



TESIS DOCTORAL

**“ESTUDIO NANOMÉTRICO
DE BIOCOMPATIBILIDAD Y ADHESIVIDAD
CELULAR A BIOMATERIALES UTILIZADOS EN
CIRUGÍA ORTOPÉDICA”**

DOCTORANDO: JESÚS PINO MÍNGUEZ



UNIVERSIDADE DE
SANTIAGO DE COMPOSTELA

El Dr. D. JOSÉ COUCEIRO FOLLENTE, Prof. Titular del área de Traumatología y Cirugía Ortopédica de la Universidad de Santiago de Compostela

CERTIFICA que:

D. JESÚS PINO MÍNGUEZ, Licenciado en Medicina y Cirugía, Medico Especialista en Traumatología y Cirugía Ortopédica, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado: "ESTUDIO NANOMÉTRICO DE BIOCOPATIBILIDAD Y ADHESIVIDAD CELULAR A BIOMATERIALES UTILIZADOS EN CIRUGÍA ORTOPÉDICA" para su presentación como Tesis Doctoral en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Santiago de Compostela.

Considero que el estudio reúne las características y metodología de investigación necesarias para ser defendido y juzgado, para así optar al grado de DOCTOR en MEDICINA.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente informe como director de esta Tesis Doctoral.

Fdo. Prof. Dr. José Couceiro Follente

Santiago de Compostela, a 8 mayo de 2008

AGRADECIMIENTOS

- Al Profesor José Couceiro Follente, director de esta tesis, por su amistad, su estímulo constante y por todo lo que me ha enseñado desde que me incorpore a su Servicio.
- A Concha, mi mujer por su ayuda, su ánimo, su comprensión, por sus momentos de soledad y por haber estado conmigo siempre en los momentos difíciles.
- A mis hijos, Jesús, Laura y Lucía, por que son mi estímulo, para todo.
- A mis padres, por haberme educado en la idea del esfuerzo, el trabajo, la amistad y la generosidad.
- A Ramiro Couceiro Otero, por su inestimable y desinteresada ayuda, estímulo y colaboración en la elaboración de este trabajo.
- Al Profesor Juan Manuel Paz Fernández, por su colaboración en los estudios estadísticos, por su paciencia, por su ayuda amable y desinteresada.
- A Manuel González, el mejor informático, por su amistad y su ayuda eficaz y desinteresada.
- Al Profesor Tojo Sierra y la Profesora Rosaura Leis Trabazo, por su constante estímulo y ayuda en los últimos momentos.
- Al profesor José María Martín por su amistad, y constante estímulo.
- A los compañeros del Instituto de Ortopedia Maite, Luis, por su ayuda en los cultivos celulares.

2.3.4	Propiedades biomecánicas de los implantes de tantalio	37
2.4	Las cerámicas	38
2.4.1	Hidroxiapatita 35.5	39
2.4.1.1	La hidroxiapatita en el hueso	40
2.4.1.2	Fuentes de hidroxiapatita	41
2.4.2	Propiedades de la hidroxiapatita	43
2.4.2.1	Biocompatibilidad	43
2.4.2.2	Biodegradación	45
2.4.2.3	Biomecánica	46
2.4.2.4	Recubrimientos de metales por hidroxiapatita	47
2.4.2.5	Usos médicos de la hidroxiapatita	50
2.5	Microscopía de barrido electrónico SEM	54
2.5.1	Introducción a la Microscopía electrónica	54
2.5.2	Historia de la Microscopía electrónica de barrido	55
2.5.3	Bases del funcionamiento del SEM	57
2.6	Microscopía de fuerza atómica	60
2.6.1	Introducción	60
2.6.2	Mecanismo de funcionamiento del AFM	62
2.6.3	Modos de actividad del AFM	66
2.6.3.1	Modo de no-contacto NC-AFM	66
2.6.3.2	Modo de contacto C-AFM	68
2.6.3.3	AFM en modo de contacto intermitente “tappin mode”	71
2.6.4	Utilidad de la AFM en biomedicina	73
2.6.5	Propiedades mecánicas de las células	76
2.6.5.1	Procesado de imágenes	76
2.6.5.2	Las curvas de fuerza	77
2.6.5.3	Método de modulación de fuerza	78
2.6.5.4	Medición de la fuerza de adhesión celular	79
2.7	QCM-D	80
2.7.1	Propiedades visco elásticas de los biomateriales	80

2.7.2	QCM-D.....	83
2.8	Adsorción de las proteínas por biomateriales	90
2.8.1	Proteínas estructura	90
2.8.1.1	Estructura primaria de las proteínas	92
2.8.1.2	Estructura secundaria de las proteínas	94
2.8.1.3	Estructura terciaria de las proteínas	95
2.8.2	Adsorción de proteínas	98
2.8.3	Fibrinógeno	103
3.	OBJETIVOS	107
3.1	Objetivos primarios	109
3.2	Objetivos secundarios	110
4.	MATERIAL Y MÉTODOS	113
4.1	Hemocompatibilidad adsorción de fibrinógeno	115
4.1.1	Fibrinógeno	115
4.2	Sistema QCM-D.....	116
4.2.1	Sensores QCM-D	116
4.2.2	Aparato Q-Sense E4	119
4.3	Análisis de la muestra mediante microscopía de fuerza atómica AFM	124
4.4	Adhesión de osteoblastos	126
4.4.1	Cultivo de osteoblastos línea SaOS2	126
4.4.2	Análisis de los discos con osteoblastos, por microscopio electrónico de barrido SEM	128
4.5	Método estadístico	129
5.	RESULTADOS	133
5.1	Adsorción de fibrinógeno medido por Q-Sense	135
5.1.1	Adsorción de fibrinógeno medido por AFM	145
5.2	Adhesividad de osteoblastos	147
5.2.1	Adhesión de osteoblastos a las superficies estudiadas	147

5.2.2	Datos estadísticos de la adhesión de osteoblastos	149
5.2.3	Pruebas de contraste de hipótesis	167
5.2.4	Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon	168
6.	DISCUSIÓN	171
6.1	Absorción de fibrinógeno	173
6.1.1	Proceso de adsorción de fibrinógeno a biomateriales ..	173
6.1.2	Absorción de fibrinógeno a los distintos biomateriales em- pleados en este estudio	175
6.1.3	Influencia de la superficie del material en la adsorción del fibrinógeno	177
6.1.4	Propiedades mecánicas de la capa de proteínas adsorbidas	181
6.2	Adhesión de osteoblastos	182
6.2.1	Monitorización del proceso de adhesión de osteoblastos	182
6.2.2	Adhesión de osteoblastos a tantalio	183
6.2.3	Adhesión de osteoblastos a titanio	189
6.2.4	Adhesión de osteoblastos a hidroxiapatita	196
7.	CONCLUSIONES	203
8.	BIBLIOGRAFÍA	209
9.	GLOSARIO DE TÉRMINOS EMPLEADOS	237

JUSTIFICACIÓN



1. JUSTIFICACIÓN

En el momento actual en el campo de la implantología ósea tanto a nivel de cirujanos ortopédicos, como de odontólogos, se han desarrollado múltiples biomateriales, tanto como sustitutivos articulares, materiales de osteosíntesis, sustancias de relleno óseo, e implantes dentales.

El número total de implantes óseos realizados en nuestro país y en la comunidad europea ha aumentado considerablemente. Así mismo se han desarrollado diferentes técnicas de estudio de los mismos, entre las que se pueden citar su capacidad de osteointegración y las interacciones hueso implante.

En Cirugía Ortopédica se han venido utilizando implantes de distintos materiales desde muy antiguo. Ya en el antiguo Egipto (entre los años 1065 y 740 antes de Cristo) en el estudio de una momia de mujer se apreció un implante realizado en vida, una prótesis del dedo gordo del pie derecho. Así mismo los egipcios colocaban prótesis a los cadáveres que habían sufrido amputaciones, pensando que las necesitarían, para poder vivir en el más allá.

En la actualidad el empleo de biomateriales es una práctica habitual en las múltiples técnicas empleadas en distintas disciplinas y especialidades médicas. A pesar de todo, y como consecuencia de la multitud de aplicaciones, se han descubierto una serie de efectos

secundarios, colaterales o complicaciones, que hacen que los clínicos hayan definido unas indicaciones precisas para cada uno de ellos, así como la prevención de las complicaciones y la solución a las mismas cuando estas aparecen.

Una de las complicaciones consiste en la osteolisis, con la consiguiente pérdida de Tejido Óseo, lo que exige para su recuperación el empleo de injertos o sustitutos óseos. Los injertos son limitados cuantitativamente en su accesibilidad y los aloinjertos óseos pueden presentar efectos secundarios, como transmisión de enfermedades, reacciones de rechazo, pérdida de injerto etc. Por este motivo en la actualidad muchos de los centros de investigación están orientados en el desarrollo de sucedáneos óseos, relacionados con la ingeniería de tejidos, que cuenta con la utilización de matrices o armazones de biomateriales. El estudio de estos biomateriales de distinta composición y estructura da lugar a la aparición de un área de investigación que implica el conocimiento de la interacción de células formadoras de hueso con los distintos armazones osteoconductores.

Osteoconducción es la propiedad que tiene un biomaterial para servir de andamio, para que se inicie el crecimiento y la proliferación de células osteoprogenitoras y de capilares a partir del hueso huésped. A diferencia con la osteogénesis en la cual el injerto por sí mismo es capaz de generar hueso.

Osteoinducción es una propiedad muy ligada al desarrollo del tejido óseo y consiste en la propiedad de estimular e inducir la formación de hueso nuevo.

Consideramos que es imprescindible un conocimiento profundo de los materiales empleados, con sus efectos tanto in Vitro, como una vez implantados en el ser humano. Este conocimiento es una de las formas de desarrollar un nexo de unión entre ciencia básica y la clínica o también llamada biomedicina.

Nuestra experiencia clínica en el empleo de distintos biomateriales nos ha llevado a ahondar en el estudio de ciertos materiales tradicionales comparándolos con otros de reciente aplicación, cuya finalidad principal es la respuesta de células formadoras de hueso, en presencia de los mismos.

La adsorción de proteínas de los fluidos corporales incluyendo los componentes de la matriz extracelular de la interfaz implante-tejido es la primera respuesta biológica a la implantación de un biomaterial. Esta adhesión de proteínas al implante irá seguida por la adherencia de células, la cual puede estar así mismo influida por la interacción de las mencionadas proteínas, dando así origen al llamado proceso de biocompatibilidad de un determinado material.

Muchos métodos han sido utilizados en los estudios de interacciones de proteínas y células con diferentes biomateriales como pueden ser la Microscopía Óptica (MO), la elipsitometría (ELM), estudios con marcadores radiactivos, espectroscopia electrónica de análisis químico (ESCA), Espectroscopia de Masa Iónica (SIMS), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), etc...

Pero a pesar de las anteriores técnicas, la actual investigación sobre biomateriales, está limitada por la disponibilidad de herramientas rápidas y versátiles para valorar las interacciones de forma cuantitativa de las células con las superficies, en tiempo real.

Una moderna técnica empleada para la monitorización del proceso de adhesión de células y proteínas en tiempo real, es el llamado QCM-D. Este sistema permite mediciones (cuantificaciones) en tiempo real, de las variaciones de masa y visco elasticidad, a través de cambios en la frecuencia y en la energía de disipación, que se originan durante el proceso de adhesión celular a un biomaterial, lo que permite un estudio de los cambios, así como una medida cuantitativa de las células adheridas, de una manera no invasiva.

En presente trabajo intentamos estudiar la biocompatibilidad de 3 distintos materiales utilizados habitualmente en C. Ortopédica como son el titanio, la hidroxiapatita, y más recientemente el tantalio. Se pretende investigar su biocompatibilidad mediante la capacidad de adsorción de fibrinógeno, así como la capacidad de adherencia a los mismos de osteoblastos cultivados “in vitro” realizando estudios en tiempo real.

Con este objeto hemos medido tanto la adhesividad de las proteínas, como de las células, por medio de la técnica QCM-D (Cuarzo Cristal Microbalance con Disipación). Así mismo hemos utilizado para el estudio de la adhesión del fibrinógeno a los biomateriales anteriormente descritos, la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), y para la adhesividad de los osteoblastos el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM).

INTRODUCCIÓN



2. INTRODUCCIÓN

2.1. BIOMATERIALES

2.1.1 Definición

Se define como biomaterial a un Material diseñado para actuar interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo¹. Tradicionalmente en los estudios de los biomateriales, se ha realizado un enfoque de cuestiones, tales como la biocompatibilidad, las reacción del tejido receptor hacia el implante, la citotoxicidad y las propiedades estructurales del implante². Estos aspectos son importantes y proporcionan las bases científicas para un entendimiento claro y bastante exitoso de los materiales utilizados en la práctica clínica

2.1.2 Requisitos de los biomateriales

Los biomateriales pueden tener propiedades especiales, que pueden ser utilizadas para conocer las necesidades de una aplicación clínica en particular. Este es un concepto importante a tener en cuenta; por ejemplo un biomaterial puede ser biocompatible, no cancerígeno, resistente a la corrosión, de baja toxicidad, y escaso desgaste³. Sin embargo dependiendo de su aplicación, diferentes requerimientos

pueden surgir y en ocasiones estos requerimientos pueden ser completamente opuestos. En ingeniería tisular del hueso, por ejemplo si el andamiaje es polimérico necesita ser biodegradable, para que las células, al generar su propia matriz extracelular reemplacen a ese material por un nuevo tejido óseo neo formado sobre dicha matriz.

Generalmente los requisitos de los biomateriales pueden ser agrupados en 4 amplias categorías⁴: Biocompatible, Esterilizable, Funcional y Manufacturable

2.1.2.1 *Biocompatibilidad*

Se han considerado 3 definiciones de biocompatibilidad la oficial, la normativa y la practica⁵.

La definición *oficial* de biocompatibilidad, consensuada en la Conferencia de Chester de la European Society for Biomaterials de 1987⁶, donde se expone que la biocompatibilidad es la capacidad de un material de ser utilizado en una aplicación específica, con una respuesta adecuada del tejido receptor.

Esta es una definición amplia, pero que no profundiza sobre cómo se puede medir la biocompatibilidad.

Esta carencia se suple con la normativa ISO 10993-1 sobre biocompatibilidad, donde se detallan una serie de ensayos (tabla 1)⁷ que debe superar un biomaterial para ser considerado biocompatible. La norma es útil sobre todo, para detectar posibles daños irreversibles sobre los tejidos, o del cuerpo en general, producidos por el uso de una muestra de material ensayado. Estos daños hacen referencia a la posible genotoxicidad, carcinogenicidad, toxicidad sobre el feto en

gestación, citotoxicidad, alergias, sensibilización al mismo y efectos de los residuos procedentes de la esterilización. Esta es la definición *normativa* de biocompatibilidad y su inconveniente radica en el hecho de que no evalúa la respuesta del material, con la forma del implante en la zona de implantación, para la función específica que ha de desempeñar.

No obstante el ensayo de efectos locales después de la implantación, lleva directamente a la definición *práctica* ya que este ensayo evalúa si se produce la “reacción a cuerpo extraño”. Si el material después de aproximadamente un mes de implantación, queda envuelto en una capa de tejido fino, blando (fibroso o cartilaginoso) avascular y si esta reacción es poco agresiva, un cirujano de forma práctica considerara que el material es biocompatible. De acuerdo con esta propiedad, en la práctica clínica, se intentara buscar una aplicación terapéutica adecuada para el material⁷.

Tabla (1-2) Ensayos biológicos para dispositivos médicos, de acuerdo con la normativa ISO10993-1

Requerimientos para el bienestar animal	Residuos de esterilización
Ensayos de geno-toxicidad y carcinogenicidad	Degradación de materiales
Toxicidad en la reproducción	Irritación y sensibilidad
Interacción con la sangre	Toxicidad sistémica
Citotoxicidad <i>in vitro</i>	Preparación de muestras
Efectos locales después de la implantación	Identificación y cuantificación de productos de degradación

Por lo tanto un biomaterial no debe perturbar o inducir reacciones de rechazo por parte del huésped y debería promover armonía y buena integración tejido-implante. Un estallido inicial de la respuesta inflamatoria es esperado y en ocasiones es considerado esencial en los procesos de curación, sin embargo un proceso inflamatorio prolongado no es deseable y puede inducir a necrosis tisular o incompatibilidad⁸. Al mismo tiempo no debe inducir citotoxicidad, ni carcinogénesis en el huésped.

2.1.2.2 Esterilizable

El biomaterial debe de ser capaz de soportar la esterilización, estas técnicas incluyen rayos gamma, gas, autoclave, y no debe tener interacción, ni debe de afectarse, por ninguno de estos procesos.

2.1.2.3 Funcionalidad

La funcionalidad de un biomaterial depende de su capacidad de adaptarse o conseguir la forma adecuada para desempeñar una función particular

2.1.2.4 Manufacturabilidad

Frecuentemente se ha dicho que hay pocos materiales adecuados para ser biocompatibles, sin embargo, es frecuente que en algunos casos, durante el proceso de fabricación este altere sus propiedades funcionales por lo que, los ingenieros de materiales pueden contribuir de una forma significativa a mejorar o conseguir esta propiedad de fabricación.

2.1.3 Clasificación de los biomateriales

Según su origen^{4,1}:

- Materiales biológicos:
 - Tejidos blandos (Piel, tendón, pericardio)
 - Tejidos duros (hueso, dentina)

- Materiales Sintéticos:
 - Polímeros (Polimetilmetacrilato, PEEK, etc.)
 - Metales (Acero, Ti, Ti-aleaciones, Cr-Co, Ta)
 - Cerámicas (Alúmina, hidroxiapatita, fosfato tricalcico, etc.)
 - Materiales compuestos (Composites)

Según su respuesta biológica⁹.

- Biotolerados Son encapsulados por una capa de tejido conjuntivo fibroso (PMMA, acero inoxidable, Cr-Co)
- Bioinertes. La superficie del material, es recubierta por una capa de oxido estable, presenta contacto directo con el hueso, y no se produce inhibición de la osteogénesis (Ti, Ti-aleaciones, alúmina, circonia)
- Bioactivos producen un enlace químico directo con el hueso circundante (fosfato cálcico, hidroxiapatita, biovidrios), gracias a su capacidad para fijar proteínas inductoras en su superficie.

2.1.4 Propiedades Mecánicas de los Biomateriales

2.1.4.1 Conceptos básicos

En general dividimos a los biomateriales sintéticos en metales, polímeros, cerámicos y composites, pero tanto los biomateriales utilizados en la confección de dispositivos como tejidos biológicos, son sistemas compuestos de estructura compleja¹⁰.

Los metales tienen una estructura cristalina en la que los átomos están dispuestos de manera ordenada.

Los polímeros están formados por largas cadenas de moléculas orgánicas que pueden estar libres o unidas entre sí a través de enlaces covalentes o fuerzas secundarias. Esto es lo que permite diferenciar a los polímeros termoplásticos de los termorrígidos. Los primeros pueden llegar a fluir, al incrementar la temperatura, mientras que los segundos no pueden hacerlo sufriendo antes su degradación.

Los polímeros amorfos experimentan un cambio en la capacidad calorífica al alcanzar la temperatura de transición vítrea (T_g) donde se produce una absorción de energía para la movilización cooperativa de segmentos de cadena. Esta temperatura define el cambio de estado vítreo al estado gomoso. Los polímeros semicristalinos además de esta transición, muestran temperaturas de cristalización y de fusión. Por lo tanto las propiedades mecánicas de los polímeros dependerán de la temperatura del ensayo empleada en relación con las temperaturas de transición antes mencionadas.

Los elastómeros son sistemas poliméricos cuyas dimensiones pueden variar mucho ante la aplicación de una fuerza, la deformación puede llegar a valores del 800%. Cuanto mayor es el número de puntos de entrecruzamiento entre las cadenas más rígido será el material.

Los cerámicos son materiales inorgánicos¹¹, no metálicos, cristalinos o no, donde los átomos se mantienen unidos mediante enlaces iónicos y/o covalentes.

Los materiales compuestos o “composites” pueden ser definidos como combinaciones tridimensionales de al menos 2 materiales con diferencias significativas en sus propiedades físicas y químicas, con una interfaz distinta.

2.1.4.2 Esfuerzo y deformación

La deformación observada cuando se aplica una carga determinada, depende del material, la geometría de la muestra y la temperatura a la que se realiza el ensayo⁵. Por lo tanto en el caso de estructuras con formas complejas, resulta difícil comparar la rigidez de materiales diferentes o predecir la capacidad de soportar carga. Entonces tanto la carga, como la fuerza aplicada (F) y la extensión deben ser normalizadas. Se definen así dos parámetros: esfuerzo nominal (nominal stress σ) y deformación nominal (nominal strain ε). El esfuerzo se obtiene dividiendo la carga aplicada por el área de la sección resistente (A) y la diferencia se calcula mediante el cociente entre la extensión (Cambio en la longitud ΔL) y la longitud original de la muestra (L_0)

$$\sigma = F/A \quad \varepsilon = \Delta L/L_0$$

El esfuerzo normalmente se expresa en MPa (1MPa es 1N/m^2 y equivale a 145 psi o libras por pulgada cuadrada), mientras que la deformación se expresa normalmente como porcentaje ($\varepsilon \%$).

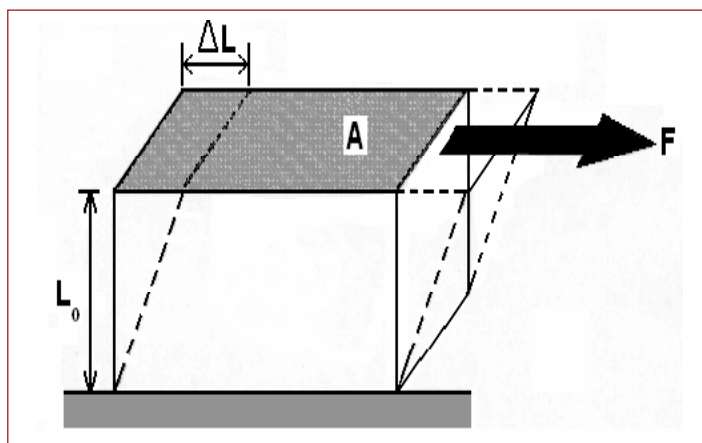


Figura 1. Deformación de un material para la acción de una fuerza paralela al área de resistencia. (Tomado de propiedades mecánicas de biomateriales T. R. Cuadrado y col. ITEMA)

Tanto en tracción como en compresión el área que soporta la carga es perpendicular a la dirección en la que se aplica (A_{\perp}) y el cambio de longitud es paralelo a la longitud original ($L_{0_{\parallel}}$). En el caso de un ensayo de corte (fig. 1) la carga aplicada es paralela al área resistente (A_{\parallel}) definiendo el esfuerzo de corte o de fricción (*shear stress*, τ) y el cambio dimensional es perpendicular a la dimensión de la referencia ($L_{0_{\perp}}$), definiendo la deformación de corte (*shear strain* γ) del mismo modo que en los casos anteriores.

En 1678 Hooke mostro que un material solido sometido a una fuerza de tracción, se extiende una cantidad que es proporcional a la carga. Esto se conoce como ley de Hooke y simplemente expresa el hecho de que la mayoría de los materiales sólidos se comportan de una manera elástica, si la carga no es demasiado grande. Empleando las definiciones dadas, la Ley de Hooke puede expresarse en términos cuantitativos como: $\sigma = \mathbf{E} \cdot \varepsilon$ (para tensión o compresión), $\tau = \mathbf{G} \cdot \gamma$ (para corte) \mathbf{E} y \mathbf{G} son constantes de proporcionalidad, \mathbf{E} usualmente se denomina *Modulo de Elasticidad o Modulo de Young*, mientras que \mathbf{G} es el modulo de corte⁷. Estos módulos están representados por el valor de la pendiente de la región elástica de una curva de esfuerzo, fig 2.

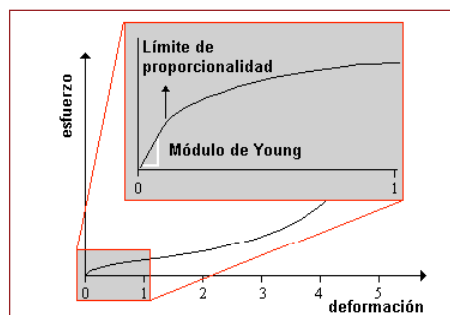


Figura 2. Curva de esfuerzo-deformación mostrando el límite de elasticidad lineal. (Tomado de propiedades mecánicas de biomateriales T. R. Cuadrado y col. ITEMA)

Las dos constantes E y G, caracterizan la rigidez de un material isotópico, es decir un material cuyas propiedades son las mismas en todas las direcciones. Sin embargo, muchos materiales poliméricos y la mayoría de los tejidos biológicos son anisotópicos (no poseen las mismas propiedades en todas las direcciones) aun a escala macroscópica. Los huesos, ligamentos y suturas son más resistentes y rígidos en la dirección de las fibras (longitudinal) que en la dirección transversal. En esos casos para realizar las propiedades de esfuerzo-deformación se requiere más de dos constantes elásticas. La rigidez no debe confundirse con la dureza superficial, que normalmente se define como la resistencia de un material a ser rallado o indentado.

2.1.4.2.1 Características de la curva esfuerzo-deformación

La curva esfuerzo deformación se puede dividir en varios tramos OABCD (figura 3), el primer tramo de la curva OA,¹² es lineal y como se comento anteriormente indica una proporcionalidad entre esfuerzo y deformación, es decir el material se deforma con arreglo a la Ley de Hooke. La pendiente OA (σ_A / δ_A) es el modulo. Una vez superado el punto A, punto límite de proporcionalidad, aun hay elasticidad en el tramo pero ya no sigue la ley de Hooke (Zona elástica no lineal)

A partir del punto B la deformación deja de ser elástica, por lo que ese punto recibe el nombre de *límite elástico o punto de fluencia (yield point)*. En este caso el material ya no se comporta como un cuerpo elástico, sino como un *sólido plástico*. En polímeros semicristalinos como polietileno o PEEK se observa la formación de un cuello de probeta y curvas con un punto de fluencia¹³ (fig.4). Los

puntos de fluencia en los ensayos de tracción se asocian siempre con un mecanismo de deformación que absorbe energía. En el caso de polímeros semicristalinos, este mecanismo involucra la orientación y la destrucción de morfologías semicristalinas de dimensiones de orden de micrones. Después del punto C, se observa que para seguir deformando el material hay que aplicar un esfuerzo algo mayor, debido a que el material puede experimentar un reordenamiento de su estructura, dando por resultado una acción de refuerzo. Este fenómeno es muy común en polímeros semicristalinos donde se observa cristalización de la fase amorfa inducida por la deformación.

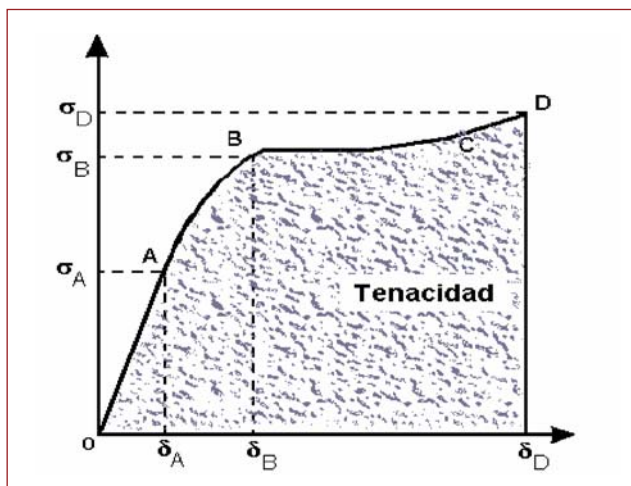


Figura 3. Curva esfuerzo-deformación

(Tomado de propiedades mecánicas de biomateriales T. R. Cuadrado y col. ITEMA)

El punto final D corresponde al momento en el que el material rompe¹⁴. Si se mide el área bajo la curva se obtiene la energía que absorbe la muestra antes de romperse, propiedad que se denomina *tenacidad* (*toughness*). Así mientras la resistencia indica cuanta

fuerza es necesaria para romper una muestra, la tenacidad indica la energía consumida para el proceso de rotura.

La *resiliencia* representa el trabajo necesario para deformar al material hasta su límite elástico, es decir, la energía que el material puede absorber sin experimentar deformación permanente y corresponde al área comprendida debajo de la porción elástica de la curva. El modulo de resiliencia o energía de resiliencia se refiere a la unidad de volumen de material.

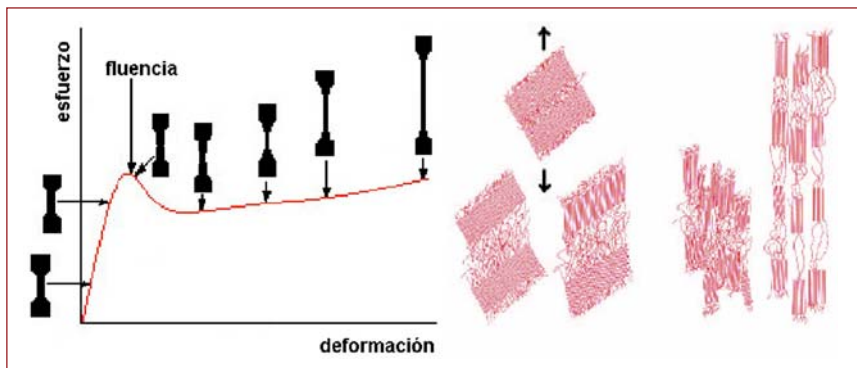


Fig 4. Mecanismos de deformación en polímeros semicristalinos (Tomado de propiedades mecánicas de biomateriales T. R. Cuadrado y col. ITEMA)

2.1.5 Fragilidad y ductilidad

Los conceptos de fragilidad y ductilidad se refieren a la capacidad de deformación de un material. La zona de comportamiento elástico es limitada. Los defectos presentes en todos los materiales, eventualmente comienzan a crecer rápidamente bajo la influencia de la carga aplicada, y el material fallara repentinamente por una fractura frágil. Un material es frágil cuando exhibe una resistencia a la rotura alta, pero una deformación baja, mientras que un material es dúctil cuando muestra una deformación alta⁷.

En general los materiales cerámicos son duros y frágiles con baja ductilidad y tenacidad. La falta de plasticidad en las cerámicas cristalinas es debida a sus enlaces iónicos y covalentes.

En los metales la deformación plástica tiene lugar por un movimiento de defectos lineales (dislocaciones) en la estructura cristalina sobre planos de deslizamiento del cristal. Las dislocaciones se mueven bajo esfuerzos relativamente pequeños a causa de la naturaleza no direccional del enlace metálico, donde todos los átomos involucrados en el enlace tienen carga negativa homogéneamente distribuida en la superficie.

Los datos básicos de propiedades mecánicas de metales dúctiles tales como cobre y aluminio, se obtienen a partir de un ensayo de tracción en el cual la probeta alcanza la rotura.

La *resistencia a la rotura*⁷ se define como el esfuerzo que se requiere para romper una muestra y es común encontrarla con el nombre de *resistencia íntima*. La *deformación a la rotura* que algunas veces es llamada *elongación íntima*, es la deformación de la muestra cuando ésta se rompe.

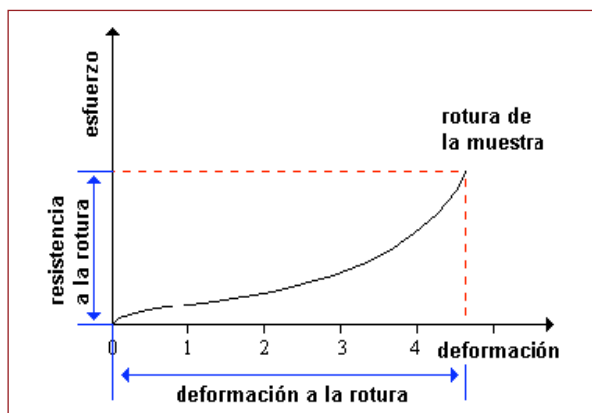


Figura 5. Resistencia a la rotura: resistencia y deformación máxima

(Tomado de propiedades mecánicas de biomateriales T. R. Cuadrado y col. ITEMA)

Es normal encontrar los términos tensile strength, compressive strength, y ultimate strain para designar la resistencia a la tracción, a la compresión y deformación a la rotura.

A diferencia de los metales el comportamiento de los polímeros es muy sensible a un gran número de variables tales como la temperatura, la deformidad de deformación, el peso molecular y el grado de entrecruzamiento en el caso de los polímeros termorrígidos como se indica en la figura 6.

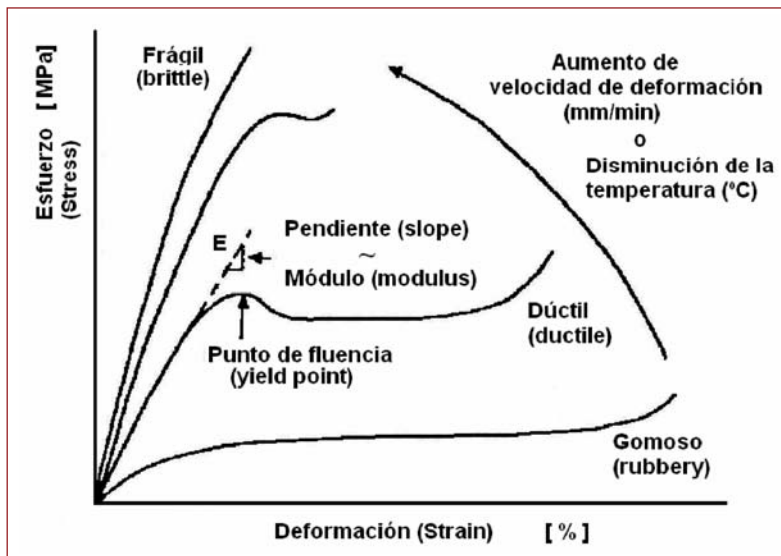


Figura 6. Curvas de esfuerzo deformación mostrando diferentes comportamientos, según las condiciones en las que se realiza el ensayo.

(Tomado de propiedades mecánicas de biomateriales T. R. Cuadrado y col. ITEMA)

En la figura 7 se observan curvas típicas esfuerzo-deformación para varios polímeros. En este ensayo el esfuerzo aplicado varía de forma tal de mantener una velocidad de deformación constante (velocidad 5 mm/min)

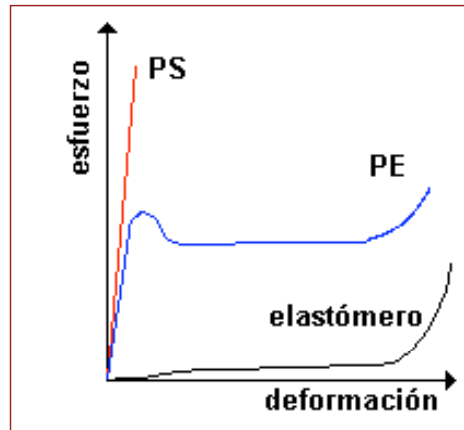


Figura 7. Ejemplo de un polímero rígido y frágil (poliestrieno, PS) rígido, tenaz y dúctil (polietileno, PE), y un polímero blando y dúctil (elastómero). (Tomado de propiedades mecánicas de biomateriales T. R. Cuadrado y col. ITEMA)

Los elastómeros o gomas son polímeros amorfos, entrecruzados, que pueden deformarse notablemente en forma elástica sin un aumento importante del esfuerzo y sin exhibir fluencia, pudiendo recuperar su dimensión original al liberar la carga (dependiendo de los niveles de elongación alcanzados pueden presentar deformación residual permanente)

2.1.6 Normalización de los biomateriales

Una norma es un documento de aplicación voluntaria, elaborado por consenso entre especialistas, que contiene especificaciones técnicas (geométricas, dimensionales, velocidades, condiciones de ensayo, etc.) que permiten comparar los materiales al someterlos a idénticos estados de carga. Existen organismos de normalización reconocidos a nivel nacional e internacional entre los que se encuentran por ejemplo, American Society for Testing and Materials (ASTM), International Organization for Standardization (ISO), Comité Europeo de Normaliza-

ción (CEN), Agencia Española de Normalización (AENOR), etc., Las normas son la herramienta fundamental para el desarrollo industrial y comercial de un país, ya que sirven como instrumento para comparar la calidad de productos y servicios.

Si bien las normas se establecen para fijar el modo de sollicitación y el estado tensional aplicado que permita comparar propiedades de diferentes materiales, en ciertos casos los ensayos mecánicos pueden realizarse en otras condiciones, de velocidad de mordaza, temperatura o geometría de probeta. Por ejemplo en el área de la investigación, en ciencia y tecnología de materiales, se utilizan los ensayos mecánicos para extraer información a cerca de la micro estructura u otros aspectos de la naturaleza propia del material. Además de los equipos propios de ensayo mecánico se ha desarrollado material específico para el análisis del comportamiento mecánico de estructuras biológicas, biomateriales y dispositivos biomédicos donde se utilizan muestras que contemplan la geometría propia de la aplicación con sus estados tensionales complejos. Esto permite evaluar de manera más aproximada el comportamiento del biomaterial en las mismas condiciones.

2.2 TITANIO

2.2.1 Historia

El titanio fue descubierto en 1791 por William Gregor, cuando estudiaba un metal gris plata que había encontrado. Poco después en 1795 un químico austriaco Martin Kalprotz le dio el nombre de titanio. Es el noveno elemento más abundante de la corteza de la tierra. Vir-

tualmente se encuentra en todas las rocas ígneas y sus sedimentos, así como muchos minerales, principalmente los que contienen hierro. El mineral más importante del que se extrae el titanio es el rutilo (óxido de titanio) muy abundante en áreas costeras. Matthew Hunter (1887) preparó por primera vez titanio puro calentando tetra cloruro de titanio (TiCl_4) con sodio a $700\text{-}800^\circ\text{C}$ en un reactor de acero.

El titanio como metal no se usó fuera de laboratorio, hasta que en 1946 William Justin Kroll, desarrolló un método para poder producirlo comercialmente, mediante reducción del TiCl_4 con magnesio, y este método, llamado método de Kroll, es el utilizado aun hoy en día. En este proceso el metal se mantiene constantemente en una atmósfera de gas inerte, como argón o helio, que inhibe su reacción, con cualquier otro elemento¹⁵.

Este fue el primer proceso que permitió la obtención de cantidades apreciables de titanio puro y es el método utilizado en la actualidad. En la década de los años 50 el Gobierno de los Estados Unidos potenció los estudios relativos al titanio y a sus aleaciones, ya que debido a sus excelentes propiedades, caracterizadas por una densidad reducida, una excelente relación resistencia mecánica/densidad y un buen comportamiento a altas temperaturas, las aleaciones de titanio constituyen un material muy útil en los campos de la industria aeroespacial y militar. En la década de los 60, se amplió su uso a otras aplicaciones como la industria química, debido a su excelente resistencia a la corrosión. Esta resistencia es causada por una capa de pasivado formada por los óxidos de titanio que se forman espontáneamente en su superficie al entrar en contacto con la atmósfera, otras aplicaciones estudiadas del titanio y sus aleaciones son las aplicaciones

estructurales en ambientes salinos por su resistencia a la corrosión y en el campo de los biomateriales gracias a su excelente biocompatibilidad. Actualmente el titanio se utiliza principalmente en la industria aeroespacial, en la industria química y en aplicaciones médicas entre otras. Cabe destacar que solo un 10% de la producción total se destina a la producción titanio en forma metálica. El 90% se destina a la fabricación de dióxido de titanio el cual es usado en forma de pintura protectora anti-oxido; del 10% restante, el 50% es utilizado para la fabricación de la aleación Ti_6AL_4V

2.2.2 Propiedades físicas del Titanio

Es un metal de transición de color plateado grisáceo, paramagnético (no se imanta), muy abundante en la naturaleza, reciclable, forma aleaciones con otros metales, para mejorar sus prestaciones mecánicas, es muy resistente a la oxidación y a la corrosión, tiene poca conductividad, no es un buen conductor del calor, ni de la electricidad, es refractario, mecanizado por el arranque de viruta, semejante al acero inoxidable, permite el fresado químico, maleable permite la producción de laminas muy delgadas, dúctil permite la fabricación de alambre delgada, duro escala de Mohs 6, muy resistente a la tracción, presenta gran tenacidad, permite la fabricación de piezas por fundición y moldeo, material soldable, permite varias clases de tratamientos tanto termoquímicos como de superficiales¹⁶, puede mantener una alta memoria en su forma.

La resistencia a la corrosión que presenta es debida al fenómeno de pasivación que sufre (se forma un oxido que lo recubre). Es resistente a temperatura ambiente al acido sulfúrico diluido y al acido

clorhídrico diluido así como a otros ácidos orgánicos, también es resistente a las bases, incluso en caliente. Sin embargo se puede disolver en ácidos en caliente. A temperaturas elevadas puede reaccionar fácilmente con el nitrógeno, el oxígeno, el hidrógeno, el boro y otros no metales.

Numero Atómico	22
Peso Atómico	47,88 g·mol ⁻¹
Volumen Atómico	10,6 Å ³
Radio covalente	1,32 Å
Primer potencial de ionización	6,83 Ev
Valencia	2,3,4
Punto de fusión	1.670° C
Punto de ebullición	3.260° C
Estructura cristalina	α (HTC) para T <882° C β (BCC) para T >882° C
Parámetros de red cristalina	α:a=0,295 nm; c=0,468 nm β:a= 0,332 nm (a 900°C)
Temperatura de transición α-β	882° C
Densidad	fase α (20° C) : 4,51 g·cm ⁻³ fase β (885° C): 4,35 g·cm ⁻³
Capacidad calorífica	523 J/kg° C
Conductividad térmica	17 W/m ° C
Coefficiente de expansión térmica (a 20° C)	8,41 x 10 ⁻⁶ /° C
Conductividad eléctrica (relativa al cobre)	0,031
Resistividad eléctrica	0,0026 Ω . m
Susceptibilidad magnética (K)	1,25 x 10 ⁻⁶

Tabla 2. Características físico-químicas del titanio

2.2.3 El Titanio cp. (Comercialmente puro)

La elevada reactividad del titanio dificulta la obtención del material puro, por lo que en aplicaciones comerciales se trabaja con el titanio denominado comercialmente puro (cp), con diferentes niveles de impurezas presentes en su composición. La normativa de la American

Society for Testing Materials (ASTM) clasifica el titanio cp en cuatro grados definidos por la concentración presente de otros elementos como se muestra en el tabla I.

Composición (wt%)

	N	C	O	Fe	H	Ti
Grado 1	0,03	0,10	0,18	0,20	0,0125	bal.
Grado 2	0,03	0,10	0,25	0,30	0,0125	bal.
Grado 3	0,05	0,10	0,35	0,30	0,0125	bal.
Grado 4	0,05	0,10	0,40	0,50	0,0125	bal.

Tabla 3-2. Composición química del titanio según la normativa ASTM F67, para aplicaciones biomédicas

Esta elevada reactividad del titanio con el oxígeno origina la rápida formación de una capa superficial de óxido. Los óxidos formados van desde el TiO hasta el Ti_7O_{12} , cada uno de los cuales muestran una gradación diferente y para capas delgadas muestran una superficie multicolorada. Esta capa de óxido si bien es muy delgada, también es sumamente impermeable. De esta forma el metal queda protegido por una capa inerte que le protege de la corrosión. Esta notable propiedad hace del titanio un material ideal para su uso en ambientes corrosivos¹⁷. Las propiedades mecánicas del titanio también dependen fuertemente de su grado de pureza. Por ello, las propiedades mecánicas del titanio metal y las del titanio comercialmente puro presentan ciertas diferenciadas debida básicamente a las variaciones de la concentración química de los diferentes grados mostrado en la tabla 3-2. las propiedades mecánicas para los diferente grados se muestran en el tabla 4-2.

Grado	Resistencia a la tracción (MPa)	Limite elástico (MPa)	Elongación (%)
1	240	170	24
2	345	275	20
3	450	380	18
4	550	483	15

Tabla 4-2. Propiedades mecánicas requeridas según la normativa ASTM F67-00 para los 4 grados comerciales de titanio para aplicaciones biomédicas

Al observar los valores de la tabla 4-2 se puede constatar que la resistencia máxima a fractura aumenta con la adicción de elementos aleantes en la red cristalina de titanio si bien también se produce una disminución de la elongación¹⁸. En este contexto general, el titanio y sus aleaciones se han empleado tradicionalmente en el campo biomédico, constituyendo junto con los aceros inoxidables y las aleaciones cromo-cobalto una de las principales familias de metales utilizados para la fabricación de implantes médicos.

2.2.4 Micro estructuras

Al igual que en todas las aleaciones monofásicas, la micro estructura del titanio cp depende del trabajo en frío y del proceso de recocido realizado¹⁹. Además si se enfría el material desde temperaturas superiores a la temperatura de β -transus, la micro estructura también es influenciada por la velocidad de enfriamiento. Todos estos factores hacen posible la obtención de 3 micro estructuras diferentes de titanio cp: la micro estructura equiaxial α , la microestructura martensítica, con

celda hexagonal, denominada fase α' y una tercera microestructura en formación de placas denominada de Widmanstätten.

2.2.5 Corrosión del titanio

Las aleaciones de titanio forman espontáneamente una capa pasiva de óxido de titanio que es la responsable de su magnífica resistencia a la corrosión, dicha capa está compuesta por óxidos amorfos de titanio desde Ti_2O hasta TiO_2 con un espesor variable entre 5 y 10 nm según el tratamiento, el acabado superficial, el medio etc. La capa de pasivación se forma de manera natural tras pocos milisegundos de contacto del titanio con un medio conteniendo oxígeno, aunque también se puede producir y hacer más espesa mediante tratamientos químicos y electroquímicos²⁰. Los diagramas de Pourbaix, basados en datos termodinámicos así como los ensayos potencio dinámicos, es decir, la termodinámica y la cinética, demuestran que la capa protectora del Ti_{cp} , principalmente formada por TiO_2 es resistente químicamente en el medio fisiológico y se reemplaza espontáneamente si se desprende como consecuencia de la acción mecánica. De hecho el rango de pasividad electroquímica es mucho más amplio que en la región de potenciales, a la cual se puede ver sometida en el medio fisiológico, también cubre un rango de estabilidad amplio a diferentes PH excepto en casos especiales donde se producen condiciones reductoras severas por la reacción de un medio altamente acidificado o fuertemente carente de oxígeno. A pesar de las magníficas propiedades electroquímicas²¹ y resistencia a la corrosión del titanio para su uso como sustituto de tejidos duros, se ha reportado problemas de carácter electroquímico asociado con procesos degradativos de ese

metal. Entre ellos encontramos la formación de pilas galvánicas por contacto eléctrico de implantes dentales de titanio con superestructuras de otro material. El aflojamiento de prótesis articulares cementadas²² puede ser debido a corrosión por aireación diferencial asistida por el desgaste y preteing, la citotoxicidad puede ser causada por la cesión desde el implante al tejido circundante, de partículas del metal TiO_2 al huésped. Así mismo la corrosión puede ser inducida bajo condiciones bioquímicas específicas causadas por compuestos oxigenados que generan los macrófagos.

2.2.6 Características de las aleaciones de titanio

El titanio es un material de transición con una estructura electrónica incompleta que le permite formar soluciones sólidas con muchos elementos de sustitución con un tamaño atómico del orden de más/ menos el 20% del tamaño atómico del titanio. En su forma original, el titanio tiene una temperatura de fusión elevada $1678^\circ C$ con una estructura cristalográfica hexagonal compacta (HCP) α hasta la transición en fase β a $882,5^\circ C$ ^{23,24} transformándose en una estructura centrada en el cuerpo (BCC) β por encima de ésta temperatura.

