción, por lo que estaríamos ante una mejora ideal.

Hemos diseñado pues un estudio in vitro que busca ver la respuesta de células mesenquimales sobre estos biomateriales.

## OBJETIVOS:

### a. PRIMARIO

- Demostrar que las LIPSS generados en diferentes materiales y con distintos parámetros favorecen las diferenciaciones a osteoblastos de células mesenquimales humanas.

### b. SECUNDARIO

- Demostrar que las LIPSS generan la misma o menor inflamación que superficies no tratadas con láser siendo el mismo material.
- Demostrar que las LIPSS generadas generan una respuesta favorable y reproducible.
- Estudiar la diferenciación de células mesenquimales a otros tipos celulares en estos materiales.
- Encontrar el patrón de LIPSS óptimo para la osteointegración.
- Buscar sustancias que potencien la diferenciación de las células mesenquimales sobre estas nuevas superficies (hacia osteoblasto, condrocito o adipocito)

## TIPO DE ESTUDIO:

- Estudio experimental in vitro

## MATERIAL Y MÉTODOS:

### a. ÁMBITO DE ESTUDIO

- Estudio con materiales generados con láser de femtosegundos de duración.
- Emplearemos células y suero obtenidos de pacientes del Servicio de cirugía ortopédica y traumatología de Santiago de Compostela.

### b. CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Seleccionaremos pacientes entre 18 y 40 años, que vayan a ser intervenidos en el Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología de un procedimiento electivo de miembros inferiores o columna que vaya a requerir anestesia general o regional, y a los que se le vaya a extraer injerto de cresta ilíaca (principalmente pseudoartrosis y artrodesis vertebrales)
- Los investigadores revisarán la historia clínica del paciente en busca de factores que puedan afectar a la proliferación osteoblástica por

si esta fuera de especial interés para el estudio (como el consumo de tabaco, alteraciones metabólicas, etc.), y poder relacionarlo con la respuesta celular.

**c. CAPTACIÓN Y RECLUTAMIENTO DE PACIENTES:**

- Captaremos pacientes de lista de espera o ingresados del servicio de cirugía ortopédica y traumatología. En todos los casos se informará a los pacientes con la antelación suficiente en la consulta (en los pacientes procedentes de lista de espera) o en el hospital (en el caso de los pacientes ingresados por traumatismos). La información será dada siempre por unos de los dos investigadores asignados al Servicio de cirugía ortopédica y traumatología, quienes le entregarán el Consentimiento Informado (Dres. Jorge y Pino).
- Los datos de los pacientes serán codificados de acuerdo a la LOPD.
- Aprovechando el abordaje realizado para la cirugía electiva, a través de un trocar se extrae aspirado de cresta ílica con una jeringa (en torno a 10-20cc). Este procedimiento no compromete la cirugía en ningún caso y aprovecha el abordaje de la misma.
- Las complicaciones van a ser las de la cirugía electiva, y el aspirado no añade mayor morbilidad.
- Buscamos asilar células mesenquimales y mononucleares para cultivar sobre nuevas superficies creadas en diferentes materiales para estudiar su diferenciación hacia diferentes estirpes celulares (osteoblasto, condrocito o adipocito)
- Aprovecharemos el suero para favorecer el crecimiento celular y buscar factores que puedan afectar a esta diferenciación.
- Si hubiese excedentes de injerto óseo obtenido, se aprovecharía para cultivo.

**d. PERIODO DE ESTUDIO**

- Inicio: Mayo 2017
- Reclutamiento: 24 meses
- Finalización: Mayo 2019

**e. JUSTIFICACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL**

- Justificación del tamaño muestral: Es realmente difícil estimar un tamaño muestral para la obtención de células mesenquimales ya que el crecimiento de las mismas depende de múltiples factores, y

aquellos que son dependientes del paciente no son modificables por nuestra parte. Inicialmente contamos con hacer 10 extracciones, a lo largo de los 2 años del estudio para cultivar sobre los biomateriales y ver su evolución. Esta cifra variará en función de la capacidad de división de las células para alcanzar una densidad de 25.000 células por  $\text{cm}^2$ . Si las mismas son funcionantes y su capacidad de división permite emplearlas en varias ocasiones podríamos llegar a reducir la obtención de muestras.

