



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN

DEPÓSITO DE PELICULAS DE CARBONO
AMORFO Y NITRURO DE CARBONO SOBRE
ACERO 316L VALORADAS EN FUNCIÓN A UN
MODELO DE BIOMINERALIZACIÓN *IN VITRO*

T E S I S

QUE PRESENTA

RENÉ OLIVARES NAVARRETE

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

Tutor :

DR. HIGINIO ARZATE

Asesor :

DRA. SANDRA E. RODIL POSADAS





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A theory is something nobody believes, except the person who made it. An experiment is something everybody believes, except the person who made it.

Albert Einstein.

Mystery creates wonder and wonder is the basis of man's desire to understand.

Neil Armstrong.

Agradecimientos

Al finalizar esta tesis, uno debe de parar y pensar en toda la gente y los eventos que han contribuido a la realización de este trabajo. Cuando hago esto pienso en todas las situaciones que pase en el doctorado, tanto buenas como malas, e incluso en las malas experiencias encuentro cosas positivas, quizá por el hecho de que tenemos que aprender continuamente de los errores para poder solucionar los problemas venideros. Por otro lado, pensando en las personas que me han ayudado a realizar esta etapa de mi vida, “es justo y necesario” agradecerle a las siguientes personas:

Primeramente quiero agradecerle al Dr. Higinio Arzate, “mi jefe”. Higinio muchísimas gracias no sólo por permitirme trabajar en tu laboratorio, sino por enseñarme a trabajar en él, enseñarme el maravilloso mundo de la biología celular de los osteoblastos, ser paciente cuando mis conocimientos no eran los suficientes para entender muchos procesos, por apoyarme en momentos difíciles y por dejarme realizar una investigación en un área diferente a la tuya.

A mi otra “jefa”, la Dra. Sandra Rodil. Sandra no tengo palabras para agradecerte todo lo que me haz ayudado, fuiste un claro de luz en medio de la oscuridad cuando te conoci. Gracias por enseñarme el mundo de las películas delgadas y la posibilidad de apicarlas en este trabajo. Muchísimas gracias por todo el apoyo que me brindaste.

Al Dr. Federico Barceló, muchísimas gracias por brindarme la primera oportunidad de realizar investigación. Usted es el responsable de que estudiara un doctorado.

A la Dra. Elba Leyva, gracias por la ayuda recibida desde la coordinación del programa, por las pláticas, los consejos y sobre todo por aguantarme las quejas del programa.

A los miembros de mi jurado de examen de grado. Dra. Cristina Piña, Dra. Margarita Rivera, Dr. Luis Felipe Jiménez, Dr. Jesus Chimal, Dr. Carlos Alvarez, Dr. Marco A. Alvarez. Muchas gracias por leer mi tesis y darme sus comentarios. En verdad fue muy enriquecedor para este trabajo su opinión.

A Carlos Magaña y José Guzman, muchísimas gracias por su ayuda en los ensayos de biomineralización, sin ustedes no hubiera sido posible observar nada en los microscopios del Instituto de Física y del Instituto de Investigaciones en Materiales.

A todos mis compañeros del laboratorio, Marco, Viridiana, Bruno, Pedro, Eduardo, muchas gracias por brindarme su amistad, sus puntos de vista, ayudarme, enseñarme, pero sobre todo por las maravillosas discusiones científicas que me obsequiaron.

A mis nuevos compañeros, Patricia, Ana Lilia, José Luis, por su amistad y por ayudarme en mis épocas “difíciles” al escribir esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio del Instituto de Investigaciones en Materiales, Jairo y Claudia, gracias por su ayuda y por enseñarme muchos conceptos y técnicas.

A la Dra. Barbara Boyan y al Dr. Zvi Schwartz, gracias por aceptarme en el laboratorio de Ingeniería de tejidos musculoesqueléticos, aún sin conocerme, por brindarme su apoyo incondicional y la posibilidad de aprender y seguir aprendiendo en su laboratorio.

A mis amigos, David, Eunice, Carlos, Joel, Rafa, Luis, Victor, por echarme porras, por estar atentos en mi vida academica y por su amistad, gracias.

A mis padres, Roge y Rosa, por entender el cambio tan radical al cambiar el consultorio por una pipeta y unos cuantos pesos menos. Sin ustedes este trabajo no hubiera sido posible. No me bastarían los días para agradecerles todo lo que han hecho por mi.

Finalmente, pero no menos importante a Argelia. Honey, gracias por compratir tu tiempo conmigo, por enseñarme lecciones de vida, por darme fuerza, por ser como eres, pero sobre todo por estar conmigo, muchisimas gracias y este trabajo también es tuyo. Te amo.

Indice

| | |
|--|-------------------------------|
| Agradecimientos | ¡Error! Marcador no definido. |
| Resumen | ¡Error! Marcador no definido. |
| Abstract..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Introducción..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Planteamiento del problema | ¡Error! Marcador no definido. |
| Justificación | ¡Error! Marcador no definido. |
| Hipótesis | ¡Error! Marcador no definido. |
| Objetivo general..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Objetivos específicos | ¡Error! Marcador no definido. |
| Capítulo I | ¡Error! Marcador no definido. |
| Biomateriales | ¡Error! Marcador no definido. |
| Definición | ¡Error! Marcador no definido. |
| Biomateriales metálicos..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Materiales metálicos de implantación | ¡Error! Marcador no definido. |
| Aleaciones de Cobalto-Cromo (Co-Cr) | ¡Error! Marcador no definido. |
| Acero inoxidable..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Titanio y aleaciones | ¡Error! Marcador no definido. |
| Corrosión de los implantes metálicos | ¡Error! Marcador no definido. |
| Modificación de superficies..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Razones para la modificación de superficies..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Métodos mecánicos | ¡Error! Marcador no definido. |
| Métodos químicos..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Métodos físicos | ¡Error! Marcador no definido. |
| Carbono..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Carbono amorfo | ¡Error! Marcador no definido. |
| Biomineralización..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| CAPÍTULO II..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Diseño experimental | ¡Error! Marcador no definido. |
| Metodología..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Muestras experimentales | ¡Error! Marcador no definido. |
| Depósito de películas..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Medición de las propiedades físicas de las películas..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Obtención de células..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Ensayos de adhesión celular | ¡Error! Marcador no definido. |
| Proliferación celular..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Ensayo de citotoxicidad..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Ensayos de diferenciación celular | ¡Error! Marcador no definido. |
| Ensayo de actividad específica de fosfatasa alcalina | ¡Error! Marcador no definido. |
| Ensayo de inmunodetección por western blot contra BSP..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Ensayo de biomineralización | ¡Error! Marcador no definido. |
| Análisis estadístico | ¡Error! Marcador no definido. |
| CAPÍTULO III..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Resultados..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Primera etapa | ¡Error! Marcador no definido. |
| Caracterización Física de los Recubrimientos..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Composición de las películas..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Perfilometría y microscopía de fuerza atómica (AFM)..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Transmisión de luz UV/visible | ¡Error! Marcador no definido. |

| | |
|--|-------------------------------|
| Caracterización biológica | ¡Error! Marcador no definido. |
| Adhesión celular | ¡Error! Marcador no definido. |
| Proliferación celular..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Viabilidad celular..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Biom mineralización..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Mapeos químicos | ¡Error! Marcador no definido. |
| Modificación de la rugosidad superficial | ¡Error! Marcador no definido. |
| Rugosidad promedio..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Caracterización biológica de las superficies con rugosidad controlada; | ¡Error! Marcador no definido. |
| Adhesión celular | ¡Error! Marcador no definido. |
| Estudio morfológico de la adhesión celular..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Segunda etapa | ¡Error! Marcador no definido. |
| Adhesión celular | ¡Error! Marcador no definido. |
| Proliferación celular..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Viabilidad celular..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Diferenciación celular..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Actividad específica de la fosfatasa alcalina | ¡Error! Marcador no definido. |
| Inmunodetección por western blot de Sialoproteína Ósea (BSP); | ¡Error! Marcador no definido. |
| Biom mineralización..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Discusión | ¡Error! Marcador no definido. |
| Anexo 1..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Anexo 2..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Anexo 3..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Bibliografía..... | ¡Error! Marcador no definido. |

Resumen

Películas de carbono amorfo (a-C) y titanio (Ti) fueron depositadas sobre sustratos de acero inoxidable de grado médico (SS) usando un sistema de magnetron sputtering de corriente directa unido a una cámara de alto vacío. Se realizaron estudios *in vitro* utilizando células derivadas de hueso alveolar. Los osteoblastos se cultivaron en muestras de a-C, Ti y SS, para evaluar la adhesión y proliferación, estos ensayos se realizaron utilizando una técnica espectroscópica de conteo celular indirecto asociadas a una curva estándar. El porcentaje de osteoblastos adheridos a 24 horas obtuvo los valores máximos en las muestras de a-C. Resultados similares se encontraron en los ensayos de proliferación, los cuales fueron evaluados a 3, 5 y 7 días de cultivo, estos resultados muestran un considerable incremento de osteoblastos en las muestras de a-C comparadas con las muestras de Ti y SS. La citotoxicidad fue evaluada con el ensayo de MTT después de 3, 5 y 7 días de incubación. Los valores de absorbancia obtenidos muestran que a-C tuvo mayores valores que las muestras control, indicando que dicha superficie no induce ningún efecto tóxico en periodos cortos y largos de cultivo. La diferenciación celular fue evaluada a través de 2 ensayos, actividad específica de fosfatasa alcalina (ALP) e inmunodetección de sialoproteína ósea (BSP) por western-blot. En el ensayo de actividad de ALP, las células fueron incubadas por 3, 7 y 14 días. Las muestras de a-C mostraron una mayor actividad de ALP que las muestras de Ti y SS en todos los tiempos evaluados. La expresión de BSP fue evaluada después de 7 y 14 días de cultivo, este ensayo mostró una mayor expresión de BSP en las superficies de a-C en los 2 tiempos estudiados en comparación con las muestras de Ti y SS. Para los ensayos de biomineralización, osteoblastos humanos fueron incubados por periodos mayores de 14 días, en este ensayo, se evaluaron los depósitos mineralizados de la matriz extracelular utilizando microscopía electrónica de barrido y mapeos químicos. Micronálisis de rayos-X realizados a nódulos mineralizados presentes sobre las muestras de biomineralización, mostraron razones Ca/P de 1.6 o cercanas a esta razón, siendo esta razón, similar a la encontrada en la hidroxiapatita. Este estudio sugiere que las películas de a-C pueden ser utilizadas para modificar la superficie de implantes biomédicos.

Abstract

Amorphous carbon (a-C) and titanium (Ti) films were deposited on medical grade stainless steel substrates (SS) using a direct current (dc) magnetron sputtering system attached to a high vacuum chamber. In vitro studies were performed on the coated samples using human alveolar bone-derived osteoblastic cells. Osteoblastic cells were grown on a-C, Ti and SS samples to evaluate cellular attachment and proliferation. These tests were determined by direct cellular counting using spectroscopic techniques and a well defined standard curve. The percentage of osteoblastic cells attached at 24 hours, attained maximum values for a-C films. Similarly, cellular proliferation evaluated at 3, 5 and 7 days showed an outstanding increase of osteoblastic cells for a-C in contrast with Ti and uncoated steel. Cytotoxicity was evaluated by the MTT test after incubation periods of 3, 5 and 7 days. The absorbance values obtained for a-C resulted significantly higher than the positive control, indicating that the surface did not induce any toxic effect in the short and the long terms. The cellular differentiation was evaluated in two assays, alkaline phosphatase specific activity and bone sialoprotein immunodetection by western-blot. To assess the ALP activity, osteoblastic cells were grown for 3, 7 and 14 days. The a-C films showed higher ALP activity than Ti and SS at the terms described. The BSP expression was assessed after 7 and 14 days of cell culture, the results showed a higher expression of BSP in a-C samples than Ti and SS. For Biomineralization assay, human osteoblastic cells were grown on a-C and SS samples for periods up to 14 days. Deposition of mineralized matrix by osteoblastic cells was evaluated using scanning electron microscopy and scanning mapping x-ray analysis. X-ray microanalysis of the nodules demonstrated the bone-like nature of the mineralized nodules, with Ca/P ratios around 1.6, similar to bone hydroxyapatite of biological type. Our results suggest that a-C films could be valuable alternative to be used in order to modify the surface of biomedical implants.

Introducción

En los últimos años se ha generado un aumento en el desarrollo de modificaciones superficiales, principalmente en materiales metálicos, para aplicaciones biomédicas, el objetivo de una gran parte de estas modificaciones es la de permitir al hueso oseointegrarse a los metales utilizados en implantes dentales y ortopédicos. La oseointegración se define como el íntimo contacto entre la superficie del implante y el tejido óseo sin que exista una interfase fibrosa entre estas. Los parámetros necesarios para la conservación de un implante a largo plazo incluyen la biocompatibilidad del material a implantar, las características físicas y químicas de su superficie, el procedimiento quirúrgico de colocación del implante, así como el tiempo y la forma en que es puesto en actividad. Por lo tanto la biocompatibilidad es sólo uno de los parámetros que influyen en la respuesta del tejido al material implantado, la respuesta deseada es la formación de fosfatos de calcio así como de hidroxiapatita sobre la superficie del implante. Con base en esto, se han realizado varias modificaciones que, en modelos teóricos, favorecerían la formación de hueso sobre el implante, estas modificaciones pueden afectar al diseño macroscópico del material a implantar para favorecer la traba mecánica del implante, otras modificaciones se ocupan de la rugosidad superficial del material y un tercer grupo de modificaciones afecta directamente la química de la superficie con el fin de facilitar el depósito de fosfatos de calcio sobre la superficie del material, es en este último grupo donde se ubican las modificaciones con recubrimientos, sin embargo el desprendimiento de estos recubrimientos, principalmente fosfatos de calcio, hidroxiapatita y óxido de aluminio, han obligado a desarrollar otras estrategias para lograr una mejor y más rápida oseointegración. Materiales como el carbono han demostrado ser biocompatibles e incluso oseoinductores, se han realizado muchos estudios sobre materiales y recubrimientos de carbono y en ellos la respuesta siempre ha sido favorable para este elemento, esto, sumado a la utilización de recubrimientos en algunos aparatos médicos reafirma el potencial de este elemento como una posible solución al problema de la oseointegración. Sin embargo, es de suma importancia estudiar y comprender las interacciones célula-sustrato ya que estas dictarán los procesos biológicos posteriores a la colocación de un implante, dichos procesos son pasos fundamentales en la creación de nuevos conocimientos encaminados a la elaboración de

materiales diseñados para aplicaciones específicas. Por lo tanto, estos pasos tienen que ser evaluados para conocer si el material es biocompatible y cómo este afecta los procesos biológicos naturales de las células y en dado caso si estimula y favorece algunos procesos biológicos.

Planteamiento del problema

Los materiales utilizados hoy en día en la implantología dental u ortopédica son, en su mayoría, materiales metálicos, algunos de ellos con modificaciones en su textura o rugosidad, sin embargo, se sabe que los materiales metálicos sufren de corrosión y esta corrosión se ve aumentada cuando se colocan en un medio ambiente hostil y complejo como lo es el cuerpo humano, en el que muchos materiales de experimentación que han sido exitosos *in vitro* han fracasado. Incluso en metales como el titanio o la aleación mas común de titanio Ti6Al4V, se ha observado que existe desprendimiento de iones, de los 3 metales que comprenden esta aleación, que pueden afectar al tejido adyacente al implante y por lo tanto causar el fracaso y por ende la pérdida del implante. La aplicación de un recubrimiento cuya función sea la de evitar la corrosión del metal, sea biocompatible y que incluso favorezca los procesos fisiológicos de los osteoblastos puede ser la solución a este problema. Aún con esto, los materiales como el titanio, el acero inoxidable quirúrgico (316L) y diversas aleaciones de titanio y Co-Cr son los materiales de elección en procedimientos ortopédicos o de implantología dental. Desgraciadamente no toda la población puede acceder a este tipo de tratamientos, ya que el costo de los implantes es sumamente elevado. Este problema podría ser solucionado con metales de bajo costo con las propiedades mecánicas necesarias para su utilización en implantología y ortopedia como el acero inoxidable, pero con un recubrimiento que evitara su corrosión y además favoreciera los eventos celulares que llevan a la oseointegración del implante. Por otro lado, la elección del material óptimo es compleja y costosa debido a la poca información existente sobre las funciones celulares en materiales que no sean titanio o alguna de sus aleaciones, evita el desarrollo de nuevos materiales, es por eso, que este trabajo pretende generar conocimiento de dicha interacción.