Las aleaciones de titanio se clasifican de la manera siguiente: α , near- α , $\alpha+\beta$, β metaestable, o β estable dependiendo de sus microestructuras a temperatura ambiente. Entonces, los elementos de aleación con el titanio se clasifican en tres grupos:

α -estabilizantes, Al, O, N, C;

β -estabilizantes como Mo, V, Nb, Ta, Fe, W, Cr, Si, Ni, Co, Mn, H,
y neutrales con Zr

$\alpha + \beta$

Las aleaciones de tipo α tienen una menor resistencia a la corrosión y se utilizan en biomedicina²⁵ de manera limitada por sus bajas resistencias a la temperatura ambiente. Las aleaciones $\alpha + \beta$ tienen una mejor resistencia por la presencia de estas dos fases. Sus propiedades dependen de la composición, de la proporción relativa de cada fase α/β , de los tratamientos térmicos y de los procesos termo mecánicos. Las aleaciones α (estable o metaestable) son aleaciones de titanio de alta resistencia^{22, 24}, de buena deformidad y de endurecimiento elevado. Las β -aleaciones tienen también la posibilidad única de combinar módulo elástico bajo y buena resistencia a la corrosión. Una β -aleación se define químicamente como una aleación con una composición por encima del β_c (figura número 9) o sea conteniendo bastante β estabilizante para obtener una fase 100% β después de un temple por encima de la línea de β transición. Sin embargo estas aleaciones pueden ser de fase $\alpha + \beta$ con una fase β metaestable y con la posibilidad de precipitar una segunda fase mediante un envejecimiento, las aleaciones con una cantidad elevada de β estabilizante, por encima de β_s , están consideradas como β aleaciones estables en cuales no hay precipitación durante un tratamiento térmico de alta duración. Las variantes de procesamiento base de titanio permiten controlar la microestructura y entonces optimizar las aleaciones como la ductibilidad, la resistencia, la resistencia a la fatiga etc. A parte de la fase α se pueden observar también precipitaciones de la fase β o ω y/o compuestos intermetálicos dependiendo de la composición, tratamientos térmicos, procesamiento y condiciones en servicio.

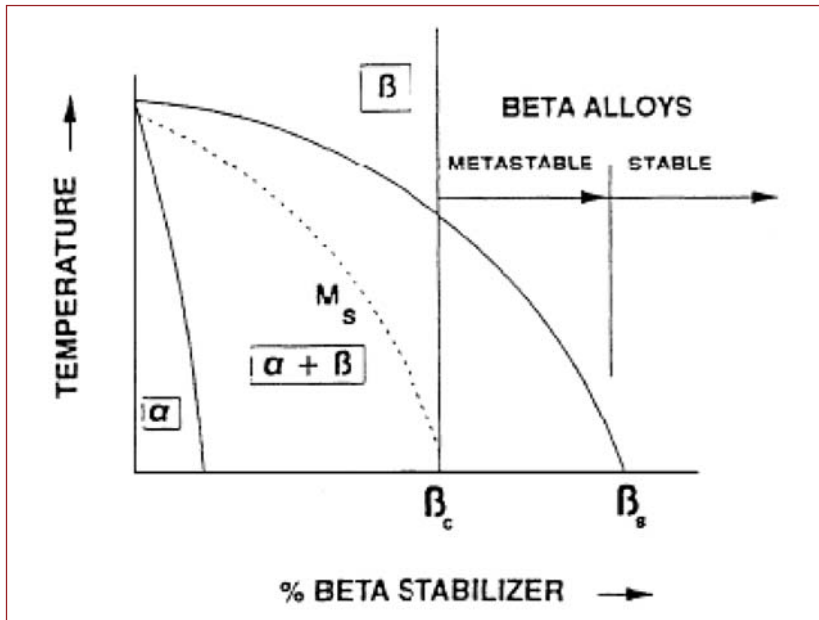


Figura 9. Pseudo-diagrama de la fase de estabilización de la fase β de aleaciones de titanio. (Tomado de Structural and functional fatigue of NiTi shape memory alloys, Eggeler G. y col. Materials Science and Engineering, 2004 (24))

Estudios sobre el comportamiento biológico de los elementos metálicos ha mostrado que las composiciones de los biomateriales deben ser muy precisas para minimizar las reacciones indeseables del organismo. Reacciones locales indeseables, reacciones alérgicas por causa de elementos metálicos se deben a la liberación de iones metálicos del implante.

Esta liberación de iones depende de la velocidad de corrosión de la aleación y de la solubilidad de los primeros productos formados por esta corrosión. En un ensayo de corrosión en vivo, Steinneman concluyó que los elementos V, Ni, Co, son elementos tóxicos (cuando no son utilizados en aleaciones) mientras que el Ti y sus aleaciones, Aceros Inoxidable, aleaciones Co, Cr, Mo, Ni y Ta, Cr, Nb, y Pt son materiales resistentes con respecto a las velocidades de corrosión.

Ti y algunas de sus aleaciones, Ta, Nb y Zr producen esencialmente ácidos insolubles, siendo los más adecuados para aplicaciones biomédicas.

Clasificación por espesor de pseudomembrana alrededor del implante	reacción menor	reacción severa	
	aleaciones de Ti acero inoxidable aleaciones de CoCr	Fe, Co, Cr, Ni, Mo, V, Ma,	
Clasificación por tipo de reacción Fibrosis, y reacción celular Inflamatoria	Vital Ti,Zr, Nb,Ta Pt, aleaciones de Ti	Cápsula Al, Fe, Mo, Ag, Au Acero inox. Aleaciones CrCo	Toxica Co, Ni, Cu, V

Tabla 5-2. Aleaciones de titanio, y sus reacciones biológicas

Finalmente Zr y Nb presentan un pasividad ideal con una capa protectora estable, resistente químicamente y velocidades de disolución en sus capas mínimas, de este hecho Zr y Nb contribuyen a formar espontáneamente una capa de pasivación altamente protectora en las aleaciones de titanio y no son liberados, como el Al o V en el medio los iones disueltos sino que son más bien incorporados a la película de pasivación. Entonces podemos concluir que los elementos Nb, y Zr son elementos adecuados, tanto frente a las posibilidades micro estructurales como por sus buenas propiedades de biocompatibilidad para alearlos con titanio con objeto de elaborar materiales óptimos para aplicaciones biomédicas²⁶.

El titanio el único metal ligero que presenta dismorfismo, ya que en estado puro su estructura compacta hexagonal (fase α) presenta una transformación alotrópica a 882° C, pasando a una micro estructura cúbica centrada en el cuerpo (fase β). En equilibrio la estructura β es inestable a temperaturas menores de 882° C descomponiéndose

de nuevo en fase α al enfriar el titanio por debajo de la temperatura de transición, esa transformación ofrece la posibilidad de obtener aleaciones con micro estructuras de tipo α , β ó α/β dependiendo de los elementos aleantes que estabilizan una u otra fase. Según la capacidad de los aleantes de estabilizar la fase α o β , se definen tres tipos de aleaciones de titanio: Las aleaciones tipo α , aleaciones tipo α/β y aleaciones β . Las aleaciones tipo α/β se suelen clasificar a su vez en casi α cuando tienen una estructura esencialmente α a temperatura ambiente, y casi β cuando la estructura a temperatura ambiente es mayoritariamente β . La manipulación de estas variaciones cristalográficas mediante adición de aleantes y procesos termo mecánicos da lugar a un amplio rango de aleaciones y propiedades.

2.3 EL TANTALIO

2.3.1 Generalidades

Elemento químico cuyo símbolo es Ta, su número atómico es 73, y su peso atómico 180,948 g/mol. Fue descubierto en el año 1802 por Anders Ekeberg. Es un elemento del quinto grupo de la tabla periódica y pertenece al grupo de los de transición 5d. se le conocen también estados de oxidación IV, III y II.

El metal tantalio se emplea en la fabricación de *condensadores* para equipos electrónicos, los cuales incluyen radios de banda civil, detectores de humo, marcapasos cardiacos y en automóviles; se utiliza también en las superficies para transferencia de calor de equipos de conducción en la industria química, en especial cuando se tienen condiciones extraordinarias de corrosión. Su inercia química ha hecho que

se le encontraran aplicaciones quirúrgicas en implantología dental y en C. Ortopédica²⁷. El tantalio forma aleaciones con gran numero de metales. Tiene una importancia especial el Ferrotantaló, el cual se agrega a los aceros austeniticos con el fin de reducir la corrosión intergranular.

El metal es bastante inerte al ataque con ácidos, excepto al ácido fluorhídrico. Se oxida con mucha lentitud en soluciones alcalinas. Los halógenos (halogenuros) y el oxígeno reaccionan con él en caliente, para formar haluros y óxidos correspondientes, con estado de oxidación V. A temperatura elevada absorbe hidrogeno y se combina con el nitrógeno el fosforo, el arsénico, el antimonio, el silicio, el carbono y el boro. El tantalio forma también compuestos por reacción directa con el azufre, el selenio y el telurio, a temperaturas elevadas.

2.3.2 Propiedades físicas del Tantalio

Nombre	Tantalio
Numero atómico	73
Valencia	2,3,4 5
Estado de oxidación	5
Electronegatividad	1,5
Radio covalente (A)	1,38
Radio iónico (A)	0,73
Radio Atómico (A)	1,46
Configuración electrónica	[Xe]4f ¹⁴ 5d ³ 6s ²
Primer potencial de ionización (eV)	6,02
Masa Atómica (g/mol)	180,948
Densidad (g/ml)	16,61
Punto de ebullición (°C)	5425
Punto de fusión (°C)	2996

Tabla 6-2. Propiedades físico químicas del tantalio

2.3.3 Estructura de los implantes de tantalio

Los implantes de tantalio tienen una estructura porosa, con el fin de conseguir que el hueso neoformado²⁸ crezca dentro de estos microporos, el material poroso está compuesto por un 90% de tantalio y un 10% de carbono vítreo, por peso. La manufactura del tantalio poroso comienza con la pirolisis²⁹ de un polímero precursor de forma esponjosa obtenido, de un esqueleto reticulado de aspecto vítreo, de carbón de baja densidad, repleto de poros de forma dodecaédrica, interconectados con pequeños portales abiertos³⁰. El tantalio comercial es depositado en este esqueleto de carbón, mediante una depositación e infiltración usando vapor químico (CVD/CVI) para crear una construcción porosa de biomaterial. Debido a la orientación y a depositación cristalográfica del tantalio, se produce una superficie con distinta microtextura. Las delgadas capas CVD/CVI de 10 a 100 μm ³¹, pueden impartir altas propiedades mecánicas, debido a que el depósito de tantalio en la superficie es 100% denso, con tamaño de grano de entre 1 a 5 μm , e impurezas de menos del 0,05%. El espesor habitual de la cubierta de tantalio es aproximadamente de 50 μm . Un incremento en el espesor de la capa de tantalio depositada, podría afectar el tamaño del poro y por tanto las propiedades mecánicas³².

Cuando se prepara como metal trabecular, su porosidad es del 80-85 %, y el tamaño medio de sus poros es de aproximadamente 500 micras. La estructura completa tiene un módulo elástico intermedio entre el hueso cortical y el hueso esponjoso. Además la estructura de tantalio que constituye los lados del dodecaedro, posee una superficie rugosa; en consecuencia ejerce fricción sobre el hueso, de forma significativamente mayor que otros implantes metálicos.

Se sabe que el metal trabecular es muy susceptible a la penetración, por el tejido óseo o blando. Se cree que este fenómeno se debe en parte a la estructura porosa y a la nonoestructura de los vástagos de tantalio del dodecaedro. Además, su comportamiento mecánico fisiológico asociado a su bajo modulo elástico, podría estimular la osteointegración mediante cargas sobre el hueso, por un mecanismo opuesto al de protección frente a la tensión.

2.3.4 Propiedades biomecánicas de los implantes de tantalio

La densidad es similar a la del hueso humano. Diversos estudios al respecto señalan que este material tiene muchas propiedades mecánicas mejores que los otros materiales utilizados para esta aplicación biomédica. Las evaluaciones clínicas de las estructuras micro porosas de tantalio³³ indican un modulo de elasticidad alrededor de 3 GPa, y se considera que las fuerzas compresivas y de estiramiento oscilan entre los 35 y los 40 MPa.

Por lo tanto el material está compuesto de un 80-85% de espacio vacío (el volumen de los poros) dependiendo del número de poros interconectados de forma continua. Cada poro o celda tiene forma de dodecaedro³⁴. El tamaño de las celdas está controlado por el sistema de fabricación siendo habitualmente entre 500-550 micras³⁵. El espesor de los soportes que definen las celdas dicta el porcentaje de vacío y la rigidez y solidez del material final³⁶. La solidez y la rigidez de la estructura porosa aumentan al disminuir la porosidad. Esto es típico de los materiales sólidos porosos e intenta semejarse al hueso esponjoso. La rigidez de este tantalio poroso aumenta, cuando disminuye el tamaño del poro, y este rigidez relacionada con el tamaño del poro ha de ser

lo suficientemente fuerte para compensar las cargas fisiológicas.

Se están desarrollando diversas aplicaciones nuevas del metal trabecular para su uso en artroplastias de rodilla y de cadera. Puesto que la osteolisis es hoy en día una preocupación fundamental en lo que respecta a la duración a largo plazo de las artroplastias de cadera, ha varias razones para pensar que un diseño acetabular monobloque podría incrementar su duración. Es conocido el desgaste del revestimiento del polietileno debido a su movimiento ficcional con la copa acetabular, este fenómeno se citaba en el pasado como origen de los restos de desgaste responsables de la osteolisis, la posibilidad de disponer de un componente acetabular monobloque podría ser ventajoso. Teniendo en cuenta, que la rigidez de este dispositivo seria notablemente menor, debido a la naturaleza porosa de la copa acetabular, pudiendo mejorar incluso la carga de la placa subcondral del acetábulo y minimizar así la perdida de hueso secundaria a la protección central frente a la tensión.

2.4 LAS CERÁMICAS

Las cerámicas son materiales no metálicos e inorgánicos con una estructura cristalina, obtenidos en general con aplicación de altas temperaturas y presiones³⁷.

En ortopedia se utilizan básicamente dos tipos: los óxidos metálicos y los fosfatos cálcicos. Las primeras son las llamadas cerámicas inertes como la alúmina (Al_3O_2) o la circonia (ZrO_2) . Son muy resistentes a la corrosión con una gran dureza y se utilizan sobre todo en la fabricación de superficies articulares potésicas³⁷.

Los fosfatos cálcicos son las llamadas cerámicas bioactivas ya que se fijan químicamente al hueso. Básicamente se usan dos tipos, el fosfato tricálcico y la hidroxiapatita sintética, que tienen propiedades biológicas muy distintas, el primero con la fórmula $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ tiene una relación calcio-fosfato de 1,5 a 1 y es biodegradable por una combinación de disoluciones físico-químicas y fragmentación. Sus características in vivo son variables.

La hidroxiapatita es relativamente insoluble y presenta unas características bastante consistentes in vivo, que la hacen más útil en recubrimientos de implantes ortopédicos³⁷.

2.4.1 Hidroxiapatita. 35.5

El término apatita fue aplicado por primera vez a minerales en 1788 por Werner, actualmente se refiere a una familia de cristales que responden a la fórmula $\text{M}_{10}(\text{Ro}_4)_6\text{X}_2$, donde M es habitualmente calcio, R Fósforo y X un hidróxido o un compuesto halogenado como fluorina. Con el desarrollo de la difracción por rayos X se confirmó el 1926, que la fase inorgánica del hueso era una apatita³⁸.

La hidroxiapatita es una apatita compuesta esencialmente por fósforo y calcio, su fórmula corresponde a $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ con una relación calcio-fósforo de 1,67³⁹, aunque algunos materiales han sido llamados hidroxiapatita por diversos investigadores en realidad presentan unas relaciones Ca/P variables que van de 2.0 a valores tan bajos como 1,3. Estos materiales raramente están bien caracterizados, por lo tanto puede ser difícil comparar resultados entre estudios de diversas fuentes³⁹. Sin embargo la American Society for Testing and Materials ha determinado los patrones de referencia tanto para la hi-

droxiapatita (1989) como para los fosfatos tricálcicos (1987) de modo que su pureza pueda ser determinada y controlada³⁸. Así la relación calcio-fosforo de la Hidroxiapatita debe ser como se ha comentado de 1,67 mientras que la de los fosfatos tricálcicos será de 1.5³⁸.

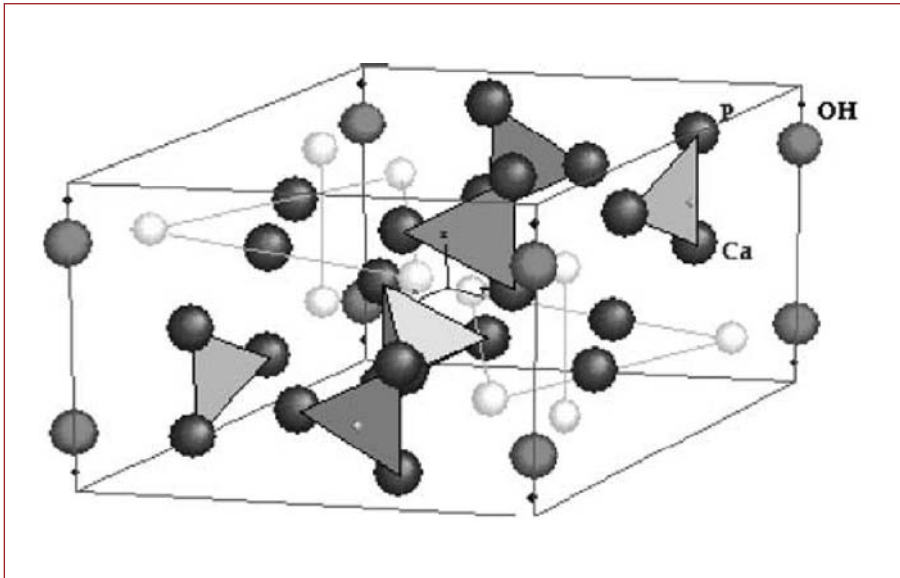


Fig. 10. Estructura de Hidroxiapatita $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$

2.4.1.1 La hidroxiapatita en el hueso.

La composición del hueso varía según el lugar, edad, antecedentes alimentarios, actividad física y enfermedades. En general la fase mineral o inorgánica constituye el 60 al 70% del tejido, el agua el 5 a 8% y la matriz orgánica el resto. Aproximadamente el 90% de esta última es colágeno y el 5% proteínas no colágenas⁴⁰.

El componente mineral del hueso humano incluye varios tipos de fosfatos de calcio hidratados, siendo el más común la hidroxiapatita. Esta apatita se encuentra presente en el hueso como un cristal plano

de 20 a 80 nm de largo y de 2 a 5 nm de espesor⁴⁰, y se calcula que el 65% de la fracción mineral de hueso humano es hidroxapatita⁴¹.

Los grupos fosfato e hidroxilo pueden verse sustituidos por carbonato, cloro y flúor, respectivamente alterándose las propiedades físicas del material. Estas impurezas pueden reflejar antecedentes alimentarios⁴⁰.

Entre las características mecánicas de la hidroxapatita destacan la rigidez y la dureza que se combinan con la elasticidad y continuidad del colágeno, principal componente orgánico para dar al hueso sus particulares propiedades. Así, los cristales de hidroxapatita aumentan la rigidez de la matriz ósea de modo que sin ellos el hueso podría doblarse con extrema facilidad⁴².

2.4.1.2 Fuentes de hidroxapatita.

La hidroxapatita puede ser de origen natural (bovina, coralina o ficógena) o sintética (cerámica o no cerámica).

La hidroxapatita de origen natural: El hueso bovino es una fuente de hidroxapatita popularizada en los años 50, hoy día se dispone de procedimientos capaces de eliminar todos sus elementos proteicos y celulares, convirtiéndolo en un material desprovisto de inmunogenicidad, su estructura macroscópica es muy similar a la matriz mineral de hueso humano y su utilización se limita al relleno de defectos óseos, ya que su resistencia mecánica es baja⁴³, su utilización ha ido disminuyendo paulatinamente en los últimos años, en parte porque se dispone de otras fuentes y por la intranquilidad creada en la sociedad

por la posible transmisión de enfermedades como fue la Encefalopatía Espongiforme Bobina una variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

Asimismo se ha demostrado que puede presentar una composición variable en su fase mineral y por consiguiente dificultad de extraer compuestos puros a partir del hueso³⁸.

El coral es otra fuente de hidroxiapatita orgánica. Algunos tipos de coral escleroactiniforme del género poritex (poritex goniopora) forma un armazón constituido por canales paralelos intercomunicados por micro poros. Este exoesqueleto está formado por carbonato cálcico que se convierte en hidroxiapatita al provocarse un intercambio químico con fosfatos, en un medio hídrico y en presencia de calor⁴⁴.

En este procedimiento la estructura micro porosa se conserva y permite que el tejido conectivo y el hueso en el que se implanta crezcan hacia el interior del material.

Existe otro tipo de hidroxiapatita natural micro-porosa y no reabsorbible derivada de las algas (ficógena). La arquitectura natural de algunas algas calcificadas (Rhodophyceae Cholophyceae) presentan una superficie muy parecida a la del hueso, teniendo afinidad por las proteínas y los factores de crecimiento de la matriz ósea. La integración ósea y la proliferación de hueso sobre la superficie de los gránulos de hidroxiapatita ficógena se explican porque el patrón de mineralización en algas y en hueso es muy parecido. Las propiedades físico-químicas de este tipo de hidroxiapatita son casi idénticas a las del hueso, debido a su gran área superficial, al tamaño pequeño del cristal y a su contenido en carbono⁴⁵.

La hidroxiapatita sintética, no cerámica equivale a la porción mineral del hueso humano desde el punto de vista físico, químico y cristalográfico. Es un material que se reabsorbe lentamente actuando como matriz ósea sobre la que se va depositando hueso neo formado. Se obtiene habitualmente por precipitación química al añadir una solución rica en fosfatos a otra con iones de Ca^{++} en condiciones controladas³⁸.

La hidroxiapatita sintética de origen cerámico está constituida por partículas esféricas de alta densidad y gran pureza. Es un material muy biocompatible, no reabsorbible que permite la aposición directa del hueso. Se considera una cerámica ya que se obtiene por calentamiento de los fosfatos calcios amorfos obtenidos, por ejemplo, por precipitación. El medio utilizado y las temperaturas aplicadas condicionarán la estructura cristalina, la porosidad y la solubilidad del producto resultante³⁸.

2.4.2 Propiedades de la hidroxiapatita

2.4.2.1 Biocompatibilidad.

Las cerámicas de fosfato cálcico o bioactivas, como la hidroxiapatita, han demostrado en estudios realizados a lo largo de las últimas tres décadas ser biocompatible, no tóxicas y capaces de unirse al hueso, permitiendo una verdadera osteointegración.

El perfil biológico de las cerámicas de hidroxiapatita incluye una falta de toxicidad local o sistémica, ausencia de reacción inflamatoria o reacción a cuerpo extraño al aplicarse en bloque o partículas sueltas

y ausencia de respuesta pirógena^{39,46,47}. Así, por ejemplo los cultivos celulares de fibroblastos no se ven afectados de forma distinta por la introducción de placas de titanio con o sin recubrimiento de hidroxiapatita⁴⁸.

Manley³⁹, en una exhaustiva revisión de la literatura, señala únicamente algunos casos de reacción inflamatoria a soluciones de hidroxiapatita usadas en animales y el problema de la migración de los gránulos de hidroxiapatita utilizados en odontología para aumentar el reborde alveolar, provocada fundamentalmente por la dificultad para obtener estabilidad mecánica del implante. Manley (1993) señala que la clave de la falta de toxicidad local, incluso en tejidos blandos o sistémicos de la hidroxiapatita reside en su naturaleza química la cual es constituida únicamente por iones de calcio y fosfatos.

Al analizar las prótesis de cadera retiradas por aflojamiento, se han detectado gránulos de hidroxiapatita en el área peri protésica junto a polietileno y partículas metálicas.

Algunos autores⁴⁹ sugieren que éstas partículas de hidroxiapatita, procedentes del fallo del intersticio cerámica-metal, podrían ser las causantes del desgaste (Thrid-Body Wear) y osteolisis, aunque no ha sido posible determinar cuál de las mencionadas partículas es causante directa de la osteolisis y subsecuentemente del aflojamiento⁴⁹, parece claro que las partículas de hidroxiapatita desprendidas del acetábulo migrarían a la articulación y podrían favorecer la abrasión de la superficie articular con liberación de partículas de polietileno y metal . Sin embargo el deterioro observado es menor que en prótesis no recubiertas: cementadas o con recubrimiento poroso de titanio⁵⁰.

4.2.2.2 *Biodegradación.*

Como se ha comentado la hidroxiapatita es poco soluble al ser implantada en tejido óseo contrariamente a lo que sucede con los fosfatos tricálcicos. El grado de solubilidad de la misma viene condicionado por su composición química, su cristalinidad (a mayor cristalinidad mayor estabilidad) la estructura física del material (Los poros y conductos aumentan la superficie de contacto y por tanto la degradación), y el ambiente en que es implantada (La acidez del medio aumenta la solubilidad)^{39,51}.

Parece ser que la hidroxiapatita pura y altamente cristalina muy estable, contiene suficiente proporción de sulfato cálcico amorfo para permitir la fijación biológica precoz sin necesidad de recurrir a hidroxiapatita menos cristalinas o fosfatos cálcicos más solubles⁵². En los implantes recubiertos, ello es aún más cierto, ya que en el proceso de spray de plasma, la superficie de las partículas de hidroxiapatita altamente cristalinas se desestructura en varios tipos de fosfato cálcico, mas solubles que la hidroxiapatita cristalina⁵¹.

La degradación de la hidroxiapatita en vivo se produce por dos vías: disolución por contacto con soluciones fisiológicas, y disolución mediada por células (fagocitosis)⁴⁶. Este fenómeno produce la liberación de fosfato cálcico amorfo que son fagocitadas por los macrófagos o quedan embebidas en el hueso neofromado. Los macrófagos pueden entonces migrar a ganglios linfáticos regionales con estas partículas o bien disolverlas provocando una liberación sistémica de Ca y P⁵¹.

La capacidad de los macrófagos de disolver partículas cerámicas había sido puesta en duda⁴⁹, pero los estudios en cultivos de mo-

nocitos parecen dejar clara esta posibilidad⁵³. No se ha observado que las partículas de fosfato cálcico liberadas den lugar a la activación de osteoclastos y consiguiente osteolisis⁵¹, ni a reacciones a cuerpo extraño.

Eggl, Mullër, y Schenk 1988 comprobaron histomorfológicamente que tras la implantación de cilindros de hidroxiapatita en hueso de conejo durante 6 meses, el porcentaje de reducción de volumen de éstos era del 5,4%, frente a un 85.4% en cilindros de fosfato tricálcico en iguales condiciones. La resistencia a la degradación de la hidroxiapatita ha sido demostrada también al utilizarla como recubrimiento⁵⁴. En un estudio experimental en humanos, Overgaard⁵⁵ et Alt 1997 demostraron que los recubrimientos de hidroxiapatita se reabsorben a un ritmo de aproximadamente el 20% anual, especialmente en las aéreas en que la cobertura está en contacto con médula ósea y no con trabéculas.

2.4.2.3 *Biomecánica.*

Las cerámicas del tipo de los fosfatos cálcicos presentan una escasa resistencia al impacto y a la tensión y son frágiles lo que les hace inviables como implantes que precisen soporte de cargas^{46, 47}. Si recubrimos un implante metálico con una hidrocerámica se combinaría la fuerza del metal con la biocompatibilidad de la cerámica (Greensink y Klein 1988) de modo que mientras la hidroxiapatita en forma de bloques ha demostrado una baja resistencia a la fatiga, al ser aplicada por chorro de plasma a un sustrato metálico permite mantener la resistencia a la fatiga del metal. Cuando es utilizada para el relleno de defectos óseos la hidroxiapatita se aplica en forma de estructuras cora-

linas, formada por poros interconectados que permiten el crecimiento del hueso huésped hacia su interior^{56,57} este relleno ha demostrado ser capaz de proporcionar al implante unas características de resistencia similares a las del hueso normal⁵⁶

Material	Resistencia a compresión (Mpa)	Resistencia a tracción (Mpa)	Modulo de elasticidad (Gpa)
Hueso			
Cortical	138	69	13,8
Esponjoso	41-62	3,4	-
Metales			
Acero 316L		552-1000	207-276
Co-Cr		669	207
Titanio		345	110
Hidroxiapatita			
Porosa	7-69	2,5	-
Compacta	207-897	69-193	34,5 – 103

Tabla 7-2. Resistencia a la compresión, resistencia a la tracción y modulo de elasticidad del hueso en comparación con algunos biomateriales (Jarcho 1991; Mankey 1993)

2.4.2.4 Recubrimientos de metales por hidroxiapatita.

Dadas las pobres cualidades mecánicas de la hidroxiapatita, para aprovechar sus propiedades como biomaterial, puede usarse en forma de recubrimientos en sustratos metálicos. Estos implantes recubiertos deben satisfacer dos condiciones para que la cerámica sea eficaz, por una parte el implante debe conseguir una estabilidad primaria inicial suficiente para que la capa de hidroxiapatita establezca una unión efectiva con el hueso circundante; por otra parte la fijación de la hidroxiapatita al sustrato metálico debe ser perdurable. La primera condición se cumple en las prótesis de cadera y de rodilla

por el diseño de las mismas. La segunda depende de tres factores separados: la morfología de la superficie a recubrir, la energía cinética de las partículas de recubrimiento y la unión al sustrato. El primer factor es el de menos importancia con los actuales métodos de recubrimiento. La energía cinética que imprimen los sistemas de spray de plasma a las partículas parcialmente fundidas de hidroxiapatita asegura que se consiga una buena adherencia al sustrato metálico. Finalmente, la unión química al metal implicaría una reacción de éste con el radical oxígeno de la cerámica⁵⁸ esta unión química defendida por algunos autores⁴¹, se daría especialmente con el titanio y sería la responsable de que la unión de la hidroxiapatita con este metal tenga una fuerza de unión un 33% superior a la obtenida con la aleación cromo-cobalto³⁸.

Se ha demostrado experimentalmente que cilindros recubiertos de hidroxiapatita e insertados en el hueso, incluso en un orificio sobredimensionado, presentan una considerable resistencia a la extracción a las 6 semanas, alcanzando el máximo a los 6 meses con valores similares al hueso cortical. Otros autores han comparado la resistencia a la extracción de cilindros recubiertos de hidroxiapatita con los de titanio con superficie rugosa⁵⁹ o biovidrio⁶⁰, obteniendo valores de extracción de cinco a siete veces mayores con la hidroxiapatita. Estos estudios han demostrado que los implantes recubiertos de hidroxiapatita comparados con otros de igual diseño pero no recubiertos muestran una fuerza de fijación mayor⁶¹ y el tiempo que necesitan para alcanzar una fijación adecuada es menor³⁷.

El grosor ideal del recubrimiento de hidroxiapatita debe estar entre 30 y 90 μm ³⁷, ya que se ha observado que en recubrimientos

del mas de 100 μm . se presentan fracturas por fatiga en su seno y si se usa un recubrimiento de menos de 30 μm el grado de absorción es inaceptablemente rápido (Greesing, De-Grood y Klein 1987)⁶⁸.

Kester y colaboradores (1991)⁶² compararon experimentalmente coberturas de 50, 120 y 240 μm , observando que las coberturas de mayor grosor eran más susceptibles de sufrir fallos por fatiga o de laminación. Wang, Lee y Chang 1993⁶³, implantaron cilindros de una aleación de titanio con recubrimientos de hidroxiapatita, de 50 y 200 μm en fémures de perros, demostrando que el recubrimiento más fino tenía una mayor resistencia tras doce semanas de evaluación.

David y colaboradores⁶⁴ estudiaron biomecánica histológicamente, una serie de vástagos de titanio introducidos en fémures de oveja. Su estudio comparaba vástagos de titanio recubiertos por hidroxiapatita por sistema de plasma spray y vástagos sin recubrir, de superficie porosa por rociado con partículas de alta presión, los resultados mecánicos demostraron que los cilindros recubiertos de titanio se aflojaban en un 45% en las tres primeras semanas, aunque luego mantenían su fijación, mientras que los recubiertos por hidroxiapatita no se aflojaban inicialmente, pero a los 9 meses presentaban un aflojamiento en el 55%. El estudio microscópico demostró que este efecto era por laminación de la hidroxiapatita, dado que en ese estudio se utilizó una cobertura de 200 μm de espesor.

El sistema utilizado para recubrir un metal con hidroxiapatita puede alterar las propiedades del compuesto y los recubrimientos pueden fallar por una aplicación inadecuada. La hidroxiapatita en un recubrimiento debe caracterizarse por su cristalinidad, relación calcio/

fosfato; densidad; propiedades de disolución y fuerza³⁷, para hacer los estudios verdaderamente reproducibles.

Existen diferentes técnicas para la aplicación de un recubrimiento de hidroxiapatita sobre un sustrato metálico que pueden condicionar las condiciones químicas, metálicas y biológicas de la cobertura.

Actualmente las técnicas más utilizadas son las basadas en un spray de plasma⁴¹. Otros sistemas como la electroforesis obtienen capas de hidroxiapatita menos uniformes y con una pobre fijación al sustrato metálico^{38, 41, 65}.

El sistema de chorro de plasma consiste en conducir la hidroxiapatita en forma de polvo mediante un flujo de partículas de un gas (generalmente argón) aceleradas por un campo eléctrico, con objeto de proyectarla con una gran energía cinética contra el metal base⁴¹. De este modo se consigue en menos de dos minutos coberturas densas y muy adherentes, con un grosor máximo de 100 μm . además se pueden aplicar sobre implantes de formas complejas y es fácil proteger las áreas que no deben presentar recubrimiento⁶⁵ en este procedimiento se crea un arco voltaico entre un ánodo y un cátodo que provoca temperaturas alrededor del 29.727 grados C capaces de disociar el gas. La hidroxiapatita en forma de partículas es llevada a través del arco de plasma por el gas transportador (argón) entonces se produce la fusión superficial de las partículas de hidroxiapatita y su aceleración contra el metal base^{38, 65}.

2.4.2.5 Usos médicos de la hidroxiapatita

Se atribuye a Albee y Morrison en 1920 la primera publicación de resultados de la utilización de un compuesto de fosfato cálcico en

forma de polvo con el fin de acelerar la formación de callo óseo. Posteriormente a principios de los años 60 se empezó a utilizar la hidroxiapatita de forma sólida en cirugía dental, aprovechando la capacidad de osteointegración para aumentar el borde alveolar o rellenar lesiones periodontales³⁸. En 1981 la hidroxiapatita fue introducida comercialmente, en forma de gránulos, para aplicaciones médicas en cirugía maxilofacial³⁹. Numerosos estudios clínicos, radiográficos e histológicos demostraron su osteointegración evidente así como la ausencia de reacciones adversas³⁸.

El siguiente paso consistió en recubrir los implantes metálicos con una capa de hidroxiapatita y se observó que presentaban ventajas sustanciales respecto a los no recubiertos con igual diseño y características metalúrgicas³⁸, incluso en un ambiente hostil causado por el pH ácido de la saliva⁴¹. Estas aplicaciones fueron estudiadas con especial interés por J.F.Osbor⁶⁶ en Alemania y sus contactos con el cirujano inglés, R. J. Furlong⁶⁷, los cuales abrieron el camino al recubrimiento de implantes osteoarticulares con hidroxiapatita cerámica⁴¹ fruto de ello en 1985 fue implantada la primera prótesis de cadera recubierta de hidroxiapatita⁶⁷. Simultáneamente R.G.T. Geesink, K., De Groot y C.P. Klein⁶⁸ desarrollaron un método de trabajo experimental a cerca de los implantes recubiertos con hidroxiapatita, concluyendo entre otras cosas que estos no presentaban efectos nocivos y eran aptos para su uso en implantes articulares en humanos. En 1986 cirujanos del grupo ARTRO colocaron las primeras prótesis recubiertas con hidroxiapatita desarrolladas por ese grupo⁶⁹.

En Estados Unidos se llevaron a cabo estudios experimentales para desarrollar las supuestas ventajas de éstos implantes, en 1988 la

FDA autorizó el desarrollo de prótesis osteoarticulares recubiertas de hidroxiapatita³⁸.

Actualmente la utilización de hidroxiapatita en cirugía ortopédica se centra en dos campos, por una parte la cobertura de sustratos metálicos para su implantación, especialmente prótesis articulares y por otra la utilización para relleno de cavidades óseas o la estimulación de la osificación. Han sido numerosas las publicaciones sobre la validez del recubrimiento de hidroxiapatita en prótesis de cadera. A corto plazo el resultado clínico de los vástagos recubiertos por hidroxiapatita han sido equiparables⁷⁰ y habitualmente superiores^{71,72} a los de prótesis no recubiertas con igual diseño. A medio plazo la supervivencia de los componente femorales recubiertos por hidroxiapatita se han demostrado excelente^{38,72,73,74,75} y se ha objetivado menor movilidad del implante en los controles radiográficos sucesivos tanto en el componente femoral^{74,76,77}, como en el acetábulo⁷⁸, cuando estos están recubiertos de hidroxiapatita.

En estudios de seguimiento más largos 10⁷⁹ y 12⁸⁰ años, los índices de supervivencia de las prótesis recubiertas han sido superiores al 0,97.

También se han utilizado recubrimientos de hidroxiapatita en prótesis de rodilla con buenos resultados a corto y medio plazo^{81,82,83}. Otros usos de la hidroxiapatita en ortopedia han sido los recubrimientos de tornillos pediculares en cirugía del ráquis^{84,85,86}, tornillos de osteosíntesis⁶⁴ o en clavos de fijación externa.

Por otra parte se ha comprobado que el utilizar bloques de hidroxiapatita con estructura coralina para el relleno de cavidades óseas, estos son invadidos por hueso normal que ocupa los poros y canales

del implante ⁵⁷. La invasión de los bloques de hidroxiapatita por tejido óseo les confiere en unos meses propiedades mecánicas similares a las del hueso en el que están implantados⁵⁶.

En estudios clínicos de fracturas de meseta tibial, no se han encontrado diferencias significativas entre la utilización de bloques de hidroxiapatita coralina o injerto autólogo⁴⁴, aunque se ha observado que los bloques de hidroxiapatita, contrariamente al injerto autólogo no se reabsorben completamente y la estructura coralina queda preservada indefinidamente como armazón en el que prolifera el hueso normal⁵⁵.

2.5 Microscopía DE BARRIDO ELECTRÓNICO SEM

2.5.1 Introducción a la Microscopía electrónica

Un microscopio es, básicamente, un sistema óptico que transforma un objeto en una imagen, la cual amplifica (magnifica) para apreciar detalles característicos de objeto.

Con el microscopio de luz se resuelven detalles del orden del micró⁸⁷, mientras que con el microscopio electrónico se alcanzan a resolver objetos del orden de los angstrom.

En el microscopio electrónico, un haz de electrones incide sobre la muestra y de la interacción de estos electrones con los átomos de la misma, surgen señales que son captadas por algún detector o bien, proyectadas directamente sobre una pantalla⁸⁸.

Dentro de la familia de microscopios electrónicos, se encuentran el microscopio electrónico de de trasmisión (TEM) y el microscopio electrónico de barrido (SEM). Cada uno de ellos, permite el estudio de diferentes características de una muestra.

El SEM provee información sobre morfología y características de la superficie, mientras que con el TEM podemos estudiar la estructura interna y detalles ultraestructurales.

La exploración mediante microscopía electrónica utilizando el microscopio electrónico de barrido (SEM), es la técnica más conocida y más ampliamente utilizada en el análisis de superficies. El SEM, acompañado por el análisis de Rayos X, es considerado un sistema de acercamiento relativamente rápido, barato, y básicamente no destructivo para realizar análisis de sustancias⁸⁹.

2.5.2 Historia de la Microscopía Electrónica de Barrido

La microscopía electrónica se desarrollo debido a las limitaciones de los microscopios convencionales, que están limitados, por la física de la luz, a una ampliación entre 500 y 1000 aumentos y a una resolución de 0,2 micrómetros.

En 1934 Ernest Ruska desarrollo un sistema electromagnético para concentrar y enfocar un haz de electrones de manera análoga a la acción que ejerce un lente de vidrio sobre un haz de luz⁹⁰. Este dispositivo, que luego se denominaría “lente electromagnético” le permitió construir el primer microscopio electrónico, cuyo aumento máximo era de 16X. Sin embargo, este fue el inicio de la era de la microscopía electrónica, que se bifurcaría en dos grandes corrientes la del Microscopio Electrónico de Trasmisión (TEM) y la del Microscopio Electrónico de Barrido (SEM). En paralelo se desarrollo otra metodología, que permite el análisis elemental de la muestra mediante el patrón de dispersión de rayos X generados por la interacción del haz de electrones sobre la muestra.

	Microscopio de luz	Microscopio electrónico
Iluminación	Haz de luz	Haz de electrones
Longitud de onda	2000Å - 7500Å	0,037 Å- 0.086 Å
Lentes	Vidrio	Electromagnética
Medio	Atmosfera	Vacío
Resolución	2000 Å	3 Å
Magnificación	10 x – 2000 x	100 x – 450000 x
Focalización	Mecánica	Eléctrica
Contraste	Absorción-Reflexión	Scattering

Tabla 8-2. Características microscopio óptico vs microscopio electrónico

El microscopio electrónico de barrido SEM es un microscopio que utiliza electrones, en vez de la luz, para formar una imagen. El SEM tiene una profundidad de campo grande, lo que permite que, una importante cantidad de la muestra pueda colocarse este en el foco. El SEM también es capaz de producir imágenes de alta resolución, lo que significa que es capaz de mostrar las características de la muestra con una gran aproximación, con lo cual se permite examinarla y ver mínimos detalles de la misma. La preparación de las muestras es relativamente fácil, puesto que en la mayoría de los SEM, solo requieren que la muestra sea conductora.

El Microscopio de Barrido, también llamado Microscopio de Escaneo Electrónico SEM, fue desarrollado en los años 60 y 70, donde tuvo un tremendo impacto en las ciencias de los materiales, en el campo de la ingeniería, así como en la comunidad biológica.

Es sorprendente, que tras la realización de un complejo mecanismo para generar una imagen, la interpretación de las mismas es muy fácil⁹¹. En el estudio de biomateriales ha sido utilizado en el análisis

de la estructuras de los mismos, a micro y nano escala así como de las interacciones de células y materiales⁹².



Fig. 11. Microscopio electrónico de barrido SEM

2.5.3 Bases del funcionamiento del SEM

En un SEM típico, los electrones son emitidos por un cátodo de tungsteno, el cual está formado por un filamento de un diámetro de alrededor de 100 micrómetros, que está soldado a unos postes de metal, los cuales encajan en un soporte cerámico, al cual atraviesan, para poder proporcionarse conexiones eléctricas. Durante su funcionamiento este filamento será calentado por el paso de una corriente eléctrica a través de él. La temperatura óptima del filamento para la emisión termoiónica de electrones es de alrededor de 2700 grados Kelvin.

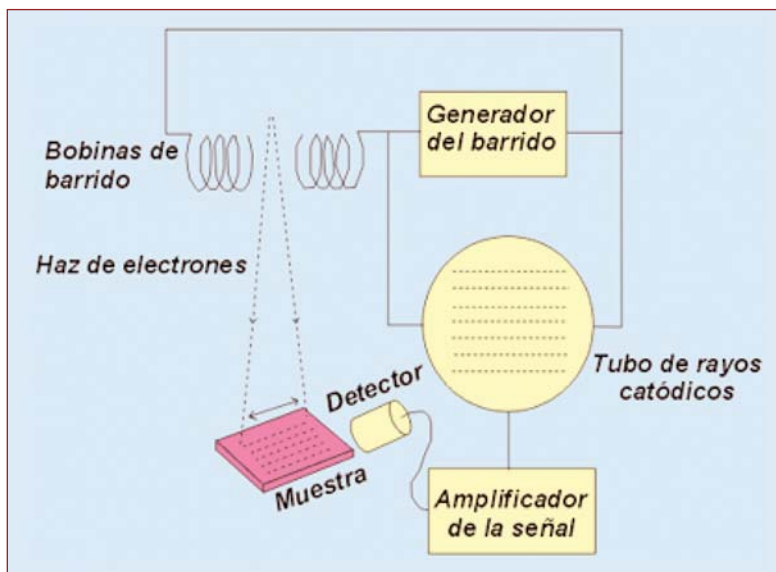


Figura 12. Esquema microscopio electrónico de barrido SEM.

(Tomado de The beginnings of electron microscopy. Hawkes P. Orlando: Academic Press, 1985) (91)

Los electrones luego son acelerados hacia un ánodo. Se utiliza el tungsteno porque tiene el punto de fusión más alto y la presión de vapor más baja de todos los metales; de tal modo que permite ser calentado a alta temperatura para conseguir la emisión de los electrones⁸⁹.

El haz de electrones que tiene típicamente un voltaje de aceleración de 500 voltios y 55000 voltios de corriente continua, se coloca un cilindro de Wehnelt (cilindro con una apertura central, que rodea al filamento y tiene un potencial más negativo que este). Este cilindro junto con el ánodo dirigen los electrones hacia la muestra. Así el mismo, los haces de electrones son enfocados por una o dos lentes de condensación en un solo haz el cual tiene un punto focal muy fino que oscila entre 0,4 a 5 milímetros. El paso del haz de electrones por el cilindro de Wehnelt y por las lentes electromagnéticas de condensación desvía el haz horizontal y verticalmente de modo que puede explorar la muestra de una forma rectangular, sobre la superficie de la misma⁸⁸.

Scanner espirales son usados para reflejar el rayo ligeramente, de lado a lado para realizar el rastreo del rayo a lo largo de la muestra. Como diferencia con las lentes de cristal, la longitud focal de las lentes magnéticas, pueden ser cambiadas simplemente cambiando el campo magnético.

Cuando el haz de electrones primario choca con la muestra, los electrones pierden energía por la dispersión repetida y por su absorción dentro de un volumen de gota de lágrima, formado del espécimen, lo que se conoce como volumen de interacción. El grado de interacción del haz de electrones y la muestra dependerá de la energía de aterrizaje de los electrones, del número atómico de la muestra y la densidad de la muestra.

El intercambio de la energía entre el haz electrónico y la muestra da lugar a la emisión de electrones secundarios de baja energía y de la radiación electromagnética, que es la que será detectada para producir una imagen. Habitualmente las señales utilizadas para la ge-

neración de una imagen es la combinación del conteo de los electrones dispersos

El Microscopio de Barrido Electrónico es algo semejante *al microscopio de escaneo confocal*, pero en vez de tener limitada la difracción del rayo láser, el rayo de electrones, es enfocado y realiza un barrido a lo largo de la superficie del espécimen. La interacción de los electrones con la muestra es *registrado y da como resultado la generación de una señal* en este caso otros electrones huyen de la muestra. Estos electrones son juntados y contados por un detector, luego los fotones son de nuevo juntados y contados por un tubo fotomultiplicador (PTM) en LSCM. Los electrones contados en cada punto de rastreo son luego recopilados en una imagen digital⁹¹.

El SEM es utilizado principalmente en las siguientes aplicaciones

1. Morfología superficial de minerales, catalizadores etc.
2. Electrodepósitos
3. Adherencia fibra-matriz en polímeros
4. Cambios morfológicos de materiales sometidos a tratamientos químicos
5. Formas de cristalización de minerales
6. Control de calidad de catalizadores industriales
7. Morfología superficial interna de partículas poliméricas
8. Morfología de tejidos y células animales y vegetales
9. Estudio de moléculas
10. Reconocimiento de fósiles

Es necesario hacer un sombreado de las muestras con Au-Pd

Las muestras han de ser electrodensas para provocar el rebote de los electrones en la superficies. Para ello se realiza un proceso

de sombreado o Sputtering. Las muestras analizadas mediante esta técnica deben ser sólidas, incluyendo también los residuos sólidos de cualquier tipo de muestra obtenida por desecación, calcinación o filtración. Todas las muestras deben estar deshidratadas, ser conductoras, resistir las bajas presiones en la medida de lo posible tener una alta producción de electrones secundarios.