- Necesitamos volumen suficiente para cultivar 30 discos entre muestras y controles a lo largo del estudio (tamaño muestral semejante al empleado en estudios de osteointegración por nuestro equipo (10), al añadir hidroxiapatita a la superficie del implante, esperamos encontrar una respuesta semejante a la observada al añadir hidroxiapatita a los cementos)

#### f. MEDICIONES E INTERVENCIONES

- Aprovechando el abordaje realizado para la cirugía electiva a través de un trocar se extrae aspirado de cresta ilíaca con una jeringa (en torno a 10-20cc). Este procedimiento no compromete la cirugía en ningún caso y aprovecha el abordaje de la misma.
- Las posibles complicaciones que pudieran surgir serían las propias de la cirugía electiva, y el aspirado no añade mayor morbilidad.
- Buscamos aislar células mesenquimales y mononucleares para cultivar sobre nuevas superficies creadas en diferentes materiales para estudiar su diferenciación hacia diferentes estirpes celulares (osteoblasto, condrocito o adipocito)
- Aprovecharemos el suero para favorecer el crecimiento celular y buscar factores que puedan afectar a esta diferenciación.
- Las variables principales son:
  - NIVELES DE OSTEOCALCINA, OSTEOPONTINA Y FOSFATASA ALCALINA
- Las secundarias son:
  - TNF-ALFA
  - TRAIL
  - IL-6
  - Podremos buscar otros marcadores de diferenciación o inflamación celular si fueren necesarios.

**g. DESCRIPCIÓN TEMPORAL DE LA INTERVENCIÓN**

- Mayo-septiembre 2017: Preparación de las nuevas superficies y sus controles (30 discos)
- Septiembre 2017-diciembre 2017: Primeras obtenciones de células para cultivo, concentración de las mismas y cultivo sobre los nuevos biomateriales (6discos)
- Repetiremos el procedimiento en 5 ocasiones más hasta completar los 30 discos previstos.

**h. CALENDARIO DE VISITAS**

- Retiramos la sutura a los 15-20 días junto con las suturas de la intervención principal.
- NO son esperables complicaciones.
- Los pacientes no requieren un seguimiento mayor que el que realizarán para su procedimiento electivo.

**i. DISTRIBUCIÓN DE TAREAS:**

- Obtención de muestras: Dres. Jorge y Pino
- Preparación de biomateriales: Dres. Jorge y Pino
- Cultivo sobre nuevas superficies: Dr. Jorge y Dr. Bahamonde

**j. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA:**

- La respuesta obtenida en términos de adhesión celular, proliferación y diferenciación osteoblástica demostrarán una superioridad de las nuevas superficies.

**k. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

- Para la realización de todo el estudio estadístico empleamos el software MiniTab Express versión 1.5 (Copyright 2017 Minitab Inc.).
- Una vez obtenidos los resultados aplicamos un test de Kolmogorov Smirnov para confirmar que éstos seguían una distribución normal.
- En aquellos casos en los que las muestras mantenían una distribución normal aplicamos un test T-student para encontrar diferencias entre los discos lisos y los rugosos en cada material.
- En los casos en los que la distribución de datos no se adaptó a una distribución normal, aplicamos test no paramétricos para

encontrar diferencias entre los discos lisos y los rugosos en cada material.

- Se aceptará un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo.

## ASPECTOS ÉTICO-LEGALES:

El estudio se realizará de conformidad con las normas de Buena Práctica Clínica (BPC) y los requisitos normativos aplicables. El investigador está ampliamente familiarizado con el protocolo y con la recogida de muestras. Se mantendrán documentos clínicos esenciales para demostrar la validez del estudio y la integridad de los datos recogidos. Los archivos maestros se constituirán al principio del estudio, se mantendrán durante su realización y se conservarán conforme a la normativa aplicable.

El estudio se llevará a cabo según los postulados éticos fundamentados en la Declaración de Helsinki. El CAEI revisará toda la documentación del estudio pertinente con el fin de salvaguardar los derechos, la seguridad y el bienestar de las pacientes. El estudio solo se realizará en el centro donde se haya obtenido la autorización del CAEI.

El investigador principal se compromete a garantizar la confidencialidad de los datos (LOPD) así como la disociación de los datos clínicos personales en cumplimiento de la legislación vigente (Ley 41/2002). De modo que en la hoja de recogida de datos solo serán incluidos los necesarios para el estudio, manteniendo el anonimato de los pacientes. El investigador se compromete a cumplir con los requisitos del RD 1716/2011. Una vez finalizado el proyecto, las muestras serán cedidas al Biobanco del CHUS, que se encargará de la gestión de las mismas. Las hojas de información al paciente así como los consentimientos informados que se utilizarán, son las actualmente aprobadas por el CAEIG para su uso.

Este proyecto se desarrollará tras su aprobación por el CAEI de Galicia.