Justificación

Las modificaciones superficiales con películas delgadas en distintos materiales utilizados en el campo biomédico han propiciado notables mejoras en su aplicación, debido a que solo se modifica la superficie del material dejando completamente intactas las propiedades internas del material, como lo son, la resistencia mecánica, módulo flexural, etc., Algunas de estas modificaciones parecen ser una alternativa para lograr mejores resultados con los materiales de implantación dental y ortopédica. Esta modificación puede alterar la textura, composición, morfología y propiedades físicas de la superficie, por lo que el campo de aplicación de estas películas es muy amplio. Una película que no cause una respuesta tóxica en el organismo y que sea capaz de mejorar o regular las respuestas biológicas de las células en contacto con el implante aumentando la actividad celular puede servir para mejorar el funcionamiento, así como, disminuir el costo del implante, y se podría pensar en que mayor número de pacientes podrían tener acceso a este tipo de tratamientos.

Hipótesis

Se sabe que las interacciones implante-célula están reguladas por las características físico-químicas de la superficie del implante, por otro lado, la mayor parte de los implantes están elaborados de materiales metálicos que no mimetizan la química de los tejidos, por lo tanto si se desarrolla una modificación nanométrica aislando al material base con un material que se encuentre en todo organismo humano como lo es el carbono, entonces las respuestas celulares se verán favorecidas al no estar en contacto con elementos ni materiales diferentes a los encontrados en el organismo y por lo tanto los procesos celulares se realizarán en menor tiempo lo que conllevará a un proceso de osteointegración del material modificado.

Objetivo general

Evaluar biológicamente las películas de carbono amorfo sobre materiales de uso ortopédico como una mejora a estos materiales.

Objetivos específicos

- Obtener diferentes tipos de películas de carbono sobre sustratos de acero 316L y determinar cual de ellas presenta una mejor respuesta biológica en sistemas de cultivo celular *in vitro*.
- Determinar la adhesión y proliferación de osteoblastos sobre películas de carbono amorfo y titanio depositadas sobre sustratos de acero 316L, así como sustratos de acero 316L sin recubrimiento, y determinar cuál de ellas presenta mejor respuesta por parte de osteoblastos.
- Evaluar la toxicidad de las película de carbono amorfo y titanio depositadas sobre sustratos de acero 316L y los sustratos de acero 316L sin recubrimiento empleando osteoblastos humanos por medio de pruebas de MTT.
- Determinar si la interacción de las células con la película de carbono amorfo favorece la diferenciación celular de osteoblastos humanos, así como determinar si las películas de carbono amorfo permiten el depósito de material mineralizado.
- Evaluar el efecto de la morfología de la película de carbono amorfo, medido a través de la rugosidad, en la adhesión de osteoblastos *in vitro*.

CAPÍTULO I

Biomateriales

Definición

Un biomaterial es aquel material que constituye partes o la totalidad de implantes médicos, aparatos extracorporales e instrumentos desechables que han sido utilizados en medicina, cirugía, odontología y medicina veterinaria, así como también en productos para el cuidado de los pacientes. Los institutos nacionales de salud (NIH) definen a los biomateriales como cualquier sustancia o material o combinación de éstos, que no sean drogas, de origen natural o sintético, el cual puede ser utilizado como un todo o como una parte de un sistema que es parte del tratamiento, aumento o reemplazo de algún tejido, órgano o función del organismo (Williams 1992). Cuando estos materiales provocan una respuesta que es compatible con la funcionalidad de los tejidos durante el periodo de tiempo del tratamiento, se dice que estos materiales son biocompatibles (Black 1992). Dentro de los biomateriales encontramos a los materiales llamados bioinertes, los cuales no provocan ningún tipo de respuesta en los tejidos y su estructura es retenida en el cuerpo sin producir alguna reacción inmunológica o biológica (Black 1992) y a los materiales bioactivos, estos materiales han sido diseñados para tener una interacción con las células y tejidos adyacentes y así provocar o modular una respuesta sobre esas células o tejidos (Williams 1992). Los implantes bioactivos en el hueso, tienen el propósito de mejorar las interacciones entre las células y el material de implantación para poder llevar a cabo los procesos que conlleven y faciliten la mineralización de la matriz extracelular sobre la superficie del implante.

El concepto de biocompatibilidad se define como la compatibilidad de los materiales y dispositivos de fabricación artificial con los tejidos y líquidos corporales. En general, la biocompatibilidad se mide sobre la base de citotoxicidad localizada, respuestas generalizadas, alergenicidad y carcinogenicidad. El término biocompatibilidad es muy amplio, y comprende el desarrollo de nuevos métodos de prueba, para los cuales el estudio de los materiales *in vitro* es indispensable para conocer su posible interacción en los diferentes

contextos biológicos. El propósito de las pruebas de biocompatibilidad es eliminar cualquier posible material o elemento presente que pueda causar daño a células y tejidos. Estas pruebas se hacen en células, animales y humanos.

Biomateriales metálicos

Los metales han sido utilizados casi exclusivamente para implantes que requieren carga mecánica, como prótesis de cadera y rodilla, además de aparatos de fijación de fracturas como clavos, tornillos, placas, alambres y grapas; en partes o componentes de válvulas cardíacas, stents y marcapasos.

La mayor parte de los metales se utilizan como aleaciones y muy pocas veces son utilizados como metales puros.

Tres grupos de materiales son los más utilizados como metales biomédicos: acero inoxidable 316L, aleaciones de cobalto-cromo y aleaciones de titanio, así como titanio puro. La tabla 1 muestra la composición elemental de estos materiales.

| Elemento | Acero 316L | Co-Cr-Mo | Ti puro | Ti-6Al-4V |
|-----------------|-------------------|-----------------|----------------|------------------|
| Al | --- | --- | --- | 5.5-6.5 |
| C | 0.03 | 0.35 | 0.01 | 0.08 |
| Co | --- | Balance | --- | --- |
| Cr | 17.00 | 26.00-30.00 | --- | --- |
| Fe | Balance | 0.75 | 0.30-0.50 | 0.25 |
| H | --- | --- | 0.012-0.015 | 0.012 |
| Mo | 2.00 | 5.00-7.00 | --- | --- |
| Mn | 2.00 | 1.0 | --- | --- |
| N | --- | 0.25 | 0.03-0.05 | 0.05 |
| Ni | 10.00 | 1.00 | --- | --- |
| O | --- | --- | 0.18-0.40 | 0.13 |
| P | 0.03 | --- | --- | --- |
| S | 0.03 | --- | --- | --- |
| Si | 0.75 | 1.00 | --- | --- |
| Ti | --- | --- | Balance | Balance |
| V | --- | --- | --- | 3.5-4.5 |
| W | --- | --- | --- | --- |

Composición elemental de las aleaciones y metales más utilizados en implantología.

Tabla 1. *la tabla muestra las diferente composición elemental de las aleaciones comúnmente utilizadas en implantología. Modificado de Brunette 2001, Keller 1986, Keating 1986.*

Materiales metálicos de implantación

Los materiales metálicos utilizados para implantes se remontan a los primeros años del siglo XX, siguiendo el desarrollo de las técnicas quirúrgicas asépticas en la segunda mitad del siglo XIX. Los primeros implantes utilizados con un éxito limitado fueron placas de fijación para fracturas, muchos de ellos fracasaron debido al diseño, otros debido a la composición del material y otros más a las pobres propiedades mecánicas del material. La década de 1930 trajo materiales como el acero inoxidable y las aleaciones de cobalto-cromo (Co-Cr) que representaron una mejora en los materiales de implantación debido a su alta resistencia a la corrosión, aún en medios biológicos. Estos materiales fueron exitosamente utilizados y a ellos se sumó el titanio y sus aleaciones en la década de los 50's. En la actualidad las aleaciones más utilizadas para implantes metálicos siguen siendo las aleaciones de titanio, acero inoxidable y Co-Cr, dependiendo de las condiciones del paciente y del prejuicio de los cirujanos.

Aleaciones de Cobalto-Cromo (Co-Cr)

La aleación Co-Cr utilizada para aplicaciones médicas tiene una composición en el intervalo de 70-75% de Co y 25-30% de Cr. Sin embargo, otros elementos han sido introducidos en la aleación para mejorar sus características (Park 1992). Las variaciones de la resistencia mecánica observadas en aleaciones de Co-Cr son debido al tamaño del grano y en parte a la cantidad y distribución de los carburos existentes en la aleación (Ratner 1996). Las aleaciones de Co-Cr forjadas tienen mucho mayor ductilidad y son capaces de ser trabajadas en frío. El principal atributo de estas aleaciones es la resistencia a la corrosión en ambientes con cloro, lo cual está relacionado con su composición en bulto así como también por su óxido superficial (normalmente Cr_2O_3). Esta aleación ha sido utilizada exitosamente por mucho tiempo en la industria aeroespacial y biomédica. Su aceptación biológica ha sido demostrada por diversas aleaciones que en su momento recibieron el nombre de Satellite (aleaciones de Co-Cr con microestructuras de forma de estrella) y por Vitallium durante la década de los 1920's (Ratner 1996). Las aleaciones de Co-Cr muestran quizá el mejor balance entre corrosión, resistencia mecánica y resistencia a la fatiga comparadas con otras aleaciones para implantes.

Actualmente se pueden encontrar diversos aditamentos para implantes ortopédicos o para aplicaciones dentales de aleaciones de Co-Cr, algunos de ellos son tornillos, alambres, clavos, partes de articulaciones así como prótesis vasculares y válvulas cardíacas.

Acero inoxidable

El acero inoxidable es una aleación de hierro (Fe), cromo, níquel (Ni) y carbono, siendo el Cr (>11% en peso) el mayor componente que promueve la resistencia a la corrosión del acero inoxidable. El Cr es un elemento reactivo, susceptible de ser pasivado brindando así una excelente resistencia a la corrosión debido a la formación de una fuerte y adherente capa de óxido (Cr_2O_3). Sin embargo, la adición de Cr a la aleación reduce las propiedades mecánicas del acero (Keating 1986). Los aceros inoxidables tipo 316 y 316L son ampliamente utilizados en implantes. Para aumentar la resistencia a la corrosión del acero inoxidable 316 en soluciones con cloro, la cantidad de carbono es reducida de 0.08% en peso a 0.03%, para restringir al máximo la formación de carburos dando lugar al acero inoxidable 316L (bajo en carbono). Así mismo el níquel es adicionado a la aleación con la finalidad de estabilizar la fase austenítica, además de incrementar la resistencia a la corrosión (Keating 1986).

Los aceros 316 y 316L no pueden ser endurecidos por tratamientos por calor pero pueden ser endurecidos por trabajo en frío. Este grupo de aceros inoxidables no es magnético y posee mejor resistencia a la corrosión que cualquier otro acero inoxidable. Los implantes fabricados de acero inoxidable incluyen placas de reducción de fracturas, clavos, tornillos, alambres, grapas y partes de reemplazo de articulaciones.

Titanio y aleaciones

El titanio (Ti) es el cuarto metal estructural más abundante sobre la tierra, únicamente el aluminio, hierro y magnesio son más abundantes que él. Es 20 veces más abundante que el cromo, 30 veces más que el níquel, 60 más que el cobre, 100 más que el tungsteno y 600 más que el molibdeno (Boyer 1994). Las calidades del titanio comercial químicamente puro (>99% en peso) se divide en diferentes grados de pureza, de acuerdo al contenido de impurezas de hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, carbón y hierro. El oxígeno, carbón y nitrógeno incrementan su resistencia mecánica pero disminuyen su ductilidad (Imam 1996). El titanio es altamente

reactivo con el hidrógeno, nitrógeno y especialmente con el oxígeno por lo que en un ambiente oxidativo (como el aire, agua o sangre) forma inmediatamente una capa natural de óxido en la superficie. El grosor de esta capa de óxido formada es de 4 a 6 nm. La capa de óxido amorfo consiste de diferentes óxidos de titanio, principalmente TiO_2 , aunque también se encuentran Ti_3O_3 y TiO (Brunette 2001). La formación de esta capa de óxido lleva a la pasivación del metal (Boyer 1994). El titanio y sus aleaciones han sido ampliamente utilizados en la industria aeroespacial debido a su alta resistencia y poco peso, tanto en partes del fuselaje como en componentes del motor. Son también muy utilizados como materiales de implantación debido a su resistencia a la corrosión, alta resistencia mecánica, bajo peso y su biocompatibilidad (Boyer 1994, Keller 1986). Para implantes ortopédicos de soporte como las prótesis de cadera, otros elementos se adicionan al titanio para formar aleaciones que incrementen la resistencia mecánica. La aleación más utilizada es Ti-6Al-4V, más del 80% de esta aleación es utilizada por la industria aeroespacial y el restante es utilizado principalmente para la fabricación de prótesis e implantes biomédicos como partes o la totalidad de prótesis de cadera, rodilla, codo, mandíbula, dedos y hombros, así como tornillos, clavos, alambres y grapas (Boyer 1994). Esta aleación es ampliamente utilizada en implantes biomédicos debido a su resistencia a la fatiga, resistencia a la tensión, alta resistencia a la corrosión y su biocompatibilidad. Existen otras aleaciones que han sido desarrolladas en otras aplicaciones biomédicas y aeroespaciales como la Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb, Ti-15Mo, Ti-13Nb-13Zr, Ti-12Mo-6Zr-2Fe (Brunette 2001).