Las muestras rígidas que no son deformables, pueden ser secadas al aire y si se desea una imagen de alta calidad es recomendable sombréelas con oro, oro-paladio o carbono, proceso que se realiza en los siguientes equipos: Metalizador Bio-Rad, Metalizador automático (VG-MICROTECH) o evaporador de Carbono (VG MICROTECH). En algunos casos, sobre todo en muestras biológicas, es necesario realizar una serie de procesos con la finalidad de mantener las estructuras en las condiciones más próximas a las vitales. En estos casos debe realizarse una fijación con formaldehído, gluraldehído o tetróxido de Osmio seguida de una deshidratación con acetona o etanol. Generalmente este tipo de muestras deben ser secadas mediante la técnica de Punto Crítico. Este método permite realizar el secado sin que se produzcan retracciones, ni artefactos en la superficie debido a las tensiones superficiales en la interface líquido-gas, que en definitiva distorsionarían la muestra.

2.6 Microscopía DE FUERZA ATÓMICA

2.6.1 Introducción

La microscopía de fuerza atómica (AFM) es un sistema mecánico óptico, que se ha ido desarrollando como un instrumento útil para la

medición directa de fuerzas intermoleculares con resolución atómica. Lo cual puede ser empleado en un amplio espectro de aplicaciones, tales como sistemas electrónicos, semi-conductores, materiales manufacturados, polímeros, aplicaciones biológicas y biomateriales.

El primer Microscopio de Fuerza Atómica fue fabricado en 1986, y fue de tipo dinámico, con punta de vibraron vertical⁹³. Sin embargo el primer diseño comercial (1989) fue de fuerza estática con contacto. El llamado Shear AFM que dispone de una punta horizontal de vibración para el control de la distancia, fue desarrollado en 1992⁹⁴. Con modo dinámico de AFM se inicio una nueva aplicación en la AFM, con la asociación de la técnica del no-contacto y el modo de golpeo⁹⁵.



Fig. 13. Microscopio de Fuerza atómica

La Microscopía de Fuerza Atómica presenta importantes ventajas, así como mayores capacidades, cuando la comparamos con otros sistemas de microscopía tales como el Microscopio de Barrido (SEM) o el Microscopio de Transmisión Electrónica (TEM) en estudios

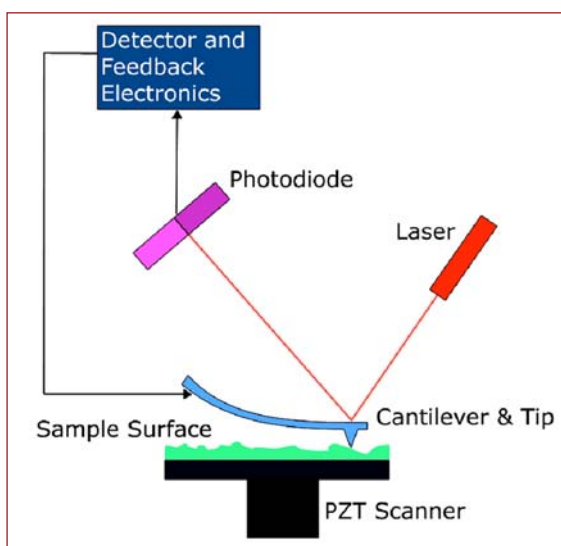
de superficies metálicas y en micro estructuras dado que permite mediciones en tiempo real en escala manométrica^{96,97}.

La Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) tiene otra interesante utilidad, que es empleada en identificación de nanopartículas que es la nano-indentación⁹⁸ mediante la cual se pueden realizar marcas e indentaciones en nanopartículas.

El Microscopio de Modulación de Fuerza (FMM) nos permite una extensión en las aplicaciones de las imágenes de AFM y es empleada para la caracterización de propiedades mecánicas de materiales y es empleada para valoración de cambios en la composición de un determinado material, análisis de la homogeneidad de un polímero, y detección de contaminantes durante un proceso de fabricación⁹⁹.

2.6.2 Mecanismo de funcionamiento del AFM

El Microscopio de Fuerza Atómica es instrumento mecánico-óptico que detecta fuerzas a nivel atómico (de orden de Nano Newton) y



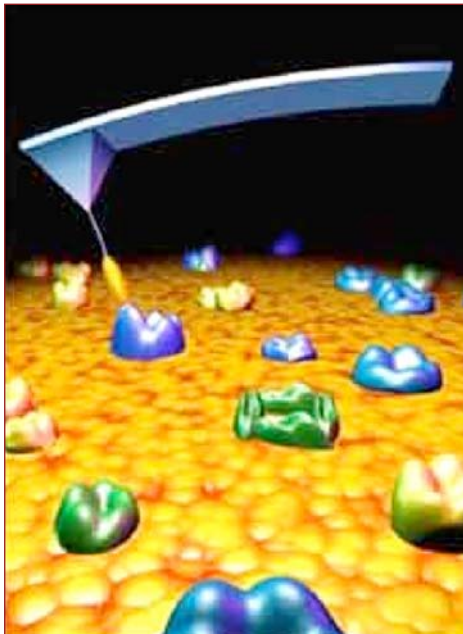
generando imágenes a través de una medición óptica del movimiento sobre una superficie de una palanca (Cantiléver) que tiene una punta muy afilada de cristal de diamante en su extremo.

Fig. 14. Esquema de funcionamiento de un AFM. (Tomado

Wikimedia Commons)

Su funcionamiento consiste en sondear la superficie de una muestra con punta de diamante que es muy aguda, habitualmente de un par de micras de longitud y menos de 100 Å de diámetro. La punta se localiza en el final de una palanca (cantiléver) de 100 a 200 micras de largo, montado en un dispositivo piezoeléctrico. Un foto detector recibe un rayo láser reflejado en el final de la punta y el rayo suministra un feedback de deflación al cantiléver¹⁰⁰ que es capaz secundariamente de modular su funcionamiento.

La idea básica que está detrás de AFM, es que la obtención de imágenes tridimensionales de las superficies, pueden ser obtenidas por una interacción mecánica de fuerzas, detectando las fuerzas entre la muestra y una punta afilada montada al final de un blando cantiléver, sin usar un rayo incidente como los microscopios clásicos. Esto es todo, el espécimen es montado en un escáner piezoeléctrico que permite un posicionamiento tridimensional con exactitud sub-manométrica;



mientras la fuerza es monitorizada con sensibilidad piconewton detectando la medida de desviación del cantiléver. La desviación o inclinación vertical del cantiléver es habitualmente detectado, usando un rayo láser enfocado en la parte libre del cantiléver y reflejado en un fotodiodo.

Fig. 15. Generación de imagen por AFM. (Tomado de Atomic Force Microscopy in cell biology. Jena, B. P. New York: Academic press, 2002) (103)

Durante el proceso de barrido de la punta sobre la muestra, la fuerza interatómica entre los átomos de la punta y los átomos de la superficie de la muestra provoca un movimiento de flexión en el cantiléver. Esta flexión es registrada por un sensor adecuado y la señal obtenida se introduce en un circuito de retroalimentación. Este último controla un actuador piezoeléctrico que determina la altura de la punta sobre la muestra de forma que la deflexión del cantiléver mantenga un nivel constante (habitualmente introducido por el operador).

Representando la altura de la punta frente a su posición sobre la muestra es posible trazar un mapa topográfico de la muestra¹⁰¹.

La fuerza interatómica, se puede detectar cuando la punta está muy próxima a la muestra. Cuando realizamos medidas de fuerza la punta se hace oscilar verticalmente sobre la muestra, mientras se registra la flexión del cantiléver. La medida se expresa entonces representando fuerza, frente altura sobre la muestra.

El principio del proceso de medición del AFM es el barrido de de la punta sobre la superficie de la muestra con un mecanismo de feedback. La fuerza repulsiva entre átomos progresivamente debilita las fuerzas de atracción, cuando la distancia Interatómica disminuye. Las fuerzas de interacción vienen a ser cero, cuando la distancia entre átomos alcanza una par de Angstroms y viene a ser repulsivo cuando los átomos están en contacto.

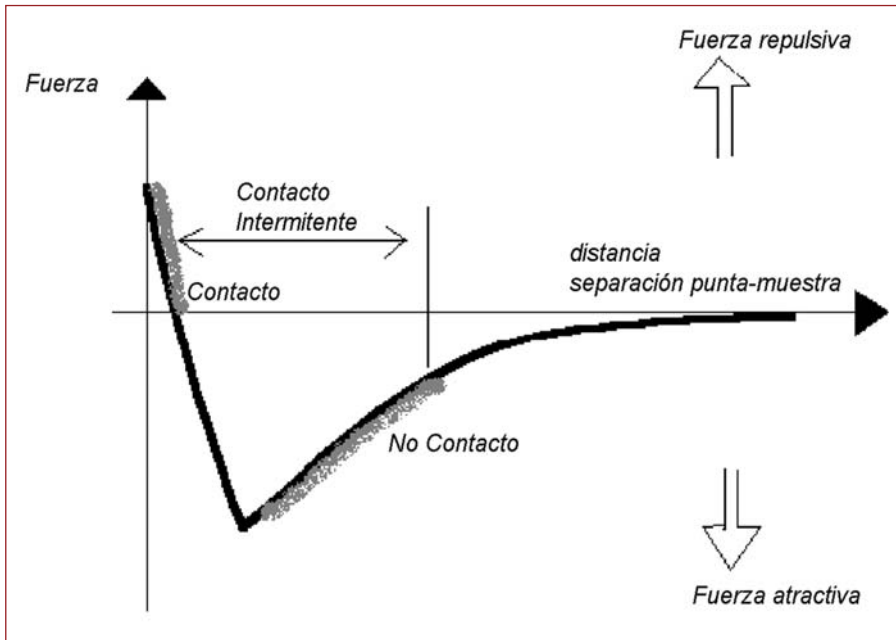


Figura 16. Magnitud de deflexión del cantiléver en función de la distancia entre la punta y la muestra.

Las medidas de fuerza son útiles en estudios de fuerzas de adhesión y permiten estudiar a nivel de una sola molécula, interacciones específicas entre moléculas (ejemplo interacciones antígeno-anticuerpo, interacciones entre cadenas complementarias de DNA) o interacciones estructurales de biomoléculas (Plegado de Proteínas), axial como estudios de superficies y adherencia de distintas sustancias a las mismas.

2.6.3 Modos de actividad del AFM

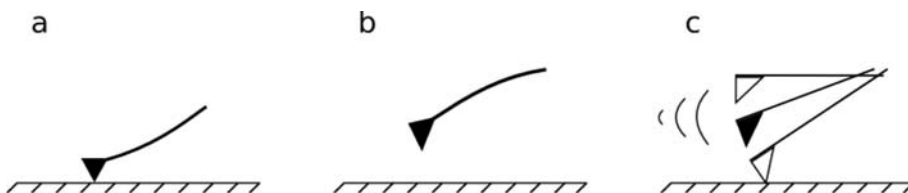


Fig. 17. Modos de actividad del AFM. a) modo contacto, b) modo no contacto, c) contacto intermitente

2.6.3.1 Modo de no-contacto NC-AFM

En este modo de acción del AFM la punta del cantiléver vibra cerca de su frecuencia de resonancia, de modo que vibre cerca de la superficie de la muestra planeando a una distancia alrededor de 10-150 Å por encima de la superficie de la muestra, para detectar las fuerzas atractivas de Van der Waals que actúan entre la punta y la muestra; y las imágenes topográficas son construidas por barrido (escaneo) de la punta sobre la muestra.

La técnica de NC-AFM se utiliza cuando no se quiere deteriorar la superficie de la muestra. La fuerza que ejerce la punta del cantiléver sobre la muestra es muy baja 10^{-12} N. El trabajo con fuerzas tan débiles hace imposible usar el modo de fuerza constante, y además estas son difíciles de medir. La sensibilidad de la técnica proviene de la frecuencia de resonancia del cantiléver. El cantiléver vibra a frecuencias de 100 a 400 KHz y las amplitudes de 10 a 100 Å y conforme se acerca la punta a la superficie se detectan cambios en la frecuencia o en la amplitud con una resolución vertical por debajo de un nivel sub-angstroms.

En la práctica corriente la detección de los cambios de de amplitud de la punta se realizan en un régimen de Van der Waals. En algunos casos la capa de fluido contaminante es sustancialmente más delgada que el rango de gradiente de fuerzas de Van der Waals, y sin embargo los intentos de realizar una verdadera imagen de la superficie con NC-AFM fracasa, porque el movimiento de oscilación viene a ser atrapado en la capa de fluido¹⁰² o planea debajo de un rango efectivo de fuerzas medibles y confunde la topografía de la muestra. Este es el mayor fracaso de la técnica NC-AFM con importante degradación en la resolución de las imágenes topográficas generadas. Otro importante fallo del sistema no-contacto es el fallo de las mediciones de la distancia entre la superficie de la muestra y la punta del micro cantiléver. Para imágenes de muy alta resolución, es necesario que sea mínima esta distancia, la cual influye en el resultado y en la mejora de la fuerza de interacción estimada en el enaltecimiento de las imágenes topográficas.

Desde su invención¹⁰³ el NC-AFM ha incrementado su utilización para obtención de imágenes de diversos tipos de materiales, desde metales a semiconductores y desde polímeros a materiales biológicos.

El modo NC-AFM ofrece una única ventaja sobre otras técnicas de escaneado contemporáneo, tales como el modo de contacto de la Microscopía de Fuerza Atómica (C-AFM) y la Microscopía de Efecto Túnel (STM). A diferencia de STM y C-AFM la ausencia de fuerzas repulsivas en NC-AFM permite las imágenes de muestras “blandas” consiguiendo proporcionar su imagen topográfica con mínimo o sin contacto de la punta con la muestra evitando así deformar o deteriorar la misma sobre todo cuando se utiliza con muestras biológicas¹⁰⁴.

Por lo que el sistema NC-AFM es útil porque proporciona medios para medir topografía de muestras, con mínimo o no contacto de la punta y la muestra. La fuerza total aplicada ente la punta y la muestra en el régimen de no-contacto es muy baja, generalmente alrededor de 10-12 pN; esta baja fuerza es útil para el estudio de muestras elásticas o blandas. Sin embargo no soporta los efectos de degradación que produce la punta del cantiléver sobre la muestra que son apreciados en el modo C-AFM.

2.6.3.2 *Modo de contacto C-AFM*

Este modo es también conocido Modo repulsivo. La punta esta en un íntimo, pero suave contacto con la muestra, cuando escanea la superficie. En este caso, la interacción De fuerzas entre la punta y la muestra son principalmente repulsivas por naturaleza.

El examen de la curva, de las fuerzas de Van der Waals penden de diversas distancias Interatómicas, lo que revela una pendiente en la curva durante el régimen de contacto que es muy empinada. La punta esta unida al final del cantiléver por una banda constante de resorte, menor que la constante de resorte efectiva que mantienen los átomos de la muestra. Conforme la muestra barre la superficie, la fuerza de contacto origina una flexión del cantiléver de modo que este se adapta a la superficie de la muestra. Como resultado en el modo de C-AFM, la fuerza de Van der Waals equilibra cualquier otra fuerza que intente mantener juntos a los átomos. Por lo tanto, cuando el cantiléver empuja su punta contra la muestra, este se flexiona forzando a los átomos de la punta y muestra, a permanecer juntos. Esto es porque están tan

cerradas las distancias interatómicas que la nube de electrones en el átomo repele a otros electrones.

En adición a estas fuerzas repulsivas hay presentes otras 2 fuerzas generalmente presente en C-AFM: Fuerza de Capilaridad debida a la presencia de una delgada capa de agua que a menudo está presente en el medio ambiente¹⁰⁵ y por lo tanto sobre la superficie de la muestra y la fuerza ejercida por el propio cantiléver (palanca). La fuerza de capilaridad es de naturaleza atractiva y se mantiene constante a través de la muestra (asumiendo que la capa contaminante es homogénea). Sin embargo la magnitud y la dirección de las fuerzas del cantiléver actuando sobre la muestra dependen de la deflexión y la velocidad constante del cantiléver.

La fuerza total que ejerce la punta sobre la muestra es la suma de las fuerzas de capilaridad y del cantiléver, y debe equilibrar a la fuerza de repulsión de Van der Waals. La magnitud de la fuerza total que se ejerce sobre la muestra varía entre 10^{-8} , 10^{-7} y 10^{-6} N.

Para obtener una imagen grafica de la superficie, se detecta la posición del cantiléver mediante el empleo de técnicas ópticas. Una radiación láser incide sobre el dorso especular del cantiléver y de ahí se refleja sobre un foto detector sensible a la posición.

La relación entre la longitud del camino recorrido por la radiación láser entre el cantiléver y el detector y la propia longitud del cantiléver origina una amplificación Mecánica. Como resultado el sistema puede detectar movimientos verticales de la punta del cantiléver inferior a los Å.

En el Modo Contacto de la AFM el perfil de la superficie puede ser generado de dos maneras diferentes: modo de altura constante o

modo de fuerza constante. En el modo de altura constante el escáner piezoeléctrico escanea de forma lateral la muestra. La deflexión del cantiléver produce como resultado una interacción de punta-muestra que puede ser utilizada para estudiar la topografía de la muestra. El problema que presenta esta técnica es que la presencia de alguna prominencia la pisada de la punta sobre la muestra puede dañar la punta y esta será empujada de nuevo por las irregularidades de la superficie durante el proceso de escaneado.

En el modo de fuerza constante, el cual es el más ampliamente utilizado. La acción de la fuerza activa normal entre la punta y la muestra es mantenida constante a través de un circuito feed back. Un procesador piezoeléctrico es usado y colocado en la punta de la sonda y aplica la fuerza requerida sobre la muestra. Inicialmente la punta es llevada en contacto con la muestra en una posición indicada hasta que el punto de deflexión requerido por el cantiléver es alcanzado. Ahora la punta puede escanear lateralmente sobre la muestra y la deflexión del cantiléver es gravada por un sistema de detección óptico. Los valores de deflexión medidos son comparados con un conjunto de valores DC Feedback en un amplificador y la señal de error resultante es utilizada para adecuar el elemento posicionador piezoeléctrico aplicando el voltaje requerido.

El voltaje aplicado por el amplificador del feed back del elemento piezoeléctrico es una medida de la superficie topográfica y es expresada tanto en función de la posición lateral de la muestra. Esta función es utilizada para generar la superficie topográfica del espécimen.

El principal fallo del método de contacto es que las fuerzas de cizallamiento resultantes del movimiento lateral de la punta tienden

a dañar las muestras blandas y distorsionar los rasgos de la imagen generada. Por lo tanto este modo de acción del AFM, no es apropiado para el estudio de superficies biológicas blandas, ni superficies de polímeros, dado que causa degradación sustancial de la muestra.

2.6.3.3 *AFM en Modo de contacto intermitente “Tapping mode”*

La técnica de contacto intermitente ha sido la llave del avance en la Microscopía de Fuerza Atómica. Uno de los problemas que la C-AFM era el deterioro que ocasiona en algunas muestras, por el arrastre continuo de la punta sobre la superficie de la muestra. Esta técnica permite unas imágenes de alta resolución en muestras blandas, lo cual era muy difícil en el modo de contacto continuo. En esta aplicación la punta está en contacto intermitente con la superficie a la vez que la barre¹⁰⁶. En este modo el cantiléver oscila (vibra) sobre la muestra, con una variación de amplitud cercana a la frecuencia de resonancia natural, usando un actuador piezoeléctrico. La variación de amplitud de oscilación de la punta, debida a la amortiguación sobre la superficie es lo que se utiliza como señal de control¹⁰⁷. El actuador piezoeléctrico aplica una fuerza en la base del cantiléver y provoca que la punta vibre con unas amplitudes que habitualmente oscilan en un rango de 20-100 nm cuando la punta no está en contacto con la superficie. La vibración de la punta es ahora movida sobre la muestra hasta que comienza a rozar su superficie de forma ligera. Durante el barrido de la muestra la punta toca ligeramente la superficie de forma intermitente y se levanta con frecuencias de alrededor de 50-500 Kciclos/s. Debido a la pérdida de energía causada por el contacto

intermitente de la punta sobre la superficie, los cambios en la amplitud de vibración van acorde con la superficie topográfica de la muestra.

Durante la forma de contacto intermitente, la amplitud de oscilación es mantenida constante a través de un sistema de feed back. Cuando la punta del cantiléver pasa sobre una protuberancia de la superficie la amplitud de vibración decrece consecuencia de que se detecta una pérdida de espacio de vibración. En otras ocasiones cuando la punta pasa sobre una depresión la amplitud de vibración se incrementa. Este cambio en la amplitud de oscilación es detectado por un sistema óptico y un feedback que controla y compara con las medidas de un conjunto de valores de referencia y genera una señal de error. Esta señal pone en acción el elemento piezoeléctrico que ajusta la separación entre la punta y la muestra para mantener constante la amplitud y por consiguiente mantiene constante la fuerza sobre la muestra. La señal de error induce cambios en el sistema piezoeléctrico, con la medida de las superficies irregulares en la dirección vertical, es expresado en función de la posición lateral de las puntas y usada en la parcela de la topografía de la muestra.

En el modo de contacto intermitente cuando el cantiléver vibra sobre la muestra, está en contacto intermitente con la superficie de la muestra, tanto la fuerza friccional como el tiempo de contacto pueden ser reproducidos y pueden ser unidos por imágenes de fricción o de falta de unión entre las muestras¹⁰⁸. Algunos estudios han examinado la topografía de células no fijadas usando este método¹⁰⁹.

Las ventajas de este modo de contacto intermitente, son que las mediciones son muy estables, la fuerza de presión es muy débil, la resolución es elevada. Presenta las mejores prestaciones para la me-

dida topográfica de alta resolución y evita imágenes artificiales, que en ocasiones aparecen en la AFM.

Como inconveniente, no se puede trabajar en medio líquido, dado que no se llega a una resolución atómica, otro inconveniente es que los estudios son más lentos.

2.6.4 Utilidad de la AFM en biomedicina

El reconocimiento molecular entre receptores específicos y ligandos juega un papel esencial en la vida científica¹¹⁰, ejemplos de estas interacciones específicas son las que se dan entre los complementarios filamentos de DNA, las uniones antígeno-anticuerpo, enzima-sustrato y la adhesión de células con proteínas.

La adhesividad de las células con otras células o con una matriz extracelular siendo esto la llave de múltiples procesos biológicos¹¹² y patológicos, tales como la embriogénesis, mitosis, actividad leucocitaria, formación de metástasis en pacientes tumorales, la unión de células a biomateriales y en la formación del trombo.

La capacidad de la célula para realizar contactos específicos es medido por la capacidad de adhesión de ciertas proteínas tales como la cadenina o la integrina.

La información cuantitativa de las fuerzas de adhesión y de los parámetros mecánicos de las células vivas pueden ser obtenidas por la aplicación de fuerzas externas. Las propiedades mecánicas de las células han sufrido diversos intentos de medición con enfoques experimentales, como las micro pipetas, fuerzas de tracción sobre las células, pinzas ópticas, pinzas magnéticas etc.

En las ciencias de estudios de los biomateriales, conocer las interacciones receptor ligando es esencial para entender sucesos celulares, como la adhesión celular¹¹⁰ y el control de la respuesta celular. Durante la pasada década importantes progresos se han conseguido en la caracterización de fuerzas biomoleculares utilizando diferentes técnicas como el Método de Stress Molecular, Aparatos de Medición de Fuerza de Superficie, Aparatos magnéticos, Pinzas Ópticas y Pruebas de Fuerza de Bio-membrana. Pero estas técnicas no ofrecen resolución tridimensional y generalmente no son adecuadas para el reconocimiento de distintas zonas en las células vivas.

La llegada de Microscopio de Fuerza Atómica AFM ha abierto un amplio espectro de nuevas posibilidades para explorar biosuperficies, en términos de estructura, propiedades e interrelaciones biomoleculares.

Mientras las imágenes de AFM son usadas para la generación de imágenes topográficas tridimensionales de especímenes biológicos con alta resolución y bajo condiciones fisiológicas. La fuerza Espectroscopia de Molécula Simple permite investigar la medida de fuerzas biomoleculares con sensibilidad de pico Newton. Esta nano escala de medidas permite un nuevo discernimiento dentro de las relaciones estructura-función de biosuperficies y contribuye al desarrollo de nuevas técnicas y aplicaciones biomédicas.

La AFM permite capacidades adicionales y ventajas relativas sobre otros métodos de microscopía (Scanning Electronic Microscopy SEM, Microscopía de Trasmisión Electrónica) en estudios de superficies metálicas y micro estructuras, dado que permite medidas exactas a escala nono métrica.

El Microscopio de Modulación de Fuerza (FMM) es una extensión del AFM, y es usado para caracterización de propiedades mecánicas y aplicaciones tales como cambios en los componentes de un metal, análisis de la homogeneidad de polímeros y detección de contaminantes durante un proceso de nano-manufactura¹¹³.

Otras propiedades de las superficies tales como Fuerzas de fricción, elasticidad de la muestra, adhesión o diferencias químicas por sensación de la fuerza torsional, la fuerza de modulación, la frecuencia de modulación y la fase de imagen pueden ser valoradas. Virtualmente todas las superficies sólidas de todas las ramas de las ciencias, industria, medicina, son accesibles a la investigación nanoscópica, con información imprecisa. La resolución y magnificación es más alta que con microscopios convencionales y la información tridimensional es una de las más importantes características que distinguen a la AFM lo cual suplementa de forma importante al microscopio electrónico de barrido, incrementando las posibilidades de este, así mismo no requiere tratamiento de las superficies y es capaz de realizar mediciones en cualquier condición ambiental.

El funcionamiento de AFM cuando se desplaza sobre una muestra biológica se basa en un deslizamiento y una fuerza prefijada en la interacción de punta-muestra, con una perfección de alcance que no deteriora a mencionada muestra biológica.

La resolución vertical es utilizada rutinariamente en los estudios de alcance de mono capas moleculares con superficies rugosas. Medidas bajo solventes, podrán no revelar la superficie original debido a la disolución o adición de material o a la turgencia (hinchazón). Mediciones de células en suspensión estaría restringida a estudios de

disolución, cristalización corrosión o similares. Sin embargo muestras que están en constante contacto con líquido, tales como células vivas pueden ser medidas en ambiente biológico cuando están adheridas a un soporte.

Este modo dinámico, ha demostrado ser el más ventajoso para el estudio de muestras biológicas.

2.6.5 Propiedades mecánicas de las células

Las propiedades mecánicas de las células son controladas principalmente por el cito esqueleto y por la elasticidad de la membrana¹¹⁴. Así mismo la organización del esqueleto intracelular está conectado con la superficie por receptores de adhesión, que a su vez están implicados en la adhesión celular. El microscopio de fuerza atómica AFM ha emergido como un poderoso aparato, para la obtención de información mecánica de una muestra. Las propiedades mecánicas de una muestra son obtenidas, procesamiento de imágenes, por análisis de la curva de fuerza y por métodos de modulación de fuerza. Vamos a revisar estos 3 métodos

2.6.5.1 Procesado de imágenes

En el procesado de imágenes un método consiste en el grabado de imágenes a sometidas a una carga constante. Esto combina las propiedades topográficas y mecánicas de la imagen celular. Por el perfil de altura de la célula escaneada se pierde sobre la indentación de la punta en distintas profundidades en la superficie de la célula, por lo que el modulo de elasticidad puede ser deducido:

$$F = k\delta = \frac{1}{2}G\delta^2 / (1 - \nu^2)$$

La variación en el módulo de elasticidad G como la indentación es debido en parte a la heterogeneidad celular y al tamaño de la punta. Por lo tanto es la manera apropiada de establecer la correlación entre la complianza y la estructura de la célula. En un intento de realizar un modelo estudio de las propiedades mecánicas de las células, se deduce por el análisis de la altura de las imágenes¹¹⁵ que una célula débilmente adherida aparenta exhibir una más homogénea respuesta elástica, que una célula adherida firmemente a una superficie.

2.6.5.2 Las curvas de fuerza

Las curvas de fuerza dan un análisis de la acción del cantiléver \hat{O}_c en función del relieve vertical de la muestra Δ . Y pueden ser establecidas con la relación $\hat{O}_c = S\Delta$

Donde \hat{O}_c es la deflación del cantiléver y S es la pendiente de la curva de fuerza que contiene las propiedades mecánicas de la célula estudiada.

Con la ayuda de dos ecuaciones una correspondiente a la igualdad de la fuerza entre la elasticidad de medio y el cantiléver, $K_c \hat{O}_c = K_s \hat{O}_s$, y la otra dando el desplazamiento vertical con la suma de la deflación del cantiléver y la profundidad de la indentación $\Delta = \hat{O}_c + \hat{O}_s$ uno puede inmediatamente calcular la expresión de la pendiente S de una curva de fuerza (la relación \hat{O}_c y Δ) que contiene información de las propiedades elásticas.

Muchos estudios experimentales han evaluado las propiedades elásticas de diferentes células¹¹⁶. Determinando las propiedades me-

cánicas de 3 tipos diferentes de células, demostrando que las células del miocardio eran las más rígidas (100 kPa), las células del músculo esquelético eran intermedias (25 kPa) y las células endoteliales eran las más blandas (1,4 – 7 kPa) dependiendo de la localización de la superficie estudiada. Revisando este artículo se observó un amplio rango de valores de módulos de elasticidad de diferentes tipos de células (0,6 kPa – 0,67 MPa), dependiendo del tipo de células y la localización de estas en la superficie.

2.6.5.3 *Método de Modulación de Fuerza*

El método de modulación de fuerza ha sido utilizado para acceder a la información sobre la estructura local. La muestra es escaneada lateralmente y las curvas de fuerza son tomadas en cada punto de la célula y las curvas de fuerza son analizadas para calcular el valor cuantitativo del módulo de elasticidad local en cada zona de la célula. Debido a la interacción hidrodinámica y la escala de movimiento, la velocidad de escaneo es limitada y la rapidez del procesamiento celular no puede ser registrada de esta manera, por lo que se utiliza un proceso de imagen, siendo útil en estos casos un procesamiento de imagen obteniendo en este caso una imagen bidimensional de la muestra. Se puede alterar el cito esqueleto de las células, utilizando diferentes drogas y luego valorar su efecto midiendo el módulo de elasticidad de las mismas¹¹⁷. Ellos demostraron la importancia de la red de actina comparada con la red de micro túbulos en el estudio de las propiedades elásticas de las células y en la estabilidad mecánica de las células vivas.

2.6.5.4 *Medición de la fuerza de adhesión celular*

La AFM ha supuesto un poderoso enfoque experimental, para el estudio de la adhesión celular. La evaluación morfológica de las células óseas, será tomado tanto por el procesado de imágenes, como por el entendimiento de la interacción de las células óseas con los implantes, y el obvio interés que esto despierta para la investigación¹¹⁸ de biomateriales óseos.

El estudio de la adhesión de las células óseas con diferentes materiales ha sido representado utilizando AFM por varios equipos de investigación^{119,120}. Estos estudios han mostrado una caracterización inicial de la adhesión celular por AFM, obteniendo imágenes que mesuran distintas formas celulares, las formas extendidas pueden ser distinguidas por este mecanismo. La forma de la célula puede ser también definida por parámetros tales como área celular, altura celular o por la forma aplanada que fue mostrado por Domke¹²¹. En otros estudios es asumido que la forma celular es una importante indicación de la calidad de la adhesión celular¹²². Sin embargo es aceptado que el aplanamiento esta directamente relacionado con una buena adhesión, aunque este no es el caso para ciertos tipos de células con morfología compacta. Finalmente la existencia de una red de fibrillas dentro de la célula como parte constituyente de la estructura cito esquelética de la misma, cambios en mencionado citoesqueleto con variación en su forma y extensión nos puede indicar directamente el establecimiento de adhesión celular¹²⁰.

Estas caracterizaciones fueron consecuentes con las obtenidas con SEM¹¹⁵ y por microscopio de tñido inmunofluorescente, que con-

firma que las fibras observadas en las imágenes de AFM tales como F-actina fue teñida en este experimento¹¹⁹.

Las cargas mecánicas como las drogas influyen también en la organización de los haces del citoesqueleto celular. Sin embargo a la hora de evaluar la efectividad de la adhesión celular una fuerza externa aplicada como puede ser la punta del cantiléver de un AFM aplicada in situ, si la célula es estable y está realmente adherida a la superficie, fuerzas externas a la célula no la alteran¹²⁰, la diferencia en la adhesión celular podría explicar el efecto de las diferentes cargas ejercidas por la punta sobre la célula

La caracterización morfológica de la adhesividad celular puede ser revelada por AFM a distintos niveles, primero por la detección de la presencia de fibras de stress elaboradas y estructuradas y por la estabilidad de las células cuando son sometidas a una fuerza o al efecto de drogas.

2.7 QCM-D

2.7.1 Propiedades visco elásticas de los biomateriales

El modelo Hookeriano de elasticidad de los sólidos es solo una descripción válida para los materiales con estrecho margen de carga. Por ejemplo, un muelle ideal que relacione la fuerza y elongación, por una fuerza de espira (muelle) constante K es *invalidada en las regiones no lineales de bajo peso y de alto peso*¹²³.

De forma similar todos los biomateriales exhiben propiedades visco elásticas. Diferentes modelos de visco elasticidad han sido de-

sarrollados para caracterizar materiales constituyendo simples ecuaciones.

Se define como material visco-elástico aquel cuya respuesta a la deformación producida por una carga combina propiedades elásticas y viscosas. Para comprender la definición hace falta primero especificar lo que es un material perfectamente elástico y uno viscoso.

Un material elástico es aquel que se deforma ante un esfuerzo, pero recupera su forma y tamaño original cuando el esfuerzo cesa. Es decir que el proceso es reversible, por lo que se conserva la energía. Un ejemplo práctico de un material elástico es de un muelle que trabaja en ciertos límites. Para los materiales elásticos el esfuerzo es directamente proporcional a la deformación.

La ecuación constitutiva de éste es:

$$\sigma_{ij} = C_{ijkl} \varepsilon_{kl}$$

Donde σ_{ij} es el tensor de tensiones, ε_{kl} es el tensor de deformaciones, ambos de segundo rango y C_{ijkl} es el tensor de cuarto grado de las constantes elástica. En el caso de un material isótropo, para una tensión uniaxial se reduce a:

$$\sigma = E\varepsilon$$

Donde E es el modulo de Young

Un material viscoso es aquel que luego de haber sido sujeto a deformaciones debidas a una carga, no recupera su forma y tamaño cuando la carga cesa. En el caso de un material viscoso deja de ser válida la relación lineal entre la tensión y la deformación; si se aplica

una tensión aparece una deformación que aumenta con el tiempo con arreglo a la formula siguiente:

$$\sigma = \eta \frac{d\varepsilon}{dt}$$

Donde η es la viscosidad del material

En el caso de materiales viscoelásticos, fue Zener en 1948 quien propuso un modelo fenomenológico para estos, a los cuales considera que responden a una combinación de ambos procesos: el elástico y el viscoso. Entonces si se asocian las respuestas elásticas y viscosas a un resorte de modulo elástico E y a un amortiguador caracterizado por una viscosidad η , respectivamente, un sólido visco elástico suele describirse disponiendo a estos elementos en serie o en paralelo; ello constituye los modelos visco elásticos de Maxwell y Voigh, y la variante al modelo de Voigt, con doble muelle en paralelo en el modelo de Kelvin.

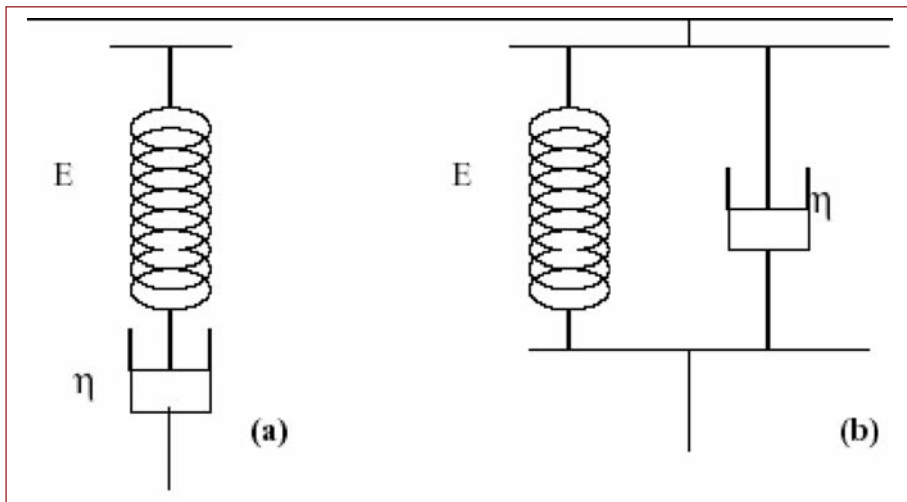


Fig. 18(a). Modelo visco elástico de Maxwell, (b) Modelo visco elástico de Kelvin-Voigt. (Tomado de Introduction to Biomedical Engineering, Enderle J. Second Edition, Elsevier, 2005) (123)

Como dijimos anteriormente existen 3 modelos visco elástico. El de Maxwell que consiste en una serie de muelles ideales y un amortiguador de aire. El de Voigt el que el muelle y el amortiguador están en paralelo y el de Kelvin con 2 muelles paralelos y el amortiguador. Cada cuerpo contiene un amortiguador, el cual genera fuerza en proporción a la derivación de su elongación. Consecuentemente los modelos resultantes exhiben carga y propiedades de tensión que varían con el tiempo.

La respuesta dinámica de cada modelo puede ser cuantificada por la aplicación de un cambio de paso en la fuerza F , apreciando que el modelo resultante cambia en longitud o en posición x , denotando una respuesta de deslizamiento H .

2.7.2 QCM-D

La técnica de Cristal de Cuarzo Micro balanceado con disipación QCM-D, es un atractivo y versátil método de medición y caracterización "in Vitro" de la adhesión de proteínas y células a superficies en tiempo real, y sin necesidad de realización de intervenciones destructivas sobre las mismas ¹²⁴

La técnica de QCM-D ha demostrado ser muy apropiada, para la medición de la adsorción de moléculas cuando se opera en fase líquida ¹²⁵ Esto ha permitido aplicaciones tales como monitorización de la adsorción de proteínas¹²⁵, adsorción de vesículas¹²⁶, formación de biofilms bacterianos¹²⁷, fijación de polímeros¹²⁸, adhesión y propagación de células¹²⁹, estudio de cambios en el cito esqueleto celular¹³⁰.



Fig. 19. Aparato QCM-D

La parte activa del sistema QCM-D es un delgado disco de cuarzo. Debido a las propiedades piezoeléctricas del cuarzo, es posible excitar el cristal produciendo una oscilación, mediante la aplicación de un voltaje de corriente alterna, a través de unos electrodos.



Fig. 20. Disco de cuarzo recubierto de oro del sistema QCM-D, denominado AT- cut

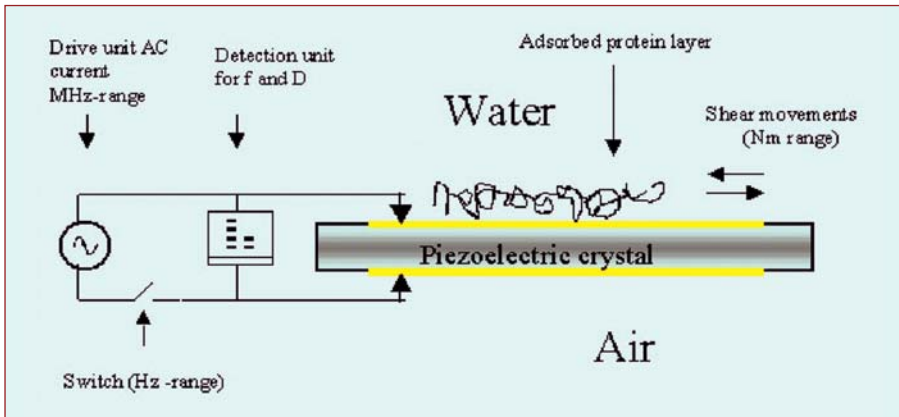


Fig. 21. Esquema de funcionamiento del sistema QCM-D. (Tomado de QCM-D Technology, en QCM page)

Por la aplicación de un campo eléctrico oscilante, el cristal oscila mecánicamente de atrás a adelante. La dirección de oscilación del cristal de cuarzo depende de cómo es colocado (donde son colocados los electrodos y cuál es la dirección del campo eléctrico aplicado).

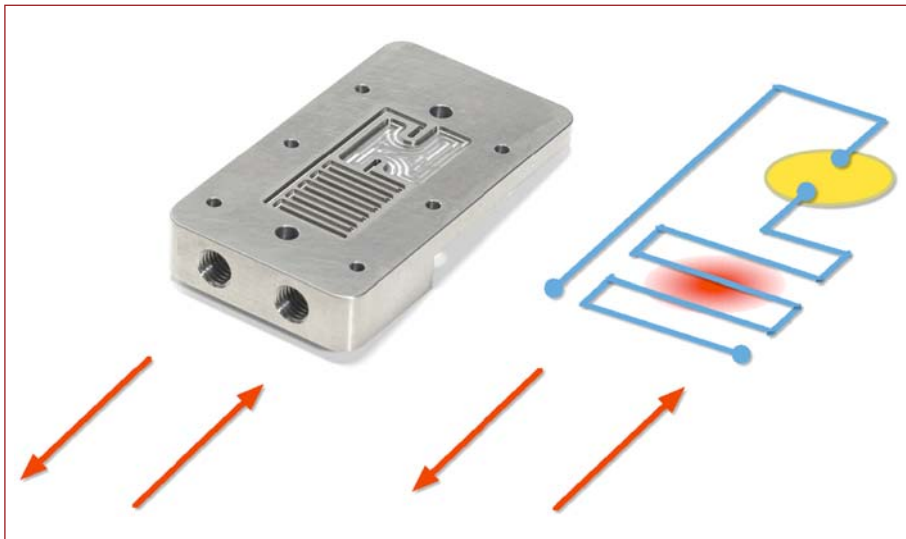


Fig. 22. Aplicación del campo eléctrico al disco AT-cut. (Tomado de QCM-D Technology, en QCM page)

En los cristales de cuarzo se utilizan electrodos que son conectados a la superficie recubierta de oro, esta superficie puede ser modificada para presentar distintos recubrimientos de materiales a estudiar, desde metales, polímeros, proteínas y células.

La frecuencia de resonancia (f) de los cristales depende de la masa total tras la adhesión de proteínas, células o cualquier molécula incluyendo el agua¹³². Cuando una fina película se adhiere al sensor del cristal (AT cut), la frecuencia de oscilación disminuye. Si la película es delgada y rígida, la disminución de la frecuencia es proporcional a la masa de la película.

Por lo tanto el cristal de cuarzo tiene una frecuencia de resonancia dependiente de la masa de oscilación. Por rastreo de la frecuencia de resonancia, son emitidas medidas muy exactas de las masas, por pequeñas que sean, de especímenes que son estudiados ($<ng/cm^2$ en vacío).

El cristal cuarzo tiene una frecuencia de resonancia muy estable, se utiliza habitualmente 5 MHz y puede ser medida con una exactitud mejor que 1 nm.

El cambio de la frecuencia con la masa es lineal de acuerdo con $\Delta f = -k \times \Delta m$.

Donde Δf es el cambio en la frecuencia de resonancia, k es una constante dependiente solo de las propiedades del Cristal Cuarzo Micro balance y Δm es el cambio en la masa, incluyendo la masa adsorbida en la superficie (cima) del cristal, junto con la oscilación.

Esta forma de medir la masa con los cambios de frecuencia es el principio fundamental del QCM-D¹³⁸.

En los cristales utilizados el umbral de la frecuencia de resonancia es 5 MHz. El cambio de la frecuencia de resonancia Δf es proporcional al cambio de la masa de adsorción Δm . Si la masa absorbida es mucho más pequeña que la masa del cristal i.e $\Delta m = C/n \Delta f$

Esta ecuación es la llamada ecuación de Sauerbrey, donde n es el número de la insinuación (1,3,5,7 es el número de connotación) ¹³³ y $C=17,7 \text{ ng/cm}^2$ por AT-Cut cristal usado en el experimento.

También es posible obtener una estimación del espesor (d) de la capa de adhesión donde p es la densidad efectiva capa de adhesión

La ecuación de Sauerbrey solo es valida si la capa de proteína adsorbida es rígida, sin fricción interna, si no hay deslizamiento en la capa interfaz metal proteína, y si la capa de proteína es homogéneamente distribuida en la superficie del metal.

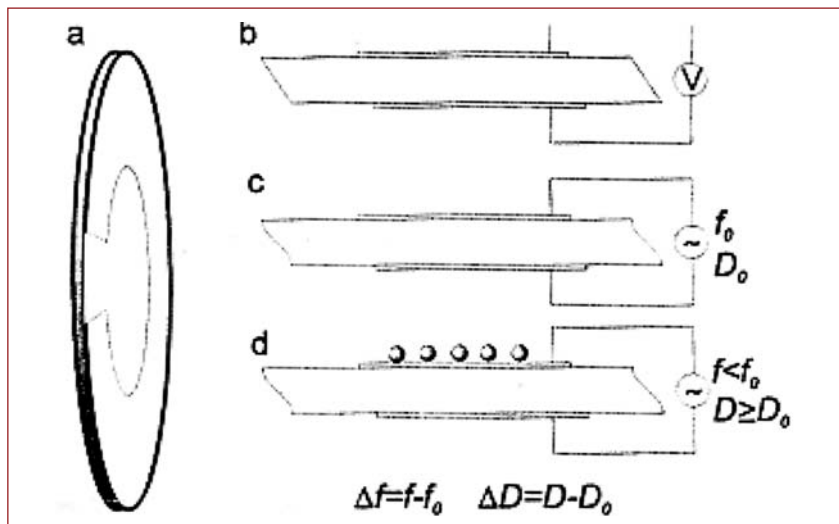


Fig. 23. Dibujo esquemático de un cristal de cuarzo del sistema QCM-D. en distintas situaciones a, b, c, d con masa de proteínas adheridas. (Tomado de Fundamental principles of the QCM. Fredrik Höök. Goteborg Swden).

Si la película adsorbida no es rígida sino visco elástica (suave), no hay una relación directa de la masa con la oscilación, por lo que la ecuación de Sauerbrey no es aplicable, dado que la ecuación de Sauerbrey subestima la masa de superficie, por lo tanto en caso de adsorción de especímenes no rígidos como las células, la relación de Sauerbrey, no siempre es válida, dado que la viscosidad de la biocapa alterara la oscilación del cristal¹³⁴.

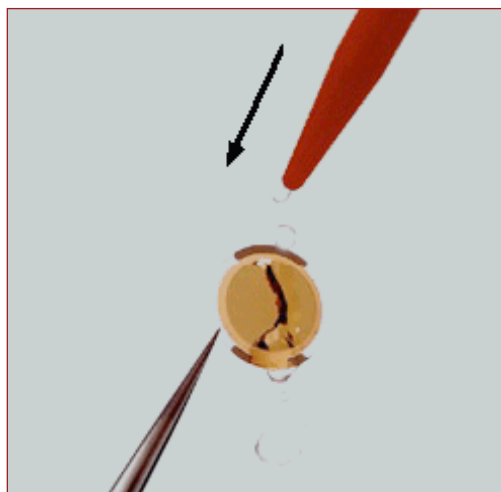


Fig. 24. sensor AT-cut modo de acción al paso de una solución

Esta suave película reduce la oscilación del cristal. La amortiguación o también llamada disipación (D) del cristal revela la suavidad (viscoelasticidad) de la película.