Todas las muestras biológicas utilizadas en este estudio serán extraídas en el contexto de la práctica clínica habitual.

Los datos del paciente serán anonimizados y manejados de acuerdo a la normativa vigente.

## MEMORIA ECONÓMICA:

### a. Gastos:

- i. Compra de kits ensayo y metales tratados: 4800 euros
- ii. Compra de vacutainers para manejo de muestras biológicas, unos 300 a razón de 0,24 la unidad: 72 euros
- iii. Compra de juego de pipetas Eppendorf Research® plus, paquete de 3 opción 2: 574 euros
- iv. Compra de pipeta Eppendorf Research® plus de 8 canales: 678 euros
- v. Centrifugadora Centrifuge 5424 R: 4314 euros
- vi. Puntas de pipeta epT.I.P.S., de 3 tamaños, en cajas de 480 puntas: 47,50, 47,50 y 49,10 euros cada una
- vii. Pipeta Eppendorf Easypet® 3: 427 euros
- viii. Agitador orbital para placas de ELISA para 4 placas (distribuido por PortoMédica): 1322 euros
- ix. Botella de vacío(distribuido por PortoMédica):299 euros
- x. Lavador de placas (distribuido por PortoMédica): 3320 euros
- xi. Lector de ELISA: Sufragado por el IDIS
- xii. Vortex (distribuido por PortoMédica):: 199 euros
- xiii. Gastos destinados a material fungible como guantes, material estéril, etc. Sufragado por el IDIS
- xiv. Alguno de los gastos en material podría obviarse con ayuda del propio laboratorio de Investigación.

### b. Ingresos/Fuente de financiación:

- i. Pendiente de solicitar una beca por una cuantía de 15000 euros a la Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología para sufragar la mayoría de los costes
- ii. El grupo “Musculoskeletal Pathology Group” con su presupuesto anual cubriría parte de los gastos fungibles
- iii. Es probable que en caso de rechazo de la beca de la SECOT se solicita ayuda/fondos a través de becas públicas o privadas

## COMPROMISO DE PUBLICACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Los autores de este proyecto se comprometen a difundir sus resultados a la comunidad científica, independientemente de que vayan orientados o no a nuestras hipótesis. Los resultados serán enviados para su publicación a revistas indexadas nacionales y/o internacionales.

## BIBLIOGRAFÍA:

1. Allepuz A, Serra-Sutton V, Espallargues M, Sarria A. Artroplastias de cadera y rodilla en el Sistema Nacional de Salud. Revista española de cirugía ortopédica y traumatología. 2009;53(5):290-9.
2. Narayan R, Bose S, Bandyopadhyay A. Biomaterials science : processing, properties and applications. V. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2015. vii, 198 pages p.
3. Han CD, Shin KY, Lee HH, Park KK, Yang IH, Lee WS. The Results of Long-term Follow-up of Total Hip Arthroplasty Using Hydroxyapatite-coated Cups. Hip Pelvis. 2015;27(4):209-15.
4. Raimbault O, Benayoun S, Anselme K, Mauclair C, Bourgade T, Kietzig AM, et al. The effects of femtosecond laser-textured Ti-6Al-4V on wettability and cell response. Materials science & engineering C, Materials for biological applications. 2016;69:311-20.
5. Cunha A, Zouani OF, Plawinski L, Botelho do Rego AM, Almeida A, Vilar R, et al. Human mesenchymal stem cell behavior on femtosecond laser-textured Ti-6Al-4V surfaces. Nanomedicine (Lond). 2015;10(5):725-39.
6. Matsugaki A, Aramoto G, Ninomiya T, Sawada H, Hata S, Nakano T. Abnormal arrangement of a collagen/apatite extracellular matrix orthogonal to osteoblast alignment is constructed by a nanoscale periodic surface structure. Biomaterials. 2015;37:134-43.
7. Sajzew R, Schroder J, Kunz C, Engel S, Muller FA, Graf S. Femtosecond laser-induced surface structures on carbon fibers. Optics letters. 2015;40(24):5734-7.
8. Bonse J, Hohm S, Hartelt M, Spaltmann D, Pentzien S, Koter R, et al. Femtosecond laser-induced surface nanostructures for tribological applications. In: König K, Ostendorf A, editors. Optically Induced Nanostructures: Biomedical and Technical Applications. Berlin 2015.
9. Gurevich EL, Gurevich SV. Laser Induced Periodic Surface Structures induced by surface plasmons coupled via roughness. Applied Surface Science. 2014;302:118-23.