Corrosión de los implantes metálicos

Muchos metales como el Fe, Cr, Co, Ni, Ti, tántalo (Ta), molibdeno (Mo), y tungsteno (W) utilizados para elaborar implantes pueden ser tolerados por el cuerpo humano en pequeñas cantidades, si ellos están presentes como especies disueltas en una forma iónica o neutral. Algunos de estos metales son esenciales para el funcionamiento del cuerpo humano, pero en general no pueden ser tolerados en grandes concentraciones. La consecuencia directa de la corrosión es la pérdida de materia, la cual debilita al implante. Sin embargo, el mayor problema de la corrosión es la liberación de productos de la corrosión al tejido circundante y a la sangre resultando en efectos indeseables. El ambiente fisiológico es típicamente

caracterizado como una solución acuosa a 37⁰ C, con un pH de 7.3, con una disolución de gases, electrolitos, células y proteínas. La inmersión de metales o aleaciones metálicas en este medio ambiente puede provocar corrosión, la cual está provocada por reacciones químicas superficiales. El tipo y concentración de los productos liberados durante la corrosión pueden alterar la función de las células adyacentes al implante, así como a células en localizaciones distantes debido al transporte de estos productos de corrosión por el torrente sanguíneo (Galante 1991, Steinemann 1998). Se han realizado diversos estudios midiendo la corrosión de varios metales y aleaciones, en ellos se ha observado que elementos como la plata (Ag) tienen una resistencia a la oxidación al aire alta, pero muestra muy poca resistencia a la corrosión en fluidos biológicos. También se ha observado que metales como el aluminio (Al), Mo y Fe que tienen menor resistencia a la corrosión que la Ag, y muestran un deterioro muy grande en tejidos vivos. Además, se ha observado que las células adyacentes a estos metales muestran signos de toxicidad e incluso muerte celular. De hecho, los metales que van del Fe a la Ag se corroen tan rápido que el abastecimiento y migración del oxígeno no puede aumentar debido al consumo del oxígeno por los metales y esto produce que los tejidos adyacentes al tejido queden hipóxicos. Se han observado abscesos estériles en el sitio de implantación producidos por la liberación de elementos de corrosión de metales como el vanadio (V), Co, cobre (Cu) y Ni (Galante 2001). Otras investigaciones concluyen que la resistencia a la corrosión de las aleaciones de Co-Cr y del acero inoxidable 316 y 316L no son suficientes para el correcto funcionamiento de los implantes, y esta resistencia a la corrosión tampoco es suficiente para evitar o disminuir la reacción tisular a cuerpo extraño o la toxicidad, debido a metales como el Ni, en el caso del acero y, Co en el caso de las aleaciones Co-Cr (Steinemann 2001). Así mismo, la aleación más utilizada en implantología Ti-6Al-4V, considerada un estándar en materiales metálicos de implantación, presenta reacción a cuerpo extraño y también se ha visto relacionada con la liberación de iones de Al que son tóxicos y se cree puedan colaborar con la aparición de la enfermedad de Alzheimer, y iones de V que se sabe son tóxicos para las células y causa muerte celular (Okazaki 1998, Steinemann 2001). Esta problemática ha ocasionado que se desarrollen diversos mecanismos para evitar la corrosión e incluso facilitar las interacciones célula-sustrato, es decir, entre el material de implantación y las células o tejido adyacente (adhesión, proliferación y diferenciación celular), muchos de estos mecanismos

consisten en modificar superficialmente los materiales de implantación con la finalidad de mejorar e incluso favorecer este tipo de interacciones.

Modificación de superficies

Las modificaciones superficiales en los materiales utilizados en implantación ortopédica y dental son principalmente de 3 tipos, la modificación macroscópica que favorece el anclaje del implante por traba mecánica, la modificación superficial micro o nanométrica que favorece la interacción célula-sustrato y las modificaciones superficiales químicas que también favorecen los procesos biológicos.

Razones para la modificación de superficies

Los eventos posteriores a la implantación de algún material en un ambiente biológico involucran la interacción de las células con la superficie del material, esta interacción influirá en el éxito o fracaso del implante y por lo tanto en la rehabilitación del paciente. Se sabe que las características y propiedades del material en bulto son importantes para el correcto funcionamiento del implante, propiedades como resistencia a la corrosión, módulo de elasticidad, resistencia a la fatiga y toxicidad, entre otras propiedades son de vital importancia en la selección del material. Sin embargo, algunas superficies de los materiales en bulto no favorecen las interacciones célula-sustrato aunque sus propiedades físico-mecánicas sean adecuadas. Una técnica adecuada de modificación de superficies no solo retiene las propiedades mecánicas del material en bulto, sino además le infiere las características superficiales específicas requeridas para las diferentes aplicaciones clínicas.

Métodos mecánicos

Los métodos mecánicos comúnmente utilizados como el maquinado, pulido y arenado involucran un tratamiento físico, una modificación en la forma, o un removido de materia de la superficie tratada. El objetivo principal de este tipo de métodos es obtener una topografía con una rugosidad específica, remover contaminaciones superficiales y lograr un mejor anclaje micromecánico del implante. (Brunette 2001). Algunos de estos métodos se resumen en la tabla 2.

Métodos químicos

Los métodos químicos como el tratamiento químico, anodizado, sol-gel, depósito químico por evaporación (CVD) y modificación bioquímica inducen procesos electroquímicos o bioquímicos sobre la superficie del material a tratar. Las modificaciones con tratamiento químico están basadas en reacciones químicas que ocurren en la interfase del material y de la solución que hará esta modificación, los métodos más comunes son el tratado ácido, tratado alcalino y la pasivación del material. El proceso de modificación sol-gel es ampliamente utilizado para depositar recubrimientos cerámicos menores de 10 μm , este proceso permite un control en la composición del recubrimiento, así como control de la microestructura, con la ventaja de realizarse a bajas temperaturas (Xuanyong 2004). El anodizado u oxidación por anodización es un método bien establecido que permite la producción de diferentes capas de óxido protectoras sobre metales. La tabla 2 presenta algunos ejemplos de estas modificaciones.

| Método de modificación | Modificación | Objetivo |
|-------------------------------|---------------------|-----------------|
|-------------------------------|---------------------|-----------------|

| Métodos mecánicos | | |
|--------------------------------|--|---|
| Maquinado Pulido Arenado | Superficie lisa o rugosa | Producir topografías superficiales específicas; limpieza y rugosidad superficial; favorecer adhesión celular. |
| Métodos químicos | | |
| Tratamiento químico | <10 nm de la capa de óxido | Remover óxidos y/o contaminación rugosidad; bioactividad. |
| Sol-gel | ~5 nm de película delgada | Biocompatibilidad; Bioactividad; conductividad ósea. |
| Anodizado | Capas de ~10 nm a 40 um | Producir topografías superficiales específicas; resistencia a la corrosión; bioactividad y biocompatibilidad. |
| CVD | Películas delgadas de ~100 nm a 1 um | Modificación de la composición; Resistencia al desgaste; resistencia a la corrosión; biocompatibilidad. |
| Bioquímicos | Silanización; fotoquímica; Monocapas autoensamblables; recubrimientos de proteínas | Inducir respuestas específicas en células y tejidos. |
| Métodos físicos | | |
| Spray térmico | Recubrimientos de ~30 a 300 um de espesor. | Modificación de la composición; Resistencia al desgaste; resistencia a la corrosión; propiedades biológicas. |
| PVD | Películas delgadas ~100 nm a ~1 um. | Modificación de la composición; Resistencia al desgaste; resistencia a la corrosión; propiedades biológicas. |
| Implantación iónica | Recubrimientos delgados ~10 nm a ~1 um. | Modificación de la composición superficial; resistencia a la corrosión; resistencia al desgaste; biocompatibilidad. |
| Descarga de plasma | Modificación superficial de ~1 a 100 nm | Limpieza; esterilización; oxidación; nitruración; remoción de capa de óxido nativa. |

Modificaciones superficiales.

Tabla 2. *Muestra las algunas modificaciones superficiales realizadas y su uso potencial.*

El depósito químico por evaporación o CVD es un proceso que involucra reacciones químicas entre la superficie a modificar y químicos en una fase gaseosa, resultando en la deposición de un producto no volátil sobre la superficie del sustrato. Se diferencia del depósito físico de vapor en que esta técnica utiliza reacciones químicas para producir la modificación superficial del sustrato. Esta modificación es ampliamente utilizada en la industria para producir recubrimientos orgánicos o inorgánicos sobre metales y materiales semiconductores entre otros (Ohring 2002). La modificación bioquímica de las superficies utiliza el conocimiento que existe sobre las funciones celulares, la adhesión y diferenciación celular así como los

procesos de remodelación para modificar las superficies. El objetivo principal de este tipo de modificación es inducir una respuesta específica en la célula o en tejido por medio de péptidos, proteínas, factores de crecimiento o moléculas inmovilizadas sobre la superficie del sustrato. Estas técnicas también son llamadas técnicas bio-miméticas (Xuanyong 2004).

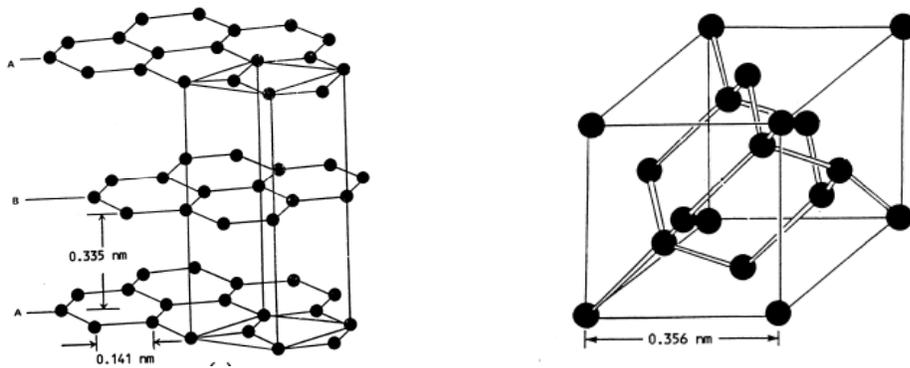
Métodos físicos

Durante el proceso de modificación superficial por métodos físicos no ocurren reacciones químicas, por lo tanto, la modificación es atribuida a la energía térmica, cinética o eléctrica. Existen diversas técnicas de modificación de superficies por estos métodos como el spray térmico, descarga gaseosa o plasma, implantación iónica y el depósito por evaporación física. El spray térmico es un proceso en el cual el material es térmicamente fundido a gotas e introducido energéticamente a la superficie en la cual las partículas se pegan y condensan. El recubrimiento es formado por el continuo depósito de capas de estas gotas (Xuanyong 2004). En la descarga gaseosa la superficie expuesta es bombardeada por iones y electrones. El número relativo de iones y electrones que se depositan sobre la muestra dependen de la polarización de la muestra. Es un método de modificación superficial que utiliza gas, bajas presiones y bajas temperaturas. En esta técnica el gas ionizado es controlado por electrones altamente energéticos. Este tratamiento ha sido utilizado en la modificación superficial de polímeros y/o producción de películas delgadas de polímeros (polimerización por plasma). Así como, es un método para limpiar la superficie de los biomateriales antes de la evaluación biológica (Xuanyong 2004). La implantación iónica es un proceso en el cual, iones altamente energéticos son introducidos dentro de las capas superficiales de un sustrato sólido mediante un bombardeo. La implantación iónica puede ser convencional o por inmersión en plasma. El depósito por evaporación física se lleva a cabo a muy bajas presiones, en este método el material blanco es evaporado para formar átomos, moléculas o iones que posteriormente serán depositados sobre la superficie de la muestra. Los procesos que utilizan el depósito por evaporación física están caracterizados por ser recubrimientos de alta densidad, así como presentar una fuerte adhesión al sustrato. Los procesos de depósito por evaporación física incluyen la evaporación, el laminado iónico y el sputtering (Xuanyong 2004). El sputtering es un método común para el

depósito de películas delgadas, su amplia popularidad reside en la simplicidad del proceso físico involucrado, así como en su flexibilidad. Es ampliamente utilizado en diversas industrias como los semiconductores, los automóviles, sistemas de grabación electrónica, entre otros. El sistema se basa en el desprendimiento de partículas de un blanco por medio de un plasma, el cual ioniza a estas partículas y las deposita en el sustrato. En ocasiones se utilizan campos magnéticos para confinar y formar un plasma de alta densidad lo que resulta en un aumento en la velocidad del depósito, además de proporcionar mayor número de partículas ionizadas (Xuanyong 2004). Todas estas técnicas han sido y son utilizadas para realizar diversas modificaciones superficiales que proporcionan características diferentes a los materiales en bulto. En este trabajo se propone la modificación superficial de sustratos de acero 316L por medio del depósito de una película de carbono amorfo depositada con la técnica de magnetron sputtering.

Carbono

En los últimos años se han realizado avances importantes en la ciencia del carbono como es el desarrollo de diversos procedimientos para su depósito, el desarrollo de diamantes artificiales, así como el desarrollo de los nanotubos de carbono. El carbono es un material inusual que presenta características metálicas y no metálicas a la vez. El carbono forma una gran variedad de estructuras cristalinas y estructuras desordenadas o amorfas debido a que es capaz de existir en 3 tipos de hibridaciones, sp^3 , sp^2 , sp^1 , el arreglo cristalino lo presentan el diamante, el grafito y los fulerenos. El grafito y diamante son redes periódicas, sólidas e infinitas con una estructura planar, mientras que los fulerenos son una forma molecular de carbono puro formando una red finita de estructura no planar (Robertson 2002, Bhushan 1999). El grafito tiene una estructura hexagonal formando planos, cuya interacción entre ellos es muy débil y presentan excelentes propiedades de lubricación. Sin embargo, entre cada plano los átomos de carbono tienen uniones covalentes fuertes con sus tres átomos vecinos utilizando los orbitales híbridos sp^2 (Bhushan 1999). Figura 1. Las capas (planos basales) están muy lejanas unas de otras y las fuerzas que unen estas estructuras son uniones débiles de van der Waals. Estas capas pueden deslizarse una sobre otra con relativa facilidad, lo que le proporciona baja fricción a este material.



Enlaces en carbono.

Figura 1. Enlace tipo Sp^2 y Sp^3 en carbono.

El diamante cristaliza en estructuras modificadas cúbicas a cara centrada con una distancia interatómica de 0.15nm. Cada átomo de carbono está tetrahedralmente coordinado, formando uniones covalentes fuertes con cuatro átomos vecinos utilizando los orbitales híbridos sp^3 . Esto le confiere al diamante una dureza extrema, conductividad térmica y brecha óptica grande (Bhushan 1999).

Carbono amorfo

El carbono amorfo no tiene un orden general en toda su estructura, más bien, está compuesto de átomos de carbono formando enlaces sp^2 y sp^3 . Los sitios sp^2 tienden a aglomerarse entre sí y el ordenamiento de estas zonas proporcionará las características o propiedades particulares a estos materiales (Bhushan 1999). Debido a que en el carbono amorfo coexisten enlaces sp^2 y sp^3 , se pueden lograr películas con propiedades físicas intermedias entre diamante y grafito, dependiendo de la cantidad relativa que haya de uno u otro tipo de enlace. Es esta característica la que ofrece una gama amplia de aplicaciones posibles para dichas películas. El estudio de los procesos de formación de películas de carbono amorfo ha permitido que en la actualidad, se pueda lograr casi cualquier combinación posible de fracciones sp^2/sp^3 y también puede variarse el contenido de hidrógeno, dando lugar a una mayor diversidad (Grill 2001, Robertson 2002). Las películas producidas se clasifican en dos grandes grupos: carbono amorfo hidrogenado, a-C:H y carbono amorfo no-hidrogenado. Dentro del grupo de a-CH se reclasifican de acuerdo a su contenido de hidrógeno y al tipo de enlaces predominantes, que en este caso pueden ser $CCsp^3$, $CCsp^2$, $CHsp^1$, $CHsp^2$ y $CHsp^3$. Sin embargo, basta con estimar el contenido de hidrógeno y el porcentaje total de enlaces sp^3 para clasificar a las películas en los

siguientes grupos: Grafíticas (GLC, Graphite-like carbon), Poliméricas (PLC, polymer-like carbon) y Cuasidiamante (DLC, diamond-like carbon). Entre las películas no hidrogenadas, solo tenemos dos categorías: Grafítica, a-C y Cuasidiamante, también llamada ta-C, para distinguirlo del cuasidiamante hidrogenado (Rodil 2005). El material más conocido de esta familia es el cuasidiamante, debido a que es un recubrimiento ultra-duro, puede alcanzar una dureza alrededor de los 80 gigapascales (Gpa), valor muy superior a los otros materiales catalogados como ultraduros (Musil 2000). Las propiedades mecánicas del carbono amorfo dependen principalmente de la fracción de enlaces $CCsp^3$; mientras mayor sea, mayor será la dureza. Por otro lado, las propiedades ópticas y electrónicas están controladas por la distribución y el tamaño de los cúmulos de sp^2 (Rodil 2005). En la tabla 3 se resumen algunos trabajos que se han realizado, modificando las superficies con carbono amorfo.