La disipación es definida por:

$$D = \frac{E_{lost}}{2\mu E_{stored}}$$

Donde E_{lost} es la energía perdida en cada oscilación, y E_{stored} es la energía total almacenada en el oscilador.

Para sistemas altamente disipativos es necesaria la utilización del Modelo de Voight¹³².

El Sistema permite saltar de la frecuencia fundamental a otras de sobretonos (por ejemplo 15, 25, 35,45 MHz). Al medir en múltiples frecuencias y la aplicación del modelo viscoelástico de Voight, el Sistema incorpora un software Q-sense QTools que permite la caracterización de la viscosidad, elasticidad y grosor correcto de la película adherida al detalle.

Con la técnica QCM-D la humedad es recogida como un cambio en la disipación del cristal, lo que posteriormente proporcionara la medida de la viscoelasticidad de la capa adsorbida. La sensibilidad de la medida Δf comparada con la Δm dependerá del espesor de la biomuestra adsorbida.

En general cuanto más elevada es la frecuencia, la disminución del decaimiento de la onda de resonancia comienza alrededor de los 250 nm de agua, con 5 MHz de frecuencia f_1 y no es más de 100nm para f_7 (35MHz)¹³². Por consiguiente células de mamíferos sujetas a una superficie, la altura de la protuberancia del núcleo mayormente excede la profundidad de penetración de las ondas de resonancia del cristal de cuarzo.

Diversas publicaciones de datos de QCM-D sobre adhesión de células han presentado algunas variaciones. Esto puede haber sido causado por las variaciones de las condiciones de estos estudios. Las diferencias fundamentales se han apreciado en, la frecuencia, las características de las superficies o los sensores.

Los aparatos electrónicos QCM-D tienen capacidad para la estabilización de movimiento, ruido y de las variaciones según el tipo

de células, su número y su adhesión a la placa, además de a las condiciones físicas, químicas o biológicas, antes y durante el cultivo y muestreo. (pre-tratamiento del sensor, con o sin suero, método de deposición de las células, temperatura, humedad y valor del pH en la cámara) todos estos factores pueden afectar la calidad y sensibilidad de los datos tomados Δf y ΔD .

Sin embargo varios parámetros son grabados para evaluar las propiedades visco elásticas de las células adheridas a las actuales superficies del sensor del cristal de cuarzo, axial como la disipación ΔD ^{129, 135}, la resistencia¹³⁶, la inducción¹³⁴, el tiempo de decaimiento constante y la máxima amplitud de oscilación.

2.8 ADSORCIÓN DE LAS PROTEÍNAS POR BIOMATERIALES

2.8.1 Proteínas estructura

Las proteínas, son sustancias constituyentes esenciales de la célula, formados por cadenas de aminoácidos, unidos por enlaces peptídicos

Este nombre está bien elegido. Entre todos los compuestos químicos, ciertamente El nombre proteína proviene de la palabra griega *πρώτα* (“prota”), que significa “lo primero”.

Las proteínas ocupan un lugar de máxima importancia entre las moléculas constituyentes de los seres vivos. En los vertebrados, las proteínas son los compuestos orgánicos más abundantes, pues representan alrededor del 50% del peso seco de los tejidos. Prácticamente todos los procesos biológicos dependen de la presencia y/o actividad

de este tipo de sustancias. Bastan algunos ejemplos para dar idea de la variedad y trascendencia de funciones a ellas asignadas. Son proteínas casi todas las *enzimas*, catalizadores de reacciones químicas en organismos vivientes; muchas *hormonas*, reguladores de actividades celulares; la *hemoglobina*, y otras moléculas con funciones de transporte en la sangre; *anticuerpos*, encargados de acciones de defensa natural contra infecciones o agentes extraños; los *receptores* de las células, a los cuales se fijan moléculas capaces de desencadenar una respuesta determinada; la *actina* y la *miosina*, responsables finales del acortamiento del músculo durante la contracción; el *colágeno*, integrante de fibras altamente resistentes en tejidos de sostén.

Las proteínas son macromoléculas formadas por aminoácidos

Las proteínas son moléculas de enorme tamaño; pertenecen a la categoría de macromoléculas, constituidas por gran número de unidades estructurales. Entre otros términos, se trata de polímeros. Debido a su gran tamaño, cuando estas moléculas se dispersan en un solvente adecuado, forman obligatoriamente soluciones coloidales, con características que las distinguen de las soluciones de moléculas más pequeñas.

Por hidrólisis, las moléculas proteínicas son escindidas en numerosos compuestos relativamente simples, de pequeño peso, que son las unidades fundamentales constituyentes de la macromolécula. Estas unidades son los aminoácidos, de los cuales existen veinte especies diferentes y se unen entre sí mediante enlaces peptídicos. Cientos y miles de estos aminoácidos pueden participar en la formación de la gran molécula polimérica de una proteína.

Todas las proteínas contienen carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno y casi todas poseen también azufre. Si bien hay ligeras variaciones en diferentes proteínas, el contenido de nitrógeno representa por término medio el 16% de la masa total de la molécula; es decir, cada 6,25g de proteínas contienen 1 g de N. El factor 6,25 se utiliza para estimar la cantidad de proteína existente en una muestra a partir de la medición de N de la misma.

La síntesis proteica es un proceso complejo desarrollado por las células según las directrices de la información suministrada por los genes.

2.8.1.1 Estructura primaria de las proteínas

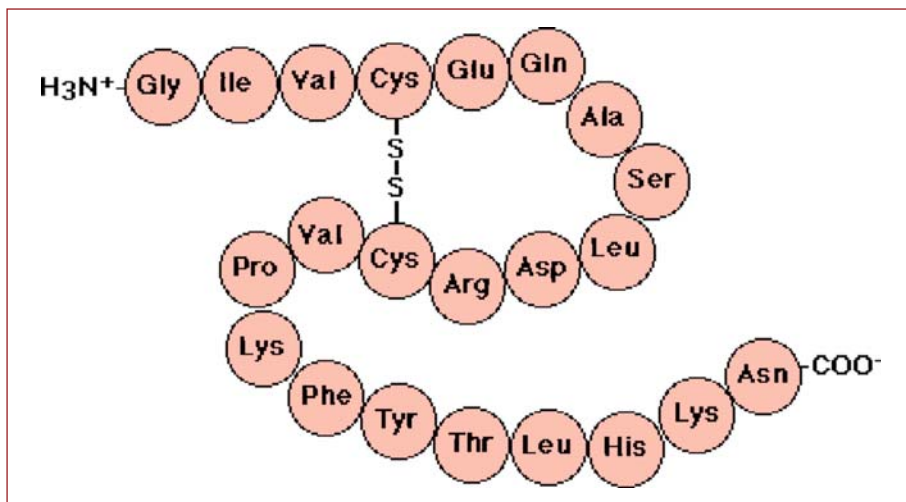
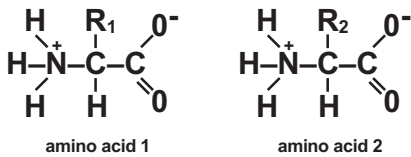


Fig. 25. Estructura primaria de las proteínas

La estructura primaria viene determinada por la secuencia de AA en la cadena proteica, es decir, el número de AA presentes y el orden en que está enlazados. Las posibilidades de estructuración a nivel

primario son prácticamente ilimitadas. Como en casi todas las proteínas existen 20 AA diferentes, el número de estructuras posibles viene dado por las variaciones con repetición de 20 elementos tomados de n en n , siendo n el número de AA que componen la molécula proteica.



Generalmente, el número de AA que forman una proteína oscila entre 80 y 300. Los enlaces que participan en la estructura

primaria de una proteína son covalentes: son los enlaces peptídicos. El enlace peptídico (Figura de la izquierda) es un enlace amida que se forma entre el grupo carboxilo de una AA con el grupo amino de otro, con eliminación de una molécula de agua. Independientemente de la longitud de la cadena polipeptídica, siempre hay un extremo amino terminal y un extremo carboxilo terminal que permanecen intactos. Por convención, la secuencia de una proteína se lee siempre a partir de su extremo amino.

Como consecuencia del establecimiento de enlaces peptídicos entre los distintos AA que forman la proteína se origina una cadena principal o “esqueleto” a partir del cual emergen las cadenas laterales de los AA.

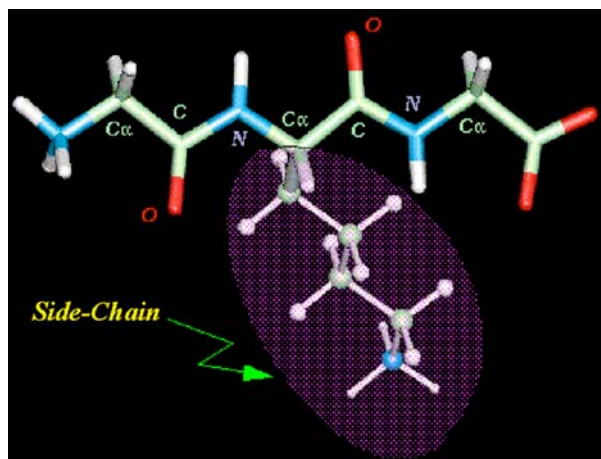
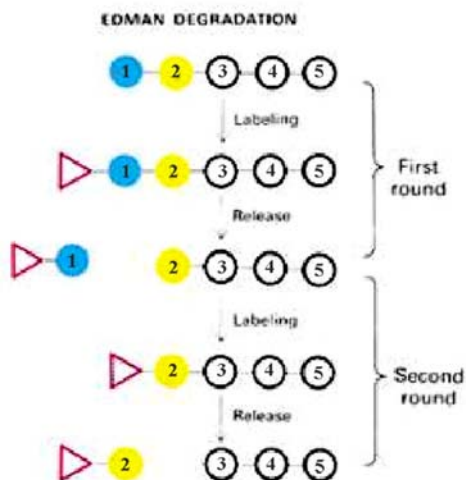


Fig. 26. Cadena principal de una proteína

(Tomado de Wikimedia Commons)

Los átomos que componen la cadena principal de la proteína son el N del grupo amino (condensado con el AA precedente), el C $_{\alpha}$ (a partir del cual emerge la cadena lateral) y el C del grupo carboxilo (que se condensa con el AA siguiente). Por lo tanto, la unidad repetitiva básica que aparece en la cadena principal de una proteína es: (-NH-C $_{\alpha}$ -CO-)



Como la estructura primaria es la que determina los niveles superiores de organización, el conocimiento de la secuencia de AA es del mayor interés para el estudio de la estructura y función de una proteína. Clásicamente, la secuenciación de una proteína se realiza mediante métodos

químicos. El método más utilizado es el de Edman, que utiliza el fenilisotiocianato para marcar la proteína (representado en la Figura de la izquierda como un triángulo) e iniciar una serie de reacciones cíclicas que permiten identificar cada AA de la secuencia empezando por el extremo amino. Hoy en día esta serie de reacciones las realiza de forma automática un aparato llamado secuenciador de AA

2.8.1.2 Estructura secundaria de las proteínas

La estructura secundaria es el plegamiento que la cadena polipeptídica adopta gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre los átomos que forman el enlace peptídico. Los puentes de hidrógeno

se establecen entre los grupos -CO- y -NH- del enlace peptídico (el primero como aceptor de H, y el segundo como donador de H). De esta forma, la cadena polipeptídica es capaz de adoptar conformaciones de menor energía libre, y por tanto, más estables.

2.8.1.3 *Estructura terciaria de las proteínas*

Se llama estructura terciaria a la disposición tridimensional de todos los átomos que componen la proteína, concepto equiparable al de conformación absoluta en otras moléculas. La estructura terciaria de una proteína es la responsable directa de sus propiedades biológicas, ya que la disposición espacial de los distintos grupos funcionales determina su interacción con los diversos ligandos. Para las proteínas que constan de una sola cadena polipeptídica (carecen de estructura cuaternaria), la estructura terciaria es la máxima información estructural que se puede obtener. La estructura terciaria es una disposición precisa y única en el espacio, y surge a medida que se sintetiza la proteína. En otras palabras, la estructura terciaria está determinada por la secuencia de AA (estructura primaria).

Se distinguen dos tipos de estructura terciaria:

Proteínas con estructura terciaria de tipo fibroso en las que una de las dimensiones es mucho mayor que las otras dos. Son ejemplos el colágeno, la queratina del cabello o la fibroína de la seda, En este caso, los elementos de estructura secundaria (hélices u hojas) pueden mantener su ordenamiento sin recurrir a grandes modificaciones, tan sólo introduciendo ligeras torsiones longitudinales, como en las hebras de una cuerda.

Proteínas con estructura terciaria de tipo globular, más frecuentes, en las que no existe una dimensión que predomine sobre las demás, y su forma es aproximadamente esférica. En este tipo de estructuras se suceden regiones con estructuras al azar, hélice hoja, acodamientos y estructuras supersecundarias.

Las fuerzas que estabilizan la estructura terciaria de una proteína se establecen entre las distintas cadenas laterales de los AA que la componen. Los enlaces propios de la estructura terciaria pueden ser de dos tipos: covalentes y no covalentes.

Los enlaces covalentes pueden deberse a la formación de un puente disulfuro¹³⁸ entre dos cadenas laterales de Cys, o a la formación de un enlace amida (-CO-NH-)¹³⁹ entre las cadenas laterales de la Lys y un AA dicarboxílico (Glu o Asp).

Los enlaces no covalentes pueden ser de cuatro tipos: fuerzas electrostáticas¹³⁸ entre cadenas laterales ionizadas, con cargas de signo opuesto, puentes de hidrógeno, entre las cadenas laterales de AA polares interacciones hidrofóbicas entre cadenas laterales apolares y fuerzas de polaridad debidas a interacciones dipolo-dipolo.

Como resultado de estas interacciones, en las proteínas con estructura terciaria globular, las cadenas laterales con carácter apolar se orientan hacia el interior de la molécula evitando las interacciones con el disolvente, y forman un núcleo compacto con carácter hidrofóbico. Las cadenas laterales de los aminoácidos polares se localizan en la superficie de la molécula, interaccionando con el agua y permitiendo que la proteína permanezca en disolución.

No todas estas interacciones contribuyen por igual al mantenimiento de la estructura terciaria. Obviamente, el enlace que aporta

más estabilidad es el de tipo covalente, y entre los no covalentes, las interacciones más importantes son las de tipo hidrofóbico, ya que exigen una gran proximidad entre los grupo apolares de los AA.

Existen regiones diferenciadas dentro de la estructura terciaria de las proteínas que actúan como unidades autónomas de plegamiento y/o desnaturalización de las proteínas. Estas regiones constituyen un nivel estructural intermedio entre las estructuras secundaria y terciaria reciben el nombre de dominios.

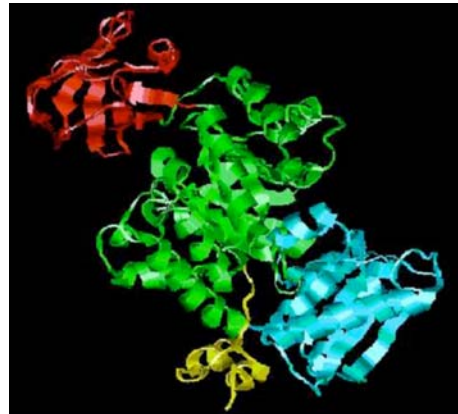


Fig. 27. Estructura terciaria de piruvato quinasa

Los dominios se pliegan por separado a medida que se sintetiza la cadena polipeptídica. Es la asociación de los distintos dominios la que origina la estructura terciaria. La Figura de la derecha corresponde a la proteína piruvato quinasa, que consta de 4 dominios, cada uno representado de un color. La pérdida total o parcial de los niveles de estructuración superiores al primario recibe el nombre de desnaturalización, que puede ser reversible o irreversible.

Cuando una proteína consta de más de una cadena polipeptídica, es decir, cuando se trata de una proteína oligomérica, decimos que tiene es-

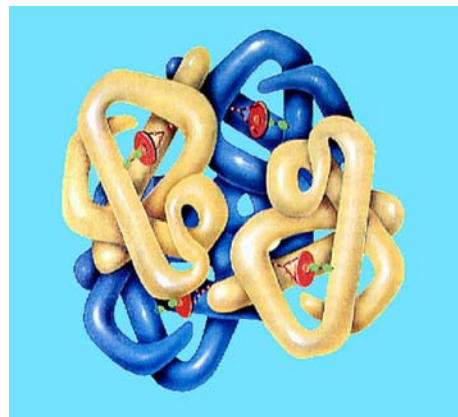


Fig. 28. Estructura cuaternaria.

(Tomado de Wikimedia Commons)

estructura cuaternaria. La estructura cuaternaria debe considerar: (1) el número y la naturaleza de las distintas subunidades o monómeros que integran el oligómero y (2) la forma en que se asocian en el espacio para dar lugar al oligómero. La figura de la derecha corresponde a la hemoglobina.

En proteínas con estructura terciaria de tipo fibroso, la estructura cuaternaria resulta de la asociación de varias hebras para formar una fibra o soga. La miosina o la tropomiosina constan de dos hebras con estructura de hélice enrolladas en una fibra levógira. La queratina del cabello y el fibrinógeno de la sangre presentan tres hebras en cada fibra levógira. El colágeno consta de tres hebras helicoidales levógiras que forman una fibra dextrógira. La fibroína de la seda presenta varias hebras con estructura de hoja orientadas de forma antiparalela.

2.8.2 Adsorción de Proteínas

Se han realizado múltiples estudios sobre la adsorción de proteínas en soluciones, estos estudios han sido realizados por diversos investigadores, así como por muy diversas técnicas como:

- Investigación de la dinámica y termodinámica de la adsorción de proteínas utilizando un gran número de ellas, sobre distintas superficies¹⁴⁰, y de las propiedades de las distintas soluciones.
- La resistencia contra la dilución de la superficie adsorbida, de la proteína usando surfactantes¹⁴¹
- El grado de mutagénesis que altera la estabilidad contra la desnaturalización¹⁴²
- Diferentes métodos independientes de investigar el grado de desnaturalización de la superficie, inducida por la proteína,

para diferentes proteínas en diferentes tipos de soluciones aplicadas sobre distintas superficies¹⁴³.

- Observación de la adsorción competitiva de las mismas, utilizando distintas mezclas de soluciones proteicas¹⁴⁴.

Estos estudios han hecho posible distinguir algunas tendencias generales de la adsorción de proteínas, y gracias a los cuales podremos realizar las siguientes consideraciones en lo que respecta a la adsorción de las proteínas por diferentes superficies:

- Incrementando la hidrofobicidad exterior de las proteínas e incrementando la hidrofobicidad de la superficie adsorbente, se incrementa la afinidad de la superficie, sin ser afectada de manera importante por variaciones de pH o variaciones de la fuerza iónica (tanto la variación del pH, o de la fuerza iónica, no afecta la estructura de la proteína)¹⁴⁵
- La combinación de cargas opuestas de las proteínas y de las superficies solventes, incrementa la afinidad. Sin embargo la repulsión proteína-proteína, entre proteínas adsorbidas, es también fuertemente dependiente¹⁴⁶, de la carga de la proteína y la afinidad. Se debe tener en cuenta también que los cambios en la superficie de proteínas son tanto positivos como negativos, y frecuentemente no distribuidas de forma homogénea en el exterior de la proteína, consecuentemente las proteínas se pueden orientar en la superficie de tal manera que pueden exponer cargas opuestas entre unas y otras cuando la necesidad de carga es de igual signo. Así mismo estas proteínas en ocasiones solo precisan un cambio en la cadena de aminoácidos para facilitar su unión a otras. Comparaciones entre contactos

prediseñados y sus resultados, nos proveerá de una guía útil, para el desarrollo de futuras arquitecturas proteicas¹⁴⁷. Todas estas interacciones de doble capa, son muy sensibles al pH de la solución de tal modo que en pH neutro disminuye la carga de la proteína y en muchas ocasiones también la carga de la superficie sorbente.

- La disminución de la estabilidad es constante con la desnaturalización de las proteínas. Es ampliamente aceptado que esto incrementa la afinidad hacia muchas clases de superficies¹⁴⁴. En las proteínas con alta tendencia a la desnaturalización, cuando son expuestas a agentes desnaturalizantes, como la alta temperatura, etc....se aprecia una alteración en su interacción con la superficie incrementando su afinidad.
- El tamaño de la proteína también se cree, que juega un papel importante, por un lado el aumento en el número de posibles lugares de enlace en la molécula de la proteína y la superficie del sorbente se incrementa con el tamaño de la proteína; sin embargo grandes moléculas de proteínas son construidas frecuentemente por algunas subunidades que pueden ser bastante móviles, en comparación con otras de menor tamaño. Así mismo estas grandes proteínas pueden tener tendencia a sufrir cambios conformacionales, en la región interraccional y así incrementar su afinidad a una superficie sólida¹⁴⁸

Estas tendencias generales sobre la adsorción de proteínas, obtenidas por investigaciones sobre distintos tipos de proteínas, pueden permitir la predicción del seguimiento de su proceso de absorción por diferentes sistemas de solución de proteínas y superficies. Estas con-

sideraciones aportan importante información, para la predicción y seguimiento de situaciones aun más complejas, tales como la exposición “in vivo” a superficies sólidas.

Hace más de un cuarto de siglo Leo Vroman¹⁴⁹ y colaboradores hicieron la observación de que el fibrinógeno absorbido por el plasma sanguíneo, que contiene varios cientos de diferentes proteínas, que fueron desplazadas, por otros tipos de proteínas con bajos ratios de transporte, pero alta afinidad hacia las superficies. Ha sido demostrado que la secuencia dominante de absorción en suero empieza con la albúmina, seguido por la inmunoglobulina G, fibrinógeno y finalmente las proteínas de alto peso molecular¹⁵⁰.

El estado final, sin embargo es diferente, siendo influido por diversas variables, así diferentes superficies, concentraciones relativas de proteínas, pH, fuerza iónica etc., son las variables que van influir en adhesión de proteínas en solución a distintas superficies.

Esta absorción competitiva hoy se conoce como Efecto Vroman. Sin embargo la absorción competitiva, se pensaba que solo ocurría con el fibrinógeno, pero estudios posteriores han mostrado que el Efecto Vroman es un efecto general de la absorción de mezclas de proteínas, consecuentemente la absorción competitiva es de relevancia en todos los campos en que se produce la adsorción de proteínas por superficies.

A pesar del hecho de que muchas proteínas son solubles en soluciones acuosas, hay una tendencia general de las proteínas de acumularse espontáneamente en regiones acuosas interfaciales.

En algunas situaciones prácticas, esto es una ventaja como su aplicación a biosensores, y en optimización de biomateriales. En otras situaciones, sin embargo, es un efecto no deseado tal como los efectos indeseables en tratamiento médicos, o en lentes de contacto. Por estas razones el entendimiento detallado acerca de la interacción entre superficies y proteínas es de suma importancia. Así mismo desde un punto de vista científico esta interacción entre la macromolécula y la superficie son de gran interés en la actualidad y no suficientemente entendidas.

La gran tendencia de las proteínas por acumularse en regiones interfaciales y los problemas de conseguir una descripción detallada, es debido al gran número de átomos en las proteínas y su gran tamaño comparado con los sitios de enlace en la superficie. La naturaleza heterogénea, con respecto a la carga local, la polaridad y la composición de la superficie de las proteínas y también la superficie absorbente afectada y las complejas propiedades dinámicas de las proteínas. Esta asignación a las proteínas de exponer varios sitios que puedan interactuar con la superficie y los sitios expuestos, podrían cambiar en número y naturaleza del sistema buscado por esta mínima energía libre, durante el proceso de adsorción y después de la adsorción.

Durante el proceso de adsorción de las proteínas, la molécula proteica cambia de polar a no polar en distintas regiones topográficas, así mismo cambia en diferentes regiones, en lo que respecta al cambio de polaridad, rugosidad etc.

2.8.3 Fibrinógeno

El fibrinógeno es la mayor proteína en el plasma sanguíneo, y es una de las más relevantes proteínas de la sangre, que son adsorbidas por las superficies, cuando está en contacto la sangre con biomateriales. También juega un papel crucial en la regulación de homeostasis y la coagulación, se encuentra en la sangre a una concentración de $2,6 \text{ mg/ml}^{-1}$

El fibrinógeno es una glucoproteína soluble del plasma sanguíneo precursor de la fibrina, su longitud es de $47,5 \text{ nm}$ y su peso de 340 Da .

Es una molécula fibrilar, que en sus extremos tiene cargas fuertemente negativas. Estos extremos, permiten la solubilidad del compuesto y también repelen a otras moléculas de compuesto previniendo la agregación. Formado por tres pares de cadenas de polipéptidos que son dos cadenas de $A\alpha$ y dos $B\beta$ y 2γ ($A\alpha$, $B\beta$, γ) unidas por enlaces de sulfuro, estas cadenas además están ligadas y reguladas genéticamente en el ser humano, y son sintetizadas en el hígado. El más simple modelo molecular de fibrinógeno comprende 3 regiones esféricas (una E dominante y 2 D dominadas), conectadas por 2 barras estrechas¹⁵¹. Bajo condiciones fisiológicas el fibrinógeno tiene carga negativa.

El proceso inflamatorio es mediado principalmente por su interacción con leucocitos a través de receptores de superficie (integrinas).

El fibrinógeno también es un ligando de adhesión intercelular y aumenta la interacción entre monocitos y las células endoteliales.

Además regula en alza y aumenta la concentración de proteínas MAI-1 en la superficie de las células endoteliales, lo que aumenta la adhesión de leucocitos y plaquetas.

Al unirse el fibrinógeno a su receptor, que es la integrina en la superficie de los leucocitos, esta unión facilita la respuesta quimiotáctica.

El fibrinógeno también está involucrado en la facilitación de la integración entre las células y de las células con la matriz extracelular. Finalmente podría facilitar la respuesta inflamatoria provocada por los biomateriales¹⁵².

El fibrinógeno se encuentra en la sangre a una concentración de ≈ 3 mg/ml¹⁵³ y el conocimiento de cómo el fibrinógeno es absorbido por las superficies de metal es de gran importancia porque las capas de fibrinógeno formadas en la interfaz líquido implante, mostraran en algunos casos el inicio de la respuesta inflamatoria y esto puede ser el inicio del proceso de aceptación o rechazo de un implante. Ahondando esta expresión, se sabe que ratones hipofibrinogénicos (con bajas concentraciones de fibrinógeno funcional y antigénico), no exhiben ninguna respuesta inflamatoria al polietileno tereftalato (PET) a menos que el material haya sido recubierto con fibrinógeno, o el fibrinógeno haya sido añadido al los fluidos que rodean al implante¹⁵⁴

Es importante hacer notar que el fibrinógeno es una proteína “pegajosa” con una fuerte tendencia a adherirse a muchas superficies, lo que sugiere que no solo la cantidad sino también los cambios conformacionales y la orientación detallada de la molécula de fibrinógeno son parámetros importantes, cuando describimos las capas de fibrinógeno adheridas a superficies biocompatibles. En ocasiones, los

implantes pueden permanecer encapsulados por largos periodos de tiempo en capsulas fibrosas de espesor variable, sin una respuesta inflamatoria significativa

Cuando un biomaterial es implantado en el cuerpo humano inicialmente interacciona con la sangre, consecuentemente la superficie expuesta del biomaterial será cubierta por las proteínas del plasma del huésped. Ahora la adsorción de proteínas es responsable, por modulación de la conducta de las células, y de que estas se adhieran a la mencionada superficie¹⁵⁵. Una vez adsorbidas las proteínas podrá ser determinada la cascada de eventos, liderando las respuestas celulares específicas. Por ejemplo, es conocido que el fibrinógeno inicia la respuesta inflamatoria aguda¹⁵⁶ Para algunos autores, la rugosidad de la superficie y la composición del biomaterial, han sido mostrados como los más importantes parámetros en la regulación de la actividad celular en el proceso de osteointegración^{157,158}.

Sin embargo se están realizando esfuerzos para confeccionar una superficie de biomaterial que promueva la adsorción de la matriz proteica, y esta a su vez guíe la respuesta celular¹⁵⁹.

OBJETIVOS



3. OBJETIVOS

Cuando un biomaterial es implantado en el cuerpo humano inicialmente interacciona con la sangre, consecuentemente la superficie expuesta del biomaterial será cubierta por las proteínas del plasma del huésped. Ahora la adsorción de proteínas es responsable, por modulación de la conducta de las células, que estas se adherirán a mencionada superficie¹⁵⁵. Una vez adsorbidas las proteínas podrá ser determinada la cascada de eventos, liderando las respuestas celulares específicas. Por ejemplo, es conocido que el fibrinógeno al entrar en contacto con un material inicia la respuesta inflamatoria aguda, iniciando el llamado proceso de hemocompatibilidad¹⁵⁶. Para algunos autores, la rugosidad de la superficie y la composición del biomaterial, han sido mostrados como los más importantes parámetros en la regulación de la actividad celular en el proceso de osteointegración^{157,158}.

Sin embargo se están realizando esfuerzos para confeccionar una superficie de biomaterial que promueva la adsorción de una matriz proteica, la cual ha de guiar la respuesta celular¹⁵⁹.

3.1 OBJETIVOS PRIMARIOS

En presente trabajo intentamos estudiar la biocompatibilidad de 3 distintos materiales utilizados habitualmente en C. Ortopédica como son el titanio, la hidroxiapatita, y más recientemente el tantalio. Se

pretende investigar su hemocompatibilidad mediante la capacidad de adsorción de fibrinógeno, así como la capacidad de adherencia a los mismos, de osteoblastos cultivados “ in vitro” realizando estudios en tiempo real.

Con este objeto pretendemos medir tanto la adhesividad de las proteínas, como de las células, por medio de la técnica QCM-D (Microbalanza de Cuarzo con Disipación). Así mismo utilizaremos para el estudio de la adhesión del fibrinógeno a los biomateriales anteriormente descritos, la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), y para la adhesividad de los osteoblastos el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM)

Realizaremos estudio competitivo entre las 3 superficies a estudio para valorar cuál de ellas tiene mayor capacidad de adherir fibrinógeno y osteoblastos, en función de composición, rugosidad (medida por AFM).

3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

Realizar una valoración cuantitativa del sistema QCM-D como método valido de cuantificación de la adhesión de proteínas y células a biomateriales en relación a las variables estudiadas (Δf y ΔD).

1. Los cambios en Δf están en relación con la masa de proteínas o de células, depositada en la superficie del biomaterial a estudio en cada momento de la medición.
2. Los cambios en la disipación ΔD están en relación con la cantidad de células o proteínas adheridas y la situación de las mismas, Así cuando la capa de células es rígida se produce una disminución

en la D, en cambio si por las características de la capa de células adsorbida esta es blanda, con alto índice de viscosidad y esta bien hidratada se produce un aumento en D.

MATERIAL Y MÉTODOS



4. MATERIAL Y MÉTODOS

En este capítulo se detallan los elementos necesarios y el proceso seguido para la realización de los experimentos, en primer lugar describimos, los ensayos realizados para el estudio de la hemocompatibilidad, mediante la adsorción del fibrinógeno por las distintas superficies investigadas, y en segundo lugar mostraremos los experimentos realizado con osteoblastos, para el estudio de su adhesión a la superficie de los biomateriales investigados.

4.1 HEMOCOMPATIBILIDAD ADSORCIÓN DE FIBRINÓGENO

4.1.1 Fibrinógeno

Fibrinógeno humano tipo 1, fue disuelto en 10 mM TRIS (tris-hydroxymethyl aminometano) amortiguado con 1 mM CaCl_2 y 100 mM NaCl, ajustando a un pH fisiológico de 7,4 a 37°, con HCl. Las concentraciones de fibrinógeno oscilaron de 1000 ng/ml a 0,33 ng/ml, que luego llamaremos HC (alta concentración) y LC (baja concentración), respectivamente, realizando también un registro intermedio a 100 ng/ml

La solución de fibrinógeno fue pasada a través del aparato QCM-D, mediante una bomba peristáltica durante 3 horas, realizando un registro de su adhesión cada minuto, analizando los datos obtenidos por el software del sistema.

4.2 SISTEMA QCM-D

4.2.1 Sensores QCM-D

La adherencia del fibrinógeno a las distintas superficies, fue estudiado con sensores de cristal de cuarzo QCM-D de 14 mm de diámetro, con una frecuencia de resonancia fundamental de 5 MHz. Estos sensores de cuarzo están recubiertos en ambos lados con electrodos de 150 ng. de oro con un inicial rugosidad de 1-2 nm. medidos por AFM. Los cristales fueron subsiguientemente recubiertos con una capa de Titanio puro Ti 99,95 (Qsx 310 Q-Sense AB, Gothenburg Sweden), Tantalio Ta 99,95 (Qsx 311, Q-Sense, Gothenburg, Sweden), Hidroxiapatita (Qsx 327, Q-Sense, Gothenburg, Sweden).



Fig. 29 Los 4 tipos de discos utilizados con distintos recubrimientos Ti, Ta, Ha, y control de Au.

El recubrimiento de los cristales con una fina capa de los distintos biomateriales (Ti, Ta y Ha), se realizó mediante un sistema de deposición de los mismos mediante vaporización física y luego por un proceso de evaporización a un ratio de 1 nm/sec. y sometido a una presión entre 5×10^{-8} y 10^{-7} Torr. Los depósitos de estos biomateriales se realizaron a temperatura ambiente y la distancia entre la fuente de vaporización y el sustrato fue de aproximadamente 25 cm. El resultado fue que los recubrimientos de Ti, Ta y Ha fueron aproximadamente de

5 nm de espesor, y un RMS de rugosidad de superficie variable según el biomaterial utilizado.

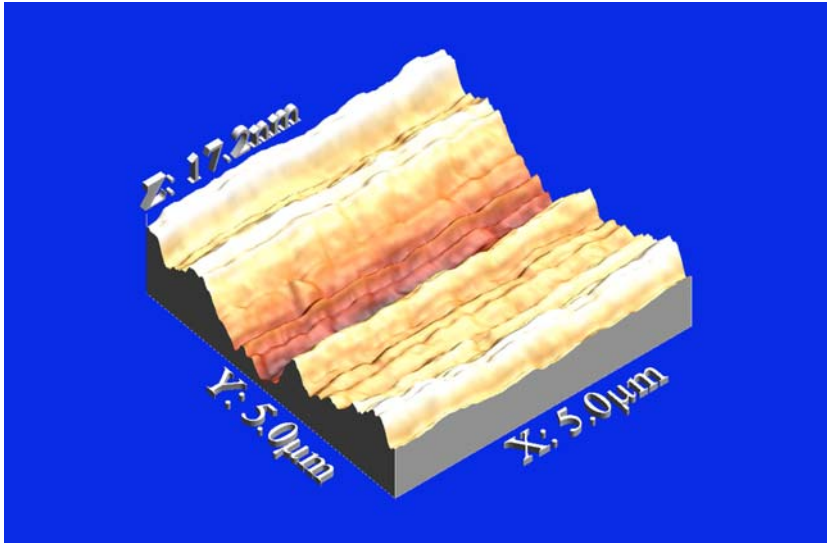


Fig. 30. Imagen de un disco de Ta utilizado mostrando su rugosidad medido por AFM

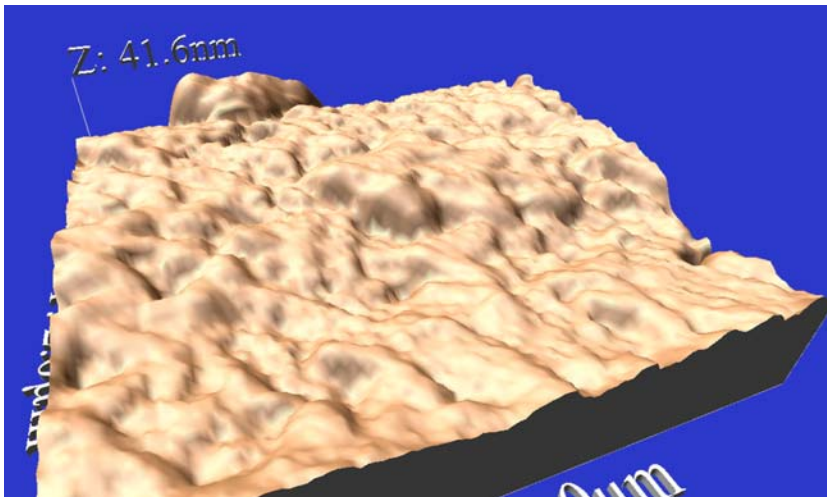


Fig. 31. imagen de la superficie de un disco de Ti empleado mostrando su rugosidad medida por AFM

Los cristales de Hidroxiapatita (QSX-327) son cristales recubiertos con una capa uniforme de Nanocrystalina Hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ producido y patentado por Promimic AB (Sweden), el recubrimiento es estable, no estando influido por el pH.

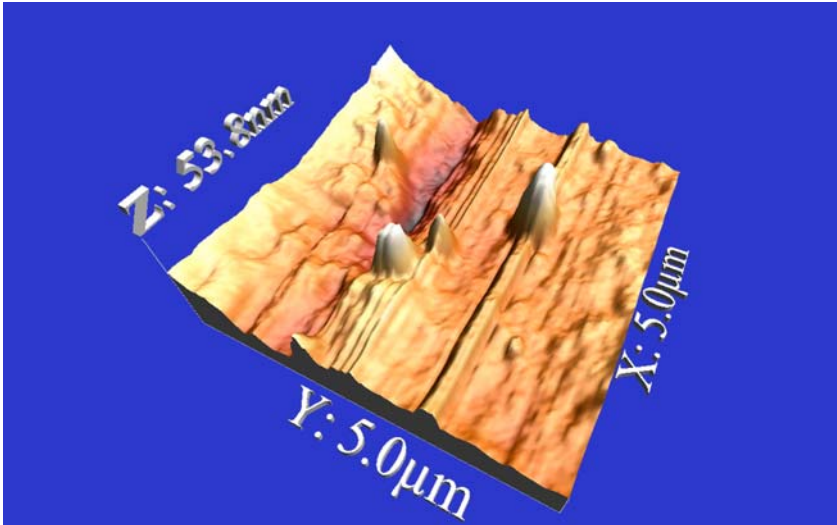


Fig. 32. Imagen de de la superficie de un disco de Ha empleado, mostrando su rugosidad medida por AFM

Se utilizo así mismo sensores AT-Cut discos de oro sin recubrimiento (QSX-301 standard de oro, Q-Sense Gothenburg, Sweden), que son discos desnudos para control.



Fig. 33. Disco de Au del sistema QCM-D

Para evitar los posibles elementos contaminantes, de las superficies de los discos, estos fueron lavados por inmersión en etanol, (spin-coated) limpiando las coberturas con poliestrieno (0,5% w/v en tolueno), como es descrito en por los creadores de la técnica¹²⁹.

Los discos de Ti y Ta fueron lavados utilizando 1:1:5 solución H₂O₂ al 35%, NH₃ AL 25% y agua destilada a 70° en lo que fueron sumergidos durante 5 minutos.

Todos los discos fueron lavados durante 20 minutos con ozono y los de Ha permanecieron en cámara UV durante 20 minutos, para evitar contaminación orgánica.

Los discos con Ha fueron recubiertos por mencionada molécula usando el método desarrollado y patentado por Promimic HA^{nano} (Promimic AB Sweden). El espesor de la capa de Ha es de 10 nm y esta uniformemente distribuida por la superficie. El revestimiento es estable y no se mueve durante los procesos de medición en el sistema QCM-D, un requisito para su utilización en estos estudios. La superficie fue limpiada por un tratamiento con UV/ozono, aclarada con agua tras lo que se realiza soplado en seco con gas nitrógeno en una cámara.

4.2.2 Aparato Q-Sense E4

Se utilizo un aparato Q-Sense E4 (Q-Sense AB Gotteborg Swedwen) que es el último y más moderno dispositivo Q-Sense, diseñado principalmente para la rápida caracterización de las interfaces.



Fig. 34.
Aparato
Q_Sense
E-4, del
Instituto
de
Ortopedia
utilizado
en nuestro
estudio

El nuevo software y la electrónica de la que dispone permite la medición de datos de los 4 sensores, los cuales que se adquieren cada segundo, conservando su sensibilidad. La cámara tiene 4 módulos extraíbles, con un sensor en cada uno de ellos. El flujo se puede medir en serie o en paralelo, para adaptarlo a diferentes situaciones.

Se colocan los discos con diferentes superficies (Au, Ti, Ta y Ha) de contacto en las 4 cámaras.



Fig. 35. Colocación
de sensor AT-Cut
en cámara del
dispositivo Q-Sense

El compartimento es de temperatura controlada y las muestras de fibrinógeno disueltas fueron introducidas utilizando una bomba peristáltica incluida en el sistema. Cada sensor está fijado en los módulos de flujo, los cuales se pueden quitar por separado. Cualquier configuración serial o paralela se puede utilizar, para las medidas y es posible parar o comenzar desde cualquier posición del sensor.



Fig. 36. Dispositivo Q-Sense E4 del Instituto de Ortopedia con los 4 sensores

Cada módulo de flujo tiene una entrada y un enchufe para los acopladores estándar de HPLC (Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento). Para permitir medidas bien-controladas del flujo, este entra del lado del cristal, y la temperatura es controlada de forma rápida y exacta.

Se obtuvo información sobre la absorción de fibrinógeno, mediante el registro de los cambios de frecuencia de resonancia Δf y la disipación ΔD , del cristal de cuarzo cuando la capa de fibrinógeno es depositada sobre él. Mencionados cambios fueron registrados duran-

te todo el proceso de adsorción. Los cristales de cuarzo (AT-Cut) son piezoeléctricos y se deforman mecánicamente cuando son expuestos a un campo eléctrico. Por la aplicación de una corriente eléctrica alrededor del cristal es inducida una oscilación ficcional en la frecuencia de resonancia por la cual los cristales utilizados son excitados, habitualmente con una frecuencia de resonancia de 5 MHz. que posteriormente puede variar en las llamadas 3^a, 5^a, 7^a y 9^a armonías (15 MHz, 30 MHz, y 45 MHz). El cambio en la frecuencia de resonancia, Δf es proporcional al cambio en la masa de fibrinógeno adsorbida Δm , si la masa adsorbida es más pequeña que la masa del cristal se produce la siguiente ecuación:

$$\Delta m = \frac{C}{n} \Delta f$$

En el caso de la adsorción de fibrinógeno, utilizamos la anterior ecuación llamada ecuación de Sauerbrey, donde para los discos utilizados en el experimento n es el numero de frecuencia de sobre tono y $C = 17,7 \text{ ng/cm}^2$.

La ecuación de Sauerbrey solo se sostiene si la capa de proteína adsorbida es rígida, y si esta homogéneamente distribuida en la capa de metal.

Para medición de capas visco elásticas en ambiente liquido esta ecuación infra estima la masa adsorbida y es posible conseguir una estimación del espesor de masa adsorbida por la siguiente ecuación

$$d_{\text{eff}} = \frac{\Delta m}{\rho_{\text{eff}}}$$

Donde ρ_{eff} es la densidad efectiva de la capa adherida.

Sin embargo la capa de proteína hidratada adsorbida no es rígida y la ecuación de Sauerbrey viene a ser invalidada, Dado que si la capa es blanda (viscoelástica) no se acopla totalmente a la oscilación del cristal, cambiando la oscilación de los cristales humedecidos. La disipación de la oscilación del cristal es medida en las capas viscoelásticas D siendo definida por la siguiente ecuación

$$D = \frac{E_{lost}}{2\mu E_{stored}}$$

Donde E_{lost} es la energía perdida (disipada) durante un ciclo de oscilación y E_{stored} es la energía total almacenada en el oscilador.

Estas medidas de f y D nos son dadas por el Software del aparato Q-Sense.

El Software del sistema Q-Sense fue empleado para la evaluación de los datos obtenidos. El rasgo principal de este paquete informático es la posibilidad de equipar un modelo matemático desarrollado por Voinova y colaboradores en el año 1999 (el cual hemos utilizado en nuestro estudio)¹³². Dentro del modelo visco elástico de Voight este sistema calcula las respuestas acústicas del sistema que son aplicadas en las fuerzas de oscilación. El algoritmo del Q-Sense basado en este modelo matemático puede ser aplicado a los cristales de cuarzo realizando medidas acústicas de la visco elasticidad de polímeros que conservan su forma bajo fuerzas deformantes, que no se alteren por el flujo y que se adhieren en capas estructuradas, como es el caso de las capas de proteínas adsorbidas de una solución sobre superficies. Bajo la asunción de que la capa es homogénea puede calcularse el espesor, la viscosidad y la elasticidad de la misma. Múltiples datos de

frecuencias y disipaciones son requeridas para un adecuado calibrado del sistema. Por la medición de múltiples frecuencias y aplicando un modelo visco elástico, las capas adheridas pueden ser caracterizadas en detalle; por lo que visco elasticidad, elasticidad, y espesor pueden ser obtenidos por el Software del aparato aplicando estas ecuaciones.

4.3 ANALISIS DE LA MUESTRA MEDIANTE Microscopía DE FUERZA ATÓMICA AFM

Se realizo un estudio previo de la rugosidad de la superficie de los destinos biomateriales empleados apreciando superficie rugosa tanto en el Ta, como el Ti, y Ha.

Tras la retirada de los distintos discos, que previamente fueron medidos en el sistema Q-Sense, estos fueron llevados para estudio mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) para comprobación y análisis de la deposición de proteínas en los mismos.

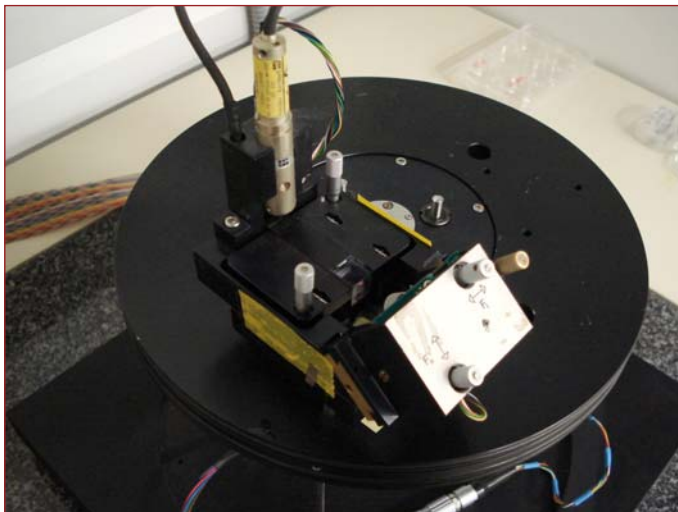


Fig. 37. Microscopio de Fuerza atómica de la Universidad de Santiago de Compostela

Se utilizó el equipo de AFM de la Universidad de Santiago de Compostela, con un cantiléver T 3.5-4.5 μm , L 110-220 μm , W 25-35 μm , con una oscilación de frecuencia de 300-342 kHz. Se utilizaron puntas de cantiléver modelo TESP (Veeco Instruments Inc. Woodbury NY, USA)

Se realizaron estudios de las muestras con la técnica AFM en modo de contacto, con muestras en seco, con una punta de cantiléver estándar de Si_3N_4 , de tamaño de 200 μm . Durante el estudio y rastreo de las muestras, la punta palpadora del cantiléver no superó 11 N/m, y una frecuencia de resonancia de 227 kHz para no deteriorar la muestra.

Se mantuvo el contacto de la punta del cantiléver con las distintas muestras Ta, Ti y Ha, adaptándose esta punta a la superficie topográfica de la muestra, dando como resultado que las fuerzas de van der Waals se equilibran con cualquier otra fuerza que intente mantener juntos a los átomos. Por lo tanto cuando el cantiléver empuja a la punta sobre la muestra, esta se flexiona forzando a los átomos de la punta y de la muestra a permanecer juntos.