10. Pino-Minguez J, Jorge-Mora A, Couceiro-Otero R, Garcia-Santiago C. Study of the viability and adhesion of osteoblast cells to bone cements mixed with hydroxyapatite at different concentrations to use in vertebral augmentation techniques. Revista española de cirugía ortopédica y traumatología. 2015;59(2):122-8

### CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS:

- Se empleará un formato digital para almacenar todos los datos y facilitar su estudio. El sistema garantizará la anonimación de los datos.
- El acceso a este cuaderno es restringido y sólo los investigadores tendrán acceso al mismo mediante la introducción de un usuario y una contraseña personales e intransferibles.



## 2. Dictamen del comité de ética



Secretaría Técnica  
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia  
Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade  
Edificio Administrativo San Lázaro  
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA  
Tel: 881546425. Correo-e: celc@sergas.es

**DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO**

Guillermo José Prada Ramallal, Secretario del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

**CERTIFICA:**

Que este Comité evaluó en su reunión del día 23 de marzo de 2017 el estudio:

**Título:** Estudio in vitro de LIPSS  
**Promotor:** Alberto A. Jorge Mora  
**Tipo de estudio:** Outros  
**Versión:** Versión 1.0  
**Código del Promotor:**  
**Código de Registro:** 2017/161

Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos legales aplicables, y en particular la Ley 14/2007, de investigación biomédica, el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humana, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, la ORDEN SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las Directrices sobre estudios Postautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, y la Circular nº 07/2004, de investigaciones clínicas con productos sanitarios.
- La idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- Los principios éticos da Declaración de Helsinki vigente.
- Los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité.

Emite un dictamen **FAVORABLE** para la realización del estudio **por el/la investigador/a del centro:**

Centros	Investigadores Principales
C.H. Universitario de Santiago	Alberto A. Jorge Mora

En Santiago de Compostela, a 30 de marzo 2017.

El Secretario del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago Lugo,



Firmado digitalmente por: guillermo.jose.prada.ramallal@sergas.es  
Fecha: 2017.03.30 14:52:26 +02'00'

Guillermo José Prada Ramallal



XUNTA DE GALICIA  
CONSELLERÍA DE SANIDADE  
Secretaría Xeral Técnica

Secretaría Técnica  
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia  
Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade  
Edificio Administrativo San Lázaro  
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA  
Tel: 881546425. Correo-e: calc@sergas.es



Guillermo José Prada Ramallal, Secretario del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

#### HACE CONSTAR QUE:

1.- El Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo cumple tanto en su composición como en sus PNTs los requisitos legales vigentes (RD 1090/2015 de ensayos clínicos, y la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica).

2.- La composición actual del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo es:

- **Juan Manuel Vázquez Lago (Presidente).** Médico especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Pilar Rodríguez Ledo (Vicepresidenta).** Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Guillermo José Prada Ramallal (Secretario).** Médico especialista en Farmacología Clínica. Área de Gestión Integrada de Santiago. Fundación Ramón Domínguez.
- **Lorenzo Armenteros del Olmo (Vicesecretario).** Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Francisco Campos Pérez.** Biólogo. Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.
- **Rosana Castelo Domínguez.** Farmacéutica Atención Primaria. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Daniel De La Iglesia García.** Médico especialista en Digestivo. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Ricardo García Martínez.** Licenciado en Derecho. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Jaime Gulín Dávila.** Farmacéutico especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Victor Herrán Carreira.** Paciente. ADIL-Asociación de Diabéticos Lucense.
- **María Jesús Lamas Díaz.** Farmacéutica especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Carlos Rodríguez Moreno.** Médico especialista en Farmacología Clínica. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Rafael Carlos Vidal Pérez.** Médico especialista en Cardiología. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **María Jesús Wandosell Picatoste.** Enfermera. Área de Gestión Integrada de Santiago.

Para que conste donde proceda, y a petición del promotor/investigador, en Santiago de Compostela, a 30 de marzo de 2017.

El Secretario del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago Lugo,



Firmado digitalmente por: guillermo.jose.prada.ramallal@sergas.es  
Fecha: 2017.03.30 14:52:29 +02'00'

Guillermo José Prada Ramallal

3. Permiso de reproducción de imágenes procedentes del artículo original de Matsugaki y colaboradores, con número de licencia 4102090725043 (Copyright Elsevier).