Dentro de estas aplicaciones biomédicas encontramos algunos trabajos en los que se pretenden aplicar las modificaciones con películas de carbono en implantes ortopédicos y dentales (Santavirta 2003, Affatato 2000). Sin embargo, aunque los 2 son implantes que se alojarán en tejido óseo, los implantes ortopédicos requieren de un medio cementante para anclar el implante al hueso, mientras que los implantes dentales requieren de las interacciones célula –implante para que se de una cascada de eventos. Estos comienzan con la adhesión de ciertas proteínas en la superficie de la película, la adhesión celular de osteoblastos y células progenitoras de los osteoblastos, la colonización de toda esta superficie, la formación de la matriz extracelular y su posterior mineralización para terminar con un contacto íntimo entre el tejido óseo y el implante.

| Película | Prueba biológica | Resultados |
|-----------------|--|--|
| a-C:H | Cultivo de fibroblastos y macrófagos de ratón. | No hubo respuesta toxica o inflamatoria. |
| a-C:H | Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares de humano y ratón. | No hubo evidencia de toxicidad celular en ninguna línea celular. Morfología celular normal. |
| a-C:H | Absorción de proteínas. Adhesión de plaquetas. | No existió activación de plaquetas. No hubo formación de trombos. Alta cantidad de albúmina y fibrinógeno absorbido. |
| a-C:H | Cultivo de osteoblastos. Implantación intramuscular y transcortical. | Los osteoblastos se adhirieron y proliferaron sobre las películas. |

| | | |
|-------------|---|---|
| a-C:H | Monocitos humanos | No hubo una activación significativa de macrófagos. |
| ta-C, CN | Ensayos con fibroblastos y osteoblastos. Hemocompatibilidad. | Todas las células se adhirieron bien a las películas experimentales. Buena hemocompatibilidad, no fueron trombogénicas. |
| ta-C, CN | Estudio morfológico con osteoblastos. | Los osteoblastos se adhirieron, expandieron y proliferaron sin ningún cambio aparente de la fisiología celular. |
| ta-C, a-C:H | Revisión | Aumento en la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Buena hemocompatibilidad, sin formación de trombos. |
| a-C:H:Si | Adhesión de plaquetas. | Disminución de la cantidad de plaquetas adheridas. |
| NACD/a-C | Cultivo de osteoblastos. | No presentaron evidencia de citotoxicidad. |
| ta-C | Ensayos de corrosión. | Las películas mejoraron la resistencia a la corrosión de las aleaciones de titanio estudiadas. |

Modificaciones con carbono.

Tabla 3. *Presenta algunos ejemplos de las aplicaciones biológicas del carbono amorfo.* (Thomson 1991, Mitura 1994, Olborska 1994, Butter 1994, Chandra 1994, Du 1998, Jones 2000, Cui 2000, Allen 2001, Linder 2002, Hauert 2003, Okpalugo 2004, Popov 2005, Wang 2005)

Biomíneralización

Se le conoce con el nombre de biomíneralización al proceso por el cual se forman depósitos minerales dentro o fuera de las células de varios organismos. En este proceso las células dirigen la formación de minerales mediante la expresión de proteínas que actuarán ya sea como nucleadores, dentro de la célula o en la matriz extracelular, o previniendo la formación de minerales en sitios no deseados (Boskey 2003). Este proceso toma lugar en una amplia variedad de organismos; por mencionar algunos encontramos a los depósitos de magnetita y hierro, y de oro en algunos organismos unicelulares, depósitos de silicatos en diatomeas, carbonatos de calcio y fosfatos de calcio en conchas de organismos invertebrados y fosfatos de calcio e hidroxiapatita en organismos vertebrados (Pardoe 1999, Baeuerlein 2000). En el hueso el proceso de biomíneralización se lleva a cabo en la matriz extracelular producida por los osteoblastos y estos mismos son los responsables de la mineralización de dicha matriz. Esta matriz extracelular mineralizada consta de un 70-90% de material inorgánico compuesto principalmente de hidroxiapatita y algunos fosfatos de calcio amorfos, el resto es material orgánico compuesto por una variedad de proteínas las cuales cumplen funciones diversas en la matriz extracelular. Entre estas proteínas las más abundantes son: colágena tipo I, osteocalcina, sialoproteína ósea y osteopontina. Sin embargo, existen otras proteínas de matriz extracelular relacionadas al

proceso de biomineralización las cuales se encuentran en menor cantidad y han sido menos estudiadas por lo que se desconoce su papel en el proceso de mineralización de matriz extracelular. La colágena tipo I es la proteína más abundante en la matriz orgánica y representa cerca del 90% del total de las proteínas. Se ha descrito que los cristales minerales se forman inicialmente en los espacios de los agujeros presentes entre las fibras de colágena (Weiner 1986). Estas fibras de colágena proporcionan una estructura que funciona como andamio sobre el que se relacionan otras proteínas, las cuales cumplen diversas funciones. Algunas de ellas actúan como proteínas que favorecen la nucleación; que constituye el proceso por medio del cual un número de átomos o moléculas se van agregando o depositando hasta formar “embriones” o núcleos de crecimiento mineral, a estos núcleos se siguen agregando más moléculas hasta formar una nueva fase. La nucleación puede ser homogénea si ocurre sin la participación de elementos externos y heterogénea si existe participación de elementos externos (Bonucci 1992), por lo tanto la nucleación en el proceso de biomineralización del tejido óseo es una nucleación heterogénea y la proteína más conocida y estudiada como nucleadora es la sialoproteína ósea (BSP). La sialoproteína es una glicoproteína altamente fosforilada de 45-70 kDa con altos niveles de ácido glutámico (Cowles 1998). Diversos estudios han relacionado esta proteína con los procesos de mineralización (Hunter 1993) y de ser la responsable de la formación de tejido mineralizado en zonas ectópicas, fracturas y en procesos de mineralización anormal (Bellahcene 1994, Chen 1994, Lekic 1997). La BSP contiene un motivo RGD (Arginina-Glicina-Ácido aspartico), por lo que esta proteína puede mediar la adhesión de osteoblastos y osteoclastos a la matriz extracelular, además de activar vías de señalización celular a través de la activación de integrinas, las cuales son receptores de membrana celular (Ganss 1999). En contraste con las proteínas nucleadoras encontramos las proteínas moduladoras, las cuales se encargan de modular el crecimiento, tamaño y forma de los cristales de hidroxiapatita. Las principales proteínas relacionadas con este proceso son la osteocalcina (OCN) y la osteopontina (OPN). La OCN es una proteína pequeña de 5.8-kDa, que presenta 2 o 3 residuos de ácido glutámico que han sido γ -carboxilados por una enzima específica (γ -carboxilasa) la cual requiere de la vitamina K como cofactor (Suttie 1985). Estos residuos de ácido glutámico modificado (residuos gla) le confieren a la proteína una alta afinidad por iones minerales como el Ca^{2+} y cristales de hidroxiapatita (Ducy 1996). Esta proteína es

expresada durante la etapa tardía de diferenciación de los osteoblastos (Price 1989). Por otro lado la OPN es una proteína altamente fosforilada y se caracteriza por la presencia de poliseuencias de ácido aspártico. Esta es una proteína que es expresada por células de varios tejidos, dentro de los cuales tenemos hueso, dentina, cemento, cartílago hipertrófico, riñón, cerebro, algunas glándulas, tejido vascular, así como en todos los fluidos (Patarca 1993, Giachelli 1995, Butler 1996, Rittling 1999). Otra función, además de modular e inhibir el crecimiento de los cristales de hidroxiapatita, es la de favorecer la adhesión de osteoclastos y favorecer la fagocitosis de restos de tejido mineralizado (Denhardt 1998).

Otra proteína de suma importancia en el proceso de la biomineralización del tejido óseo es la fosfatasa alcalina (ALP). Esta es una proteína glicosilada con actividad de enzima, localizada en la porción externa de la membrana citoplasmática de los osteoblastos (Low 1989) y también se encuentra en las vesículas de matriz, las cuales son organelos producidos por la células mineralizantes y están localizadas en la matriz extracelular, estas estructuras contribuyen a la mineralización de la matriz extracelular formando fosfatos de calcio amorfos y cristales de hidroxiapatita (Sela 1992). La ALP es también la responsable de regular las concentraciones extracelulares de fosfatos desfosforilando diversas moléculas. La isoforma presente en hueso es llamada fosfatasa alcalina ósea y contribuye a formar un micro ambiente propicio para la mineralización de la matriz extracelular (Davies 2000). La actividad de esta enzima se incrementa cuando comienza la mineralización de la matriz extracelular, por lo que es un indicador de la biomineralización (Whyte 1989). Otras moléculas importantes en la matriz extracelular secretada por los osteoblastos son la osteonectina (ONC) el biglicano y la decorina, sin embargo, su papel en la biomineralización no es del todo claro, aunque diversos estudios demuestran su importancia en el tejido óseo (Salonen 1990, Gilmour 1998, Gehron 2002, Xu 1998, Reed 2003, Xaus 2001, Schonherr 1998, Danielson 1997).

El proceso de la biomineralización de la matriz extracelular ósea se realiza cuando existe remodelación ósea, fracturas, procesos patológicos y en la embriogénesis. Durante la embriogénesis, el hueso es formado a través de 2 vías independientes: la osificación intramembranosa y la osificación endocondral (Karsenty 1999, Ducy 2000). En ambas vías. Los osteoblastos son los responsables en la formación del hueso. En el caso de la osificación intramembranosa, los osteoblastos se diferencian directamente de células mesenquimatosas,

formando posteriormente el hueso. Por otro lado, en la osificación endocondral, las células mesenquimatosas se diferencian primeramente en condrocitos y forman un templete cartilaginoso. Posteriormente, los condrocitos maduran y pasan a ser condrocitos hipertrofos, en esta etapa, las células mesenquimatosas que rodean al cartílago se diferencian en osteoblastos y comienzan a colonizar el templete de cartilago y a formar hueso (Ducy 2000, Katagiri 2002). La diferenciación de las células mesenquimatosas a osteoblastos es un paso crucial en el proceso de la formación del hueso, esta diferenciación esta regulada principalmente por 2 factores de transcripción: core binding factor 1 (Cbfa1) y Osterix. El Cbfa1 es el responsable de regular la expresión de los genes más importantes expresados por los osteoblastos, se ha demostrado que la ausencia de este factor arresta a los osteoblastos y no permite su diferenciación (Ducy 2000), sin embargo, su función no sólo se limita a la diferenciación de los osteoblastos, puesto que es expresado aún en osteoblastos diferenciados y se ha asociado al control del depósito de la matriz extracelular (Ducy 1999). Por otro lado, se sabe poco acerca del factor de transcripción Osterix, sin embargo, se ha demostrado que es indispensable para la diferenciación de osteoblastos, puesto que las células que carecen de este factor, no expresan los genes característicos de los osteoblastos maduros (Nakashima 2002, Kobayashi 2005).

La biomineralización también se lleva a cabo en el proceso de oseointegración de los implantes. En este último caso, los procesos que se llevan a cabo para la biomineralización de la matriz extracelular sobre el implante, comprenden en primera instancia, la adhesión de proteínas del suero, sangre o saliva sobre la superficie del implante por medio de interacciones electroquímicas. Estas interacciones electroquímicas son de suma importancia ya que dictan cuáles proteínas y cómo estas interactúan con las células (Anselme 2000). Posteriormente se lleva a cabo el reclutamiento de las células progenitoras de osteoblastos, preosteoblastos o bien los mismos osteoblastos del tejido adyacente. Estas se adhieren a la superficie con las proteínas adheridas, mediante interacciones de receptores de membrana que reconocen a estas proteínas y favorecen la adhesión celular; por lo tanto las células se adhieren al sustrato de manera indirecta. Es importante que las células se adhieran al sustrato ya que los osteoblastos son células dependientes de la adhesión celular y es indispensable para ellas estar adheridas para poder producir la matriz extracelular y se inicie el proceso de biomineralización (Boyan 2001). Las interacciones entre los receptores de membrana y las proteínas

adheridas a la superficie son las primeras de tipo célula-sustrato, las proteínas más estudiadas en el proceso de la adhesión celular de osteoblastos sobre biomateriales son las integrinas (Anselme 2000, Boyan 2001). Como se ha mencionado, estas proteínas actúan como receptores de membrana formando heterodímeros consistentes de una cadena α y una cadena β ; al ser proteínas transmembranales poseen una porción citoplasmática unida al citoesqueleto, una porción de membrana y una porción extracelular que junto a la cadena complementaria forma el receptor de membrana. Estas proteínas favorecen la organización del citoesqueleto además de activar diversos procesos celulares, como la proliferación y la diferenciación celular. Si bien los osteoblastos no son células proliferativas, las interacciones célula-sustrato propician la expresión de numerosas moléculas por parte de los mismos osteoblastos, como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-I o II), proteínas morfogenéticas de hueso (BMP's), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y citocinas entre otras, que se sabe estimulan la proliferación celular (Gehron 1992). Algunas de estas moléculas también inducen a las células a diferenciarse y expresar otras proteínas que favorecen la formación de la matriz extracelular. Durante este proceso de proliferación las células acondicionan el sustrato modificándolo con las proteínas adecuadas para establecer las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (Gehron 1992). Además durante el proceso proliferativo, las células secretan activamente proteínas componentes de la matriz extracelular como la colágena tipo I, fibronectina y trombospondina las cuales participan en la adhesión celular; proteoglicanos como la decorina y el biglicano entre otras, las cuales crean un micro ambiente favorable para que se lleve a cabo la mineralización de la matriz extracelular (Boyan 2001). Una vez formada la matriz extracelular, la proliferación celular disminuye, se da una disminución en la expresión de la colágena y comienza un incremento en la expresión y actividad de la fosfatasa alcalina, la cual actúa regulando las concentraciones de fosfatos. En esta etapa se da un reordenamiento o modificación de la matriz extracelular eliminando o adicionando proteínas a ella (Gehron 1992). Las proteínas más estudiadas en esta etapa del proceso son la BSP, OPN y OCN. No se sabe con certeza el momento exacto donde comienzan a actuar, pero se ha observado que la BSP se presenta en etapas

más tempranas y en zonas de formación ósea *de novo*, mientras que la osteocalcina, se presenta en etapas más tardías.