El movimiento de la punta palpadora del Cantiléver provoca variaciones en el reflejo del haz láser, que son recogidos en el sensor conectado a un ordenador, utilizando el software estándar del aparato, la dimensión de la superficie estudiada fue habitualmente entre 1 μm x 1 μm y 20 μm .

Las mediciones fueron realizadas en ambiente de aire, con una temperatura ambiente de la habitación de 25°, el tamaño de la punta del cantiléver fue de 200 μm , con un resorte constante con una frecuencia de 227 kHz, regulado por el Software del aparato, que prevé una calibración automática de la frecuencia de resorte de la punta del cantiléver.



Fig. 38. Superficie de Tántalo con proteína (fibrinógeno) adsorbida

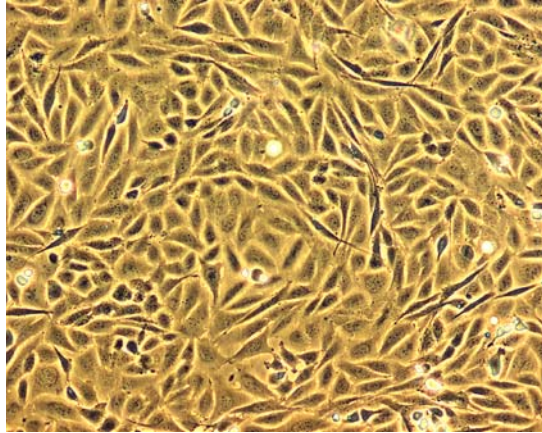
4.4 ADHESIÓN DE OSTEOLASTOS

4.4.1 Cultivo de osteoblastos línea Saos2

Se utilizaron osteoblastos línea Saos2 (American Type Culture Collection, ATCC Manassas, VA, USA), que fueron cultivados en Medio de Eagle modificado por Dulbecco, D-MEM (12491-015 Invitrogen) más 10% FCS mas gentamicina (GIBCO), en un incubadora humidificado, con 5% de CO₂ y 95% de aire.

Se realiza ajuste del pH del cultivo a 7,4 . Se cambio el medio de cultivo cada 3 días, y cuando se consiguió la confluencia celular se realizo la tripsinizacion mediante lavado con Tripsina-EDTA (0,5 g/L Trypsin y 0,2 g/L EDTA, GIBCO, Scolland, UK) durante 5 minutos a 37°; con posterioridad se retira la tripsina, las células se centrifugan con 5 ml de D.MEM Completo, se resuspenden y se llevan al counter, realizando una dilución 1:10, y se realiza un contaje de célula colocando las células sin suero para evitar interacción suero sustrato.

Fig. 39. Imagen de osteoblastos utilizados en el estudio cuando se ha conseguido confluencia.



Previamente y durante la realización del ensayo, se llevaron controles de especificidad mediante marcaje histoquímico de la fosfatasa alcalina intracelular (SIGMA, USA). En todos los casos las células se tiñeron intensamente demostrando su adecuado fenotipo osteoblastico.

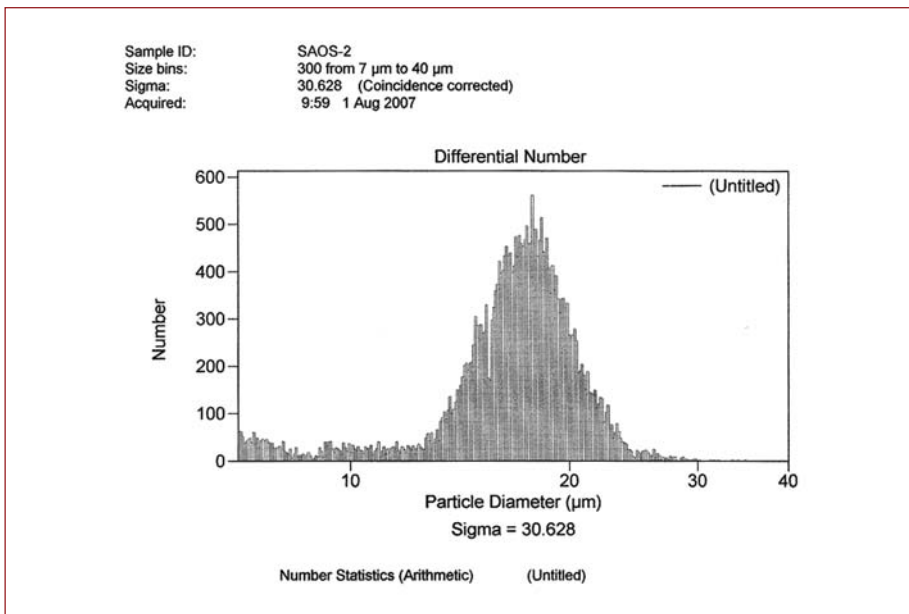


Fig. 40. COULTER, conteo de osteoblastos previo a colocación en frasco de agitación

Cuando se consiguieron las células suficientes (medidas en el coulter) se colocan en un frasco de agitación (Weheaton flask) se pasan a D-MEM sin suero, para evitar interacción sustrato con el suero, y se colocan en la bomba peristáltica para ser introducidas en el sistema Q-Sense.



Fig. 41. Frasco de agitación

4.4.2 Análisis de los discos con osteoblastos, por Microscopio Electrónico de Barrido SEM

Tras haber pasados los discos con las 3 superficies a estudio por el sistema Q-sense, se realizó el paso del mismo por 24 pocillos para fijación, y se realizó fijación con glutaraldeído 1% más 1% formaldehído, durante 12 horas a 4°.

Luego se realizan lavados PBS tampón fosfato varias veces hasta el aclarado de glutaraldeído, formaldehído.

Se realizaron deshidrataciones con etanol a diferentes concentraciones cambiándolas de forma creciente 10%, 20%, 30%.....100%, de 45 minutos cada una.

Se retira el etanol, se realiza sombreado de las muestras con Au-Paladio (Pau). Y se realiza visionado de las muestras por SEM.

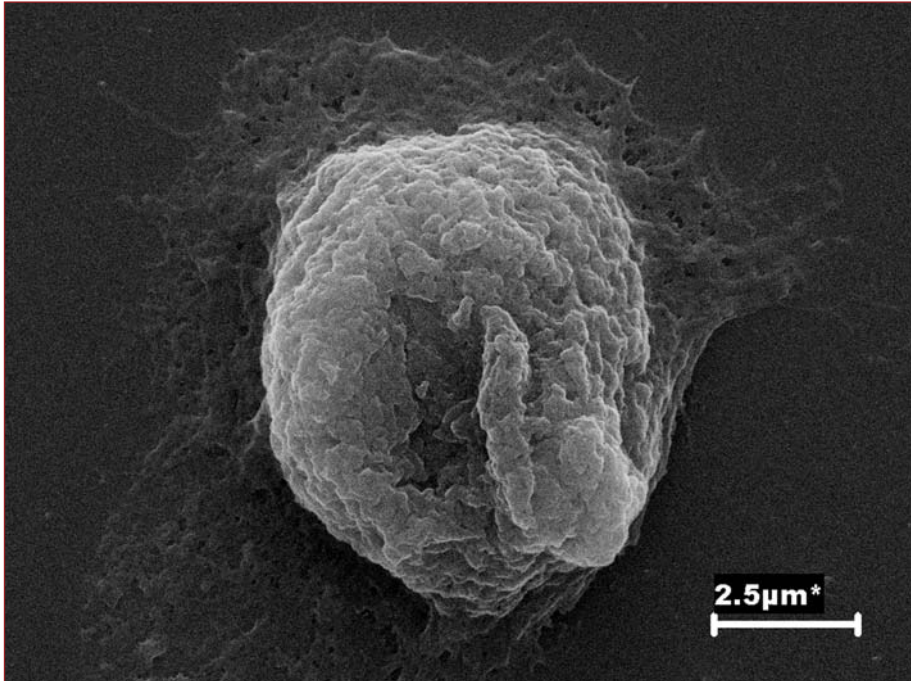


Fig. 42 osteoblasto adherido a la superficie del disco te Ti. Imagen de SEM

4.5 MÉTODO ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de resultados se empleo el paquete estadístico SSPS 14.0.

Con mencionado sistema se realizo un análisis estadístico descriptivo.

Las diferencias obtenidas en los resultados se consideraron estadísticamente significativas, con una probabilidad de error menor del 5%, ($p < 0,05$)

Se practicaron pruebas de normalidad de todas las variables, cuando n era mayor que 50 se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En función de sus resultados, se analizaron las relaciones entre las variables estudiadas, con test no paramétricos.

Se realizó también un análisis no-paramétrico Kruskal Wallis.

Se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov, dado que es un test bastante potente cuando se utilizan muestras grandes, como es nuestro caso.

El nivel de medición de la variable y su distribución son elementos que intervienen en la selección del método que se utilizara en el procedimiento posterior. De hecho, si la variable es continua con distribución normal se podrán utilizar técnicas paramétricas, si es una variable discreta o continua no normal solo son aplicables las técnicas no paramétricas, pues aplicar las primeras arrojaría resultados de dudosa validez.

Para su aplicación hemos necesitado que las mediciones se encuentren en una escala de intervalo. Se necesitó también que la medición considerada, fuera básicamente continua. Por lo que dicha prueba es aplicable cualquiera que sea el tamaño de la muestra.

La prueba de la muestra de Kolmogorov-Smirnov puede, en todos los casos en que se aplique ser más poderosa que su prueba alternativa, la prueba de χ^2 (ji-cuadrado).

La prueba de Kolmogorov-Smirnov de una muestra en una docima de bondad de ajuste. Esto es, se interesa en el grado de acuerdo entre la distribución de un conjunto de valores de la muestra y alguna distribución teórica específica. Determina si razonablemente puede

pensarse que las mediciones muestrales provengan de una población que tenga esa distribución teórica. En la prueba se compara la distribución de frecuencia acumulativa de la distribución teórica, con la distribución de frecuencia acumulativa observada. Se determina el punto en que estas dos distribuciones muestran el punto de mayor divergencia.

Normalmente la estructura que tiene la base de datos es la de utilizar una variable para entrar los resultados de la medición y otra donde se divide a estos resultados en los dos grupos.

La única premisa que se necesita es que las mediciones se encuentren al menos en una escala ordinal. Adicionalmente se necesita que la medición considerada sea básicamente continua. Comparada ante la alternativa paramétrica de la *t* de student para dos muestras independientes (o el modelo de análisis de la Varianza para dos muestras), cuando las premisas paramétricas se cumplen, tiene una potencia eficiencia del 96%, que tiende a decrecer ligeramente a medida que se aumentan los tamaños de la muestra¹⁶⁰.

La docima de Kolmogorov-Smirnov está construida, teniendo como base detectar las discrepancias existentes entre las frecuencias relativas acumuladas de las dos muestras objeto de estudio. Lo anterior propicia que esta docima pueda advertir diferencias no tan solo entre los promedios, sino que estas sean debidas a la dispersión, a la asimetría, o a la oblicuidad. Esta característica la hace distintiva de aquellas en que solamente se ocupan de analizar las diferencias entre los promedios.

Aunque el análisis en sentido único de variación ANOVA, es un método de elección para probar las diferencias entre grupos múltiples,

asume que la media es una estimación válida para el centro y que la distribución de la variable de la prueba es bastante normal y similar en todos los grupos.

Sin embargo cuando la variable de la prueba es ordinal, la media no es una estimación válida porque las distancias entre los valores son arbitrarias.

Aun cuando la media es válida, la distribución de la variable de la prueba puede ser tan no-normal, que lo hace sospechoso de cualquier prueba que asume la normalidad. Cuando las asunciones del ANOVA normal son invalidadas o son sospechosas, debemos considerar, utilizando procedimientos no-paramétricos diseñados para probar la importancia de la diferencia entre los grupos múltiples. Estos se llaman no-paramétricos, porque no hacen ninguna asunción sobre los parámetros (como la media y la varianza) de una distribución, ni ellos asumen que cualquier distribución particular está usándose la prueba de Kruskal-Willis que es un análisis de sentido único de variación por las líneas y prueba la hipótesis nula de que las muestras independientes vienen de la misma población.

RESULTADOS



5. RESULTADOS

Los resultados fueron analizados con el software estadístico obteniéndose los siguientes datos:

5.1 ADSORCIÓN DE FIBRINÓGENO MEDIDO POR Q-SENSE:

Conforme se van depositando moléculas de fibrinógeno sobre la superficie de los distintos cristales empleados, el movimiento oscilatorio del cristal va disminuyendo, creando una disminución en la frecuencia de resonancia. El cambio final en la frecuencia de resonancia en el Sistema QCM está en relación con la cantidad de masa acoplada, incluyendo el agua que interacciona con la capa de proteína. La ecuación de Sauerbrey que ya se comentó en el capítulo anterior, relaciona los cambios de frecuencia (Δf) con la masa adsorbida por unidad de área (M ng/cm²).

Cuando se incrementa la concentración de fibrinógeno un importante cambio de frecuencia es detectado.

En primer lugar nos hemos de fijar en la gráfica de frecuencias de vibración obtenidas in situ con el Q-Sense. (Fig. 29). En ella es apreciable la diferencia de adsorción de fibrinógeno a diferentes concentraciones a lo largo del tiempo experimental. En la primera parte del gráfico, el medio de cultivo sin fibrinógeno, ni suero nos proporciona una línea base estable para realizar el experimento. La primera

concentración usada (0.33 ng/ml) nos muestra una diferencia patente entre los tres materiales empleados. El Ti y la Ha adsorben fibrinógeno relativamente rápido mostrando una importante disminución en la vibración de los discos. En el caso del Ta, las observaciones son realmente interesantes ya que a baja concentración de fibrinógeno apenas se aprecia una adsorción de la proteína, siendo su adsorción casi igual a la línea base. En la siguiente concentración utilizada (100 ng/ml) apreciamos que la adsorción en Ha y Ti registra un ligero aumento, mientras que el depósito de fibrinógeno en Ta experimenta un aumento radical en la disminución de frecuencia de vibración, demostrando así la deposición y adsorción masiva del fibrinógeno, en tantalio.

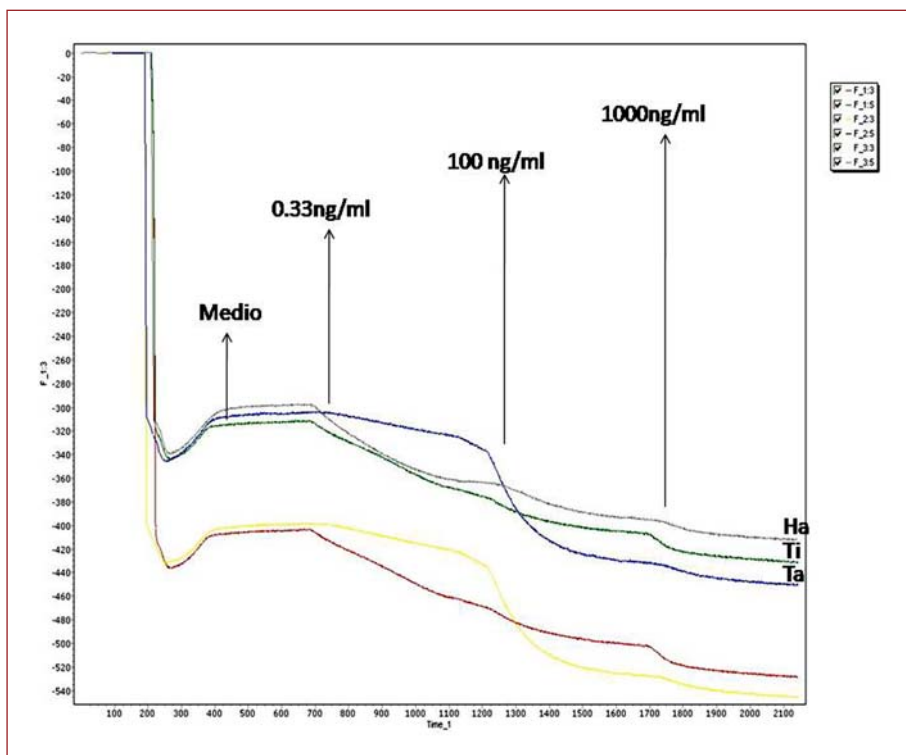


Fig. 43. Absorción de fibrinógeno por los distintos biomateriales empleados diferentes concentraciones a lo largo del tiempo del experimento

Al final del proceso de absorción, con concentraciones altas HC (1000 ng/ml) se aprecia el depósito final de fibrinógeno en las 3 superficies estudiadas, así como en los discos de Au, utilizados como control, estos resultados son los que mostramos a continuación realizando así mismo un estudio estadístico de los mismos.

En primer lugar se muestra el estudio estadístico descriptivo tabla (1-5)

		ng/m2 Ti	ng/m2 Ta	ng/m2 HA	ng/m2Au
N	Válidos	188	188	188	187
	Perdidos	0	0	0	1
Media		9308,6111	9610,6045	8917,9611	8773,5478
Error típ. de la media		1,83856	1,90565	1,72985	1,14957
Mediana		9311,2011	9613,8591	8918,5866	8774,5524
Desv. típ.		25,20901	26,12897	23,71844	15,72016
Varianza		635,494	682,723	562,565	247,124
Asimetría		-,187	-,237	-,155	-,050
Error típ. de asimetría		,177	,177	,177	,178
Curtosis		-1,033	-1,156	-1,060	-,950
Error típ. de curtosis		,353	,353	,353	,354
Mínimo		9254,72	9560,00	8869,72	8737,12
Máximo		9350,80	9657,03	8960,97	8806,21
Percentiles	2,5	9260,5171	9565,2829	8874,6525	8746,2673
	68	9325,1000	9627,0950	8931,8170	8783,1661
	97,5	9348,7897	9649,8315	8956,1180	8800,5716

Tabla 1-5. Estudio estadístico descriptivo del depósito de fibrinógeno en los biomateriales empleados

En la estadística descriptiva se aprecio un alto grado de concentración, lo que implica un importante coeficiente de determinación. Se apreciaron así mismo unas diferencias significativas entre la adsorción de fibrinógeno en los 3 biomateriales estudiados, junto con los discos de Au que se emplearon como estudio basal, con una $p < 0,001$.

También en este estudio estadístico final se aprecio que el 95% de los resultados estaba en un percentil 2,5, dando una distribución normal, por lo que se realizaron test parametricos. Tabla (2-5)

		ng/m2 Ti	ng/m2 Ta	ng/m2 HA	ng/m2Au
N		188	188	188	187
Parámetros normales(a,b)	Media	9308,6111	9610,6045	8917,9611	8773,5478
	Desviación típica	25,20901	26,12897	23,71844	15,72016
Diferencias más extremas	Absoluta	,085	,081	,074	,065
	Positiva	,054	,078	,058	,065
	Negativa	-,085	-,081	-,074	-,061
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,160	1,108	1,021	,884
Sig. asintót. (bilateral)		,135	,172	,248	,415

Tabla 2-5. Test de Kolmogorov Smirnov

Se realizo también un estudio estadístico comparativo de todos los biomateriales empleados, contra todos, dado que se trata de muestras relacionadas. Realizando el test de Student para muestras relacionadas y aplicando una penalización tipo Bonferroni. Tabla (3-5)

		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1	ng/m2 Ti	9308,6111	188	25,20901	1,83856
	ng/m2 Ta	9610,6045	188	26,12897	1,90565
Par 2	ng/m2 Ti	9308,6111	188	25,20901	1,83856
	ng/m2 HA	8917,9611	188	23,71844	1,72985
Par 3	ng/m2 Ti	9308,4218	187	25,14231	1,83859
	ng/m2Au	8773,5478	187	15,72016	1,14957
Par 4	ng/m2 Ta	9610,6045	188	26,12897	1,90565
	ng/m2 HA	8917,9611	188	23,71844	1,72985
Par 5	ng/m2 Ta	9610,4410	187	26,10254	1,90881
	ng/m2Au	8773,5478	187	15,72016	1,14957
Par 6	ng/m2 HA	8917,7986	187	23,67706	1,73144
	ng/m2Au	8773,5478	187	15,72016	1,14957

Tabla 3-5. Estadístico de muestras relacionadas

		N	Correlación	Sig.
Par 1	ng/m2 Ti y ng/m2 Ta	188	,955	,000
Par 2	ng/m2 Ti y ng/m2 HA	188	,952	,000
Par 3	ng/m2 Ti y ng/m2Au	187	,927	,000
Par 4	ng/m2 Ta y ng/m2 HA	188	,963	,000
Par 5	ng/m2 Ta y ng/m2Au	187	,924	,000
Par 6	ng/m2 HA y ng/m2Au	187	,925	,000

Tabla 4-5. Correlaciones de muestras relacionadas

		ng/m2 Ti	ng/m2 Ta	ng/m2 HA	ng/m2Au
ng/m2 Ti	Correlación de Pearson	1	,955(**)	,952(**)	,927(**)
	Sig. (bilateral)		,000	,000	,000
	N	188	188	188	187
ng/m2 Ta	Correlación de Pearson	,955(**)	1	,963(**)	,924(**)
	Sig. (bilateral)	,000		,000	,000
	N	188	188	188	187
ng/m2 HA	Correlación de Pearson	,952(**)	,963(**)	1	,925(**)
	Sig. (bilateral)	,000	,000		,000
	N	188	188	188	187
ng/m2Au	Correlación de Pearson	,927(**)	,924(**)	,925(**)	1
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,000	
	N	187	187	187	187

Tabla 5-5. **La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

En estudio comparativo de las muestras de Ta y Ti, (fig.44) se aprecia que los valores están contenidos entre las dos diagonales próximas a la bisectriz lo que indica que aunque hay diferencias significativas en la absorción a favor del tantalio, se mantiene una relación entre las mismas, no esparciéndose valores fuera de las coordenadas.

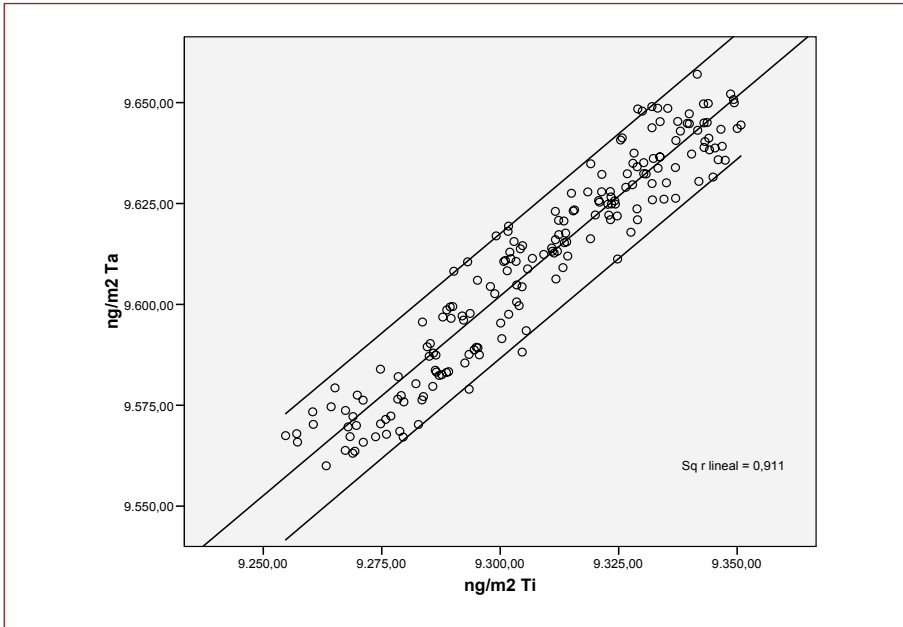


Fig. 44. comparativa de la adsorción de fibrinógeno en Ti y Ta

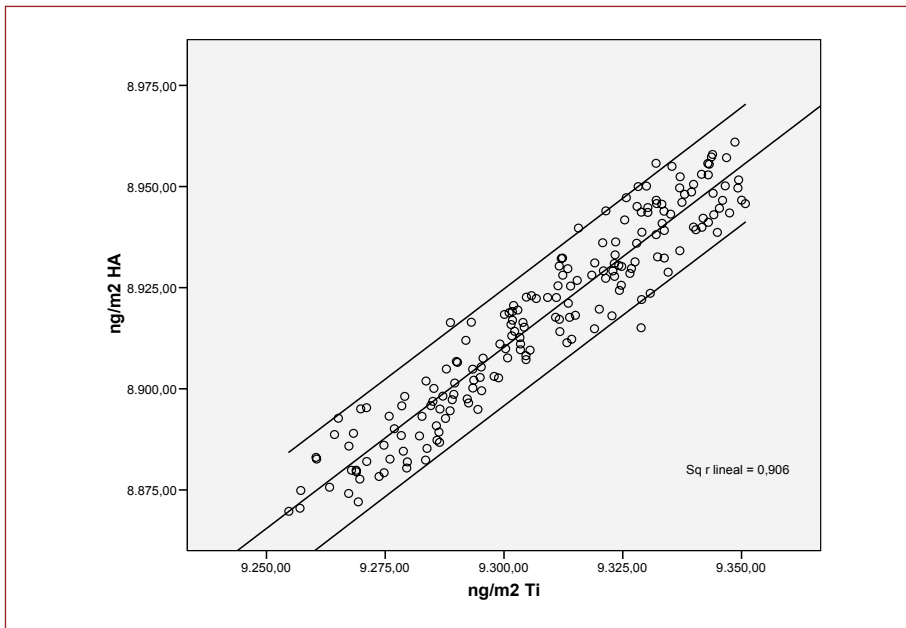


Fig. 45. comparativa de adsorción de fibrinógeno en Ha y Ti

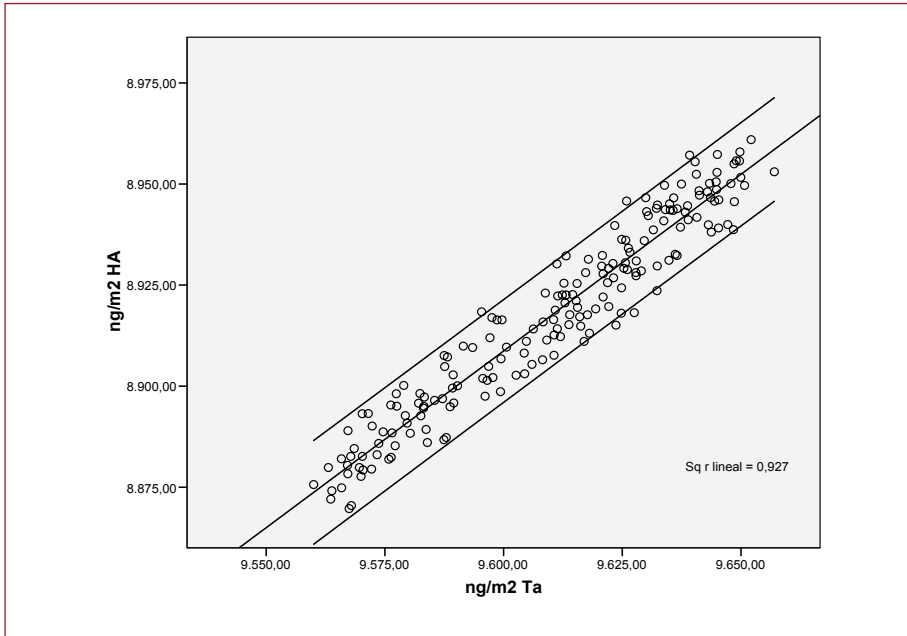


Fig. 46. comparativa de Ha con Ta

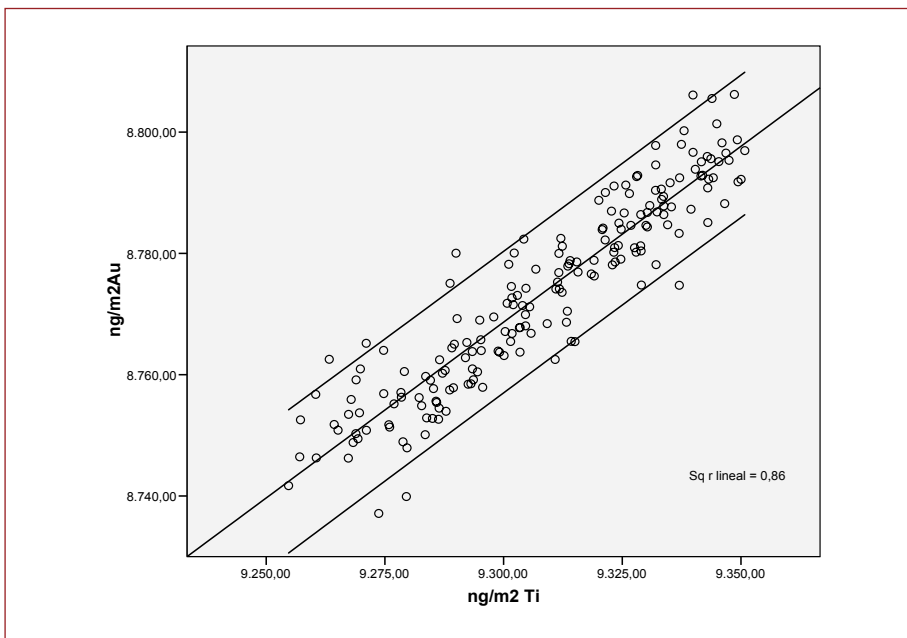


Fig. 47. comparativa de Au con Ti

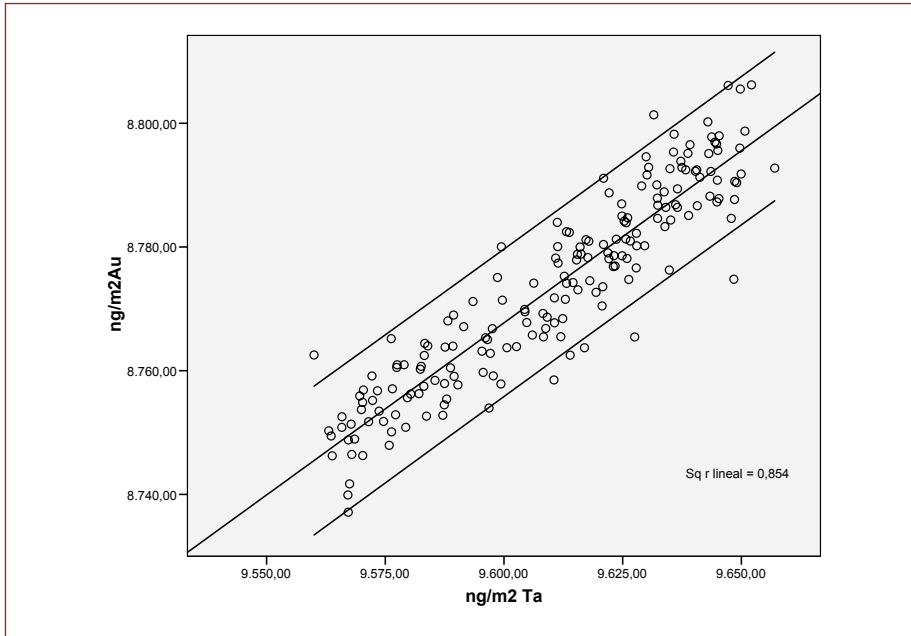


Fig. 48. comparativa entre Au y Ta

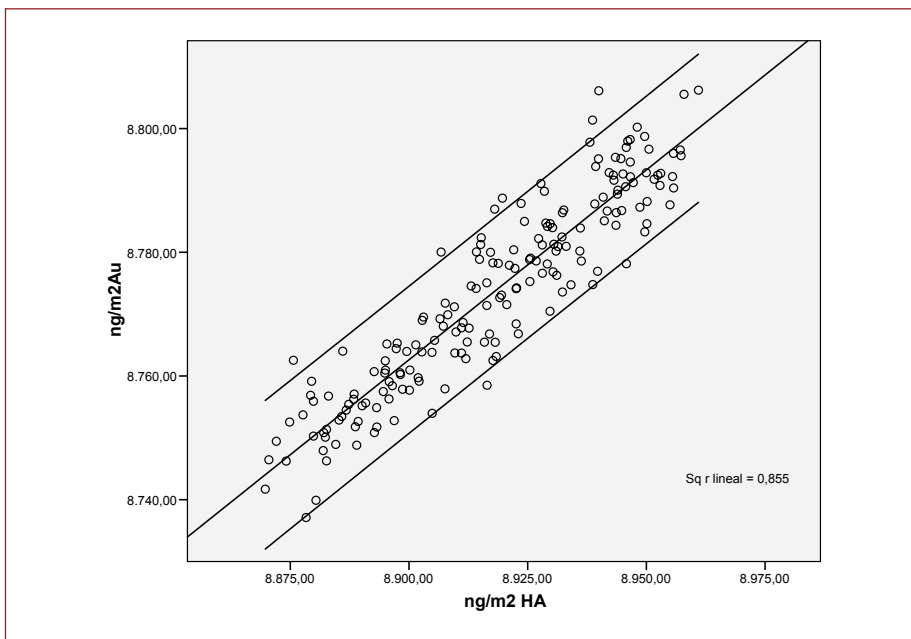


Fig. 49. Comparativa de Au con Ha

Del estudio comparativo de todos contra todos podemos apreciar que cuando la comparación es entre los biomateriales estudiados, los resultados se encuentran dentro de las líneas paralelas del cuadro. Cuando realizamos estudios comparativos con el control Au apreciamos que un importante número de datos que sale de los paralelismos, lo que implica, las diferencias significativas entre la adsorción de los biomateriales empleados con el control de Au.

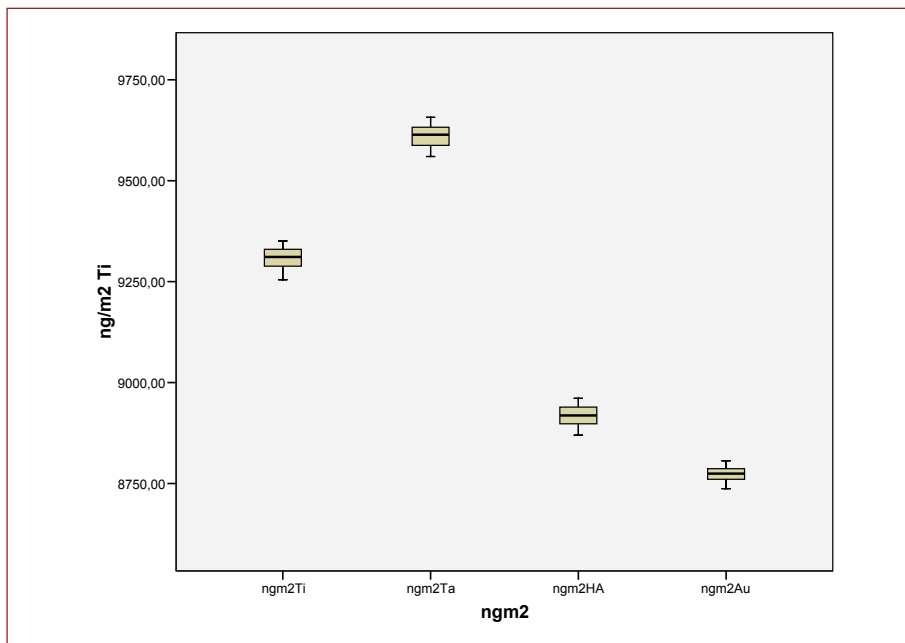


Figura 50. muestra la adsorción final altas concentraciones de los 4 discos empleados

A concentraciones mayores (1000 ng/ml) final de proceso de absorción continua la tendencia en la disminución en la frecuencia vibración del disco, pero no se parece haber cambios bruscos manteniéndose un aumento en la adsorción casi paralelo entre los 3 materiales, pero con una diferencia significativa ente los tres y también comparándolo con el registro base de los discos de Oro.

En la que se aprecia que la adsorción de fibrinógeno es bastante superior en tantalio, seguido por el Ti, estando más alejada la adsorción en Ha, y también podemos apreciar la escasa adhesión del fibrinógeno a los discos controles de Au.

5.1.1 Adsorción de fibrinógeno medido por AFM

Tras el paso de los discos por el Q-Sense estos fueron llevados a Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) para realizar un visualizado de la adhesión de fibrinógeno a los mismos, y analizar los depósitos de proteína sobre la superficie de los mismos.

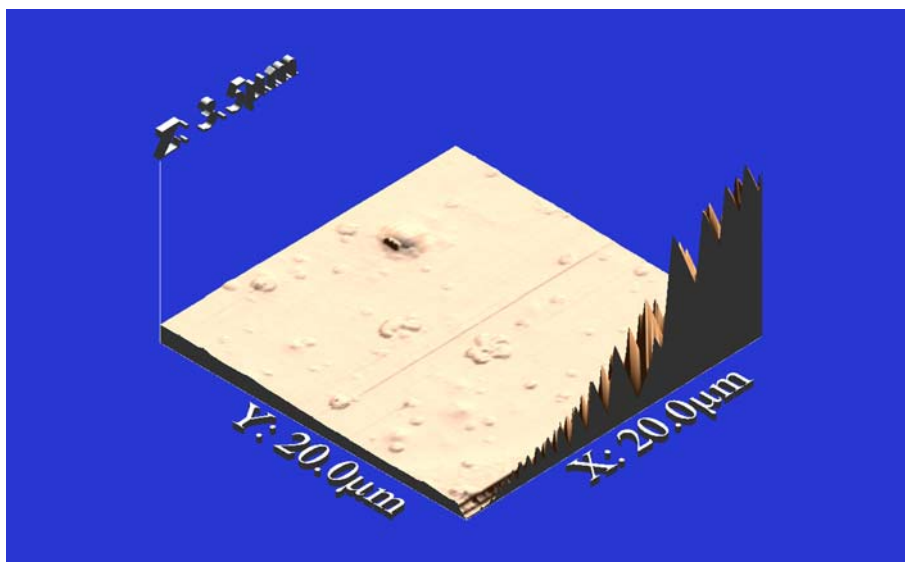


Fig. 51. Disco de Ha donde se muestran moléculas de fibrinógeno depositadas en su superficie

En la fig 51 se aprecia las proteínas depositadas en superficie de Ha, no alterando su rugosidad.

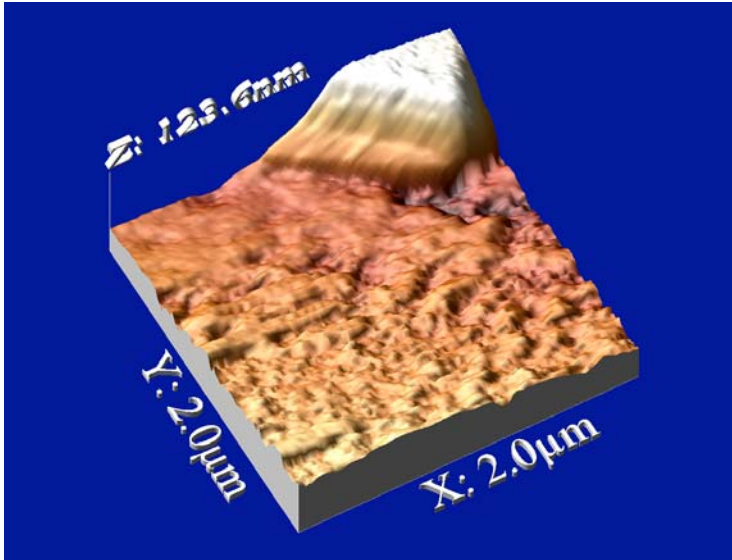


Fig. 52. deposito de fibrinogeno sobre Ta, donde se aprecia la molecula de fibrinogeno adherida a la superficie del disco de Ta, mostrando su rugosidad.

La comparacion de las imágenes obtenidas por AFM en los distintos materiales empleados. Se aprecio una alta rugosidad en las superficies de los mismos sobre todo en Ti y Ta, Ha.

Los depositos de proteínas, sobre la superficie tenían un tamaño de alrededor de 0,2 a 0,3 μm . las dimensiones tipicas encontradas fueron de 1 x 1,8 μm y 0,1 μm de altura, para los mas grandes y de

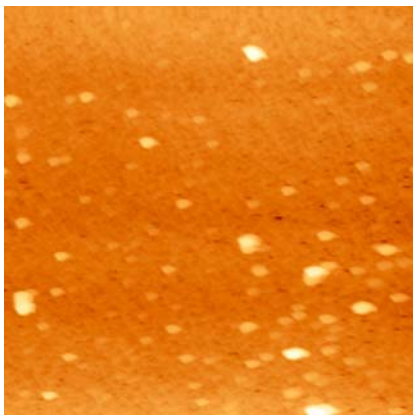


Fig. 53. Adsorcion de moleculas fibrinogeno en superficie de Ti

0,7 x 0,7 μm y 0,07 μm de altura en las mas pequeñas. Se aprecio que las proteínas depositadas tienen tendencia a depositarse lateralmente es decir que forman colinas por acumulacion de una o de una sobre otra. Una vez que las proteínas se han depositado en la superficie del biomaterial, este aumenta su rugosidad.

Mas especificamente en la fig 51, el AFM revela de echo la acumulacion de moleculas de fibrinogeno

5.2 ADHESIVIDAD DE OSTOBLASTOS

5.2.1 Adhesión de osteoblastos a las superficies estudiadas

En el presente estudio, hemos analizado la utilización de la técnica QCM-D, en la medición de de la adhesión inicial de osteoblastos linea Saos2, en superficies de distintos biomateriales Ti, Ta y Ha. Los sensores de Ti, Ta, y Ha fueron equilibrados inicialmente en el sistema QCM-D, con medio sin suero, para la obtención de líneas base de Δf y ΔD , tras lo cual se realizo el paso de los osteoblastos cultivados con la bomba peristáltica, sobre los distintos sensores del aparato QCM-D, se realizaron medidas inmediatas de los cambios de frecuencia inicial de 5 MHz, y de las frecuencias de sobretono empleadas (15, 25, 35 y 45 MHz), registrando el Software del sistema los cambios en la frecuencia y en la disipación, cada minuto.

Con posterioridad los cristales con los diferentes biomateriales empleados fueron analizados por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) para realizar confirmación y cuantificación de presencia de osteoblastos en los mismos.

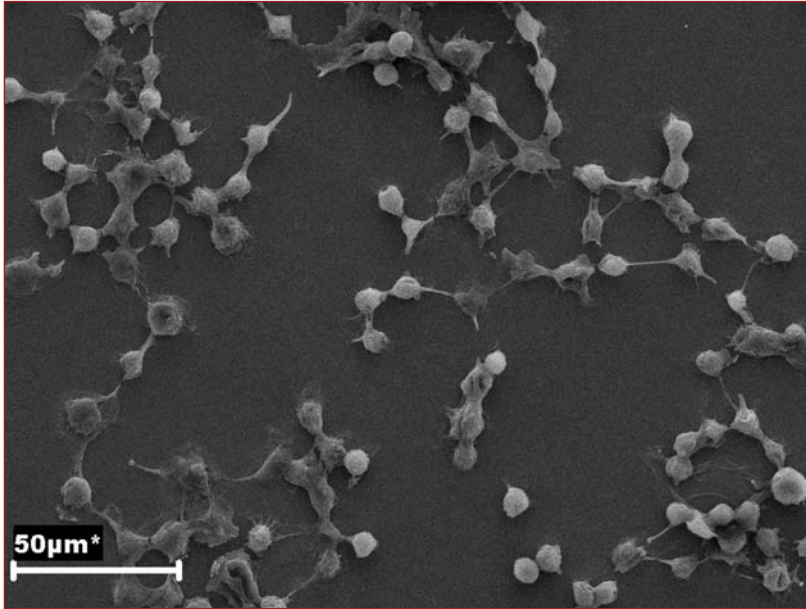


Fig. 54. Superficie de discos de titanio mostrando osteoblastos adheridos a su superficie

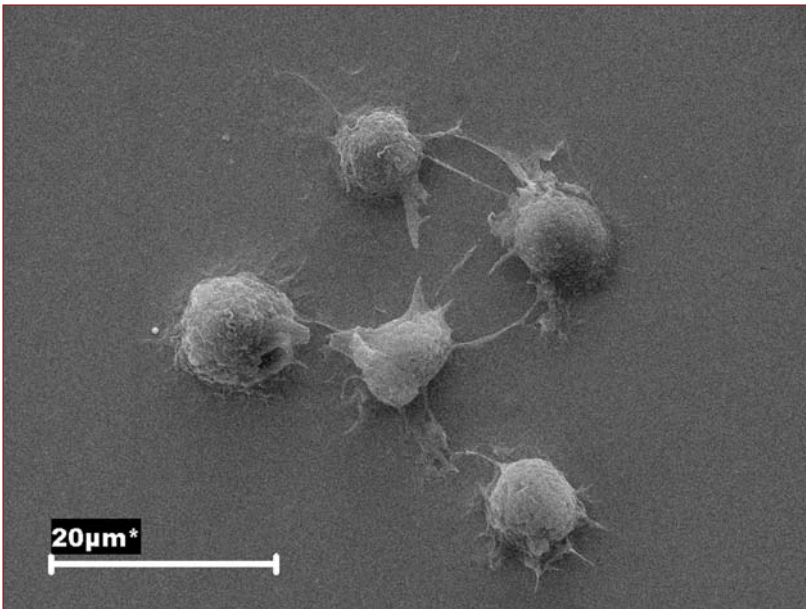


Fig. 55. Superficie de Ta, con osteoblastos adheridos a su superficie

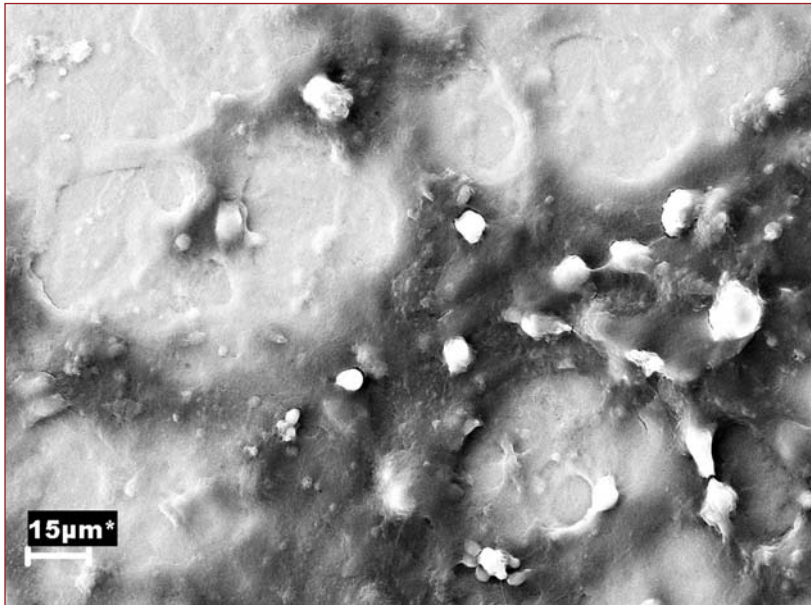


Fig. 56. Superficie de disco de Ha, con osteoblastos adheridos a su superficie

5.2.2 Datos estadísticos de la adhesión de osteoblastos

Los datos cuantitativos de la adsorción de los osteoblastos en las diferentes superficies estudiadas, fueron analizados por el Software del sistema Q-Sense y los datos proporcionados fueron analizados por el paquete estadístico SSPS 14.00

En los estudios estadísticos realizados sobre la adhesividad de los osteoblastos, apreciamos que la estadística descriptiva, los valores obtenidos tiene una distribución no gaussiana, por lo que tomamos la mediana como índice de tendencia central, y como índice de dispersión, (como el tamaño de la muestra es mayor de 70), se tomo el ma 68, o sea la diferencia entre el percentil 68 y el percentil 50 (mediana). Así mismo informamos de los valores experimentales máximo y mínimo.

Se observó que solamente seguían una distribución normal los estudios sobre Ha, en cambio el Ta y el Ti seguían una distribución no normal, verificándolo mediante el test de Kolmogorov- Smirnov.

Se realizaron correlaciones no paramétricas, al no ser muestras normales, utilizando el coeficiente de correlación de rango de Spearman.