4. Publicación en le revista de la Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología.

<http://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-cirugia-ortopedica-traumatologia-129-articulo-estudio-viabilidad-adhesividad-celular-osteoblastos-S1888441514001635>





## 5. Publicación enviada a “Colloids and Surfaces B” (en proceso de aceptación)

Nuber of Figures: 6  
 Number of Words: 4.918  
 Number of tables: 2

### **In vitro response of bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSCs) on laser-induced periodic surface structures for hard tissue replacement: Comparative between tantalum and titanium**

**Alberto Jorge-Mora<sup>1</sup>, Naroa Imaz<sup>2</sup>, Eva Garcia-Lecina<sup>2</sup>, Gerard O’connor<sup>3</sup>, Rodolfo Gómez-Vaamonde<sup>4</sup>, Ana Alonso-Pérez<sup>4</sup>, Jesús Pino-Minguez<sup>1</sup> and Daniel Nieto<sup>3,4,5</sup>**

<sup>1</sup>SERGAS (Galician Health Service) and IDIS (Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), Orthopaedic Department. Universidad de Santiago de Compostela.

<sup>2</sup>Surface Engineering Division, IK4-CIDETEC, Paseo Miramón 196, E-20014 Donostia-San Sebastián, Spain

<sup>3</sup>NCLA / Inspire Labs, School of Physics, National University of Ireland, University Road, Galway

<sup>4</sup>Musculoskeletal Pathology Group, Institute IDIS

<sup>5</sup>Photonics4Life Research Group, Departamento de Física Aplicada, Facultad de Física, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela 15782, Spain

#### **Abstract**

This study investigates the biological response of Tantalum and Titanium materials with Laser Induced Periodic Surface Structures (LIPSS) produced by a femtosecond laser at 1030 nm wavelength. Periodic surface nanostructures were formed by laser irradiation using a laser fluence slightly above the threshold laser fluence of Titanium and Tantalum applying femtosecond pulses with a 500 fs pulse duration at a high repetition rate to smooth polished Tantalum and Titanium surfaces, with an original roughness value of  $3.9 \pm 0.2$  nm and  $3.1 \pm 0.2$  nm respectively. We have demonstrated in vitro that LIPSS are an efficient option to increase osteoblastic differentiation of hBMSCs in titanium and tantalum surfaces. LIPSS created increase statistically cell metabolism (best values in MTT assay) and similar inflammatory response to the material (IL-6 and TNF- $\alpha$  values). Collagen is produced in more quantity and cells differentiate to osteoblast easily. These differences are seen from the beginning until the end point (day 20).

#### **1. Introduction**

Orthopaedic surgery has grown from the hand of new materials that made possible to perform procedures as total hip replacement with feasibility. These procedures are common in most orthopaedic departments [1] and the survival of these implants is critical to prevent loosening and the need for revision arthroplasty. The ideal surface to interact with bone has not been created, because promising results as seen with hydroxyapatite plasma coating decrease in long-term reviews [2].

Multiple techniques have been proposed to increase osteointegration in metals. Probably the most accepted and used are the creation of a plasma coating with hydroxyapatite and the



## 6. Carta de aceptación del capítulo de libro en IntechOpen.

<https://www.intechopen.com/>

**INTECH**  
open science | open minds

**CHAPTER:** In vitro evaluation of laser induced periodic surface structures on new zirconia/tantalum biocermet for hard tissue replacement.  
**AUTHORS:** Daniel Nieto, Alberto Jorge-Mora, Naroa Imaz, Nekane Frutos, Rodolfo Gomez, Jose Bartolomé, Jesus Pino and Gerard O'Connor  
**BOOK EDITOR:** Tatiana Itina  
**STATUS:** ACCEPTED

## FULL CHAPTER REVIEW

September 05, 2017

### Editor's comments

The Chapter is presents rather new results in particular related with wetting applications of laser-induced surface structures.  
 A better review of the previous results is required. In addition, a correlation between the obtained structures, laser parameters and final properties should be provided.  
 There is a problem with equation (1) and maybe with the other equations that should be corrected. Some parts include only 2 sentences and are too short.  
 The InTech template was not used, but is strongly recommended.  
 There are around 17% of the material that overlaps with the already published one and should be revised. In addition, there are many small linguistic mistakes ("on Figure", "as you can see", "a treated surface", "efficient option", etc...), so that it will be better to correct the Chapter by a Native English speaker.

After revision, the chapter is accepted for publication.  
 Similarity index: 2%

Sincerely yours,

InTechOpen

**INTECH**  
d.o.o. Rijeka

**INTECH d.o.o**

Janeza Trdine 9/51000 Rijeka, Croatia-EU/Phone: +385 (51) 770 447/Fax: +385 (51) 686 166/info@intechopen.com/www.intechopen.com