La calcificación biológica requiere de una serie de procesos complejos que deben estar perfectamente regulados a favor de que ocurran en el tiempo y lugar adecuados. Sin embargo, el proceso de biomineralización ósea *in vitro* requiere del control de numerosas variables que pueden estar afectando este proceso. Existen diversos modelos que han sido utilizados para estudiar el proceso de biomineralización, estos modelos se basan en cultivos de órganos y cultivos celulares, los cultivos de órganos más estudiados son los de calvaria, huesos largos y placa de crecimiento del cartílago, mientras que los sistemas más utilizados en los cultivos celulares de osteoblastos son los osteoblastos aislados de calvaria, de huesos largos, de periostio, así como células provenientes de médula ósea, cartílago y cemento radicular (Gehron 1992). Células obtenidas a partir de osteosarcomas, expresan ciertas características de interés y dentro de este grupo de células encontramos las ROS, UMR, SAOS, MG-63 y TE85 entre otras (Gehron 1992). Es importante mencionar que no todas las células citadas tienen la capacidad de mineralizar la matriz extracelular *in vitro*, sin embargo, son utilizadas por las características específicas que ayudan a entender el proceso de la biomineralización. La biomineralización *in vitro* no es un proceso de un solo paso, sin embargo, los eventos temporales se pueden dividir en 3 fases: la proliferación de células con un fenotipo mineralizante, la formación y modificación de la matriz extracelular; y finalmente la precipitación de la hidroxiapatita. Como se mencionó anteriormente los osteoblastos no son células proliferativas *in vivo*, por lo tanto los cultivos celulares en estos modelos están compuestos por mayor cantidad de células progenitoras de osteoblastos (Gehron 1992). En los sistemas *in vitro*, es necesario agregar factores de crecimiento y hormonas para favorecer la proliferación celular, estos factores se agregan al medio de cultivo enriqueciéndolo con suero fetal bovino y en los modelos de biomineralización se adiciona dexametasona, la cual es una hormona sintética que promueve la proliferación celular. Además se ha observado que los cultivos tratados con esta hormona incrementan el número de nódulos mineralizados sobre la matriz extracelular (Jorgensen 2004). El proceso de la proliferación celular disminuye conforme las células se van diferenciando (Gehron 1992). En esta etapa de proliferación celular las células acondicionan la superficie con proteínas que favorecen las

interacciones célula-célula, célula-sustrato y célula-matriz extracelular además de secretar componentes de la matriz extracelular, esta es rica en colágena tipo I, proteínas de adhesión celular como la osteonectina, fibronectina y vitronectina, así como proteoglicanos (Gehron 1992). En etapas tempranas de proliferación celular una gran cantidad de estas proteínas se integra a el medio de cultivo y otras proteínas presentes en el medio pueden interaccionar con la incipiente matriz extracelular. Al finalizar la etapa proliferativa *in vitro*, las células comienzan a formar multicapas en algunos puntos aislados del cultivo, además de disminuir el ritmo de proliferación celular debido a la creciente diferenciación celular y a la inhibición por contactos celulares. La formación de la matriz extracelular es crucial en esta fase, por lo tanto en los estudios *in vitro* se adiciona ácido ascórbico al medio de cultivo ya que este es un cofactor importante en la producción de fibras de colágena (Peterkofsky 1991).

Una vez que la matriz extracelular se ha formado comienza la fase de maduración de esta. En esta fase disminuye la producción de colágena y se observa un incremento en la expresión y actividad de la fosfatasa alcalina (Boyan 2001). La maduración de la matriz extracelular requiere de la diferenciación celular de los osteoblastos los cuales favorecen la remoción y adición de proteínas y moléculas a la matriz. Así se ha observado como la decorina y el biglicano reemplazan al versicano (Gehron 1992), además de la incorporación de proteínas como la BSP, OPN y OCN (Stein 1990, Gesztenfeld 1987, Gehron 1992)). La diferenciación de los osteoblastos es favorecida *in vitro* con la adición de moléculas como la dexametasona y la $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$, esta última es un metabolito de la vitamina D que promueve la expresión y estimula la actividad de fosfatasa alcalina y osteocalcina (Boyan 2001). Por último para que se lleve a cabo el proceso completo de biomineralización *in vitro* debe ocurrir la mineralización de la matriz extracelular, la cual se da por 2 vías: la mediada por fibras de colágena y la mediada por vesículas de matriz, para que esta mineralización se lleve a cabo es necesario que los nutrientes y iones se encuentren en las concentraciones suficientes en el medio de cultivo, los niveles de calcio presentes en las formulaciones comunes de los medios de cultivos son parecidos a los encontrados *in vivo* y por lo tanto adecuados para la mineralización. Sin embargo, las concentraciones de fosfatos son bajas comparadas con las condiciones *in vivo* (Tenenbaum 1981), por lo tanto se necesita de la adición de una fuente de fosfatos externa y la más utilizada es el β -

glicerofosfato (Tenenbaum 1981). Una vez que se alcanzan las concentraciones adecuadas de sales de calcio y fosfatos el proceso de nucleación heterogénea de los cristales de hidroxiapatita toma lugar y éstos se incorporan íntimamente a la matriz extracelular.

La biomineralización es la suma de numerosos e importantes procesos que tienen que ocurrir en los tiempos y lugares indicados, los cuales son regulados y controlados por una gran cantidad de proteínas, de las cuales algunas favorecen la biomineralización y otras la limitan o la inhiben. Los modelos de biomineralización existentes, estudian estos procesos *in vivo* e *in vitro*, en condiciones normales de cultivo celular. Sin embargo, existe escasa información del proceso de biomineralización sobre implantes dentales u ortopédicos.

CAPÍTULO II

Diseño experimental

Se establecieron 2 etapas para el desarrollo de este trabajo.

La primera etapa consistió en la determinación de la composición elemental, la biocompatibilidad de las películas, y la evaluación de su capacidad para permitir la formación de tejido mineralizado, además, se evaluó el papel de la rugosidad superficial en la respuesta biológica de los osteoblastos.

La segunda etapa tuvo como objetivo reevaluar la biocompatibilidad de las películas, además de evaluar la capacidad de las películas de permitir la diferenciación celular y la formación de una matriz extracelular mineralizada.

Durante la primera etapa del estudio se utilizaron sustratos cuadrados de acero 316L de 1 cm², los cuales se obtuvieron cortando placas de acero 316L de 1 mm de espesor. Los sustratos fueron utilizados con la rugosidad superficial original de la placa de acero 316L, esta rugosidad sin bien era baja, no era uniforme. En la segunda etapa, se optó por tener una rugosidad superficial (la cual fue determinada en la primera etapa) uniforme para todos los sustratos a experimentar. En esta etapa se utilizaron sustratos de 15 mm de diámetro, los cuales ajustan perfectamente en los pozos de las placas de cultivo. Estas muestras fueron sometidas a un pulido en torno y posteriormente fueron lijadas con lijas gruesas para eliminar las irregularidades del corte y posteriormente se produjo la rugosidad superficial por medio de la técnica de “sand-blasting”, mediante esta técnica se logró conseguir la rugosidad promedio de 2 μm que fue utilizada en esta etapa del estudio.

Metodología

Muestras experimentales

Las muestras utilizadas durante la primera etapa fueron: carbono amorfo (a-C), carbono amorfo hidrogenado (a-C:H), nitruro de carbono amorfo (a-CN). acero 316L (SS), película de titanio químicamente puro (Ti) y poliestireno de las cajas de cultivo (Control). Las películas de titanio fueron utilizadas debido a que los

implantes comerciales son de titanio. Las muestras utilizadas para la segunda etapa fueron: acero 316L, titanio, carbono amorfo sobre película de titanio y poliestireno como control.

Las condiciones experimentales como el tiempo de depósito, amperaje, así como el flujo del gas fueron estandarizadas en estudios previos.

Depósito de películas

El depósito se realizó en un sistema de magnetron-sputtering, basado en la evaporación por medio físico, este sistema de depósito fue elaborado por el Dr. Stephen Muhl del Instituto de Investigaciones en Materiales de la U.N.A.M.

Sistema de magnetron-sputtering de corriente directa (dc):

El sistema consiste de una cámara de alto vacío con un cabezal del magnetron sputtering. El cabezal del magnetron sputtering consta de un blanco y de un conjunto de imanes distribuidos de manera radial detrás del blanco. El blanco constituye el cátodo y la cámara de vacío el ánodo, a través de los cuales se conecta una diferencia de potencial (~500 volts). Dentro de la cámara de vacío se permite el flujo de un gas (generalmente argón) de modo que al establecer el potencial entre el cátodo y el ánodo se genera una descarga gaseosa (plasma). El plasma puede definirse como un gas ionizado formado por un número igual de cargas negativas (electrones) y positivas (iones) cuyo comportamiento es colectivo. Los iones positivos son principalmente iones de argón, o del gas utilizado, que son acelerados hacia el cátodo debido al potencial negativo. Estos iones bombardean la superficie del blanco, erosionándolo, es decir, arrancando átomos del blanco, por lo que el proceso se considera una evaporación física. Los átomos del blanco salen despedidos y son guiados por el plasma hacia el sustrato donde se condensan formando la película, cuyo espesor está determinado por el tiempo que dure el proceso o bien el tiempo de depósito. El papel de los imanes colocados detrás del blanco y de donde proviene el nombre de magnetron, es el de confinar el plasma alrededor del blanco haciendo más efectivo el proceso de erosión.

La película depositada depende del gas y del material del blanco, en el siguiente cuadro se resume el material del blanco y el gas utilizado para las diferentes películas.

| Tipo de superficie | Blanco | Gas |
|----------------------------|---------------|------------|
| Carbono amorfo | Carbono | Argón |
| Nitruro de carbono amorfo | Carbono | Nitrógeno |
| Carbono amorfo hidrogenado | Carbono | Metano |
| Titanio | Titanio | Argón |

Medición de las propiedades físicas de las películas.

Para medir las propiedades físicas de las películas se utilizaron diversas técnicas como: la espectrofotometría de infrarrojos (IR) para ver los enlaces atómicos y la estructura química de las películas. La espectrofotometría con luz UV y visible (UV/Vis) para medir el coeficiente de absorción y la brecha óptica. La espectroscopia de fotoelectrones (XPS) para ver la composición elemental y los enlaces químicos.

Limpieza de las muestras

Las muestras fueron lavadas 3 veces con isopropanol, etanol y posteriormente con agua doble destilada. Una vez lavadas las muestras, estas fueron esterilizadas por autoclave durante 30 minutos.

Obtención de células

La línea celular derivada de hueso alveolar humano fue generada y expandida por la técnica de explante. El hueso alveolar humano se obtuvo del Departamento de Cirugía de la Facultad de Odontología de la UNAM. El hueso alveolar humano se limpió de tejido blando adherente, después fue cortado hasta obtener trozos de aproximadamente 1 mm². Los trozos de hueso alveolar se colocaron en un frasco para cultivo de tejidos de 25 cm² en medio Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y una solución de antibióticos compuesta de penicilina (100 U/mL) y estreptomina (100 µg/mL) (Invitrogen Corporation). Los explantes fueron entonces incubados en un medio ambiente con 100% de humedad a una temperatura de 37°C en una atmósfera de 95% aire y 5% CO₂. El medio de cultivo se cambió cuando se observó crecimiento celular fuera de los explantes. Una vez que las células alcanzaron la confluencia se subcultivaron utilizando tripsina porcina-EDTA al 0.025% (Invitrogen Corporation). Para el desarrollo

experimental de este proyecto se utilizaron células entre el 1^{er} y 4^o pasaje. La caracterización de la línea celular se realizó por medio de la actividad específica de la fosfatasa alcalina y por la capacidad de las células de formar tejido mineralizado.

Ensayos de adhesión celular

Los osteoblastos derivados de hueso alveolar humano fueron sembrados a una cantidad inicial de 2×10^4 sobre los diferentes tipos de sustratos, en cajas de cultivo de 24 pozos (Costar Corporation) y se cultivaron durante 24 horas en medio DMEM suplementado con 10% de SFB y una solución antibiótica compuesta de penicilina (100 U/mL) y estreptomina (100 µg/mL). Las células que no se adhirieron a las superficies, fueron removidas con PBS (solución amortiguadora de fosfatos) por medio de 3 lavados. Las células adheridas se fijaron con 3.5 % de paraformaldehído. La adherencia fue evaluada de acuerdo al método de Hyman (1982) con algunas modificaciones. Brevemente, las células fijadas fueron incubadas con 0.1% de azul de toluidina por 4 horas, lavadas 3 veces con PBS para remover el colorante no específico y posteriormente el colorante fue extraído con 500 µL de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1.0 %. 100 µL de esta solución fueron colocados en un pozo de una placa de 96 pozos para ensayo de ELISA y leído en un lector de ELISA a 605 nm, los valores de la absorbancia obtenidos fueron extrapolados de acuerdo a una curva estándar para determinar la cantidad de células o el porcentaje de células que se adhirieron al sustrato. Los experimentos de adhesión celular se realizaron por triplicado y fueron repetidos por lo menos 3 veces.

Proliferación celular

La proliferación celular fue evaluada por medio de la técnica colorimétrica descrita por Hyman (1982). Osteoblastos derivados de hueso alveolar fueron sembrados a una densidad inicial de 2×10^4 sobre los diferentes sustratos en cajas de cultivo de 24 pozos (Costar Corporation). Las células fueron incubadas durante 3, 5 y 7 días en el medio de cultivo antes mencionado, en el ensayo de adhesión celular. Las células adheridas se fijaron con 3.5 % de paraformaldehído y posteriormente el colorante fue extraído, como se mencionó en el ensayo de adhesión celular, y los extractos fueron leídos a 605 nm. Los ensayos fueron realizados por triplicado y fueron repetidos 3 veces.

Del mismo modo, en la segunda etapa, la proliferación celular fue observada por microscopía electrónica de barrido. Para las muestras evaluadas por SEM solo se tomo el día 5 como periodo de incubación, al término de este período las muestras fueron lavadas dos veces con PBS a 37° C, fijadas con glutaraldehído al 4% por 30 minutos y deshidratadas gradualmente con etanol a diversas concentraciones 30, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%. Posteriormente las muestras fueron cubiertas con oro por medio de la técnica de sputtering. Las muestras fueron observadas en un microscopio de barrido JEOL JSM 5600LV. Los experimentos proliferación celular se realizaron por triplicado y repetidos por lo menos 3 veces.

Ensayo de citotoxicidad

Osteoblastos derivados de hueso alveolar fueron sembrados a una densidad de 2×10^4 células sobre los diferentes sustratos en cajas de cultivo de 24 pozos (Costar Corporation). Las células fueron cultivadas por 3, 5 y 7 días en medio el medio de cultivo arriba mencionado. Una vez terminados los tiempos de incubación, las células fueron tratadas con MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide Sigma chemicals Co.) disuelto en PBS a una concentración de 5mg/mL, esterilizado por medio de filtrado. Se utilizó una cantidad de 10 μ L de esta solución por cada 100 μ L de medio para tratar las células, las cuales fueron incubadas por 4 horas a 37° C con esta solución. Una vez terminado el periodo de incubación con el MTT, el sobrenadante fue removido y las células lavadas 3 veces con PBS, posteriormente se añadió 500 μ L de dimethyl sulfoxido (DMSO) a cada pozo. Las muestras fueron puestas en un agitador de placa a velocidad lenta por 1 hora. 100 μ L de esta solución fueron transferidos a un pozo de una placa de 96 pozos para ensayos de ELISA. La absorbancia fue leída a 570 nm. Los experimentos fueron realizados por triplicado y repetidos 3 veces.

Ensayos de diferenciación celular

La determinación de la diferenciación celular se realizó por medio de los ensayos de actividad específica de la fosfatasa alcalina y por medio de inmunodetección para la proteína sialoproteína ósea (BSP) por medio de Western blots.

Ensayo de actividad específica de fosfatasa alcalina

Células osteoblásticas derivadas de hueso alveolar fueron sembradas a una densidad de 2×10^4 sobre los diferentes sustratos en cajas de cultivo de 24 pozos (Costar Corporation). Las células fueron cultivadas por 3, 7 y 14 días en medio DMEM. Al término de cada periodo de incubación las células fueron lavadas 3 veces con PBS y se agregó 500 μ L de buffer de lisis que consistió en Triton X100 al 0.5% en PBS, posteriormente las células fueron raspadas y el extracto celular fue sonificado por 20 segundos. De este extracto celular 25 μ L fueron tomados para determinar la cantidad de proteína total por medio del kit macro BCA (Pierce Chemical Co.). La actividad específica de fosfatasa alcalina se determinó midiendo la liberación de p-nitrofenol desde p-nitrofenilfosfato a pH de 10.2.