Se muestran los datos estadísticos descriptivos del Δf , que nos indica la masa depositada de osteoblastos por adhesión a las distintas superficies al final del experimento.

En los estudios comparativos sobre depositación de osteoblastos sobre los biomateriales empleados se utilizó el test de Friedman. Realizando una comprobación “a posteriori” utilizando el test de Wilcoxon con penalización tipo Bonferroni, para ver si había diferencias estadísticamente significativa.

En la estadística descriptiva, apreciamos, las diferencias de adhesión entre las distintas superficies empleadas, si nos fijamos en la mediana, el percentil ma68 y los valores máximo y mínimo de absorción de osteoblastos en las distintas superficies empleadas.

		TaGRO	TiGRO	HAGRO
N	Válidos	1691	1691	1691
	Perdidos	1	1	1
Media		7,3214531	7,5206937	8,1013027
Error típ. de la media		,02470473	,00027959	,00137327
Mediana		7,5228297	7,5211812	8,1003211
Desv. típ.		1,0159021	,01149718	,05647128
Varianza		1,032	,000	,
Asimetría		,353	-,043	,075
Error típ. de asimetría		,060	,060	,060
Curtosis		-,398	-,345	-,302
Error típ. de curtosis		,119	,119	,119
ma 68		,224	,005	,028
Mínimo		5,96568	7,49231	7,95647
Máximo		9,99297	7,55107	8,25168
Percentiles	2,5	6,0137927	7,4975842	7,9915733
	68	7,7472607	7,5261408	8,1282004
	97,5	9,6273484	7,5426450	8,2148990

Tabla 6-5. Estadística descriptiva grosor de capa de osteoblastos adheridos

Si valoramos los valores extremos tanto máximo, como mínimo apreciamos que la adsorción de osteoblastos en tantalio muestra una mayor dispersión con valores entre 5,965 y 9,992 ng/cm², obteniendo el máximo valor entre las 3 superficies estudiadas.

Pero si utilizamos, la mediana y el percentil ma68, (dado que es una distribución no normal) apreciamos que deposito de osteoblastos es superior en Ha, que en sus competidores.

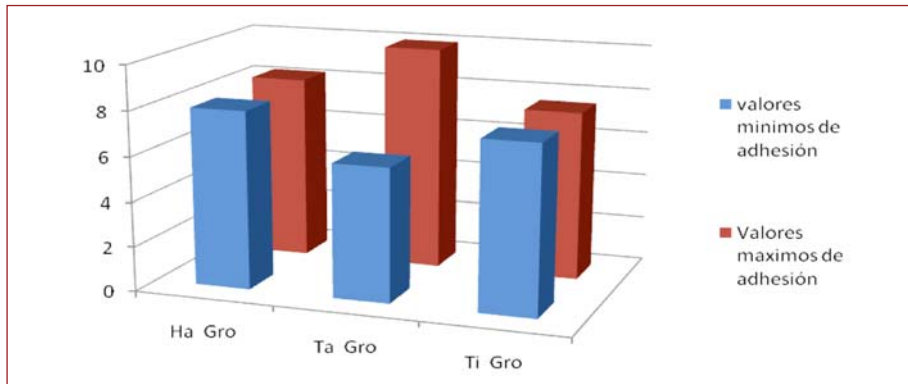


Fig. 57. Valores extremos de grosor en diferentes superficies empleadas

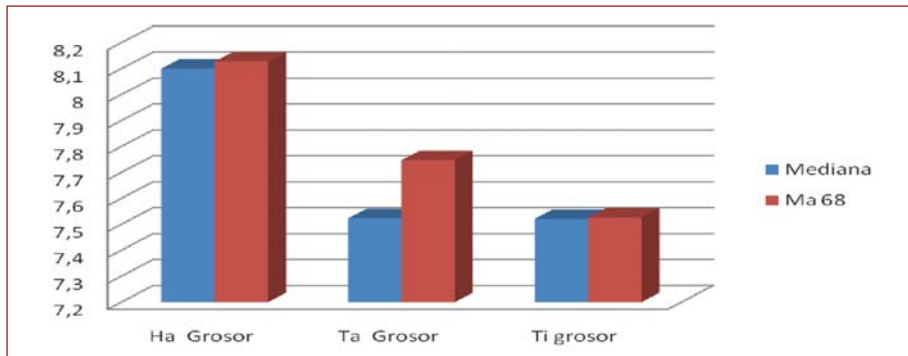


Fig. 58. Grosor de la capa de osteoblastos adheridos a diferentes superficies mediana y percentil 68

En lo que respecta a la viscosidad de la capa adsorbida valoramos disipación ΔD , promovió por la humidificación de los cristales oscilantes, lo que nos indica la naturaleza no rígida, sino viscoelástica de las células adheridas.

Revisando la estadística descriptiva, apreciamos como en el caso del grosor, una mayor dispersión de los datos obtenidos, cuando se trata de las superficies de Tantalio, pero también se apreció que donde se aprecia un mayor aumento de la disipación fue en las superficies de Ha.

		TaVIS	TiVIS	HAVIS
N	Válidos	1691	1691	1691
	Perdidos	1	1	1
Media		3,5615682	3,2162300	3,8441996
Error típ. de la media		,00048257	,00003975	,00006759
Mediana		3,5601985	3,2160197	3,8442003
Desv. típ.		,01984399	,00163472	,00277924
Asimetría		,485	,046	,000
Error típ. de asimetría		,060	,060	,060
Curtosis		-,298	-,493	-,186
Error típ. de curtosis		,119	,119	,119
ma 68		,010	,001	,001
Mínimo		3,53006	3,21165	3,83683
Máximo		3,62000	3,22062	3,85154
Percentiles	2,5	3,5325430	3,2136102	3,8385508
	68	3,5702075	3,2171925	3,8454550
	97,5	3,6059605	3,2197821	3,8497990

Tabla 7-5. Estadística descriptiva de las viscosidad de la capa de células absorbidas AD

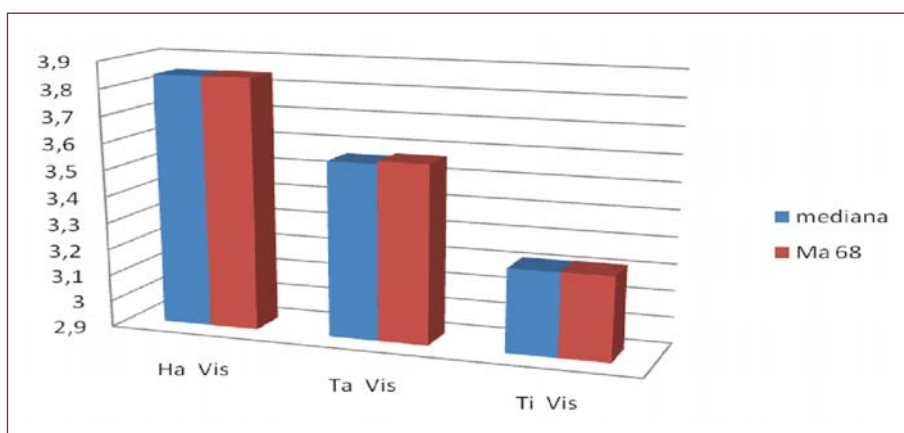


Fig. 59. Tabla de resultados ΔD en las diferentes superficies empleadas, valores de la media y percentil 68

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov(a)		
	Estadístico	Gl	Sig.
TaVIS	,070	1691	,000
TaGRO	,184	1691	,000
TiVIS	,071	1691	,000
TIGRO	,041	1691	,000
HAGRO	,017	1691	,200(*)
HAVIS	,011	1691	,200(*)

Tabla 8-5. Test de Kolmogorov-Smirnov

* Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a Corrección de la significación de Lilliefors

Como se observa en el cuadro anterior la aplicación del test de Kolmogorov-Smirnov al dar significativa la prueba ($p < 0,001$) para el grosor y la viscosidad en las superficies de Ti y Ta, significa que los resultados correspondientes a estos biomateriales no se ajustan a una distribución gaussiana. No así la Ha.

Si realizamos una correlación del Δf y ΔD para cada material empleado en estudio, empleando diferentes frecuencias de oscilación, 5, 15, 25, 45 MHz, apreciamos en Ta, cuando empleamos una alta frecuencia en los sensores es cuando más se aprecia el cambio en la disipación ΔD , con frecuencias de oscilación menor se aprecia menor diferencia en la disipación en relación con las propiedades viscoelásticas de los osteoblastos adheridos.

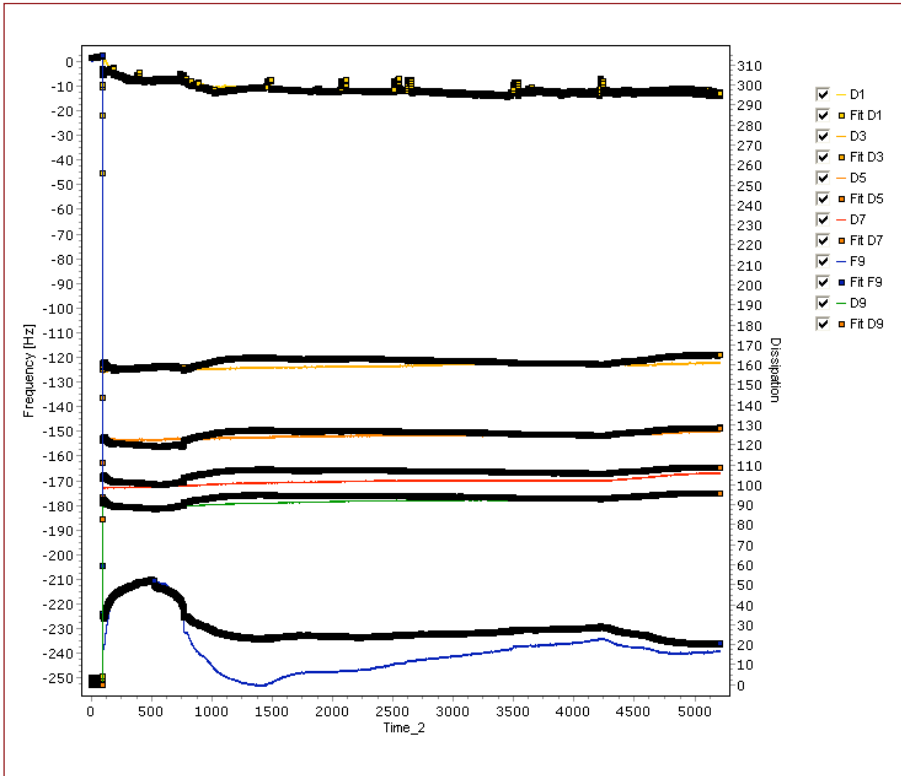


Fig. 60. Registro de variación de Δf y ΔD en superficie de Ta a diferentes frecuencias de oscilación D_1 5 MHz., D_3 15 MHz., D_5 25 MHz., D_7 35 MHz., y D_9 45 MHz.

En lo que respecta a la adhesión de osteoblastos en Titanio si comparamos la tabla de espesor depositado, con la diferencia de disipación provocada por la viscoelasticidad de la capa de osteoblastos depositada. Apreciamos una mayor homogeneidad tanto en Δf como ΔD independientemente de la frecuencia de oscilación empleada (Figura 61)

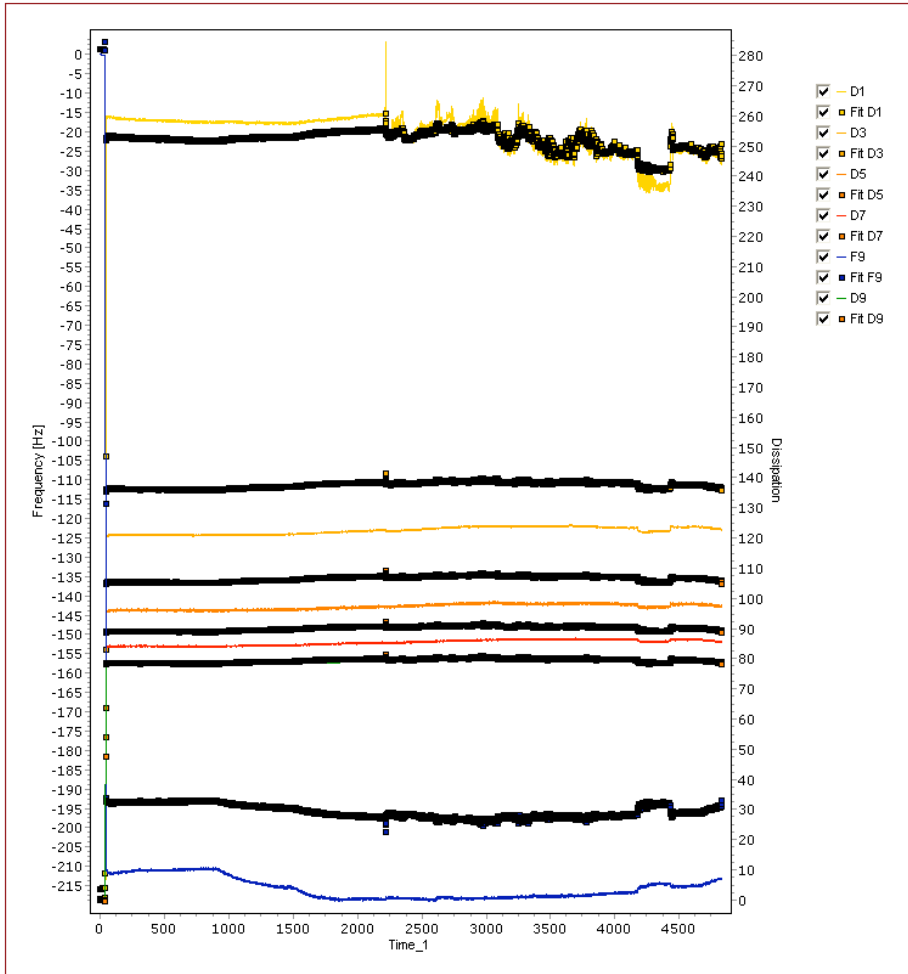


Fig. 61. Registro de variación de Δf y ΔD en superficie de Ti a diferentes frecuencias de oscilación D_1 5 MHz., D_3 15 MHz., D_5 25 MHz. D_7 35 MHz, y D_9 45 MHz.

Cuando empleamos Hidroxiapatita la grafica que relaciona el Δf con ΔD , se obtiene una graficas con diferentes datos en las frecuencias extremas de oscilación 45 MHz. (Figura 62)

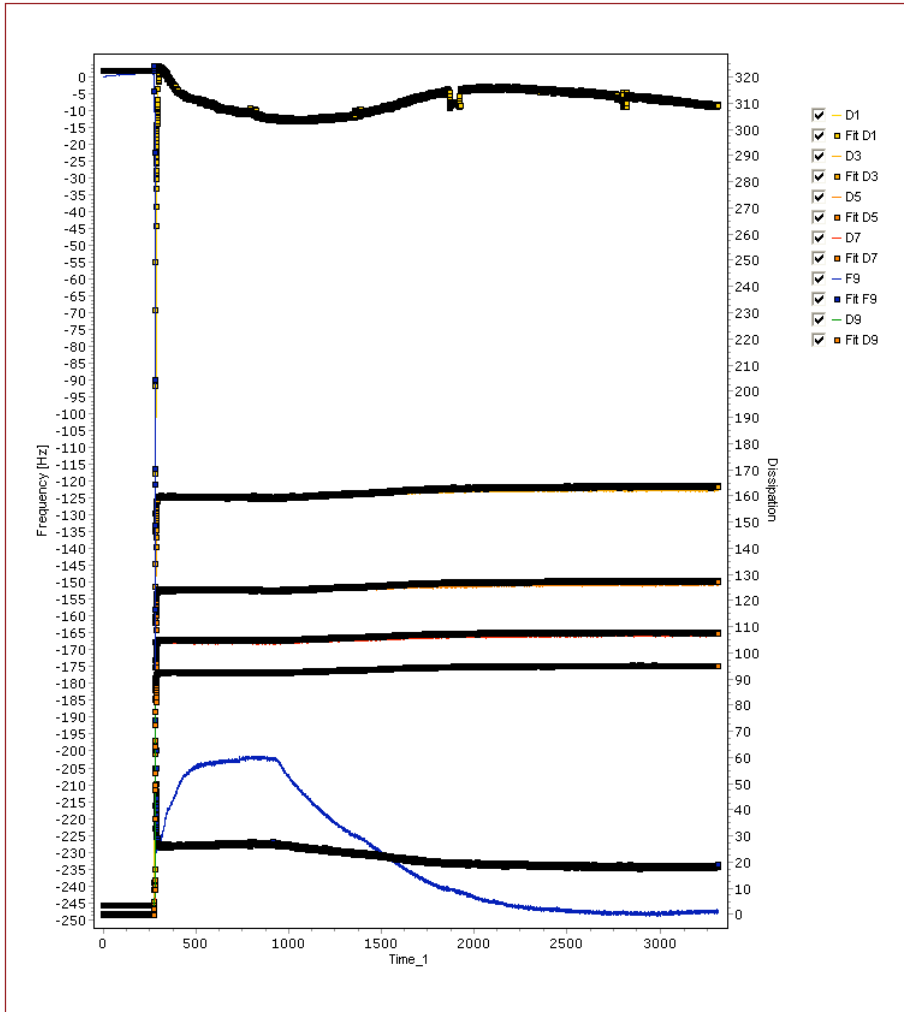


Fig. 62. Registro de variación de Δf y ΔD en superficie de Ti a diferentes frecuencias de oscilación D_1 5 MHz., D_3 15 MHz., D_5 25 MHz. D_7 35 MHz, y D_9 45 MHz.

Para verificar si había relación de dependencia entre los distintos valores en lo que respecta al grosor de la masa depositada de osteoblastos y las diferencias en la disipación en relación con las características viscoelásticas de la capa de osteoblastos adherida, se realizaron correlaciones no paramétricas, dado que el Ti y el Ta, presentaban

una curva no gaussiana de depositación, calculando el coeficiente de correlación de rangos de Spearman, cuyos resultados exponemos en las tablas siguientes.

Correlaciones no paramétricas

			TaGRO	TiGRO	HAGRO
Rho de Spearman	TaGRO	Coefficiente de correlación	1,000	,561(**)	-,118(**)
		Sig. (bilateral)	.	,000	,000
		N	1691	1691	1691
	TiGRO	Coefficiente de correlación	,561(**)	1,000	-,096(**)
		Sig. (bilateral)	,000	.	,000
		N	1691	1691	1691
	HAGRO	Coefficiente de correlación	-,118(**)	-,096(**)	1,000
		Sig. (bilateral)	,000	,000	.
		N	1691	1691	1691

Tabla 9-5. Correlaciones del grosor de la capa de osteoblastos adheridos

**** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).**

Correlaciones

			TaVIS	TiVIS	HAVIS
Rho de Spearman	TaVIS	Coefficiente de correlación	1,000	,282(**)	-,045
		Sig. (bilateral)	.	,000	,062
		N	1691	1691	1691
	TiVIS	Coefficiente de correlación	,282(**)	1,000	-,223(**)
		Sig. (bilateral)	,000	.	,000
		N	1691	1691	1691
	HAVIS	Coefficiente de correlación	-,045	-,223(**)	1,000
		Sig. (bilateral)	,062	,000	.
		N	1691	1691	1691

Tabla 10-5. Correlaciones de la viscosidad de la capa de osteoblastos adheridos a las superficies estudiadas

**** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).**

Correlaciones

			TaVIS	TaGRO
Rho de Spearman	TaVIS	Coefficiente de correlación	1,000	,247(**)
		Sig. (bilateral)	.	,000
		N	1691	1691
	TaGRO	Coefficiente de correlación	,247(**)	1,000
		Sig. (bilateral)	,000	.
		N	1691	1691

Tabla 11-5. Correlación de espesor-viscosidad de la capa de osteoblastos adheridos a tantalio

**** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).**

Correlaciones

			TiVIS	TiGRO
Rho de Spearman	TiVIS	Coeficiente de correlación	1,000	,426(**)
		Sig. (bilateral)	.	,000
		N	1691	1691
	TiGRO	Coeficiente de correlación	,426(**)	1,000
		Sig. (bilateral)	,000	.
		N	1691	1691

Tabla 12-5. Correlación de grosor-viscosidad de la capa de osteoblastos adheridos a titanio

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Correlaciones

			HAGRO	HAVIS
Rho de Spearman	HAGRO	Coeficiente de correlación	1,000	-,056(*)
		Sig. (bilateral)	.	,021
		N	1691	1691
	HAVIS	Coeficiente de correlación	-,056(*)	1,000
		Sig. (bilateral)	,021	.
		N	1691	1691

Tabla 13-5. Correlación de grosor-viscosidad de la capa de osteoblastos adheridos a hidroxiapatita

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

En los casos en que encontramos correlaciones significativas, estimamos las ecuaciones de regresión, entre las variables, así mismo representamos las rectas correspondientes, con sus nubes de dispersión.

Regresión								
Resumen del modelo								
Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación				
1	,546(a)	,298	,298	,85118992				
a Variables predictoras: (Constante), TiGRO								
ANOVA(b)								
Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.		
1	Regresión	520,455	1	520,455	718,340	,000(a)		
	Residual	1223,722	1689	,725				
	Total	1744,176	1690					
a Variables predictoras: (Constante), TiGRO								
b Variable dependiente: TaGRO								
Coeficientes(a)								
Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.	Intervalo de confianza para B al 95%	
		B	Error típ.	Beta	Límite inferior	Límite superior	B	Error típ.
1	(Constante)	-355,685	13,544		-26,261	,000	-382,250	-329,120
	TiGRO	48,268	1,801	,546	26,802	,000	44,735	51,800
Tabla 14-5. Coeficiente y regresión en el estudio comparativo de adhesión de osteoblastos a titanio y tantalio								
a Variable dependiente: TaGRO								
$y = ax + b$								
a Slope o pendiente de la recta 48,268								
b ordenada en origen, intercept								
TaGro=48,27xTiGro-355,68								

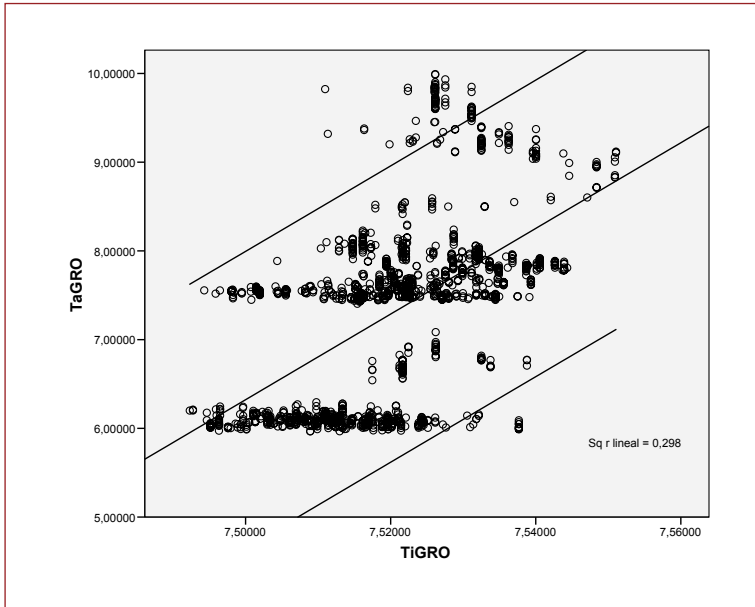


Fig. 63.
Comparativa del grosor de la capa de osteoblastos adheridos a titanio y tantalio

Sq r = r², coeficiente de determinación, % de covariación, el 30% de la variación de Ta en explicable por la variación de Ti

Regresión

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,334(a)	,112	,111	,01870779

a Variables predictoras: (Constante), TiVIS

ANOVA(b)

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	,074	1	,074	212,514	,000(a)
	Residual	,591	1689	,000		
	Total	,665	1690			

a Variables predictoras: (Constante), TiVIS

b Variable dependiente: TaVIS

Coeficientes(a)

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.	Intervalo de confianza para B al 95%	
	B	Error típ.	Beta	Límite inferior	Límite superior	B	Error típ.
1 (Constante)	-9,490	,895		-10,600	,000	-11,246	-7,734
TiVIS	4,058	,278	,334	14,578	,000	3,512	4,604

Tabla 15-5. Coeficiente y regresión en el estudio comparativo de viscosidad entre tantalio y titanio

a Variable dependiente: TaVIS

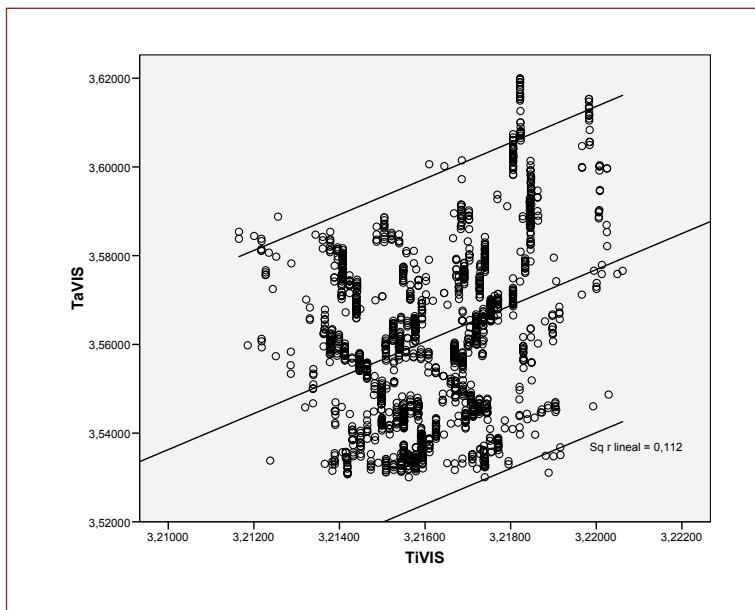


Fig. 64. Comparativa de viscosidad de la capa de osteoblastos adheridos en titanio y tantalio

Regresión

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,139(a)	,019	,019	,01965798

a Variables predictoras: (Constante), TaGRO

ANOVA(b)

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	,013	1	,013	33,133	,000(a)
	Residual	,653	1689	,000		
	Total	,665	1690			

a Variables predictoras: (Constante), TaGRO

b Variable dependiente: TaVIS

Coefficientes(a)

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.	Intervalo de confianza para B al 95%	
		B	Error típ.	Beta	Límite inferior	Límite superior	B	Error típ.
1	(Constante)	3,542	,003		1017,972	,000	3,535	3,549
	TaGRO	,003	,000	,139	5,756	,000	,002	,004

Tabla 16-5. Coeficiente y regresión en el estudio comparativo del grosor y la viscosidad en la capa de osteoblastos adheridos en tantalio

a Variable dependiente: TaVIS

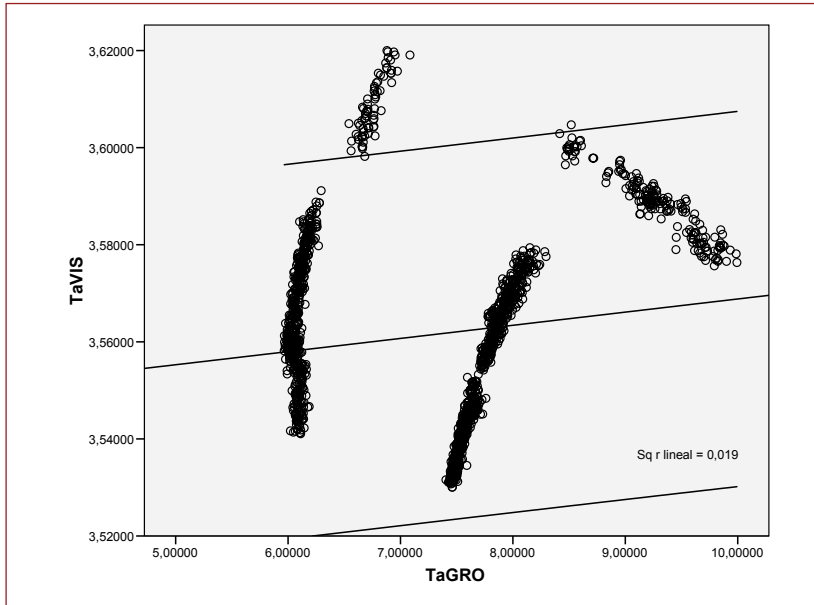


Fig. 65. Comparativa de grosor y viscosidad en la capa de osteoblastos adheridos en tantalio

Regresión

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,401(a)	,161	,160	,00149803

a Variables predictoras: (Constante), TiGRO

ANOVA(b)

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	,001	1	,001	323,479	,000(a)
	Residual	,004	1689	,000		
	Total	,005	1690			

a Variables predictoras: (Constante), TiGRO

b Variable dependiente: TiVIS

Coefficientes(a)

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.	Intervalo de confianza para B al 95%	
	B	Error típ.	Beta	Límite inferior	Límite superior	B	Error típ.
1 (Constante)	2,788	,024		116,943	,000	2,741	2,834
TiGRO	,057	,003	,401	17,986	,000	,051	,063

Tabla 17-5. Coeficiente y regresión en el estudiocomparativo de grosor y viscosidad de la capa de osteoblastos adheridos en titanio

a Variable dependiente: TiVIS

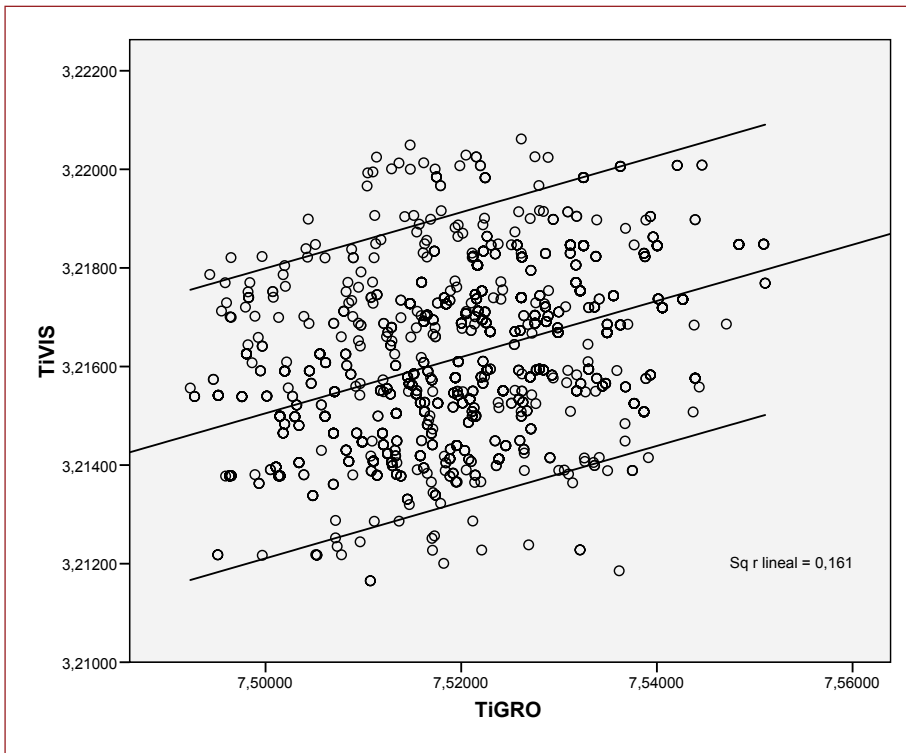


Fig. 66. Comparativa de grosor y viscosidad de la capa de osteoblastos adheridos en titanio

5.2.3 Pruebas de contraste de hipótesis

Para verificar si había diferencias significativas entre las distintas series de valores, dado que estos en su mayoría seguían una distribución no gaussiana, y se trataba de muestras relacionadas, se aplicó el test de Friedman, con comprobación “a posteriori” utilizando el test de Wilcoxon de rangos signados con penalización tipo Bonferroni.

De esta forma en la comparación de todas contra todas, empleamos la prueba de Friedman, en su primera parte valora diferencias entre algún grupo, (si no las hay termina el problema), si las hay el test de Friedman no da más de sí. Si da significativo realizamos comprobación a posteriori, y contemplamos, comprobación de todos contra todos, o todos contra una referencia, en nuestro caso todos contra todos.

Prueba de Friedman

	Rango promedio
TaGRO	1,64
TiGRO	1,49
HAGRO	2,86

Estadísticos de contraste(a)

N	1691
Chi-cuadrado	1907,171
Gl	2
Sig. asintót.	,000

a Prueba de Friedman

Rangos

	Rango promedio
TaVIS	2,00
TiVIS	1,00
HAVIS	3,00

Estadísticos de contraste(a)

N	1691
Chi-cuadrado	3382,000
Gl	2
Sig. asintót.	,000

a Prueba de Friedman

Tabla 18-5. Pruebas de contraste de hipótesis

5.2.4 Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Rangos

		N	Rango promedio	Suma de rangos
TiVIS – TaVIS	Rangos negativos	1691(a)	846,00	1430586,00
	Rangos positivos	0(b)	,00	,00
	Empates	0(c)		
	Total	1691		
HAVIS – TaVIS	Rangos negativos	0(d)	,00	,00
	Rangos positivos	1691(e)	846,00	1430586,00
	Empates	0(f)		
	Total	1691		
HAVIS – TiVIS	Rangos negativos	0(g)	,00	,00
	Rangos positivos	1691(h)	846,00	1430586,00
	Empates	0(i)		
	Total	1691		
TiGRO – TaGRO	Rangos negativos	856(j)	746,37	638889,00
	Rangos positivos	835(k)	948,14	791697,00
	Empates	0(l)		
	Total	1691		
HAGRO – TaGRO	Rangos negativos	232(m)	768,49	178289,00
	Rangos positivos	1459(n)	858,33	1252297,00
	Empates	0(o)		
	Total	1691		
HAGRO – TiGRO	Rangos negativos	0(p)	,00	,00
	Rangos positivos	1691(q)	846,00	1430586,00
	Empates	0(r)		
	Total	1691		

Estadísticos de contraste(c)

Tabla 19-5. Test de Wilcoxon de rangos signados (descriptivo)

	TiVIS TaVIS	HAVIS TaVIS	HAVIS TiVIS	TiGRO TaGRO	HAGRO TaGRO	HAGRO TiGRO
Z	-35,618(a)	-35,618(b)	-35,618(b)	-3,805(b)	-26,740(b)	-35,618(b)
Sig. asintót. (bilateral)	,000	,000	,000	,000	,000	,000

Tabla 20-5. Resumen final del test de Wilcoxon de rangos signados

a Basado en los rangos positivos.

b Basado en los rangos negativos.

c Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

DISCUSIÓN



6. DISCUSIÓN

6.1 *ABSORCIÓN DE FIBRINÓGENO*

6.1.1 **Proceso de adsorción de fibrinógeno a biomateriales**

Las primeras reacciones de un organismo ante la implantación de un biomaterial incluyen agresión (injury), interacciones entre la sangre y el biomaterial, formación de una matriz provisional, inflamación aguda, inflamación crónica, desarrollo de un tejido de granulación, reacción a cuerpo extraño y desarrollo de una fibrosis o una capsula fibrosa¹⁶¹.

En el inicio del proceso de implantación de un biomaterial las interacciones sangre-material comienzan con adsorción de proteínas de la sangre a la superficie del biomaterial desarrollándose así una matriz transitoria y provisional, basada en componentes sanguíneos alrededor del material. La matriz provisional es el trombo inicial que cubre la interfaz tejido biomaterial. Obviamente la adsorción de proteínas y sobre todo el fibrinógeno entran a formar esta matriz inicial, lo que está íntimamente ligado a los mecanismos de respuesta del organismo hacia el material implantado. La agresión al tejido conectivo vascularizado, no solo inicia la respuesta inflamatoria, sino que también guía la formación del coagulo activando los sistemas intrínseco y extrínseco de coagulación, así como el sistema complemento y el sistema de

fibrinólisis, el sistema de generación de kinina y la agregación plaquetaria. Este es el motivo por lo que la adsorción del fibrinógeno en la superficie de biomateriales es importante para la valoración de su biocompatibilidad. Siendo en ocasiones muy interesante su adhesión a las superficies de biomateriales para la integración del implante como es el caso de los biomateriales empleados en Cirugía Ortopédica y en Odontología. En cambio su Adhesión a otros biomateriales como son las prótesis valvulares y prótesis vasculares puede ser negativa en lo que respecta a facilitación de procesos tromboticos en las mismas.

Como comentamos anteriormente los biomateriales y dispositivos médicos, tras ser implantados de forma inmediata y de forma espontanea sufren una adhesión de una capa de proteínas del organismo anfitrión previamente a que las células de mencionado organismo interactúan con él. Esto tiene una alta probabilidad, que el tipo, nivel y la conformación de la superficie de las proteínas adsorbidas juegan un papel determinante en la reacción del huésped hacia el implante ¹⁶². A la inversa, la conformación de esta superficie de proteínas adsorbidas son dependientes de las propiedades de la superficie del biomaterial, y a su vez dictaran la adhesión y el comportamiento de células especialmente monocitos, macrófagos que se han fijado a estas superficies recubiertas de proteínas.

La interacción de las proteínas adsorbidas con los receptores presentes en las poblaciones de células inflamatorias, constituye el sistema de reconocimiento del sistema inmunitario para biomateriales implantados y dispositivos médicos. La presencia de proteínas adsorbidas tales como albúmina, fibrinógeno, factores del complemento, fibronectina, vitronectina, γ globulinas, modulan las interacciones de de

las células inflamatorias y pueden inducir respuestas de aceptación o de rechazo¹⁶³. Como se indico anteriormente estas proteínas adsorbidas por las superficies del biomaterial también pueden desprenderse de forma espontanea o por interacciones de otras proteínas o células.

6.1.2 Absorción de fibrinógeno a los distintos biomateriales empleados en este estudio

Llama la atención que a bajas concentraciones (0,33 ng/ml) la adhesión de fibrinógeno registrada por el QCM-D es más baja en el tantalio, con respecto al titanio y la hidroxiapatita, siendo incluso semejante al grupo control con oro, pero cuando empleamos concentraciones más altas (1000 ng/ml) de fibrinógeno apreciamos que la adhesión en Au es significativamente más baja que en Ha, Ti y Ta. Siendo significativamente más alta en Ta, que en Ti y aun más que en Ha. en los estudios estadísticos comparativos entre todos contra todos, realizando el Test de Student, con la penalización de Bonferroni pudimos apreciar las diferencias antes señaladas.

Si consideramos las variables tiempo y concentración de fibrinógeno empleado, como dijimos antes llama la atención que el tantalio fue el material que mas biocompatibilidad demostró, al ser donde más cantidad de fibrinógeno se deposito al final del experimento, con una diferencia significativa con los otros biomateriales estudiados como se demostró en estudios estadísticos realizados. Pero llamo la atención que a bajas concentraciones de fibrinógeno 0,33 ng/ml, su adsorción en Tantalio era inferior a la observada en sus competidores el Ti y la Ha, pensamos que esto sea debido a factores que pueden influir en la adhesión de proteínas a biomateriales como son la carga iónica de la

superficie, la topografía, la hidrofobicidad, los enlaces isoelectrónicos de las proteínas, y pensamos que estas circunstancias pudieron variar en el tantalio tras una primera depositación.

Es por lo que debemos de tener en cuenta que las capas de fibrinógeno depositadas y el estado desnaturalización del fibrinógeno en diferentes materiales depende de numerosos factores que incluyen, las propiedades de la superficie de estos, la concentración, las condiciones de flujo temperatura y tiempo de adsorción¹⁶⁴

También debemos de tener en cuenta que proteínas adsorbidas pueden desprenderse de la superficie a la que se adhirieron rápidamente por el efecto Vroman y estas variaciones tiempo dependientes, del tipo y nivel de proteínas así como de las células que se encuentran junto a los biomateriales e influyen en los acontecimientos que se desarrollan “in vivo” durante el proceso de adhesión de proteínas a biomateriales¹⁶⁵.

A altas concentraciones 1 mg/ml y al final del proceso de adhesión del fibrinógeno a las distintas superficies empleadas, se apreció un mayor depósito en los discos de Ta incluso mayor que en Ti, lo que nos indica su mayor biocompatibilidad, situación reflejada también estudios de otros autores¹⁶⁶.

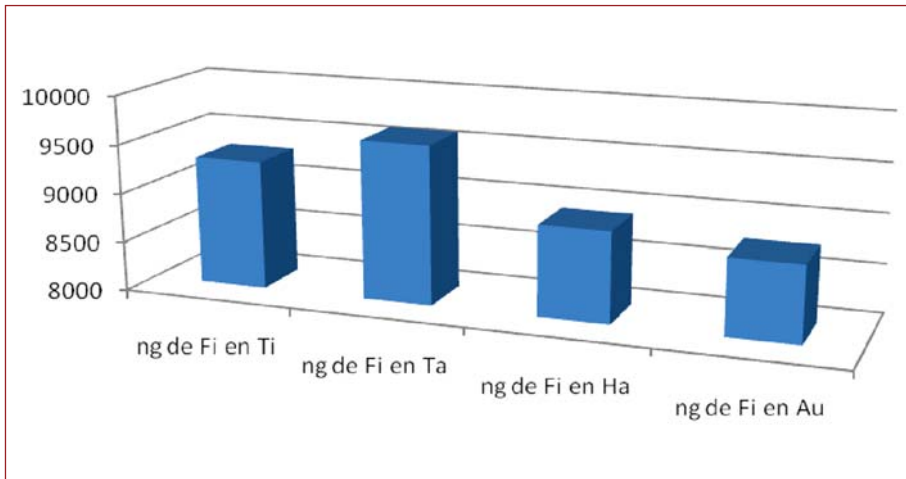


Fig. 67. Comparativa de adsorción de fibrinógeno

6.1.3 Influencia de la superficie del material en la adsorción del fibrinógeno

Diferentes estudios han demostrado que la respuesta biológica de un material así como su biocompatibilidad, depende de una manera importante de las interacciones que ocurren en su superficie, cuando éste entra en contacto con sustancias biológicas. Las características de la superficie del implante tales como la carga eléctrica, la composición química en lo que respecta a radicales de superficie, así como la topografía de misma influyen en la respuesta biológica del huesped¹⁶⁷. Es bien sabido que la química y la topografía de la superficie son dos de los más importantes factores que influyen en las reacciones biológicas de los biomateriales¹⁶⁸. La composición química de los biomateriales tiene una gran importancia durante el proceso de adsorción de moléculas o células, es bien sabido que las proteínas tienden a absorberse con más facilidad sobre superficies que permiten la humedad, comparándolas con las superficies hidrofóbicas^{169, 170}

También ha sido demostrado por distintos autores^{171, 172,168} la influencia de la rugosidad o del relieve de la capa en la adhesión de sustancias biológicas a las mismas. Los efectos de la rugosidad de la superficie de biomateriales sobre la adsorción de polímeros ha sido estudiada con importantes detalles teóricos, pero existen pocas publicaciones de trabajos experimentales con los mismos¹⁷³.

Las proteínas sin embargo tienen una estructura terciaria definida, y tienden a formar capas menos densas, comparadas con las capas formadas por polímeros simples. A esto se debe que los estudios de investigación sobre adsorción de polímeros en superficies rugosas, no es aplicable a los estudios de adhesión de proteínas en superficies de biomateriales¹⁷⁴.

En nuestro estudio se aprecia también una mayor adsorción del fibrinógeno en los discos de Ta y Ti y Ha que presentaron importantes diferencias en lo que respecta a la rugosidad de su superficie con los discos de Au.

Así los discos de Ta utilizados en nuestro estudio presentaban una rugosidad en su superficie medida por AFM entre 2.0 y 71,2 μm , Fig.68.

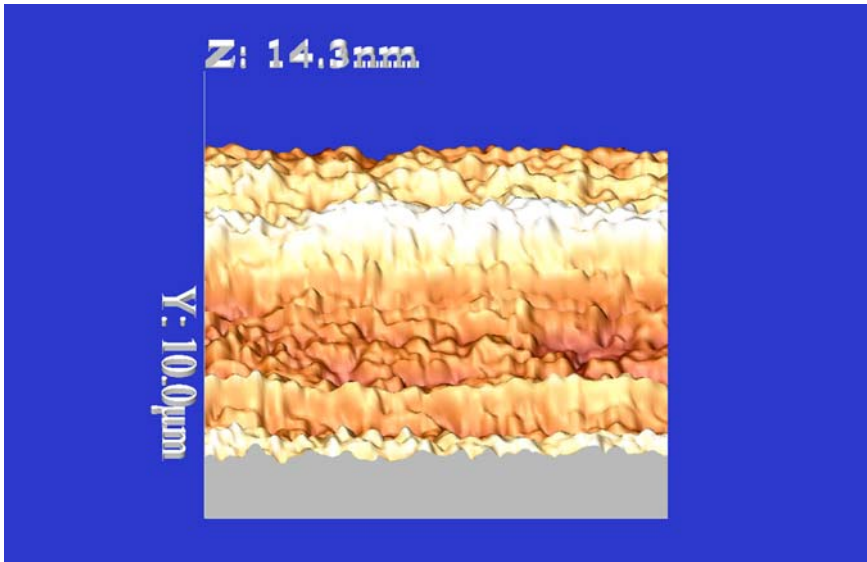


Fig. 68. Imagen de AFM de discos de Ta utilizados en el estudio

Así mismo los discos de Ti presentaban una rugosidad importante medida por AFM, vario entre 1,9 y 90,5 nm Fig. 69

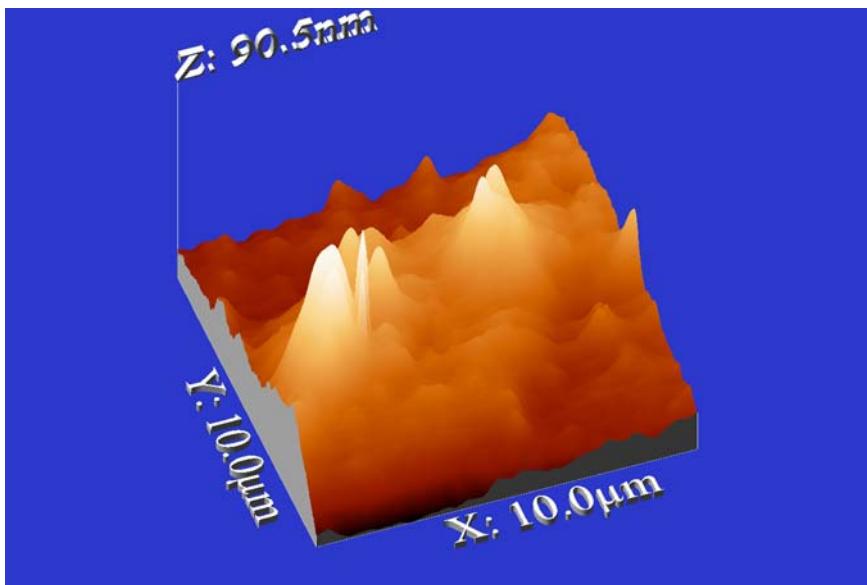


Fig. 69. Imagen de AFM de discos de Ti utilizados en el estudio

Los discos de Ha utilizados en este estudio mostraron una rugosidad semejante (20-65 μm) que los de Ti y Ta Fig. 70

En un estudio realizados por Rechendorff¹⁷⁵ sobre la influencia de la rugosidad de la superficie de tantalio, en la adsorción de proteínas los autores utilizando QCM-D y elipsometría, que la adhesión de fibrinógeno en muestras de Ta la saturación de las mismas se incrementaba un 70% cuando se incrementaba la rugosidad de 2,0 a 32,9 nm. este efecto fue apreciable dado que con ese cambio de rugosidad el área de superficie se incremento en ($\sim 20\%$). En contraste el relativo aumento de la adsorción de albumina sérica hace que su captación sea más íntima a los incrementos en el aumento del área de superficie Estudios con SM simuladores mostraron que incrementos en la adsorción de fibrinógeno pueden ser explicados teniendo en cuenta la anisotropía de las proteínas. Los cambios de rugosidad aumentan los pentámeros que sujetan a una proteína sobre una determinada superficie.

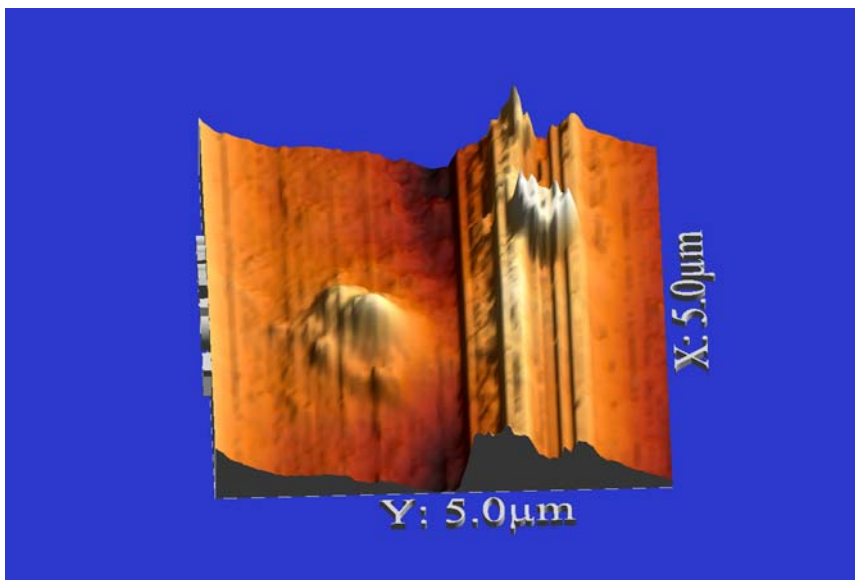


Fig. 70. Superficie de Ha medida por AFM

La adsorción de monómeros experimenta un importante incremento en la cantidad adsorbida, comparándola con el incremento de la cantidad adsorbida de albumina sérica durante su captación. Esta observación es probablemente debida a los efectos de relajación post-adsorción en la albumina sérica. Estos resultados son importantes, y explican las bases conceptuales de la interpretación de las mediciones en la adsorción de proteínas en superficies con rugosidad y aclaran que la rugosidad en escala manométrica tiene un significativo impacto en la adsorción de proteínas, por lo tanto la rugosidad es un parámetro importante en el diseño de biomateriales.

6.1.4 Propiedades Mecánicas de la capa de proteínas adsorbida

Los datos del QCM-D, pueden ser utilizados en el estudio del espesor de la capa adsorbida y estimar de alguna manera su densidad, diferenciando entre las proteínas y el agua adsorbido.

En situaciones con moderada humedad ambiente las capas adsorbidas pueden ser lo suficientemente rígidas que la ecuación de Sauerbrey puede ser utilizada para la estimación de los parámetros físicos del sistema, como ha sido en nuestro caso, por las condiciones físicas que aplicamos en el proceso de adsorción del fibrinógeno en nuestro laboratorio.

Sin embargo en ambientes muy húmedas, la respuesta de disipación nos puede indicar que las capas adsorbidas, pueden ser mucho menos rígidas y algo pegajosas; y parece probable que la humedad plastifique los materiales produciendo una capa visco elástica. En estos casos para estimar las propiedades físicas de la capa de proteínas, se puede emplear el modelo visco elástico. Este algoritmo se basa en

el modelo de Voight-Voinova¹³². Las bases y variables de este modelo están incluidas en el Software del aparato QCM-D, de tal manera que el rendimiento del tratamiento matemático de los datos tomados, nos son dados en función de las propiedades físicas de la muestra (viscosidad, modulo de elasticidad, densidad).

Las respuestas dadas por el software del sistema QCM-D nos producen resultados en de las propiedades físicas (viscosidad, densidad etc.) en lo que respecta al espesor de la capa adherida y la frecuencia de oscilación.

6.2 ADHESIÓN DE OSTEOLASTOS

6.2.1 Monitorización del proceso de adhesión de osteoblastos

La técnica QCM-D, nos ha permitido monitorizar el proceso de adhesión de osteoblastos, a las distintas superficies de los biomateriales estudiados, gracias a las medidas en tiempo real de la masa adherida y la visco elasticidad a través de cambios en la frecuencia y en la energía de disipación durante el proceso de adhesión celular, haciendo posible el estudio morfológico y de cambios cito-esqueléticos en la superficie adherente de los osteoblastos, de una forma no invasiva.

Nuestros estudios nos han permitido valorar la adhesión de osteoblastos a las superficies estudiadas realizando análisis en tiempo real, realizando los estudios “in vitro”. Pero no hemos podido reproducir la situación exacta, de cuando se implanta un biomaterial en un organismo, dado que está ampliamente demostrado que en mencionado proceso también intervienen proteínas que se encuentran en el espacio extracelular. Es bien conocido que la conducta de las células

sobre las superficies de los biomateriales es modulada, por la concentración, composición y conformación de proteínas de la matriz extracelular¹⁷⁶. Pero también es bien sabido, que esta circunstancia se dará siempre que realicemos estudios “in Vitro”. También debemos de tener en cuenta que están reconocidas secuencias peptídicas específicas, en proteínas de la matriz extracelular tales como la fibronectina, la vitronectina, el fibrinógeno mediante las cuales se puede iniciar la adhesión inicial de las células a los biomateriales¹⁷⁷, que en estudios in vitro por problemas de modulación de las mismas no podemos emplear, dado que nunca se darán las mismas situaciones e influencias de la matriz extracelular en estudios “in vitro” e “in vivo”.

6.2.2 Adhesión de osteoblastos a Tantalio

En estos últimos años el tantalio ha generado, un gran interés y ha aumentado considerablemente su utilización en implantes utilizados en Cirugía Ortopédica^{178,179,180}. El Tántalo poroso (Trabecular Metaltm) ha demostrado ventajas sobre otros biomateriales convencionales usados en Cirugía Ortopédica debido a su uniformidad, continuidad estructural, su resistencia, su baja rigidez, alta porosidad, y un coeficiente de fricción alto¹⁸¹. En estudios pre clínicos, las construcciones con tantalio poroso han demostrado ser un excelente andamio, que permite crecimiento óseo a través de él, con unas buenas propiedades mecánicas¹⁸², y actualmente ha incrementado su uso para una gran variedad de aplicaciones en la implantología ósea¹⁸³. Por ejemplo han sido comunicados excelentes resultados con la utilización de cúpulas acetabulares no cementadas de tantalio poroso en cirugía de revisión de artroplastia de cadera, mostrando una aposición ósea exce-

lente, gran osteointegración y muy buenos resultados clínicos a medio plazo¹⁸⁴. Las propiedades osteoconductoras del tantalio poroso puede aportar importantes beneficios en artroplastias. En un modelo canino de artroplastia de rodilla, los insertos de tantalio poroso han reportado más beneficios en lo que es la prevención de migración de partículas de polietileno del espacio articular hacia el hueso, lo que sugiere que este material puede asegurar un retraso en las osteolisis periprotésicas inducidas por la llamada enfermedad de las partículas¹⁸⁵.

A pesar de la exitosa utilización del tantalio en Cirugía Ortopédica, no hay muchos trabajos de investigación de la interacción de osteoblastos humanos con este material. La presencia, en vivo de múltiples tipos de células que pueden interaccionar cuando se realiza un implante, oscurece las características de la interacción de los osteoblastos con este material per se¹⁸⁶.

En este estudio no hemos podido utilizar tantalio poroso, debido a que los discos AT.-Cut del sistema Q-Sense por las características del sistema no permiten en el momento actual un material poroso, dado que aumentaría el calibre y grosor de los mismos y habría que tener en cuenta también que el tantalio poroso lleva un esqueleto de carbón vítreo, lo que tendría que ser considerado a la hora de valorar la frecuencia de oscilación del disco Q-Sense, por lo que nuestros estudios se realizaron sobre una capa de tantalio sólido, eso sí se valoró la rugosidad de la misma medida por AFM.

En nuestro estudio sobre la adhesión de osteoblastos a Ta sólido valoramos la adhesión de osteoblastos a la superficie del disco. En lo que respecta a la capa de células adheridas a las superficie es medido en relación al Δf , podemos apreciar (Fig.72) que en el tantalio

se obtuvo una importante dispersión de los datos encontrándose con este biomaterial los valores máximos y mínimos de adsorción en nuestro estudio.

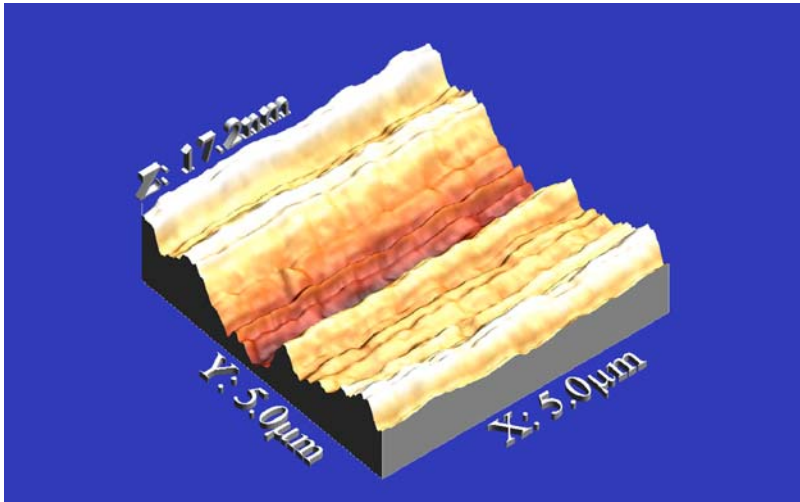


Fig. 71. Superficie de discos de TA medido por AFM

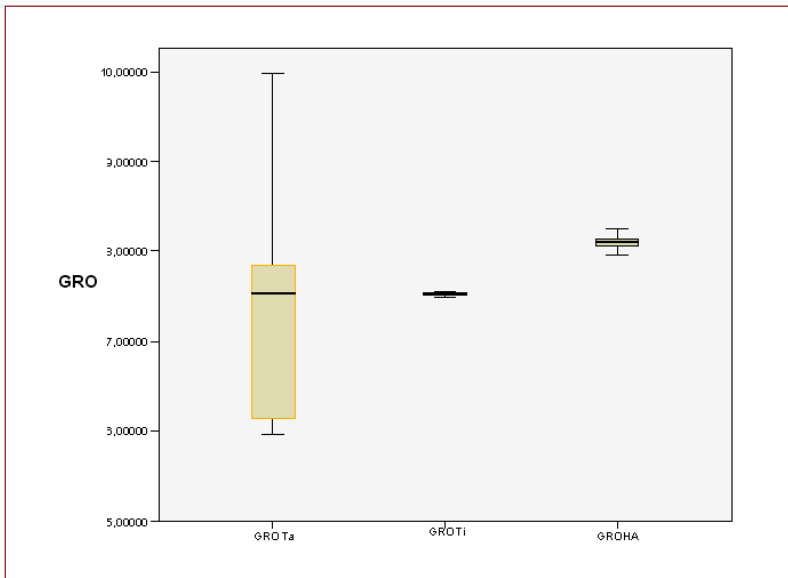


Fig. 72. Grosor de la capa de osteoblastos adheridos a las superficies analizadas Ti, Ta, y Ha.

Pensamos que esta dispersión de los resultados, en lo que respecta a la capa de osteoblastos adsorbidos en la superficie de tantalio pudiera estar en relación con la rugosidad de la superficie de este biomaterial¹⁸⁶ y posiblemente con el tiempo de contacto de la solución de osteoblastos con el biomaterial.

En lo que respecta a la mediana, y el Ma 68, como valores estadísticos mas importantes en este estudio de la adsorción de osteoblastos en tantalio apreciamos que la adsorción es inferior a la obtenida con Ha, y semejante al titanio.

En cuanto a la medición de la disipación, la cual nos da una información cualitativa acerca de las propiedades visco elásticas de la capa de osteoblastos adsorbida. También tenemos que tener en cuenta, que el factor de disipación es la suma de la energía disipada por todos los mecanismos del sistema de oscilación. El incremento en la energía de disipación es proporcional a la raíz del producto de la viscosidad y la densidad. Si la capa adsorbida es rígida se obtendrán ΔD bajos y si es muy visco elástica se obtendrán valores más altos. En nuestro estudio se aprecio que la adhesión de osteoblastos se realizo con un importante grado de humedad y se observó que la viscoelasticidad de los osteoblastos adheridos fue alta en las 3 superficies estudiadas, siendo en Tantalio superior al Titanio, pero inferior a la de Hidroxiapatita

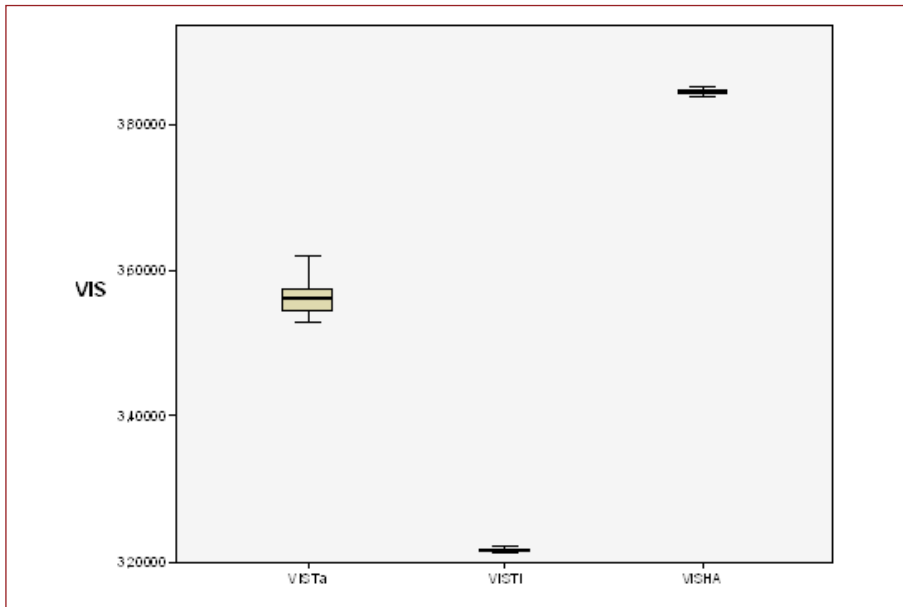


Fig. 73. ΔD en la capa de osteoblastos adheridos a las distintas superficies estudiadas Ta, Ti y Ha.

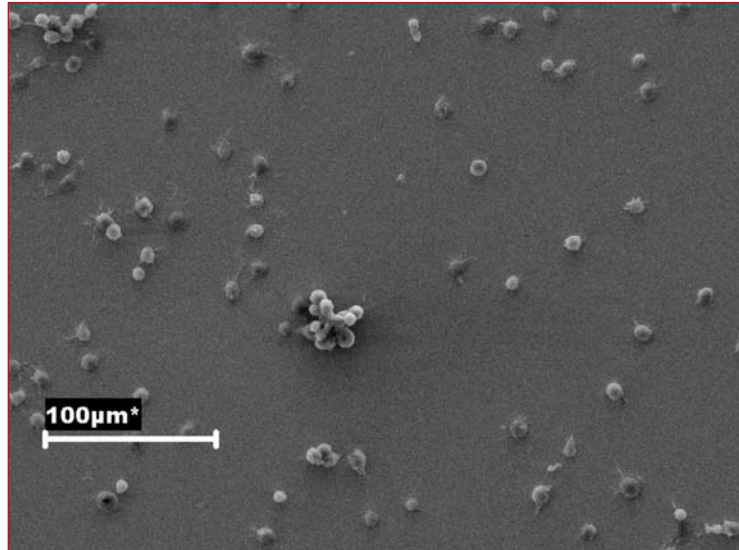
Hemos encontrado, en la revisión bibliográfica realizada, pocos estudios que compara la adhesión de osteoblastos humanos en superficies porosas y solidas de tantalio^{186,187}.

En el trabajo de Welldon¹⁸⁶ se realiza un estudio comparativo del crecimiento de osteoblastos cultivados en superficie solida de Ta, con tantalio poroso (tabecular metaltm), realizando en mencionado estudio cultivo de osteoblastos en tantalio poroso, tantalio solido y cultivo plástico, valoraron la maduración celular, mediante la producción de fosfatasa alcalina y anticuerpos monoclonales STRO-1, apreciando que al día 14 de cultivo se observo un incremento en la fosfatasa alcalina y una disminución el STRO-1 en los osteoblastos cultivados en tantalio poroso, comparados con los que se cultivaron en tantalio sólido, también los autores mostraron que al día 42 de cultivo, la mineralización

fue superior en los osteoblastos cultivados en tantalio poroso, que en osteoblastos cultivados en Ta sólido, aunque manifiestan que este aumento de la mineralización puede estar en relación con el aumento de la población de osteoblastos, que se observó en el tantalio poroso, más que en un aumento de la mineralización de los osteoblastos “per se”. También en este estudio los autores apreciaron una superior expresión genética de los osteoblastos cultivados en tantalio poroso en lo que respecta a la producción de osteocalcina, osteopontina, sialoproteína ósea y colágeno tipo I, apreciando una expresión sustrato dependiente de los mismos. Los autores concluyen que los resultados de su estudio, en lo que respecta a la interacción de los osteoblastos con el tantalio poroso comparado con el tantalio sólido, el poroso está en consonancia con los modelos pre clínicos, que muestren un exuberante crecimiento óseo en este biomaterial, así mismo concluyen que el tantalio poroso demuestra ser un buen sustrato, para el crecimiento, diferenciación y expresión funcional de los osteoblastos, consiguiendo mejores resultados que con el tantalio sólido o con el control en cultivo plástico. Por lo que consideran al tantalio poroso un biomaterial exitoso para su uso clínico en implantología ósea, tanto en Cirugía Ortopédica como en Implantología Dental.

Asumiendo que nuestro estudio se realizó en tantalio sólido, pudimos apreciar tanto por los datos suministrados por el sistema QCM-D, como en las pruebas de imagen realizadas, que los osteoblastos se adhirieron de una forma importante y estadísticamente significativa a este material, apreciando la existencia de una importante relación en lo que respecta a la rugosidad del mismo, con la capacidad de adhesión de los mismos..

Fig. 74.
osteoblastos
línea Saos 2
adheridos a
la superficie
de tantalio
sólido, disco
Q-Sense



6.2.3 Adhesión de osteoblastos a titanio

En los últimos años ha aumentado considerablemente la utilización de titanio o de sus aleaciones en aplicaciones biomédicas. El titanio es, en el momento actual, prácticamente el biomaterial metálico más utilizado en el cuerpo humano, sobre todo en implantología dental, ósea y en campo cardiovascular; en la fabricación de aparatos e implantes tales como implantes dentales, prótesis articulares, sistemas de osteosíntesis, implantes en cirugía espinal, así como en válvulas cardíacas y marcapasos.

Sus propiedades de masa y de superficie tienen ventajas comparados con otros metales empleados en implantología: en particular, un relativo bajo módulo de elasticidad, una alta consistencia, una resistencia a la fatiga, una excelente resistencia a la corrosión, una función biológica superior y que apenas induce reacciones inmunológicas.

Es por lo que es, uno de los biomateriales más importantes en lo que respecta a utilización y buenos resultados obtenidos con los implantes de titanio.

Diversos datos clínicos sugieren que modificaciones en la superficie de los implantes de titanio y cambios en sus propiedades juegan un papel importante en el éxito del implante¹⁸⁸.

Es bien conocido que la superficie química y su topografía son dos de los más importantes factores que influyen en las reacciones biológicas.

En un intento de investigar la relación entre la superficie del implante y su éxito clínico, ha sido demostrado que cuando contacta con fluidos del cuerpo humano, la superficie del implante y la vecindad sufren cambios dinámicos causados por una rápidas interacciones iónicas, moleculares y finalmente celulares: la formación de una capa de oxido en la superficie de titanio puede afectar su interacción con fluidos y tejidos que se encuentran alrededor del implante. Se ha demostrado que la energía de la superficie y las modificaciones químicas de la capa de oxido tiene su importancia en los efectos biológicos, de los implantes de titanio¹⁸⁹. Sin embargo, su microestructura y la rugosidad de su superficie generalmente influye en la humidificación dinámica de la superficie del implante durante el contacto inicial con el huésped. Las proteínas tienden a adsorberse en el lado donde la superficie esta menos húmeda comparándola con las superficies hidrofílica. Esto influirá en la respuesta biológica inicial de la adsorción de las proteínas del plasma, la expresión de las proteínas del hueso y la respuesta celular^{190, 191}.

Se ha demostrado que una inadecuada unión del material implantado con el hueso, provoca una desestabilización del implante,

inhibiendo los tejidos reparadores y la regeneración ósea de su alrededor, dificultando su adhesión y facilitando la aparición de posibles procesos infecciosos¹⁹². Consecuentemente la adhesión de las células sobre las superficies del biomaterial “in vitro” es rigurosa y refleja la relativa biocompatibilidad del material implantado y debe de ser crítica en la selección de biomateriales para que puedan demostrar una óptima biocompatibilidad “in vivo”.

La adhesión, la propagación y la migración de las células es regulada por el citoesqueleto, incluyendo los filamentos de actina, y esta favorecida por la adhesión de proteínas a la membrana plasmática de la célula.

En nuestro estudio utilizamos discos de titanio (Q SX 310 Q-Sense AB, Gothenburg Sweden), en el estudio de su rugosidad medido por AFM presentaban una rugosidad que varió entre 1,9 y 90,5 nm, mencionada rugosidad fue mayor que la apreciada en los discos de Ta y Ha.

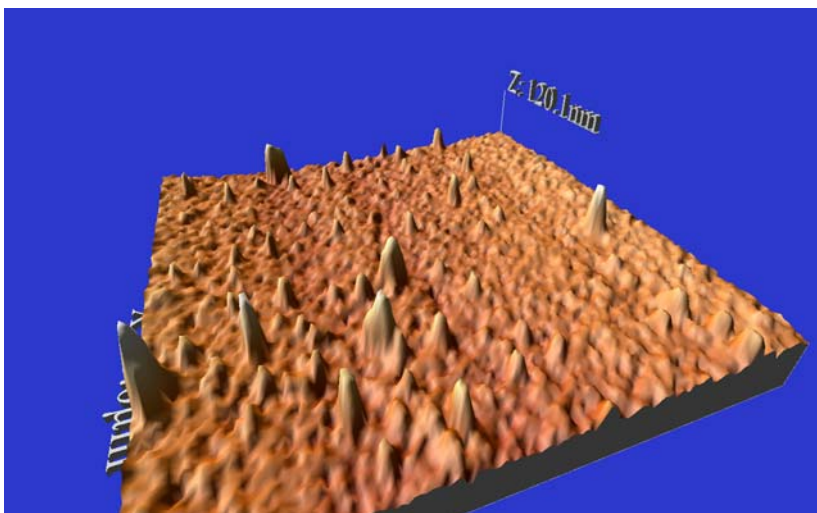


Fig. 75. rugosidad de disco de titanio del disco Q SX 310 Q-Sense AB

En lo que respecta a la adhesión de osteoblastos en nuestro estudio, apreciamos que el titanio fue el biomaterial más homogéneo en lo que respecta a la estadística de depositación de osteoblastos con muy escasa variación en los valores máximos y mínimos de depositación 7,49231 y 7,55107, respecto a la media de adsorción de osteoblastos 7,5206937 fue semejante al tantalio (Ta 7,5228297) y en lo que respecta al percentil Ma 68 también los resultados fueron semejantes al tantalio 7,52611408 (Ta 7,7472607) y también con la mediana.

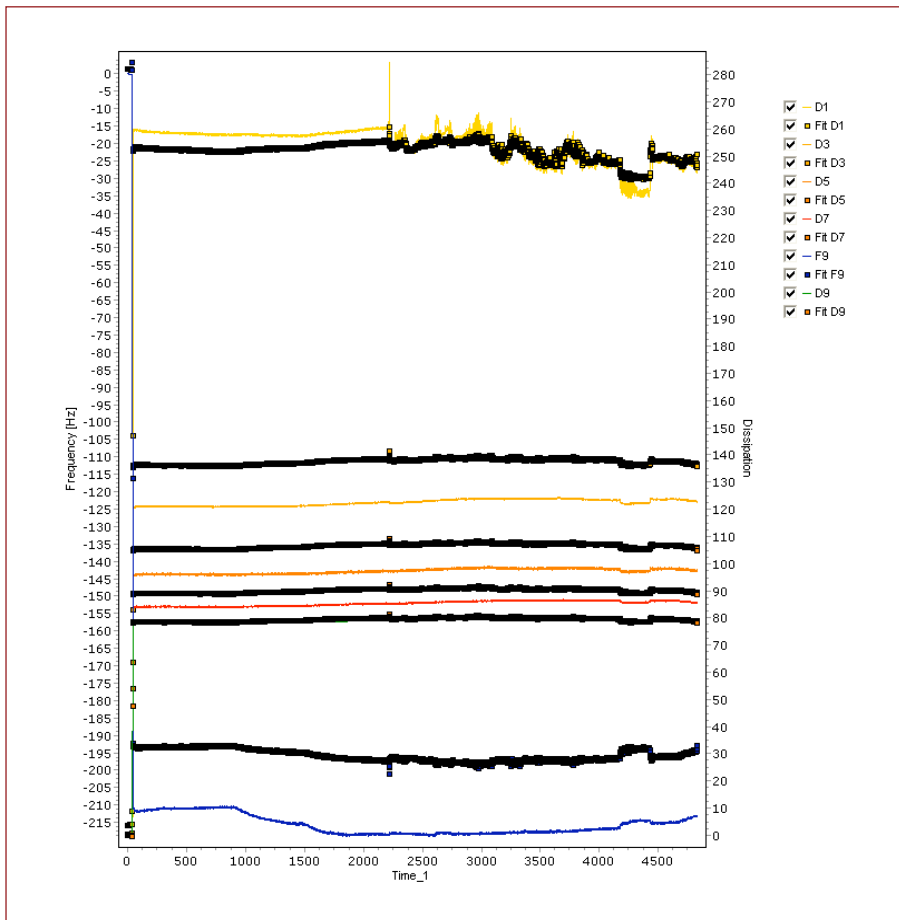


Fig. 76. Comparativa de grosor y viscosidad de la comparativa de osteoblastos en titanio a distintas frecuencias de resonancia

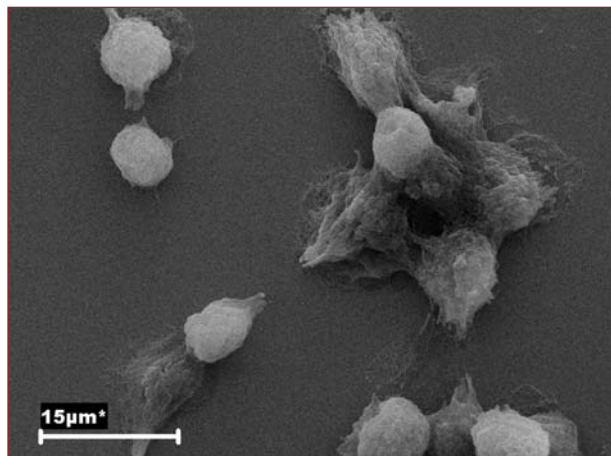
Si valoramos la viscoelasticidad de la capa de osteoblastos adsorbida, medida por el ΔD , sí que apreciamos que es inferior al tantalio y a la hidroxiapatita, esto en nuestra opinión esta en relación con hidrofobicidad del titanio, indicándonos que la capa de osteoblastos adsorbida es mas rígida si valoramos la grafica que relaciona la frecuencia y la disipación.

Por lo tanto en nuestro estudio en el que se valoró la adsorción de osteoblastos a diferentes superficies podemos considerar al titanio como el “Gold Estándar”, en parte porque es el biomaterial mas experimentado en la implantología ósea de los 3 utilizados en este estudio y porque en los datos obtenidos en este estudio fue el que mostró más homogeneidad, durante el proceso de adsorción.

Respecto a la influencia de su rugosidad y a la composición química de su superficie en lo que respecta a las aleaciones de titanio, en nuestro estudio utilizamos el llamado titanio comercialmente puro, que es el que montan en los cristales AT-cut que adquirimos para la realización de nuestro experimento y son los únicos que están disponibles comercialmente para el sistema QCM-D.

Realizamos al final del proceso un estudio de imagen de los osteoblastos adheridos a la superficie de titanio.

Fig. 76. Osteoblastos adheridos a la superficie de discos de titanio. Imagen SEM



La mayoría de los estudios clásicos han demostrado la influencia de la rugosidad del titanio en su capacidad de osteointegración^{190, 192, 193}. pero también hay estudios recientes que indican que la rugosidad del titanio, no ha influido en la adhesión de osteoblastos, ni en la viabilidad de los mismos, una vez adheridos¹⁹¹. En estos trabajos últimos, los autores realizaron un estudio de la adsorción de proteínas, crecimiento celular, y viabilidad de las células, sembrando osteoblastos en superficies de titanio con distinta rugosidades, y en medio de cultivo (DMEM con 10% de FBS) y añadiendo albumina y fibrinógeno, tras 1,4 y 7 días los osteoblastos fueron despegados de las distintas superficies y luego contados, realizando así mismo un estudio de la viabilidad de los osteoblastos mediante conversión mitocondrial. En sus conclusiones los autores manifiestan que la rugosidad de la superficie tuvo escaso efecto en la adsorción de proteínas, ni en la conducta de crecimiento celular.

Un estudio posterior de Li y col.¹⁹⁴ utilizaron nuestra misma línea celular Saos-2, con 3 distintas aleaciones de titanio y con diferentes rugosidades. En su estudio comprobaron que los osteoblastos se adherieron peor a las superficies rugosas del HF-Ti, que a las superficies lisas de N-Ti o de P-Ti. Considerando en otras palabras que el relieve de la superficie influyó poco en la propagación, y en la migración de osteoblastos. Los datos de este estudio indican que los osteoblastos de la línea Saos-2 se propagaron peor en superficies rugosas que en lisas, pero otros autores publicaron resultados contrarios con mayor adhesión a superficies rugosas¹⁹⁵. Los autores muestran que la propagación y la migración de los osteoblastos disminuye en superficies rugosas de titanio, apreciando una débil adhesión local y una organización pobre de los filamentos de actina en las superficies rugosas.

Recientemente recubrimientos de aleaciones de N-Ti, han sido utilizadas para mejorar la biocompatibilidad, recubriendo las superficies de titanio. Se ha comunicado que el N-Ti reduce la adhesión bacteriana y disminuye la inflamación de los tejidos peri-implante en vivo¹⁹⁶. Pero no se han demostrado diferencias en lo que respecta al crecimiento celular, ni en los perfiles de expresión genética de los osteoblastos cultivados en N-Ti con los cultivados en P-Ti¹⁹⁷.

En el momento actual parece haber cierta controversia en lo que se refiere a la rugosidad de las superficies de titanio y la adhesión de osteoblastos, pensamos que en parte es consecuencia, de las variaciones en la medición de la tipología de las superficies de titano, y que quizás no se ha podido reproducir la situación presente in vivo, con las interacciones de las proteínas del espacio extracelular y su adhesión a las superficie del biomaterial lo cual regulara la adsorción de osteoblastos, En los distintos experimentos “in vitro” realizados se ha intentado conseguir un modelo semejante, pero se han realizado estudios, con distintas proteínas albumina, fibrinógeno etc., pero no se ha conseguido la situación real que ocurre “in vivo”.

En nuestro estudio se valoró la adhesión de osteoblastos a superficies de Tcp, en tiempo real según van contactando con la superficie del biomaterial, sin proteínas añadidas solamente con la posible interacción del medio de cultivo utilizado. Y en el presente estudio se aprecio un importante depósito de osteoblastos en tiempo real, que es lo que se pretendió en los objetivos del estudio.

6.2.4 Adhesión de osteoblastos a hidroxiapatita

Como se ha venido diciendo las propiedades de la superficie de un biomaterial tales como su área de superficie, la carga iónica, la topografía influyen en su capacidad de adhesión celular. A este respecto los materiales nano estructurados poseen una gran área de superficie, aumentando dicha área con la rugosidad de la superficie. A este respecto la hidroxiapatita (Ha), ha sido considerado como un buen candidato para el diseño de implantes tisulares duros, por sus excepcionales propiedades biológicas, la no toxicidad, su baja respuesta inflamatoria, con escasas reacciones inmunológicas y su habilidad de tener un estrecho vinculo con el hueso neoformado¹⁹⁸. Sin embargo el carácter quebradizo, su alto modulo de Young, limita su utilización por la presión de carga necesaria en determinados implantes óseos. Esto se ha solucionado en parte recubriendo la superficie de determinados metales con Ha, con lo cual se consigue aprovechar la biocompatibilidad y su bioactividad conservando las buenas propiedades biomecánicas del metal. Sin embargo hay una cuestión que preocupa a los cirujanos ortopédicos y es la efectividad de ese recubrimiento a largo plazo, teniendo en cuenta que los recubrimientos de Ha tienen una importante solubilidad en los fluidos del cuerpo. Se ha investigado como mejorar la resistencia a su solubilidad en los fluidos orgánicos, sin sacrificar su bioactividad y su biocompatibilidad. La solubilidad de la Ha disminuye con la fluorificación de la misma ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_x(\text{OH})_{2-x}$ FHA) conservando esta ultima FHA la biocompatibilidad y la bioactividad.

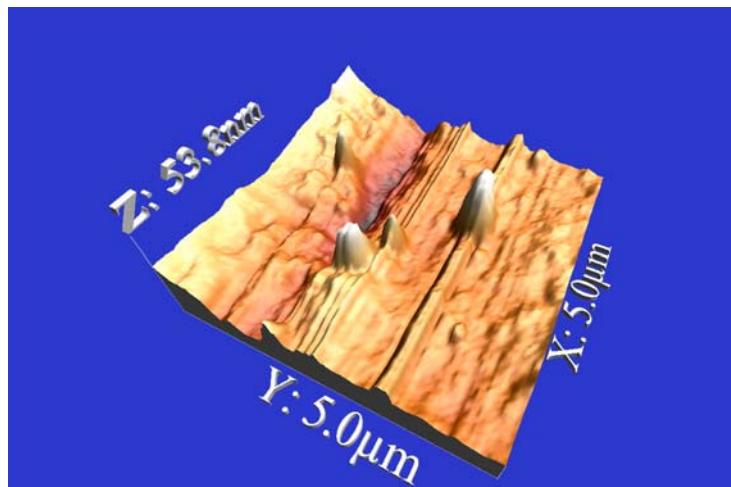
Pero se ha demostrado¹⁹⁹ que un alto contenido en F en los recubrimientos de FHA limita la adhesión de osteoblastos, reduce tam-

bién la presencia de iones Ca^{2+} al reducir la solubilidad del medio e inhibiendo la proliferación celular, por lo que es recomendable que el contenido en flúor para aplicaciones medicas sea moderado.

Otro factor atractivo en el estudio de la adhesividad celular a la Ha es explorar *si y como* la hidroxiapatita nanoestructurada con reforzamiento de sus propiedades de superficie pudiera ser utilizada para promover respuesta celular y su capacidad de unión al hueso adyacente en implantes ortopédicos y dentales. No son muchos los artículos en la literatura médica que estudian la respuesta de adhesión y proliferación de osteoblastos. Webster y col.²⁰⁰ demostraron que la síntesis de fosfatasa alcalina y el contenido de calcio mineral fue significativamente mayor en osteoblastos cultivados durante 21 y 28 días, en cerámicas nanoestructuradas que en cerámicas convencionales.

En nuestro estudio con Ha utilizamos discos recubiertos de Hidroxiapatita (Q SX 327, Q-Sense), la cual no era FHA, y su rugosidad medida por AFM oscilo entre 20 y 65 μm , por lo cual podría considerarse nanoestructurada.

Fig. 77.
superficie
de disco de
HA (Q SX 327,
Q-Sense),
utilizado en
nuestros
estudio y
medido por
AFM



En lo que respecta a la adhesión de osteoblastos, los resultados al final del experimento fueron los mejores en comparación con las otras superficies estudiadas, con un máximo de depositación de 8,25168 ng/m² y un mínimo de 7,95647 ng/ m² lo que nos indica que los valores no están dispersos, consiguiendo una mayor adhesión que en las otras superficies, en la medición realizada en tiempo real.

También debemos de destacar que en los parámetros estadísticos utilizados (Mediana y ma 68) la hidroxiapatita mostró ser la superficie con mayor capacidad de adsorción de osteoblastos como muestran las figuras 72 y 78.

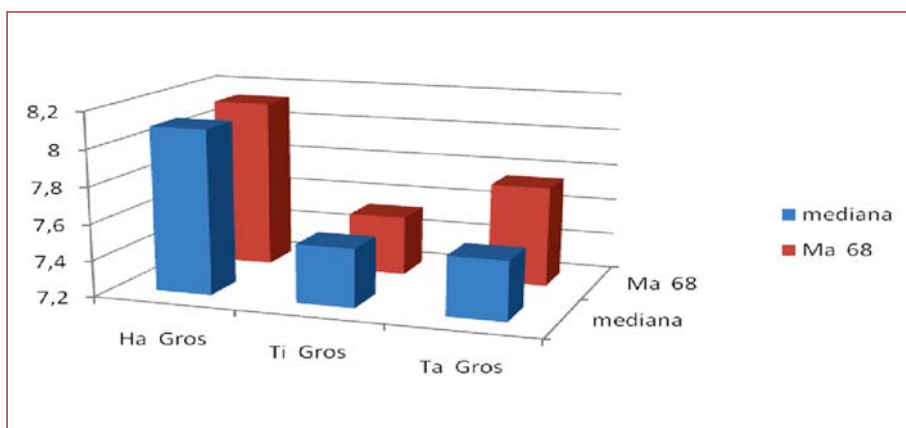


Fig. 78. Depositaciones de osteoblastos al final del experimento, valorando la mediana y el índice de dispersión ma 68

También en estudio de la capa de Ha observada por SEM se aprecia un mayor número de células adheridas a la superficie de Ha, aunque no se dispuso de método cuantitativo fiable para su medición cuantitativa, que ya realizamos con el sistema DCM-D

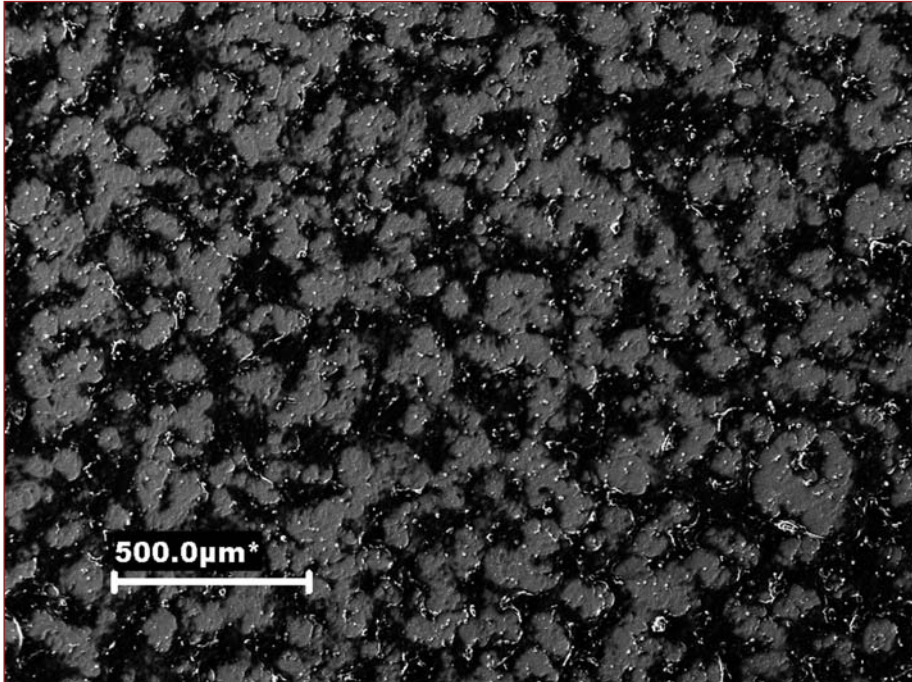


Fig. 79. Capa de osteoblastos adheridos a la superficie del disco de Ha. Impreso SEM

En lo que respecta a las propiedades de la capa viscoelástica de osteoblastos adsorbidos, apreciamos que también en los discos de Ha se apreció un mayor aumento de la ΔD y pensamos que esto es debido a que la superficie de Ha es la que posee más capacidad hidrofílica de las 3 superficies estudiadas, esto tiene su importancia dado que la superficie de osteoblastos adsorbida es más viscoelástica, y esta viscoelasticidad no altera la capa de osteoblastos adsorbida, con lo que tendría más posibilidades de adaptación a diferentes situaciones que se podrían presentar, en una posible aplicación in vivo.

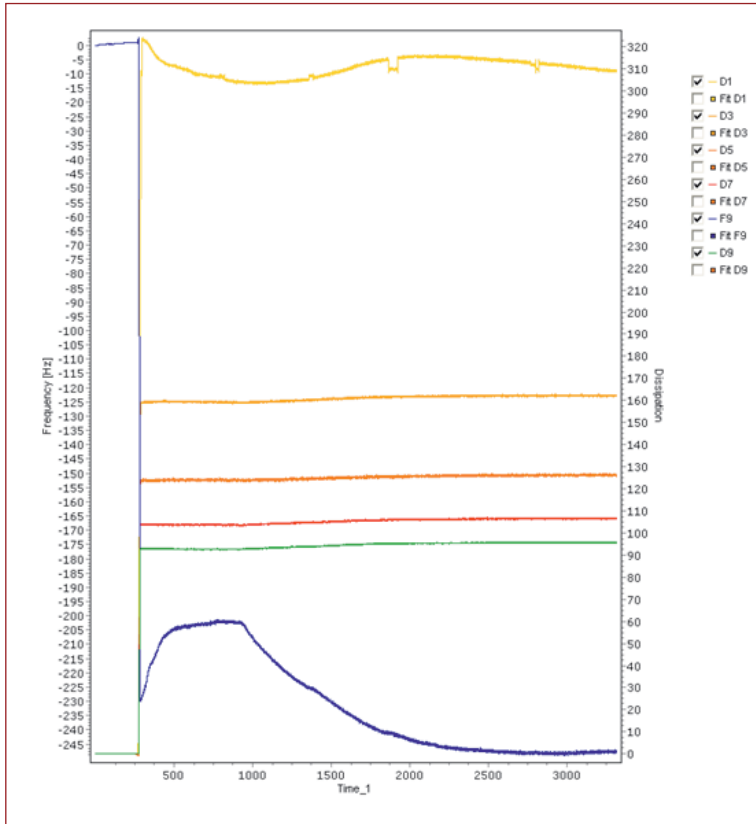
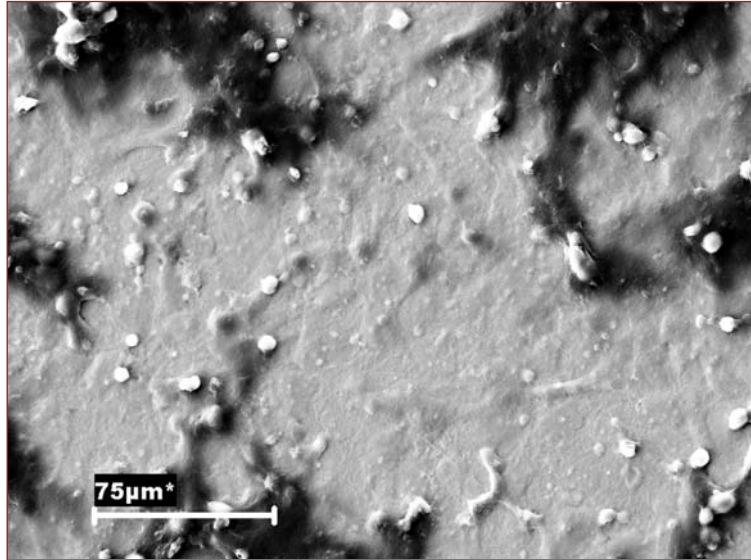


Fig. 80. Variaciones ΔD de la capa de osteoblastos adheridos de Ha, a distinta frecuencia de resonancia.

Revisando la grafica apreciamos que el ΔD , a frecuencias medias se mantiene constante, pero a frecuencias bajas de D_1 de 5 MHz, y alta D_9 45 MHz, se aprecia un cambio con aumento de la disipación a altas frecuencias que este en relación con la capa de osteoblastos adsorbida.

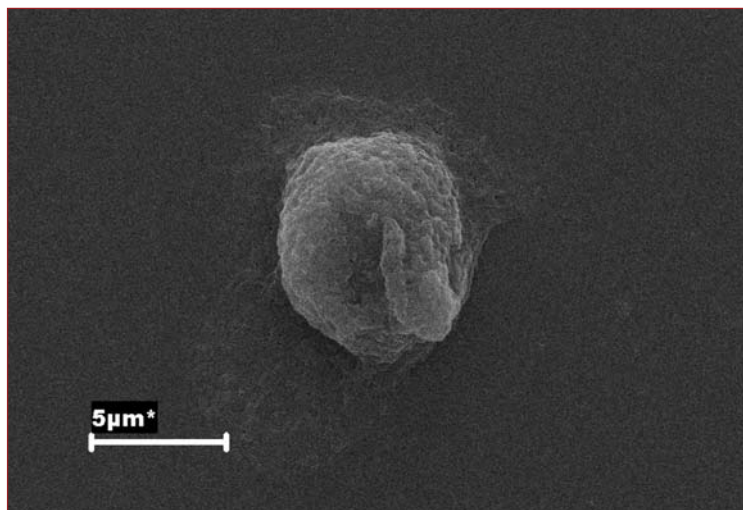
Tras el estudio por el sistema QCM-D la superficie de Ha con osteoblastos adheridos fue llevada a estudio mediante SEM, en el que pudimos apreciar que no se produjo alteración en la forma de los osteoblastos fig.82.

Fig. 81.
 Capa de osteoblastos adheridos a la superficie de Ha, apreciando que no se produce ninguna alteración en su morfología.



El mantenimiento de su forma esférica y con aspecto de estar cubierta de espículas romas en los osteoblastos adheridos tiene su importancia debido a que la conservación de esta forma influye en el desarrollo de la filopodia, para su adhesión a las distintas superficies. Así mismo esta forma facilita la de adhesión de otros osteoblastos.

Fig. 82.
 Osteoblasto con forma esférica y con espículas romas adherido a superficie del disco de Ha



Como dijimos previamente en nuestro estudio no se añadió ningún sustrato, ni proteína para mejorar la adhesión de los osteoblastos a las superficies estudiadas, solamente el medio de cultivo en el que se encontraban suspendidos los osteoblastos D-MEM, sin suero para evitar interferencias, dado que el objeto de estudio fue realizar una comparación en tiempo real y in vitro en los 3 biomateriales empleados, dado que la aplicación de una determinada proteína favorece la adhesión de osteoblastos a un tipo de superficie, y no al resto.

Por ejemplo es bien sabido que en superficies de hidroxiapatita la adherencia y la proliferación de osteoblastos es significativamente incrementada con la adición de fibronectina o de suero bovino fetal FCS²⁰¹. También se ha demostrado que la hidrofobicidad de las superficie de Ha, puede cambiar la adsorción de determinadas proteínas en su superficie, y mencionado ambiente húmedo puede llegar a cambiar la carga polar de la superficie de la Ha, alterando la adsorción de proteínas, pero ese ambiente húmedo per se puede aumentar la adhesión celular, como se demostró en este estudio con el importante ΔD . Por lo tanto podríamos concluir que en la adsorción de osteoblastos por superficies de hidroxiapatita juegan un importante papel tanto la topografía, la superficie química de la misma, la polaridad, proteínas y FCS, los fosfatos cálcicos in suero²⁰².