Ensayo de inmunodetección por western blot contra BSP

Los niveles relativos de BSP fueron determinados a los 7 y 14 días. Osteoblastos derivados de hueso alveolar fueron sembrados a una densidad de 2×10^4 sobre los diferentes sustratos a estudiar en cajas de cultivo de 24 pozos. Las células fueron cultivadas por los periodos de tiempo previamente establecidos en medio DMEM. Al término de cada periodo de incubación las células fueron lavadas 3 veces con PBS y se agregaron 500 μ L de buffer de lisis que consistió en Tritón X100 al 0.5% en PBS, posteriormente las células fueron raspadas y el extracto celular fue sonificado por 20 segundos. De este extracto celular 25 μ L fueron tomados para determinar la cantidad de proteína total por medio del kit macro BCA (Pierce Chemical Co.). Una vez determinada la cantidad total de células, 5 μ g de proteína total fueron cargados por carril en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS) al 12%. Posteriormente las proteínas fueron transferidas por electroforesis a una membrana de nitrocelulosa (Millipore, Bedford, Ma). Las membranas fueron bloqueadas con un buffer de bloqueo a base de leche descremada al 5% por 1 hora y después incubadas a 4° C toda la noche con un anticuerpo policlonal de conejo contra BSP (LF100, Larry Fisher, NIH) a una dilución 1:500. Después de la incubación la membrana fue lavada y posteriormente incubada con un anticuerpo secundario de cabra conjugado con peroxidasa de rábano contra IgG de conejo por 2 horas, lavado con PBS y revelado con diaminobencidina. La membrana fue escaneada y analizada por un software de análisis de imagen (Quantity

One), los resultados son presentados como porcentajes relativos de proteína en relación a la superficie control. Este experimento fue repetido 3 veces.

Ensayo de biomineralización

La biomineralización fue evaluada, para las muestras de la primera etapa, sembrando osteoblastos derivados de hueso alveolar humano a una densidad de 2×10^4 sobre los diferentes sustratos en cajas de cultivo de 24 pozos. Se utilizó un medio inductor de la biomineralización que contenía medio DMEM suplementado con 10% SFB, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido ascórbico, 10 mM de β -glicerofosfato, 10^{-7}M de dexametasona y una solución de antibióticos compuesta de penicilina (100 U/mL) y estreptomina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las células fueron cultivadas por 7 y 14 días. El medio se cambió cada 2 días. Al término de estos períodos las muestras fueron lavadas dos veces con PBS a 37°C , fijadas con glutaraldehído al 4% por 30 minutos y deshidratadas gradualmente con etanol a diversas concentraciones 30, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%. Posteriormente las muestras fueron cubiertas con oro por medio de la técnica de sputtering. Las muestras fueron observadas en un microscopio de barrido JEOL JSM 5600LV equipado con un sistema de microanálisis de rayos X (EDX). La evaluación de la biomineralización consistió en el examen de composición elemental y morfológica de los depósitos de mineral encontrados en las muestras. Así mismo se realizaron mapeos químicos de las superficies modificadas y sin modificar buscando los elementos Ca y P. Cada experimento se realizó por triplicado.

Para las muestras de la segunda etapa, las células fueron sembradas a una densidad de 2×10^4 sobre los diferentes sustratos en cajas de cultivo de 24 pozos. Se utilizó un medio inductor de la biomineralización, que fue colocado una vez que las células estuvieron en confluencia (7 días aproximadamente). Las células fueron incubadas por 7 y 14 días para las inmunolocalizaciones de BSP y OCN; y por 14 y 21 días para la observación al microscopio electrónico de barrido. El medio se cambió cada 2 días. Al término de cada periodo las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS a 37°C , posteriormente fueron fijadas con glutaraldehído al 4% por 30 minutos. Para la observación en el microscopio electrónico de barrido, las muestras fueron deshidratadas gradualmente con etanol a diversas concentraciones: 30, 50, 60, 70, 80, 90 y

100% y recubiertas con oro. Mientras que para el estudio de inmunolocalización de BSP y OCN, las muestras fueron permeabilizadas con tritón x100 al .5% durante 5 minutos, posteriormente se colocó el primer anticuerpo, específico contra BSP u OCN en PBS con albumina al 2% y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, después de esto las muestras fueron lavadas 3 veces en PBS con tween 20 al 0.1% (PBST). Después del lavado, las muestras fueron incubadas con un anticuerpo secundario conjugado con FITC por 1 hora a temperatura ambiente, lavadas 3 veces con PBST al 0.1% y lavadas 3 veces con PBS. Al término las muestras fueron colocadas en un portaobjetos, montadas con DABCO y observadas con un microscopio Carl Zeiss de epifluorescencia.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los ensayos biológicos fueron analizados por medio de la prueba de ANOVA, utilizando el programa Sigma Stat 3.1 con una $p < 0.05$.

CAPÍTULO III

Resultados

Primera etapa

Caracterización Física de los Recubrimientos.

La caracterización de las pruebas físicas sólo se realizaron en películas de carbono amorfo y nitruro de carbono, ya que el depósito de películas de carbono hidrogenado falló, esto se debió a que el plasma nunca fue estable y los depósitos no tuvieron los mismos tiempos de deposición ni las mismas condiciones de energía, por lo tanto las muestras de carbono hidrogenado fueron desechadas tanto para la caracterización física como para la caracterización biológica.

Composición de las películas

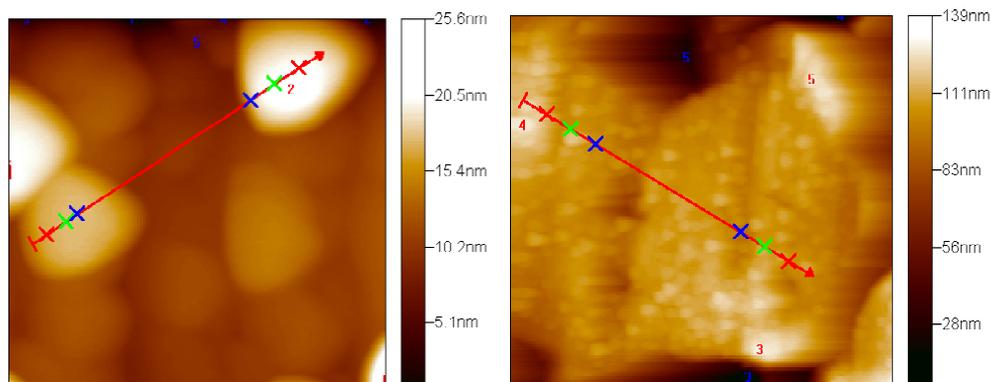
La composición superficial se determinó en las películas de a-CN por las técnicas de Rutherford backscattering spectroscopy (RBS) y Auger. Con la técnica RBS se obtuvo que la razón atómica C/N fue cercana a 1, mientras que con la técnica Auger se obtuvo un a razón ~1.2. En los análisis realizados a las películas de a-C, se detectó carbono y oxígeno, sin embargo, este último se encontró como contaminante superficial, el cual fue fácilmente removido con un haz de iones de argón.

Perfilometría y microscopía de fuerza atómica (AFM)

Como se explicó anteriormente, las muestras de acero inoxidable 316L correspondiente a la primera etapa, no fueron pulidas, por lo que la rugosidad promedio a escala microscópica variaba de 50 a 100 nm, dependiendo de la dirección del escaneo de la muestra y como consecuencia del rayado presentado en estas muestras.

AFM en el modo de contacto, fue utilizada para estudiar la morfología superficial a una escala menor. La rugosidad promedio, R_a , en un área de 300x300 nm fue de 3 nm para las muestras con películas de carbono amorfo y de 2.5 nm para las muestras con película de nitruro de carbono. Sin embargo, cabe decir que en áreas más grandes los valores de R_a fueron mucho mayores, esto se entiende como el reflejo de la rugosidad del sustrato.

Figura 2.



Rugosidades heterogéneas en la superficie de las muestras

Figura 2. La figura muestra microfotografías de fuerza atómica en donde se pueden observar las rugosidades heterogéneas presentes en las muestras no pulidas.

Transmisión de luz UV/visible

Con la finalidad de determinar las propiedades electrónicas de la superficie, se realizaron mediciones de transmisión y reflexión en películas depositadas sobre vidrio. Con los espectros de reflexión y transmisión se determinó el coeficiente de absorción óptica en un intervalo de energía entre 1-5 eV. Los resultados mostraron que ambas películas, carbono

amorfo y nitruro de carbono, tenían una brecha óptica pequeña (0.5-1 e V), típica de los materiales semiconductores.

Caracterización biológica

La caracterización biológica se realizó con el objeto de conocer el comportamiento de los osteoblastos sobre las diferentes superficies estudiadas, así como los posibles efectos tóxicos de estas superficies hacia las células. En el conteo celular con la técnica colorimétrica modificada de Hayman, se realizó una curva estándar de manera previa a los ensayos. Dicha curva se determinó colocando un número establecido y conocido de células de forma creciente (5, 10, 15, 20, 25, 30 x 10³) en cajas de cultivo de 24 pozos por triplicado. Las células se incubaron por 24 horas y fueron fijadas, posteriormente teñidas según el ensayo de adhesión celular. Finalmente, se obtuvo la absorbencia correspondiente a cada cantidad de células. La gráfica 1 muestra la relación entre el número de células y la absorbencia. Se puede observar que existe una buena relación lineal que nos permite utilizar la medición de la absorbencia para obtener el número de células adheridas.



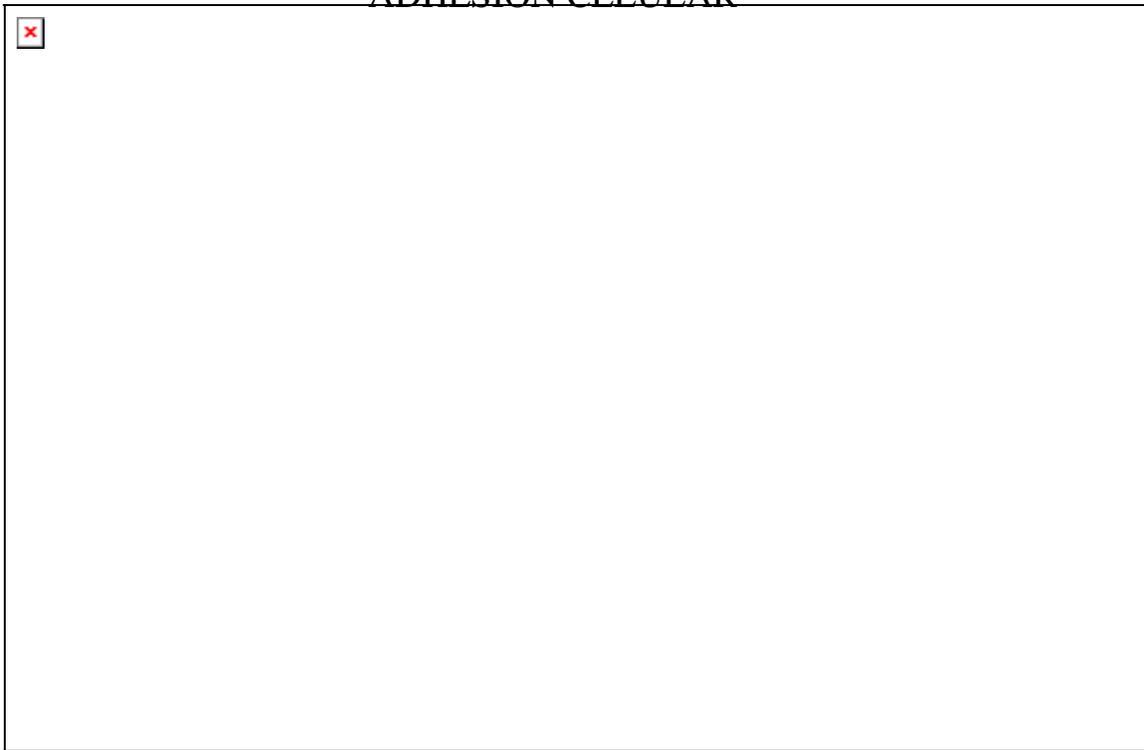
Aproximación lineal de células adheridas

Gráfica 1. *La gráfica muestra el resultado de la aproximación lineal y el coeficiente de regresión de la absorbencia de células adheridas*

Adhesión celular

Este estudio tuvo la finalidad de observar en que tipo de superficies existe un mayor número de células adheridas durante 24 horas de cultivo. La gráfica 2 muestra los resultados del ensayo de adhesión celular de osteoblastos humanos sobre los diferentes tipos de superficies. Los resultados se presentan como porcentaje del control, considerando a las células adheridas en los pozos de cultivo (control) como el 100%.

ADHESION CELULAR



Adhesión celular de osteoblastos después de 24 horas de cultivo.

Gráfica 2. Gráfica de la adhesión celular de osteoblastos a las diferentes muestras. Acero 316L (SS), carbono amorfo (a-C), nitruro de carbono (CN), titanio (Ti). En esta gráfica se puede observar como las muestras de a-C y CN tienen valores por encima del control (línea roja) y las muestras metálicas se encuentran por debajo del control.

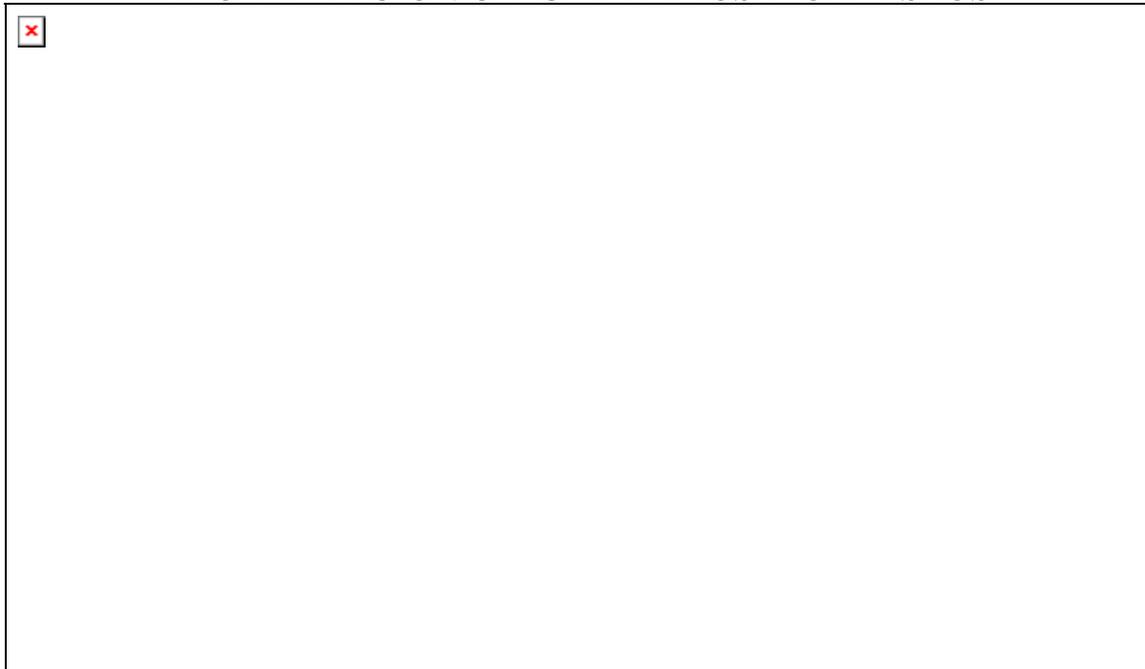
Puede observarse que existe una mayor cantidad de osteoblastos adheridos a las superficies no metálicas en relación con las superficies como el acero y el titanio. las superficies con mayor cantidad de osteoblastos adheridos fueron las superficies de

carbono amorfo, superando al control en un 20% y a las superficies metálicas en un 30%. En cuanto a la adhesión de osteoblastos sobre titanio y acero 316L, estas superficies presentaron valores muy parecidos, sin embargo, estos valores fueron menores que las muestras control, carbono amorfo y nitruro de carbono. Estos ensayos fueron realizados con otro tipo celular (anexo 1).

Proliferación celular

La proliferación celular fue estudiada con el objeto de observar si los sustratos experimentales permitían el crecimiento de las células durante los diferentes tiempos de incubación estudiados. Para los ensayos de proliferación celular las células fueron incubadas por 1, 3 y 7 días en la primera etapa. Las gráfica 3 presenta la proliferación celular de los osteoblastos durante los diferentes tiempos de incubación.

PROLIFERACION CELULAR DE OSTEOLASTOS



Proliferación celular de osteoblastos.

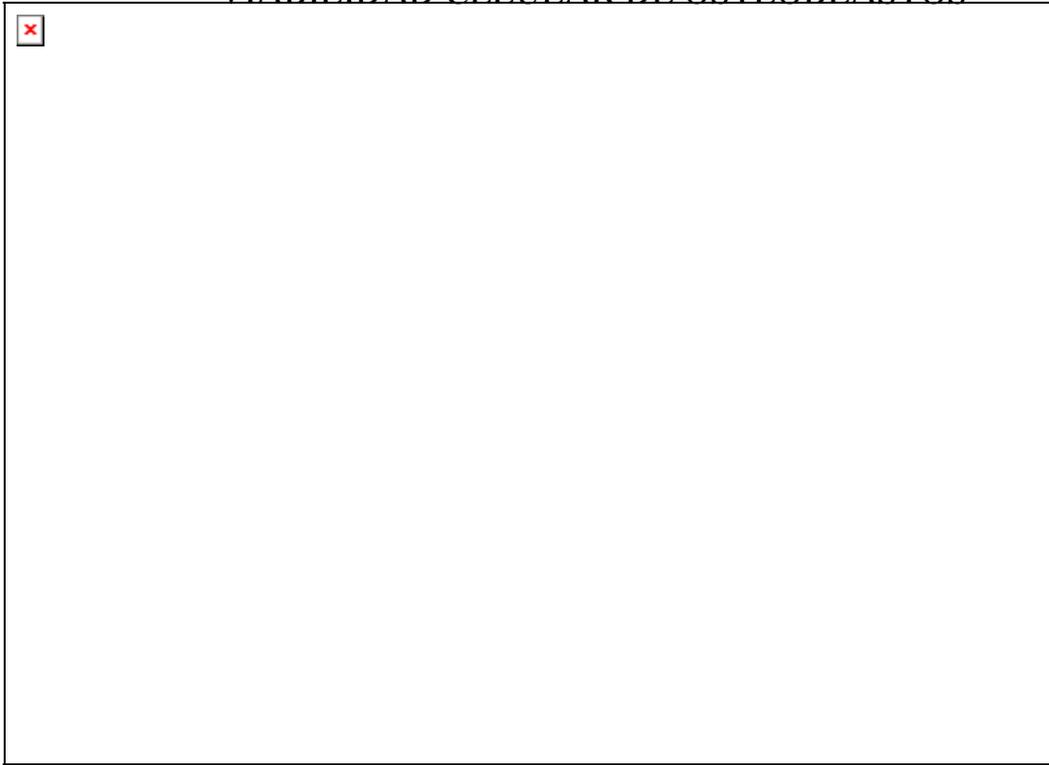
Gráfica 3 . *La gráfica muestra la proliferación celular a lo largo de 7 días, en dicha grafica se observa el comportamiento de los diferentes sustratos experimentales. El carbono amorfo y titanio muestran una tendencia a favorecer la proliferación celular.*

La gráfica 3 muestra como las superficies de carbono amorfo y titanio mostraron una mayor cantidad de células presentes durante todos los días de cultivo, mientras que las superficies de acero 316L presentaron la menor cantidad de células adheridas y con un nulo incremento durante los días de cultivo. Por otro lado, las superficies de nitruro de carbono mostró una disminución de la cantidad de células, dicho comportamiento se relaciona con los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular.

Viabilidad celular

El ensayo de viabilidad celular se realizó con el objeto de observar si las muestras experimentales resultaban tóxicas para las células en cultivo o bien si disminuían su actividad metabólica. Este ensayo fue realizado utilizando la prueba de MTT, también llamada prueba de citotoxicidad. La gráfica 4 muestra los resultados de este ensayo como cantidad de absorbencia a 570nm. La absorbencia es directamente proporcional a la actividad metabólica de las células e inversamente proporcional a la toxicidad del material. Todas las superficies mostraron valores por encima de los obtenidos por las muestras control, por lo que podemos pensar que ninguna de las superficies es tóxica o altera negativamente el metabolismo celular de los osteoblastos humanos en cultivo. En las superficies de nitruro de carbono existió una disminución de los valores de absorbencia para el día 5. El comportamiento de las películas de nitruro de carbono, tanto en los ensayos de proliferación celular como los de viabilidad celular, pudo verse afectado ya que en las muestras de este material se observaron partes de la película despegada (figura 3) después del día 4 de cultivo, esto se considera una falla de adhesión película-sustrato, por lo que los resultados en los ensayos de proliferación y viabilidad celular para estas superficies no son confiables.

VIABILIDAD CELULAR DE OSTEÓBLASTOS



Viabilidad celular de osteoblastos en cultivo directo con las películas experimentales.

Gráfica 4. *Se puede observar que ninguna muestra experimental es tóxica, esto valorado hasta los 7 días de cultivo, y las muestras experimentales obtienen valores semejantes o superiores a los obtenidos por el control en la prueba de MTT.*



Falla de adhesión en las películas de nitruro de carbono.

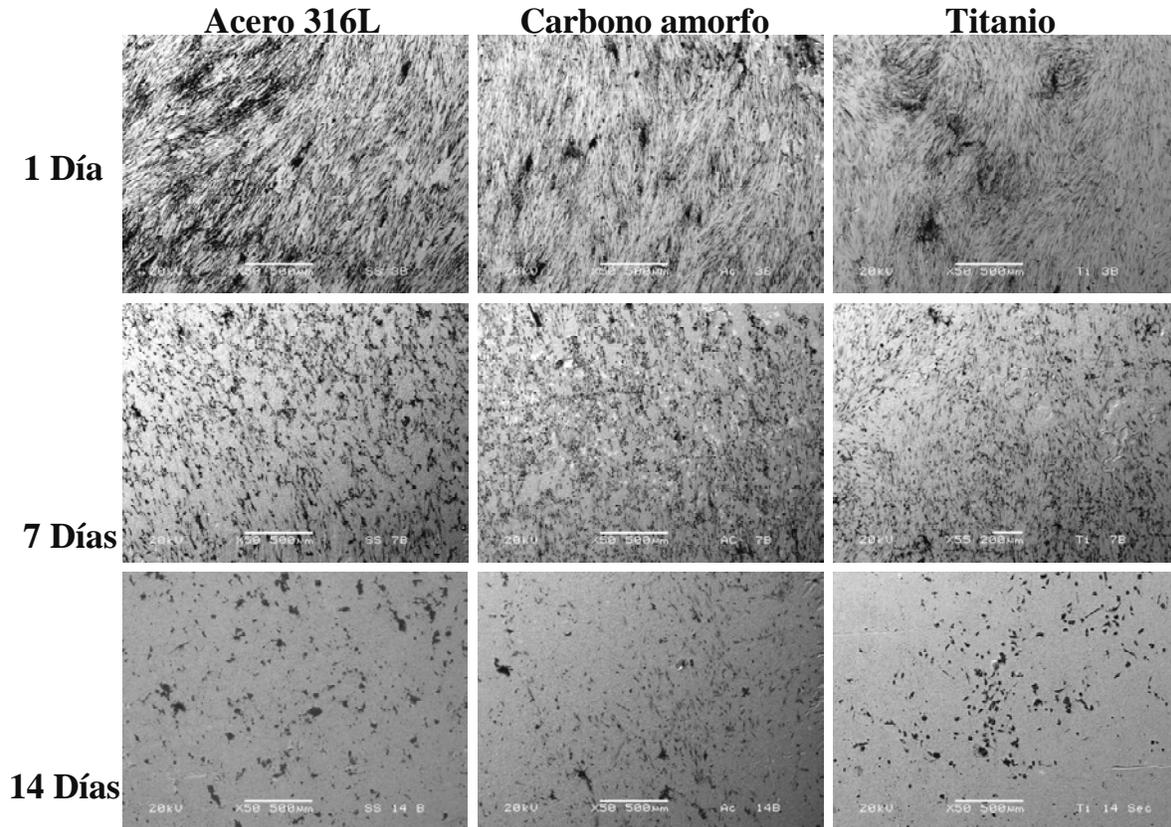
Figura 3. *La figura muestra el desprendimiento de la película de nitruro de carbono del sustrato de acero 316L, estos desprendimientos se observaron después de varios días de cultivo celular.*

Debido al desprendimiento de las películas nitruro de carbono, se decidió eliminar a estas películas experimentales, por lo que en los ensayos posteriores no se experimentó con estas superficies.

Biom mineralización

El ensayo de biom mineralización se realizó con el objeto de observar si las superficies experimentales permitían la mineralización de la matriz extracelular, así como la composición elemental de dichos minerales. Este ensayo fue realizado durante 3, 7 y 14 días de cultivo celular. Para este estudio las células osteoblásticas fueron tratadas con ácido ascórbico, β -glicerofosfato y dexametasona inmediatamente después de sembrar las células, con el fin de inducir a las células a formar tejido mineralizado. La figura 4 muestra microfotografías de barrido electrónico, por la técnica de electrones retro-dispersados, esta técnica forma las imágenes de acuerdo a la composición química de la muestra, es por eso que las superficies experimentales se observan de color más claro y las células y material orgánico como porciones oscuras. En estas imágenes se observa como a los 3 días de cultivo con el medio promotor de la mineralización, las células están cercanas a la confluencia y presentan una morfología alargada. Mientras que a los 7 y 14 las células no se distinguen debido a la formación de matriz extracelular. A pesar de ello, no existe una diferencia clara entre las diferentes superficies observadas a bajas ampliaciones por microscopía electrónica de barrido, por lo que fue necesario realizar análisis elementales por la técnica de EDS en las zonas donde se encontraban depósitos mineralizados. En los espectros obtenidos se observaron diferentes concentraciones de calcio, fósforo, magnesio y azufre, la concentración de estos elementos era variable en las diferentes zonas estudiadas, por lo que se realizaron un análisis elementales por EDS, en

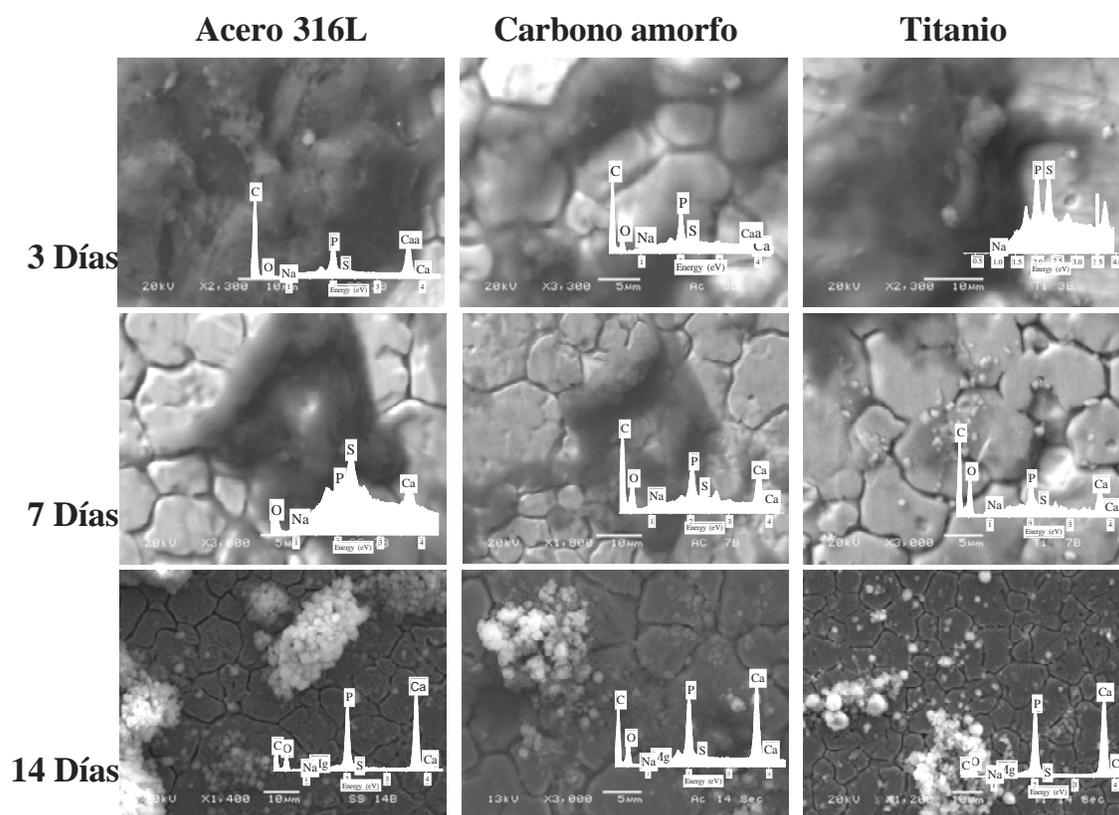
ello se observan pequeñas diferencias en cuanto a composición y sobre todo en las razones Ca/P.



Microfotografías electrónicas de barrido a bajas ampliaciones.

Figura 4. Se observan imágenes a bajas ampliaciones de las superficies experimentales después de los diferentes tiempos de incubación. las células se pueden observar claramente a los 3 y 5 días de cultivo, sin embargo, la definición de las células se pierde a los 7 días.

La figura 5 muestra las microfotografías de las superficies experimentales y el respectivo espectro de EDS después de 3, 7 y 14 días de cultivo celular. Las microfotografías y los análisis fueron tomados en diferentes zonas de cada muestra. La cantidad de nódulos y la composición fue variable en diferentes zonas de una misma muestra, por lo que se realizaron numerosas mediciones. En la figura 5, se observa que los nódulos se encuentran relacionados con materia orgánica a tiempos de incubación más tempranos.



Microfotografías electrónicas de barrido a altas ampliaciones y espectros de EDS.

Figura 5. Se observan microfotografías de las superficies experimentales en el ensayo de biomineralización. Se pueden observar los nódulos mineralizados con sus respectivos espectros de EDS durante los diferentes tiempos de cultivo.

Para los 7 días de cultivo se encontraron más nódulos y de mayor tamaño sobre las superficies de carbono amorfo y titanio. La razón Ca/P, de dichos nódulos, fue cambiando conforme aumentaban los días de cultivo, esto se observa en la tabla 4, la cual muestra el promedio de las razones Ca/P de los nódulos mineralizados en los diferentes tiempos de cultivo. Es importante hacer notar que existen otros elementos asociados a los nódulos mineralizados como el azufre, sodio, cloro, potasio y magnesio. Estos minerales posiblemente jueguen un papel en la formación y crecimiento de dichos nódulos. Asimismo, el contenido de azufre disminuye conforme aumentan los días de cultivo, esto se relaciona con la disminución y ausencia de la materia orgánica en los 7 y 14 días de cultivo.