CONCLUSIONES



7. CONCLUSIONES

1. Los 3 biomateriales utilizados en nuestro estudio, tantalio, titanio e hidroxiapatita, han demostrado capacidad de adsorber proteínas “in Vitro”, en estudios realizados en tiempo real, en nuestro caso fibrinógeno. Hemos apreciado en el estudio comparativo realizado con el sistema QCM-D que la mencionada adsorción está en relación con las características nano-topográficas de los mismos, así como con la composición química de superficie; También se ha demostrado la influencia de la concentración de fibrinógeno en la solución empleada. Esto último tiene su importancia y nos debe hacer entender que a la hora de evaluar un material se deben de utilizar concentraciones de proteínas, cercanas a las que se apreciarían en una situación “in vivo” en el ser humano
2. También en nuestro estudio hemos observados otra serie de factores que también tienen su importancia en la adhesión de las proteínas a los biomateriales empleados, como son la composición química de la superficie del biomaterial, la carga iónica de la misma, la hidrofobicidad de la proteína y del biomaterial, el pH que puede alterar la estructura de la proteína, y la polaridad de la proteína (influida por su estructura terciaria)
3. Es obvio que las preguntas sobre la adsorción de proteínas a biomateriales, no pueden ser contestadas por una simple técnica,

requiriendo estudios en tiempo real y estudios cinéticos. En este trabajo hemos demostrado que la asociación de nano-tecnologías como es la AFM y el sistema QCM-D, pueden contribuir significativamente en esta dirección.

4. En el estudio realizado se apreció una mayor adhesión de fibrinógeno al tantalio, con una diferencia significativa con respecto al resto de los biomateriales
5. En los estudios de adhesión de osteoblastos a biomateriales “in Vitro”, no podemos valorar, las interacciones y las modulaciones que realizan las proteínas del espacio extracelular en su adhesión. Se sabe que cuando la superficie de un implante se pone en contacto con el espacio extracelular en pocos segundos produce un proceso de adsorción de proteínas, muchas de las cuales influirán en su proliferación y diferenciación.

Consecuentemente la adhesión de células sobre las superficies de biomateriales “in Vitro” es rigurosa y refleja la relativa biocompatibilidad del material implantado por lo que se debe ser crítico en la selección de biomateriales, para que puedan demostrar su óptima biocompatibilidad “in vivo”.

6. La rugosidad de la superficie es un factor importante que afecta a la adhesión, propagación celular. Sin embargo han surgido últimamente controversias entre distintos investigadores a este respecto. En nuestro estudio hubo diferencias significativas en lo que respecta a la adhesión de fibrinógeno a los 3 biomateriales empleados, que eran rugosos, con respecto al grupo control con material liso como era el oro, aunque creemos que influyeron más factores además de la rugosidad de su superficie.

7. El sistema QCM-D ha demostrado su utilidad para la realización de una cuantificación no métrica en tiempo real, de la adhesión de células a superficies de biomateriales, que no son detectables con otros sistemas como la inmunofluorescencia, el electroinmunoensayo, sistemas de microscopía etc. y sin producir deterioro en las células como se demostró al pasarlas a posteriori por el microscopio electrónico de barrido (SEM).
8. En nuestro estudio el biomaterial que demostró mayor capacidad para la adhesión de osteoblastos fue la Ha, así mismo demostró este material su capacidad de mantener de forma más homogénea las propiedades viscoelásticas de osteoblastos que adhirieron a su superficie, aunque también el Ti y el Ta mostraron una buena capacidad de adhesión, llamando la atención las el amplio rango de capacidad de adhesión que presento el Tantalio, con la homogeneidad en la adhesión que presento el titanio.
9. Los biomateriales porosos como la hidroxiapatita y el tantalio poroso también llamado "Trabecular Metal"TM parece favorecer la osteointegración de los implantes. Es por lo que se ha desarrollado últimamente el titano poroso, a base de una aleación níquel-titanio, consiguiendo porosidades variables y controlables entre el 40% y el 90%, definiéndose en mencionada porosidad pasadizos interconectados que pueden extenderse a lo largo del implante, mostrando dicha red una permeabilidad eficaz a fluidos^{203, 204, 205}. En el momento actual en Instituto de Ortopedia de Santiago de Compostela se están realizando estudios con mencionados implantes porosos de titanio.

BIBLIOGRAFÍA



8. BIBLIOGRAFÍA

1. Cordero A. Actualizaciones en Cirugía Ortopédica y Traumatología. Actualizaciones Fundación SECOT 3. Barcelona (España) Ed. Masson;2003
2. Jamisson RD, Gilbertson LN. Composite materials for implans, applications in the human body (American Society of testing and Materials). Philadelphia USA: 1993 ASTM STP 1178
3. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ and Lemonds JE editors. Bio-materials Science: an introduction to materials in medicine. New York (NY): Elsevier Sc; 1996.
4. Teoh S.H. Introduction to biomaterials engineering and processing. In: Engineering Materials for biomedical applications. Vol. I (USA) : Ed. World Scientefic; 2004. p. 1-4.
5. Ratner B.D. A perpestive in titanium biocompatibility. En titanium en medicine. Material Surface Science Engineering Biological response and medical applications. Berlin: Eds. P. Spingen Verlang; 2001. P. 1-12.
6. Willians DF, editors. Definitions in Biomaterials proceeding of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials. Chester, Progress en Biomedical Engineering. Amsterdam: Elsevier; 1987.

7. High Performance Biomaterials. Part. 2 Fundamental properties and test methods. Pennsylvania (USA). Ed. Michael Szycher Technomic Publishing Co ;1991. p. 37-142.
8. Greco R.S. Implantation Biology. In: The host response and biomedical devices. New York: John Wiley & Sons; 1988.
9. Clavel S, Nolla M, Meseguer LR. Biomateriales en Cirugía Ortopédica. En: Fundación SECOT. Ciencias básicas aplicadas a la Cirugía Ortopédica. Oviedo: 1999. p.293-306.
10. Willian FS. Fundamentos de la ciencia e ingeniería de materiales. 2ª ed. Madrid (España) Mc Graw-Hill; 1993.
11. Saykaya M, Aksay IA. Nacre of abalone shell. A natural functional monolaminate ceramic-polymer composite material in structure cellular. Synthesis and assembly of biopolymers. Berlin: S.T. Case. Springer – Velang; 1992.
12. Shaskefford JF, Introduction to materials science for engineers. New York: Mc Millan Publishing Company; 1992.
13. Young RJ. Introduction to Polymers. Semy-Cristalline polymers, (USA): Chapman and Hall;1986. Paginas 260-76
14. Teoh SH. Failure of biomaterials in compressive structural integrity. in Introduction of Biomaterials Engineering Vol 9 .Eds Y.W. Mai and S. H. Tedh. London U.K: Elsevier; 2003.
15. Varios autores, Enciclopedia de Ciencia y Técnica. Tomo 13. Titanio, Salvat Ed; S.A. 1984.
16. Gluszek J, Masalski J, Furman P, Structural and electrochemical examinations of PACVD TiO₂ films in Ringer solutions. Biomaterials 1997;18:789-94.

17. Akahori T, Niimomi M, Fukunaga K, Inagaki I. Effects microstructure on the shot fatigue crack initiation and propagation characteristics of biomedical alpha-beta titanium alloys. *Metallurgical and Materials Transactions*. 2000; (8):1949.
18. Santos EC., Osakada K, Shiomi M, Kitamura Y, Abe F. Microstructure and mechanical properties of pure titanium models. *Proceeding of the institution of mechanical Engineers*. ProQuest Science Journals 2004; 218:711.
19. Fujita T, Ogawa A, Ouchi C, Tajima H, Microstructure and properties of titanium alloy produced with the metallurgy powders process. (USA) : *Materials science and Engineering A213*; 1996. p.148-153.
20. Kuphasuk C, Oshida Y, Andres CJ, Hovijitra ST, Barco MT, Brown DT. Electrochemical corrosion of titanium and titanium-based alloys. *J Prosthet. Dent*. 2001;85 : 195-202
21. Ramires I, Guastaldi AC. Estudo do Biomaterial Ti-6Al-4V Empregandose técnicas Electroquimicas e XPS. *Quim. Nova*. 2002; 25:10-1,
22. Long M., Rack H.J., Titanium alloys in total joint replacement a materials science perspective. *Biomaterials* 1998; 19:1621-39.
23. Destefani JD. *Metals Handbook*. 10th ed. ASM International; 1996. p. 586-605.
24. Eggeler G, Hombogen E, Yawny A, Heckmann A, Wagner M. Structural and functional fatigue of NiTi shape memory alloys. *Materials Science and Engineering*. 2004;378:24-33.

25. Nakayama Y, Yamamura T, Kotoura Y, Oka M. In vivo measurement of orthopaedic implant alloys comparative study of in vivo and in vitro experiments. *Biomaterials*. 1989;10:420-424.
26. Hironobu M, Yokoyama A, Watari F, Motohiro U, Kawasaki T. Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium. *Biomaterials* 2001;22:1253-1262.
27. ASTM. Standard specification for unalloyed tantalum for surgical implant applications (ASTM F 560-98) In; Annual Book of ASTM Standards, ASTM, Philadelphia: ASTM International 1998. p.63-5
28. Bobyn JD, Toh KK, Hacking SA, Tanzer ., Krygier JJ. Tissue response to porous tantalum acetabular cups; a canine model. *J Arthroplasty* 1999;14:347-54.
29. Hamman G. Comparisons of measurements methods for characterization of porous coatings. In Lemons JE (ed): Quantitative characterization and performance of porous implants for hard tissue applications. ASTM STP 953, Philadelphia: ASTM International 1987. p.77
30. Zardiackas L., Parsell DE, Dillon LD, Mitchell DW, Nunnery LA, et al. Structure, Metallurgy and Mechanical proprieties of a porous Tantalum foam. School of Dentistry/Biomaterials, University of Mississippi Medical Center, 2500, North State Street, Jackson, Mississippi 39216
31. Xuenong Z, Haisheng i, Bünger M, Egund N, Lind M., Bünger C. Bone in growth characteristics of porous tantalum and carbon fib-

- ber interbody devices an experimental study in pigs. *The Spine Journal* 2004; 4:99-105.
32. Papakyriacou M, Mayer H, Plenk H, Stanzi-Tschegg S, Cyclic plastic deformation of tantalum and niobium at very high numbers of cycles. *Materials Science and Engineering A*. 2002; 325:520-524.
 33. Chistie MJ. Clinical applications of Trabecular Metal. *Am. J Orthop.*2002; 31:219-20
 34. Bobyn JD, Pilliar RM, Cameron HU, Weatherly GC. The optimum pore size for the fixation of porous-surfaced metal implants by the ingrowth of bone. *Clin. Orthop.* 1980;150:263-70
 35. Krygier JJ, Bobyn JD, Poggie RA, Cohen RC. Mechanical characterisation of a new porous tantalum biomaterial for orthopaedic reconstruction. SIROT. Sydney: 1999.
 36. Bobyn JD Stackpool GJ. Hacking SA. Tanzer, Krygier JJ. Characteristics of bone ingrowth and interface mechanics of a new porous tantalum biomaterial. *J Bone Joint Surg.* 1999;81:907-14
 37. Friedman RJ. Advances in biomaterials and factors affecting implant fixation. *Inst. Course Lect.* 1992; 41:127-136
 38. Jaffe W, Scott B. Current concepts review. Total hip arthroplasty with hydroxylapatite coated prosthesis. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1996; 78:1918-1934.
 39. Manley M. Calcium phosphate biomaterials: a review of the literature. En: Geesink R and Manley M.. Editores. Hydroxylapatite coatings in orthopaedic surgery. New York: Raven press, Ltd; 1993. p.1-23.

40. Kaplan FS, Hayes W, Keaveny T, Boskey A, Einhorn T, Iannotti J, Forma y Función del hueso En: Simon SR. Editores. Ciencias básicas en ortopedia. American Academia of Orthopaedic Surgeons; 1997. p.135-191.
41. Petit R. The use of hidroxyapatite in orthopaedic surgery: a ten years review. Eur. J Orthop. Surg. Traumatol 1999; 9:71-74.
42. Kay JF, Cook SD. Biologic profile of calcium-phosphate coating. En: Geesink, R. and Manley MT. Editores. Hydroxiapatite coating in orthopaedic surgery. New York: Raven press, Ltd.; 1993. p. 89-106.
43. Pasquier G., Hardouin P, Fontaine C, Migaud H, Duquennoy A. A les différents modes de comblement osseux en chirurgie orthopédique. Rev Rhum Mal Orthop. 1992; 59: 821-828.
44. Bucholz RW, Carlton A, Holmes R. Interporous hidroxyapatite as a bone graft substitute in tibial plateau fractures. Clin. Orthop. 1989; 240:15-24.
45. Kasperk C, Ewers R, Simons B, Kasperk R. Hidroxiapatita derivada de algas (ficogena). Un estudio comparativo (1). Av Period. 1990; 2:11-23.
46. Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. Clin. Orthop. 1981; 157:259-278.
47. Cook SD, Thomas KA, Kay JF, Jarcho M. Hidroxiapatite-coated titanium for use as an orthopaedic biologic attachment system. Clin. Orthop. 1988;230: 303-312.
48. Yoshinari M, Klinge B, Derand F. The biocompatibility (Cell culture and histologic study) of hidroxy-apatite-coated implants created

- by ion beam dynamic mixing. *Clint. Oral Implant Res* 1996; 7: 96-100.
49. Bloebaum RD, Beeks D, Dorr LD, Savory CG, DuPont JA et al. Comparisons with hydroxyapatite particulate separation in total hip arthroplasty. *Clint Orthop.* 1994; 298:19-26.
 50. Bauer TW, Taylor SK, Jiang M, Medendorp SV. An indirect comparison of third-body wears in retrieved hydroxyapatite-coated, porous and cemented femoral components. *Clint Orthop.* 1994;298:11-18
 51. Frayssinet P, Vidalain J, Ranz X, Cartillier J, Rouquet N. Hydroxyapatite particle migration. *Rur.J. Orthop. Surg. Traumatol.* 1999; 9:95-98.
 52. Kitsugi T, Yamamuro T, Takeuchi H, Ono M. Bonding behaviour of three types of hydroxyapatite with different sintering temperatures implanted in bone. *Clint Orthop.* 1988; 234:280-290.
 53. Benahmed M, Heyman D, Berreur M, Cottrel M, Godard A, et al. Ultrastructural study of degradation of calcium phosphate ceramic by human monocytes and modulation of this activity by HILDA/LIF cytokine. *J Histochem Cytochem* 1996; 44: 1131-40.
 54. Cook SD, Thomas KA, Kay JF. Experimental coating defects in hydroxyapatite coated implants. *Clint Orthop.* 1991; 265:280-90.
 55. Overgaard S, Soballe K, Lind M, Bunger C. Resorption of hydroxyapatite and fluorapatite coating in man. An experimental study in trabecular bone. *J Bone Joint Surg. Br.* 1997;79: 654-59.

56. Martin RB, Chapman MW, Sharkey NA, Zissimos SL, Bay B et al. Bone ingrowth and mechanical properties of collarine hidroxiapatite I yr. after implantation. *Biomaterials* 1993;14: 341-348.
57. Holmes RE, Bucholz RW, Mooney V. Porous hidroxiapatite as a bone graft substitute in diaphyseal defects. A histometric study. *J Bone Joint Surg. Am.* 1986;68:904-11.
58. Furlong R. The application and clinical behaviour of hidroxiapatite ceramic in prosthetic coatings. *J Bone Joint Surg. Br.* 1998;80:31-32.
59. Cook SD, Thomas KA, Kay JF, Jarcho M. Hydroxiapatite-coated titanium for orthopaedics implant applications. *Clint. Orthop.* 1988; 232(b):225-243.
60. López SA, Val J, Gonzalo J, Gorrochategui I, Buelta, L, et al. La influencia del revestimiento de hidroxiapatita y de biovidrio en la osteointegración de implantes de titanio. *Rev. Ortop. Traum.* 1997; 41:173-81.
61. Tisdell CL, Goldberg VM, Parr JA, Bensusan JS, Staikoff LS, Stevenson S, The influence of a hidroxiapatite and tricalcium-phosphate coating on bone growth into titanium fibber-metal implants. *J Bone Joint Surg. Am.* 1994; 76: 159-171.
62. Kester M, Manley MT, Taylor SK, Cohen R. Influence of thickness on the mechanical properties and bond strength of HA coating applied to orthopaedic implants. 37th Annual Meeting Orthopaedic Research Society 1991 Mar 4-7; Anaheim, California.
63. Wang BC, Lee TM, Chang E. The shear strength and the failure mode of plasma-sprayed hidroxiapatite coating to bone: the ef-

- fect of coating thickness. *J Biomed Mater Res.* 1993; 27:1315-27.
64. David A, Eitenmuller J, Muhr G, Pommer A, Bar HF, et al. Mechanical and histological evaluation of hydroxyapatite-coated, titanium-coated and grit-blasted surfaces under weight-bearing conditions. *Arch Orthop. Trauma Sur.* 1995; 114:112-18.
65. Serekian P. Process application of hydroxyapatite coating. En: Greesing R. and Manley MT editors. *Hydroxyapatite coating in orthopaedic surgery.* New York: Raven Press. Ltd 1993; p. 405-409.
66. Osborn J. Die biologische leistung der hydroxylapatitkeramikbeschichtung auf dem femurschaft einer titanendoprothese – erste histologidche auswertung eines humanexplantats *Biomed Tech.*1987; 32(Ber.):177-183.
67. Furlong RJ, Osbornj F. Fixation of hip prosthesis by hydroxyapatite ceramic coating. *J Bone Joint Sur Br.* 1991; 73:741-45.
68. Geesink R, de Goot K, Klein CP, Bonding of bone to apatite-coating implants. *J Bone Joint Sur Br.* 1988; 70: 17-22.
69. Geesing R. Experimental and clinical experience with hydroxyapatite –coated hip implant. *Orthopaedics.* 1989; 12:1239-42.
70. Rothman R, Hozack W, Ranawat A, Moriarty L. Hydroxyapaptite-coated femoral stems. A matched-pair analysis of coated and ancoated implants. *J Bone Joint Sur Am* 1996; 78:319-24.
71. Soballe K, Toksvig LS, Gelinek J, Fruensgaard S, Hansen ES, et al. Migration of hydroxyapapatite coated femoral prosthesis.

- A roentgen stereophotogrammetric study. *J Bone Joint Sur Br.* 1993; 75: 681-87.
72. Geesing, R. Hydroxylapatite-coated total hip replacement: five years clinical and radiological results. En Geesing R. and Manley MT editorial. *Hydroxylapaptite coating in orthopaedic surgery.* New York: Raven Press, Ltd; 1993. p.171-208.
73. D'Antonio JA, Capello WN, Jaffe WL, Hydroxyapatite-coated hip implants: A multicenter study with three-year minimum follow-up. En: Geesink R and Manley MT editors. *Hydroxylapatite coatings in orthopaedic surgery.* New York: Raven Press;1993. p. 209-226.
74. Capello WN. Hydroxyapatite in total hip arthroplasty: five year clinical experience. *Orthopaedics* 1994;17: 781-92.
75. Geesing R, Hoefnagels NH. Six-years results of hydroxyapatite-coated total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br.* 1995; 77: 534-547.
76. McPherson E, Friedman RJ, Dorr LD. The APR-I experience with hydroxyapatite. En: Geesing, R and Manley MT editores. *Hydroxyapatite coatings in orthopaedic surgery.* New York: Raven press;1993. p. 249-262.
77. Karrholm J, Malchau H, Snorrason F, Herberts P. Micro motion of femoral stems in total hip arthroplasty. A randomized study of cemented hydroxyapatite-coated and porous-coated stems with roentgen sterophotogrammetric analysis. *J Bone Joint Surg Am.* 1994; 76:1692-1705.

78. McPherson E, Dorr LD, Gruen T, Saberi M, Hydroxyapatite-coated proximal ingrowth femoral stems. A matched pair controls study. *Clint Orthop.* 1995; 315: 223-230.
79. Epinette J, HA.coated hip implants: a 10 years follow-up. *Eur. J. Orthop. Surg Traumatol* 1999; 9: 83-85.
80. Vidalain J. The corail system in acetabular revisions. *Eur. J Orthop. Surg. Traumatol.* 1999; 9:111-14.
81. Verhaar J. Early clinical results of hydroxyapatite-coated total Knee replacement. En Geesing, R and Manley MT editors. *Hydroxyapatite coatings in orthopaedic surgery.* New York: Raven Press; 1993. p. 297-304.
82. Epinette J. Hydroxyapatite in knee arthroplasty. *Eur J Orthop Surg Traumatol.* 1999; 9:115-18.
83. Laurent P. Total cementless Knee prosthesis with hydroxyapaptite coating: results with the Alfenor prosthesis after more than 6 year. *Eur J Orthop Sur Traumatol.* 1999; 9:119-121.
84. Fini M, Giovaresi G, Greggi T, Martín L, Aldini NN, et all. Biological assessment of bone-screw interface after insertions of uncoated and hydroxyapaptite-coated pedicular screws in the osteopenic sheep. *J Biomed Mater Res Am.* 2003;66:176-183.
85. Spivak JM, Neuwirth MG, Labiak JJ, Kummer FJ, Ricci JL. Hydroxyapaptite enhancement of posterior spinal fixation. *Spine* 1994; 19: 955-964.
86. Lapresle P, Missenard G. Hydroxilapatite-coated Diapason screws: first clinical report. *J Spinal Disord.* 1995;(Suppl. I):31-39.

87. Rubbi CP. Light microscopy essential data. (UK) John Wiley Sons, Chichester: 1994. p.. 109.
88. Slayter EM, Slayter HS. Light and Electron Microscopy. Cambridge University Press. 1992. (UK) p. 212
89. Goldstein JI, Newbury DE, Echlin P, et all. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. New York: Plenum Press;1992. p. 820.
90. Hernández F. Historia de la microscopía electrónica. 1 Los primeros microscopios electrónicos. Rev. Costarricenc Cienc Med 1987; 8:199-202.
91. Hawkes P. The beginnings of electron microscopy. Orlando: Academic Press, Inc;. 1985.
92. Galli G, Gruizzard S, Passari G, Martín D, Tinti A, et all. Comparison of human mandibular osteoblasts grown in two commercially available surfaces titanium implant surfaces, J Periodontl. 2005;76 : 264-372
93. Binning G, Quate CF, Gerber CH. Atomic Force Microscope. Phys Rev Lett 1986;56:930-933.
94. Yang PC, Chen Y, Vaez-Iravani M, Attractive mode atomic force microscopy with optical detection on orthogonal cantilever/sample configuration. J Appl Phys 1992; 71: 2499-2502.
95. Dreier M, Anselmetti D, Güntherodt HJ. Dynamic force microscopy in liquids. J Appl Phys 1994; 76:5095-98.
96. Göken M, Kempf M, Microstructural properties of super alloys investigated by nanoindentations in an atomic force microscope. Act Mater 1999; 47:1043-1052

97. Kempf M, Göken M, Vehoff H. Nanohardness measurements for studying local mechanical properties of metals. *Appl Phys A: Mater Sci Process* 1998; 66:s843-846
98. Gahlin R, Jacobson S. Novel method to map and quantify wear on a micro-scale. *Wear*, 1998; 222: 93-102.
99. Amelio S, Goldade AV, Rabe U, Scherer V, Bhushan B, Microscope. *Methods*. 2003;29:175-187.
100. Arnold W. Measurements of elastic properties of ultra-thin diamond-like carbon coatings using atomic force acoustic microscopy. *Thin Solid. Films* 2001;392: 75-84
101. Asahhab M, Salapaka MV, Dahleh M, Mezić I. Dynamical analysis and control of micro cantilevers, *Automatica* 1999; 35:1663-70
102. Jalili N, Dadfarina M, Dawson DM, A fresh insight into the micro-cantilever sample interaction problem in no-contact mode atomic force microscopy. *ASME J Dyn Sys Measurements Control*:2004; 126: 909-11
103. Jena, B.P., Horber, H., *Atomic Force Microscopy in cell biology*. New York: Academic press Paperback;2002.
104. Albrecht TR. Grutter P, Horne D, Rugar D. Frequency detection using High-Q cantilevers for enhanced force microscope sensitivity. *J Appl Phys* 1991; 69-668.
105. Dagata JA, Schneir J, Harary NH, Evans CJ, Postek MT, Bennett J. Modification of hydrogen-passivated silicon by a scanning tunnelling microscope operating in air. *Appl Phys Lett* 1990; 56.2001

106. Alexander S, Hellems L, Marti O. An Atomic resolution, atomic-force microscope implemented using optical level. *J Appl Phys.* 1989; 65: 164-167
107. Magonov SN, Eling VB, Whangho MH. Phase imaging and stiffness in tapping-mode atomic force microscopy. *Surf Sci* 1997; 375: 1385-91
108. Tamayo J, Humphis AD, Owen RJ, Milles MJ. High-Q Dynamic force microscopy in liquid and its application to living cells. *Biophys.* 2001; 81: 526-537
109. Putman CAJ, Vanderwerf KO, Degrooth BG. Tapping mode atomic force microscopy and liquid. *Appl Phys Lett.* 1994;64:2454-2456
110. Florin EL, Moy VT, Gaub HE. Adhesive forces between individual ligand-receptor pairs. *Science*1994; 264:415-417
111. Stossel TP,.On the crawling of animal cells. *Science* 1993; 260:1086-1094
112. Folkman J, Moscona A, Role of cells saphe in growth control. *Nature*1978; 273:345-349
113. De Vecchio D, Bhushan B, Localiced surface elasticity measurements using an atomic force microscope. *Rev. Scientific. Instum.* 1997;68 :4498-4505
114. Sackmann E. Intra and extracellular macromolecular networks physics and biological function. *Macromol. Chem. Phys.*1994; 195:491-497.
115. Simon A., Cohen-Bouhacina T, Aime JP, Ponte MC, Amedee J, Baquey C. Heterogeneous cell mechanical properties: an atomic force microscopy study. *Cell Mol Biol.* 2004;50: 255-266.

116. Mathur AB, Collinsworth AM, Reichert WM, Kraus WE, Truskey GA. Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy. *J Biomech.* 2001;34:1545-1553
117. Rotsch C, Radmacher M, Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts. An atomic force microscopy study. *Biophys. J.* 200;78:520-553
118. Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* 1999;20:2311-2321
119. Charras GT, Horton MA. Single cell mechanotransduction and its modulations analysed by atomic force microscope indentation. *Biophys.* 2002; 83:858-879
120. Simon A, Cohen-Bouchacina T, Ponte MC, Aime JO, Aime JP, Amedee J, Bareille R, Basquey C. Characterization of dynamic cellular adhesion of osteoblasts using atomic force microscopy. *Crytometry* 2003;54A:36-47
121. Domke J, Dannohl S, Parak WJ, Muller O, Aicher WK, Radmacher M, Substrate dependent differences in morphology and elasticity of living osteoblasts investigated by atomic force microscopy. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 2000;19:367-379
122. Van Wachem PB, Schakenraad JM, Feijen J, Beugeling T, Van Aken WG, Blaauw EH, Nieuwenhuis P, Motenaar I. Adhesion and spreading of cultured endothelial cells on modified and unmodified poly (ethylene terephthalate). A morphological study. *Biomaterials* 1989;10:532-539
123. Enderle J, Blanchard S, Bronzino J. Introduction to Biomedical Engineering, Second Edition, Elsevier 2005, 159-168

124. Medin Ch, Strane AL, Foss M. QCM-D studies of attachment and differential spreading of pre-osteoblastic cells and Ta and Cr surfaces. *Biomaterials*.2006;27:1346-1354
125. Rodahl M, Hook F, Krozen A, Braenzinki P, Kasemo B. Quartz crystal Microbalance setup for frequency and Q-factor measurements gaseous and liquid environments. *Rev Sci Instrum*. 1995;66: 3924-3940
126. Keller CA, Kasemo B. Surface, specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a Quartz Crystal Microbalance. *Biophys. J*. 1998;75 : 1397-1402
127. Pavey KD, Burnes LM, Hanlon GW, Ollif CS, Ali Z, Paul FA. Rapid non destructive method, for determination of staphylococcus epidermidis adhesion to surfaces using quartz crystal resonance sensor. *Technology let. Appl. Microbiol*. 2001; 33 :344-348
128. Voinuz MV, Rodahl M, Johnson M, Kasemo B. Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces. *Continuum mechanics approach. Phys Ser*. 1999;59 :391-396
129. Fredrikson C, Kihlman S, Rodahl M, Kasemo B. The piezoelectric quartz crystal mass and dissipation sensor, a means of studying cell adhesion. *Langmuir*.1998;14 :248-51
130. Marx KA, Zhou TA, Montione A, Schulze H, Braunhut SJ. A quartz crystal microbalance alteration in living cell at nM nocoda zone concentrations. *Biosens. Bioelectron*. 201;16 : 773-82
131. Rodahl M, Kasemo B. Basic and applications of QCM-D and nanoparticle Plasmon sensing. *Sci Industri*. 1996;67:132-38

132. Voinova MV, Rodahl S, Jonson M, Kasemo B. Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces: continuum mechanics approach. *Phys Scr.* 1999; 59 :391-6
133. Radepenning J, Schsinger TK, Mechalke EJ, Puleo DA, Bizios R. Osteoblast attachment monitored with a quartz crystal microbalance. *Anal. Chem.* 1993;65:3378-81
134. Wegener J, Seebachs J, Janshoff A, Galla HJ. Analysis of the composite response of shear wave resonators to the attachments of mammalian cell. *Biophys J.* 2000; 78 : 2821-33
135. Cans As, Hook F, Shupliakov O, Ewing AG, Eriksson PS, Brodin L. Measurement of the dynamic of exocytosis and vesicle retrieval at cell populations using a quartz crystal microbalance. *Anal. Chem.* 2001; 73:5805-11
136. Mars KA, Zhou T, Warren M, Braunhut SJ. Quartz crystal microbalance study of endothelial cell number dependent differences in initial adhesion and steady-state behaviour evidence for cell-cell cooperatively in initial adhesion and spreading. *Biothechnol Prog.* 2003;19: 987-99
137. Maexer CM, Coen MC, Greber T, Greber UF, Schlapbach L. Cell spreading on quartz crystal microbalance elicits positive frequency shifts indicative of viscosity changes. *Anal. Bioanal Chem.* 2003;377:578-86
138. Andrade JD, Hlady V. *Avances en Polymer science.* 1986;vol.79:1-63
139. Marco MP, Barcelo D. *Measurements Science and Technology.* 1996; 7:1549-62

140. Mac Donald DE, Deo N, Markovic B Stranick M, Somasundaran P. Adsorption and dissolution behaviour of human plasma fibronectin on thermally and chemically modified titanium dioxide particles. *Biomaterials* 2002;23 :1269-79
141. Mc Guire J, Kirisdhasima V, Amebrang T, Wahlgren MC. Proteins at interfaces II. A.C.S. Symposiums Series 602; 1995 Ed. Washington D. C. :53
142. Mc Guire J, Wahlgren MC, Arnebrang T, Journal of Colloid and Interface science 1995;179:182-92
143. Mac Donald DE, Rapuano BE, Deo N, Stranick M, Somasundaran M, Boskey AL, Thermal and chemical modification of titanium-aluminium. Vanadium implant materials: effects on surfaces properties glycoprotein absorption and MG63 cell attachment. *Biomaterials*. 2004; 25 :3135-46
144. Glomm WR, Halskan O Jr, Hanneseth AM. Adsorption behaviour of acidic and basic .proteins onto citrate-coated Au surfaces correlated to their native fold, stability, and pI. *J.Phys.Chem.B*. 2007 Dec. 27; 111 :14329-45
145. Cha P, Krishnan A, Fiore VF, Vogler EA. Interfacial Energetics of Protein Adsorption from Aqueous Buffer to Surfaces with Varying Hydrophilicity. *Langmuir*. 2008;30: 2553-63 (Epub ahead of print)
146. Dhayalan A, Jurkowski TP, Laser H, Reinhardt R, Jia D, Cheng X, Jeltsch A. Mapping of protein-protein interaction sites by “absence of interference” approach . *J Mol Biol*. 2008 Feb 29; 376 : 1091-9
147. Gueninguer D, Treiber N, Ziegler MO, Koetter JV, Schulze MS, Schulz GE. Designed protein-protein association .*Science* 2008, *Science*. 2008 Jan 11;319(5860):206-9.

148. Backovic A, Huang HL, Del Frari B, Piza H, Huber LA, Wick CH. Identification and dynamics of proteins adhering to the surface of medical silicones in vivo and in vitro. *J Proteome Res.* 2007; 6:376-81
149. Vroman L, Adams AL. Adsorption of proteins out of plasma and solutions in narrow spaces. *J Colloid Interface Sci.* 1985; 111 : 391-42
150. Slack SM, Horbertt AM. Proteins and interfaces II Symposium Series 602. Ed. Washington DC ;1995. p. 113.
151. Lin J, Wang LJ, Fang XH, Study of fibrinogen adsorption on self assembled monolayers on Au by atomic force microscopy, Ultra-microscopic. 2005;105:129-36
152. Tang L, Eaton JW. Fibrinogen mediates acute inflammatory responses to biomaterials. *J. Exp. Med.* 1993;178:2147-56
153. Grunkemeier JM, Tsai WB, McFarland CD, Horbett TA. The effect of adsorbed fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor and fibronectin on the precoagulant state of adherent platelets. *Bio-materials.* 2000;21:2243
154. Tang L, Eaton J. Fibrinogen mediates acute inflammatory responses to biomaterials. *J. Exp. Med.* 1993;178:2147
155. Jenney CR, Anderson JM, Adsorbed serum proteins responsible for surface dependent human macrophage behaviour. *J Biolog Mater Res.* 2000;49:435-47
156. Tang L, Eaton JW. Fibrinogen mediates acute inflammatory response to biomaterials. *J Exp Med.* 1993;178:2147-56

157. Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR, Shwartz Z. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials*. 1998; 19:2219-32.
158. Habibovic P, Li J, Van der Valk CM, Maijer G, Layrolle P, Van Blitterswijk CA, et al. Biological performance of uncoated and actocalcium phosphate-coated Ti₆Al₄V. *Biomaterials* 2005;26:23-36.
159. Diener A, Niever B, Lüten F, Becker P, Beck U, Neumann HG, Rychly J. Control of focal adhesion dynamics by material surface Characteristics. *Biomaterials* 2005;52:413-21
160. Álvarez de Zayas C. Metodología de la investigación científica. Santiago de Cuba: Centro de Estudios Superiores Manuel F Grau:1995.
161. Anderson JM. Biological responses to materials. *Annu. Rev Mater Res*. 2001;31:81-110
162. Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Pearcy MJ. Mediation of biomaterial-cell interactions by absorbed proteins: a review. *Tissue Eng*. 2005;11: 1-18
163. Horbett TA, Brash JL. Proteins and interfaces II. *Fundament Appl* 1995; 602: 112
164. Hu WJ, Eaton JW, Ugarova TP, Tang L. Molecular basis of biomaterial-mediated foreign body reactions. *Blood*. 2001; 98:1231-8
165. Xu LC, Siedlecki CA. Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials*.2007;28(22):3273-83

-
166. Hemmersan AG, Foss M, Chevallier J, Besembacher F. Adsorption of fibrinogen on tantalum oxide, titanium oxide and gold studied by QCM-D technique. *Coll And Surf B*. 2005; 43: 208-15.
167. Caster D.G., Ratner B.D. Evaluating protein attraction and adhesion to biomaterials with Atomic Force Microscopy. *Surf Sci*. 2002; (500):28-60.
168. Galli C, Coen MC, Hauert R, Katanaev VL. *Colloids. Surf. B* 2002; 26: 255-67.
169. Cai K, Bossert J, Jandt K. Does the nanometer scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation? *Col and Sur. B*. 2006; 2:138-44
170. Lee NK, Vilgis TA. Preferential adsorption of hydrophobic polar model proteins on patterned surfaces. *Phys Rev E*. 2003; (67) es este el volumen del artículo: 050901 ®
171. Vertegel AA, Siegel RW, Dordick JS. Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of absorbed lysocyme. *Langmuir*. 2004; 20: 6800-07.
172. Riedel M, Müller B, Wintermantel E. Protein adsorption and monocyte activation on germanium nanopyramids. *Biomaterials*. 2001; 22 : 2307-16
173. Zhang ZH, Feng CL. The investigation behaviors on different functionalized polymers films. *Biotechnol J*. 2007; 2: 743-51
174. Huang YW, Gupta VK. A SPR and AFM study of the effect of surface heterogeneity on absorption of proteins. *J Chem Phys*. 2004; 121 :2264-71

175. Rechendorff K, Hovgaard MB, Foss M, Zhdanov VP, Besenbacher F. Enhancement of protein adsorption induced by surface roughness. *Langmuir*. 2006; 22: 10885-88
176. Nath N, Hyun J, Ma H, Chilkoti A. Surface engineering strategies for control of protein and cell interactions. *Surf Sci*. 2004; 570 : 98-110
177. Keselowsky BG, Collard DM, García AJ. Surface Chemistry modulates fibronectin conformation and direct integrin binding and specify to control cell adhesion. *J Biomed Mater Res*. 2003; 66A: 247-59
178. Levine BR, Sporer S, Poggie RA, Della Valle CJ, Jacobs JJ. Experimental and clinical performance of porous Tantalum in orthopedic surgery. *Biomaterials* 2006;27:4671-4681
179. 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; 73:315-324.
180. Stiehl JB. Trabecular metal in hip reconstructive surgery. *Orthopedics* 2005; 29:368-374
181. Cohen R. A porous tantalum trabecular metal: basic science. *Am. J. Orthop.* 2002; 31: 216-217
182. Adams JE, Zobitz ME, Reach JS Jr. An KN, Lewallen DG, Steinmann SP. Canine carpal joint fusion: A model for four-corner arthrodesis using a porous tantalum implant. *J Hand Surg. (Am)* 2005; 30:1128-1135.

-
183. Christie MJ. Clinical applications of trabecular metal. *Am J Orthop* 2002; 31:219-220.
 184. Unger AS, Lewis RJ, Gruen T. Evaluation of a porous tantalum uncemented acetabular cup in revision total hip arthroplasty clinical and radiological results of 60 hips. *J Arthroplasty*. 2005; 20:1002-1009.
 185. Rahbek O, Kold S, Zippor B, Overgaard S, Soballe K. Particle migration and gap healing around trabecular metal implants. *Int. Orthop*. 2005; 29:368-374
 186. Welldon KJ, Atkins GT, Howie DW, Findlay DM. Primary human osteoblasts grow into porous tantalum and maintain an osteoblastic phenotype. *J Biomed Mater Res A*. 2008; 84 : 691-701
 187. Findlay DM, Welldon KJ, Atkins GT, Howie DW, Zannettino AC, Bobyn D. The proliferation and phenotypic expression of human osteoblasts on tantalum metal. *Biomaterials*. 2004; 25: 2215-2227.
 188. Khang W., Feldman S., Hawley CE., Gunsoley J., A multi-center study comparing dual acid-etched and mechanical-surfaced implants in various bone qualities . *Journal of Periodontology* 2001; 1384-1390
 189. Eriksson C, Nygren H, Ohlson K. Implantation of hydrophilic and hydrophobic titanium disc in rat tibia: cellular reactions on the surface during the first 3 weeks in bone. *Biomaterials*. 2004; 25: 4759-4766
 190. Jarayaman M., Meyer U, Buhner M, Joos U, Wiesmann HP. Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cell in vitro. *Biomaterials*. 2004; 24:625-631

191. Cai K, Bossert J, Jandt KD. Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation. *Coll and Suf.* 2006; 49:136-144.
192. Brunette DM, Chehroudi B. The effects of the surface topography and micro machined titanium substrata on cell behavior in vitro and in vivo. *J Biotech. Eng.* 1999; 121: 49-57.
193. Huang HH, Ho CT, Lee TH, Lee TL, Liao KK, Chen FL. Effect of surface roughness of grown titanium on initial cell adhesion. *Biomol. Eng.* 2004;21:93-97
194. Li Ch, Gao S, Terashita T, Shimokowa T, Kawahara H, Matsuda S, Kobayashi N. In vitro assays for adhesion and migration of osteoblastic cells (Saos-2) titanium surfaces. *Cell. Tissue Res.* 2006 ; 324:369-375.
195. Eligianni DD, Katsala N, Ladas S, Sotiropoulo D, Amedee J, Misirlis YF. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials.* 2001; 22: 1241-1251.
196. Scarano A, Piattelli M, Vrespa G, Caputi S, Piattelli A. Bacterial adhesion on titanium nitride-coated and uncoated implants: an in vivo human study. *J Oral Implantol.* 2003; 29: 80-85.
197. Kawahara D, Koike H, Kawahara H. Initial implant stability: Clinical Testing Methods and its evaluation. *Avd. Scienc. and Technol.* 2006; 49:269-74.
198. Vallet-Regi M, González –Calvet JM. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Prog. Solid. Chem.* 2004; 32: 1-31.

199. Cheng K, Weng W, Wang H, Zhang S. In vitro behavior of osteoblasts like cells on fluoridated hidroxiapatita coatings. *Biomaterials* 2005; 26:6288-6295
200. Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramic. *Biomaterials*. 2000; 21: 187-208
201. Schönmeyr BH, Wong AK, Li S, Gewal F, Cordero PG, Mahara BJ. Treatment of hidroxiapatita scaffolds with fibronectin and fetal calf serum increases osteoblasts adhesion and proliferation in vitro. *Plast. Reconst. Surg.* 2008; 121:751-62.
202. Dos Santos EA, Farina M, Soares GA, Anselme K. Surface energy of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate ceramics driving serum protein adsorption and osteoblast adhesion. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;19 : 307-16.
203. De Medeiros WS, de Oliveira MD, Pereira LC, de Andrade MC. Bioactive porous titanium an alternative to surgical implants. *Artif Organs* 2008;32 :277-82
204. Lopez de Heredia MA, Sohier J, Gaillard C, Quillard S, Dorget M, Layrolle P. Rapid prototyped porous titanium coated with calcium phosphate as a scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2008; 29: 2608-15.
205. Wu S, Liu X., Chan YL, Chu PK, Chung CY, et al. Nickel release behavior and surface Characteristics of porous NiTi shape memory alloy modified by different chemical processes. *J Biomed Mater Res A.* 2008; 22(4): (Epub). Ahead of print)

9. GLOSARIO DE TÉRMINOS EMPLEADOS

AENOR Agencia española de normalización de materiales

AFM Microscopio de Fuerza atómica.

Aloinjerto Injerto en el que donante y receptor son de la misma especie, pero de diferente genotipo.

Angstrom Unidad de longitud empleada principalmente para expresar distancias moleculares y atómicas $1\text{\AA}=1\text{ m} \times 10^{-10}=0,1\text{ nm}$

Autoinjerto Injerto en el que donante y receptor son el mismo sujeto.

Biocompatibilidad Propiedad de un material o sustancia de poder implantado en un ser vivo, generalmente en el ser humano, sin producirle efectos indeseables.

Biodegradable Dicho de un compuesto químico que puede ser degradado por acción biológica.

Cantiléver Especie de palanca o viga que solo está sujeta por un extremo, soportando cargas en su extremo libre.

Citotoxicidad Cualidad de una sustancia u organismo de ser toxico a células, ejemplos de agentes tóxicos, sustancias químicas, bacterias, una células de la inmunidad.

Composite Materiales compuestos de dos o más sustancias, con propiedades físicas o químicas significativamente diferentes, las siguen manteniendo sus diferencias dentro de la estructura acabada.

Ductilidad Propiedad de ciertos de ciertos metales y aleaciones, cuando bajo la acción de una fuerza pueden deformarse sin romperse.

Elipsometria Espectroscópica es una técnica de análisis óptica que se basa en el cambio de estado de polarización de la luz que se incide sobre un material. Mencionado análisis no es destructivo y es útil para la determinación de espesores de películas delgadas, está basado en el índice de refracción.

Escala de Mohs Es una relación de 10 materiales ordenados en función de su dureza, escala de dureza .

Estructura Martensica Nombre que recibe la fase cristalina en aleaciones ferrosas, y se caracteriza por experimentar transformaciones sin difusión.

Feed-Back Retroalimentación.

Foto detector Transductor de luz que proporciona una señal eléctrica como respuesta a la refracción óptica que incide sobre la superficie sensora.

Fragilidad Capacidad de un material de fracturarse con escasa deformación.

Fuerzas de Van der Waals Son fuerzas de estabilización molecular, forman un enlace químico, no covalente en el que participan 2 tipos de fuerzas o interacciones, las fuerzas de dispersión (que son fuerzas

de atracción) y las fuerzas de repulsión entre las capas electrónicas de dos átomos contiguos.

Ha Hidroxiapatita.

Hidrofobicidad Capacidad de repeler o no adsorber agua.

Inmunogenicidad Capacidad de activar reacciones inmunológicas.

ISO Organización internacional par estandarización de materiales.

Ley de Hooke También llamada ley de la elasticidad de Hooke mantiene que la deformación de un material elástico es directamente proporcional a la fuerza aplicada.

Micrón Medida de longitud que equivale a un micrómetro 1/1000000.

Modulo de Young También llamado modulo de elasticidad, es un parámetro que caracteriza el comportamiento de un material elástico, según la dirección en que se aplica una fuerza.

Monómero Molécula de pequeña masa molecular, que unida a otros monómeros, por medio de enlaces químicos, generalmente covalentes forma macromoléculas llamadas polímeros. Suelen ser unidades básicas o moléculas orgánicas relativamente simples, con estructura definida estabilizada y específica.

Nano indentación Sistema de realizar marcas a escala manométrica en sustancias habitualmente realizadas con un AFM.

Nanotecnología Campo de las ciencias aplicadas dedicado al control y manipulación de la materia a escala menor de un micrómetro, es decir a nivel de átomos y moléculas.

Osteoconducción Proceso tridimensional de crecimiento de brotes peri vasculares y células osteoprogenitoras desde un lecho receptor al interior de un injerto

Osteoinducción Terminio que se refiere a la transformación de células mesenquimales indiferenciadas peri vasculares en células ostoformadoras, en presencia de ciertas sustancias polipeptidicas (ej. BMP) y de un ambiente tisular favorable.

Osteointegración Unión mecánica firme, directa, estable y duradera ente un hueso vivo y un biomaterial.

Osteolisis Perdida, destrucción o reabsorción ósea.

Paramagnético Se denomina paramagnético a los materiales o medios cuya permeabilidad magnética es similar a la del vacío.

Pasivación Formación de una película relativamente inerte, sobre la superficie de un material que lo enmascara frente a la acción de agentes externos.

Piezoelectricidad Es un fenómeno presentado por determinados cristales que al ser sometidos a tensiones adquiere una polarización eléctrica en su masa, apareciendo una diferencia de potencial y cargas eléctricas en su superficie. Este fenómeno también se presenta a la inversa, esto es, se deforman bajo la acción de fuerzas internas al ser sometidos a un campo eléctrico. El proceso piezoeléctrico es generalmente reversible: al dejar de someter a los cristales a un voltaje exterior o campo eléctrico, recuperan su forma.

Pirolisis Descomposición química de materia orgánica causada por el calentamiento en ausencia de oxígeno u otros reactivos.

Polímero Macromoléculas (generalmente orgánicas) formadas por la unión de moléculas más pequeñas llamadas monómeros, pueden ser naturales, semisintéticos y sintéticos.

QCM-D Sistema Cuarzo Cristal Micro balance con Disipación.

SEM Microscopio electrónico de Barrido.

Ta Tantalio.

TEM Microscopio Electrónico de transmisión.

Tenacidad En ciencias de los materiales se define como la energía total que absorbe un material hasta romperse.

Ti Titanio.

Transformación alotrópica Transformación de la estructura de un metal por acción del calor