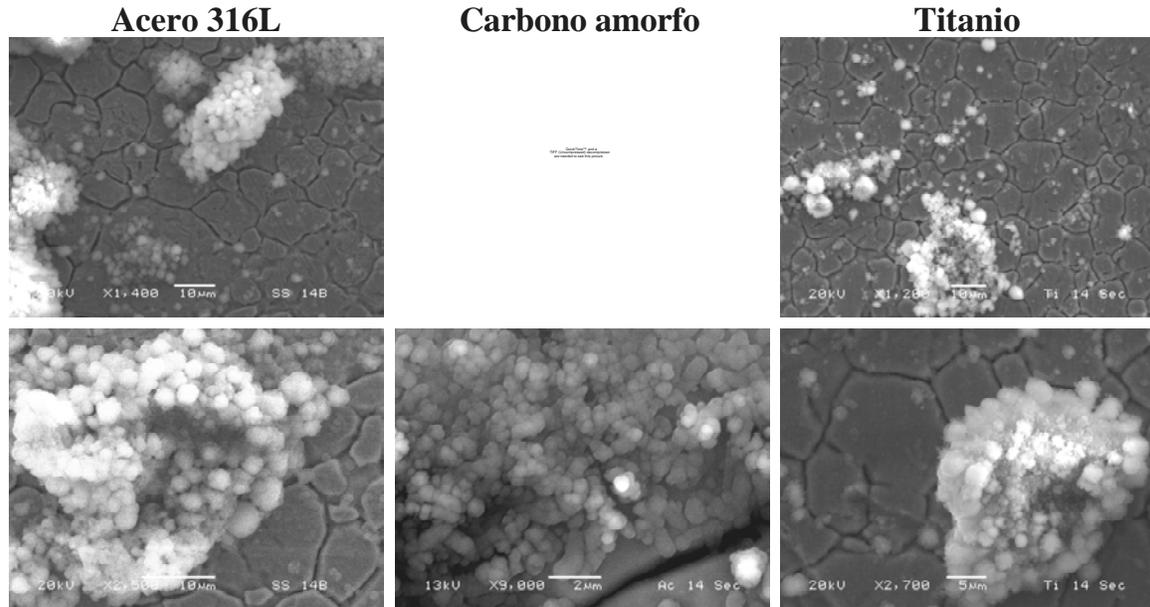
| Sustrato | Días de cultivo | | |
|----------------|-----------------|------|------|
| | 3 | 7 | 14 |
| Acero 316L | 1.78 | 2.18 | 1.71 |
| Carbono amorfo | 0.59 | 1.55 | 1.64 |
| Titanio | 1.24 | 1.67 | 1.66 |

Razones Ca/P promedio durante los diferentes tiempos de cultivo.

Tabla 4. La tabla muestra los promedios de las razones Ca/P de diferentes zonas de las diferentes superficies estudiadas durante los tiempos de incubación establecidos en el estudio.

La figura 6 muestra los nódulos encontrados sobre las superficies de acero 316L, carbono amorfo y titanio después de 14 días de cultivo celular. Las muestras que fueron incubadas durante 14 días bajo las condiciones del medio inductor a la mineralización presentaron la mayor cantidad de nódulos, así como las razones Ca/P más parecidas a las encontradas en el hueso humano. Los nódulos encontrados sobre las superficies de acero 316L se agrupaban en racimos para formar estructuras grandes, sin embargo, dichas estructuras se encontraban cubriendo muy pocas zonas de las muestras, por lo que la mayor parte del área de las muestras no tenían formación de nódulos mineralizados. Por otra parte, los nódulos formados sobre las superficies de carbono amorfo, también se encontraron formando racimos, éstos eran estructuras de menor tamaño que las encontradas sobre las superficies de acero 316L, aunque, se encontraron dispersos por toda la superficie de las muestras de carbono amorfo. Así mismo, las estructuras mineralizadas encontradas sobre las superficies de titanio también presentaron la formación de racimos de nódulos minerales, sin embargo, estas estructuras fueron más pequeñas en relación con las muestras de acero 316L y carbono amorfo, cabe resaltar que dichas estructuras se encontraban presentes en casi toda la superficie de las muestras analizadas y las razones

Ca/P fueron muy parecidas a las encontradas en el hueso.



Nódulos mineralizados sobre las diferentes superficies después de 14 días de cultivo.

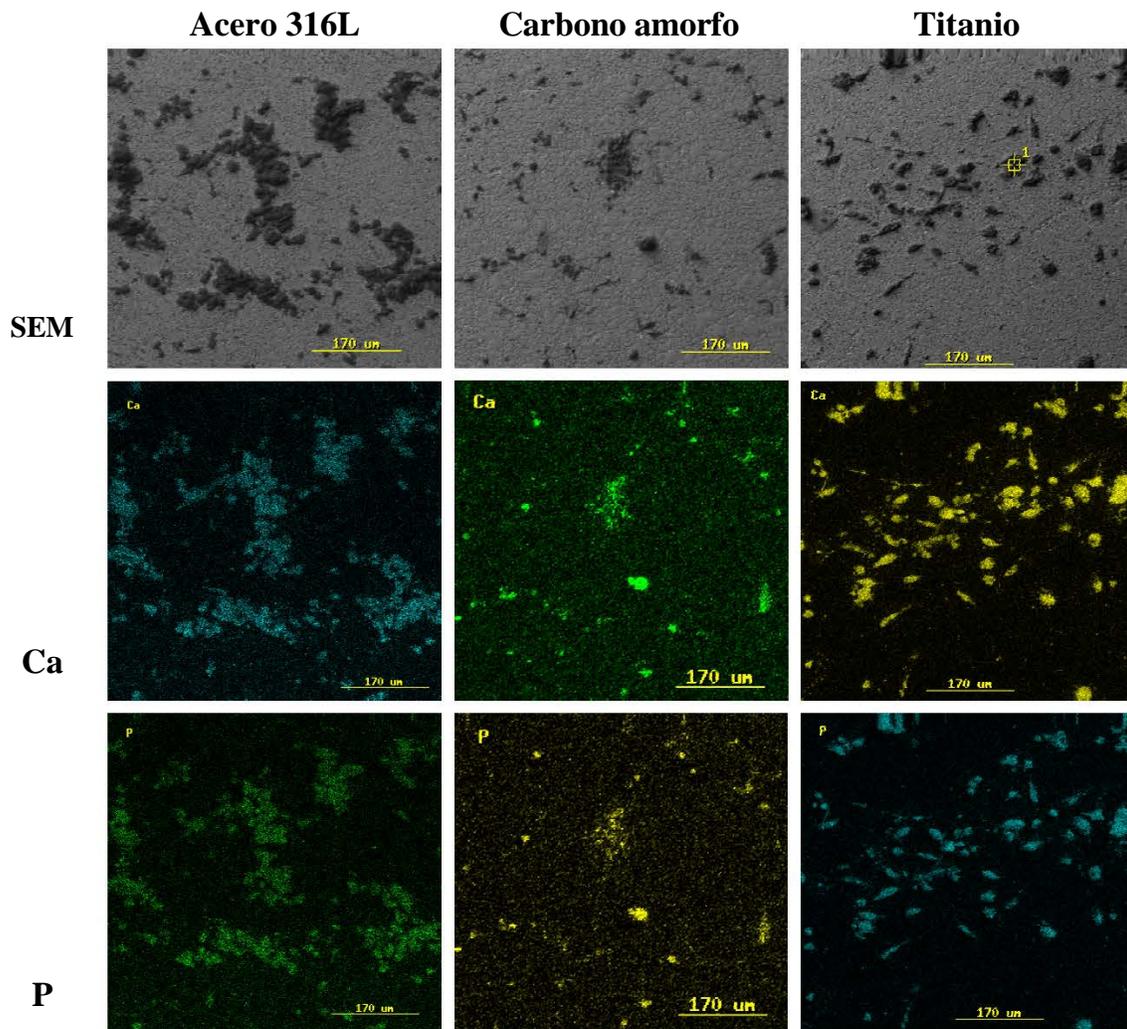
Figura 6. Se observan los nódulos mineralizados sobre las diferentes superficies después de 14 días de incubación con el medio mineralizante.

Como se observa en la figura 6, los nódulos encontrados sobre las superficies no cubren homogéneamente las superficies de las muestras e incluso dichos nódulos varían en una misma muestra. Este hecho llevo a plantearnos la posibilidad de utilizar la técnica de mapeos químicos con el fin de conocer el área ocupada por los nódulos del área total de cada muestra.

Mapeos químicos

Con la finalidad de obtener un análisis cuantitativo del área ocupada por los nódulos encontrados sobre las diferentes superficies, se utilizó la técnica de mapeos químicos con el EDS, el objetivo principal de este análisis fue obtener la composición elemental de áreas grandes para poder compararlas entre las diferentes superficies. En este estudio, es posible realizar barridos de una misma zona para diferentes elementos, por lo que

realizaron buscando señal de Ca y P. La figura 7, presenta los mapeos químicos realizados sobre las diferentes superficies. Los mapeos fueron realizados sobre estructuras cuyas razones Ca/P fueran cercanas a 1.6. Sin embargo, las imágenes obtenidas fueron de áreas muy pequeñas (0.5 mm^2) lo cual no representaba al 1 cm^2 de la superficie total. Como se menciona anteriormente, los nódulos no se encontraban distribuidos uniformemente, por lo que el análisis cuantitativo del total del área cubierta por estos depósitos mineralizados no es exacta y puede ser engañosa, como se observa en la figura 7, en la cual parece que existe una gran cantidad de depósitos mineralizados sobre acero 316L, mientras que en las superficies de carbono amorfo parece que se encuentran muy pocos nódulos, sin embargo, los depósitos que se muestran en la figura 7 del acero 316L fueron los únicos encontrados en la muestra, mientras que los nódulos que presenta el panel B correspondiente al carbono amorfo representa la zona con menor densidad de estos depósitos. Los resultados de este análisis indican que los nódulos observados por medio del microscopio electrónico de barrido sobre las muestras están asociados a señales de Ca y P, figura 7, sin embargo, no es posible realizar un análisis cuantitativo del área total cubierta por los nódulos debido al tamaño del área de escaneo, el cual es demasiado pequeño para representar el total del área superficial de las muestras, aunado a la distribución no homogénea de los depósitos mineralizados.



Mapeos químicos de las superficies después de 14 días de cultivo.

Figura 7. Se observan los mapeos químicos realizados sobre las diferentes superficies del ensayo de biomineralización, después de 14 días de cultivo. Es evidente que la distribución de los depósitos mineralizados no es homogénea, por lo que no es posible hacer una análisis cuantitativo del área cubierta por dichos depósitos.

Modificación de la rugosidad superficial

La modificación de la rugosidad fue estudiada con la finalidad de conocer de que manera afecta este parámetro a la adhesión de osteoblastos en cultivo sobre las muestras de carbono amorfo, ya que se han reportado diversos estudios mostrando como un aumento de la rugosidad superficial incrementa la adhesión de osteoblastos sobre muestras de

titanio, sin embargo, no existe ningún estudio con muestras de carbono amorfo. Las muestras experimentales fueron modificadas por medio de la técnica de sand-blasting para producir diversas rugosidades, obteniéndose 4 diferentes rugosidades: pulido (0.04 μm), R1 (1.5 μm), R2 (2.1 μm), R3 (3.4 μm).

Rugosidad promedio

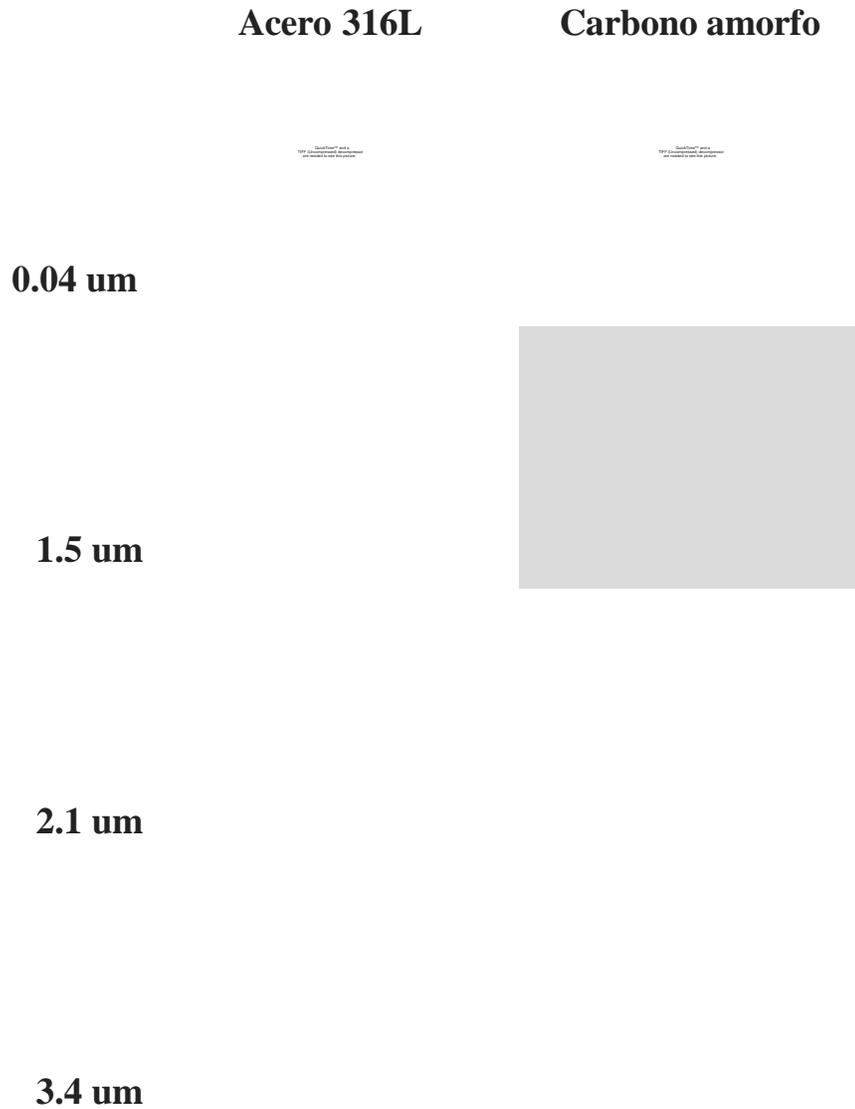
La obtención de la rugosidad promedio se realizó con un perfilómetro antes y después del recubrimiento con la película de carbono amorfo. En cada muestra se realizaron 12 mediciones en plano, 6 en la dirección X y 6 en dirección Y. La tabla 5 permite observar la rugosidad promedio (R_a) de las muestras de acero 316L y de carbono amorfo en las 2 diferentes direcciones. Con este análisis se pudo observar que las superficies expuestas al sand-blasting con diversos grosores de partículas de óxido de aluminio muestran una rugosidad isotrópica, ya que los valores obtenidos en dirección X y en dirección Y tienen el mismo valor de rugosidad promedio. La figura 8 muestra las microfotografías electrónicas de barrido de las superficies de acero 316L y carbono amorfo con las diferentes rugosidades estudiadas.

| Muestra | Rugosidad | Rx(μm) | Desv. estandard | Ry (μm) | Desv. estandard |
|----------------|-----------|---------------------|-----------------|----------------------|-----------------|
| Acero 316L | Pulido | 0.042 | 0.008 | 0.044 | 0.012 |
| Acero 316L | R1 | 1.539 | 0.128 | 1.454 | 0.074 |
| Acero 316L | R2 | 2.143 | 0.141 | 2.201 | 0.094 |
| Acero 316L | R3 | 3.493 | 0.354 | 3.795 | 0.341 |
| Carbono amorfo | Pulido | 0.018 | 0.005 | 0.020 | 0.005 |
| Carbono amorfo | R1 | 1.557 | 0.274 | 1.574 | 0.193 |
| Carbono amorfo | R2 | 2.284 | 0.150 | 2.268 | 0.270 |
| Carbono amorfo | R3 | 3.500 | 0.330 | 3.461 | 0.377 |

Rugosidad promedio de las diferentes rugosidades obtenidas.

Tabla 5. Se muestran las rugosidades promedio obtenidas después de la modificación de la rugosidad por la técnica de sand-blasting.

En esta parte de la caracterización pudimos observar que las superficies no cambian la morfología superficial al ser cubiertas con películas de carbono amorfo, sin embargo, en la superficies pulidas, las películas de carbono amorfo matizan las líneas que quedaron de la etapa de pulido.



Microfotografías electrónicas de barrido de las diversas rugosidades.

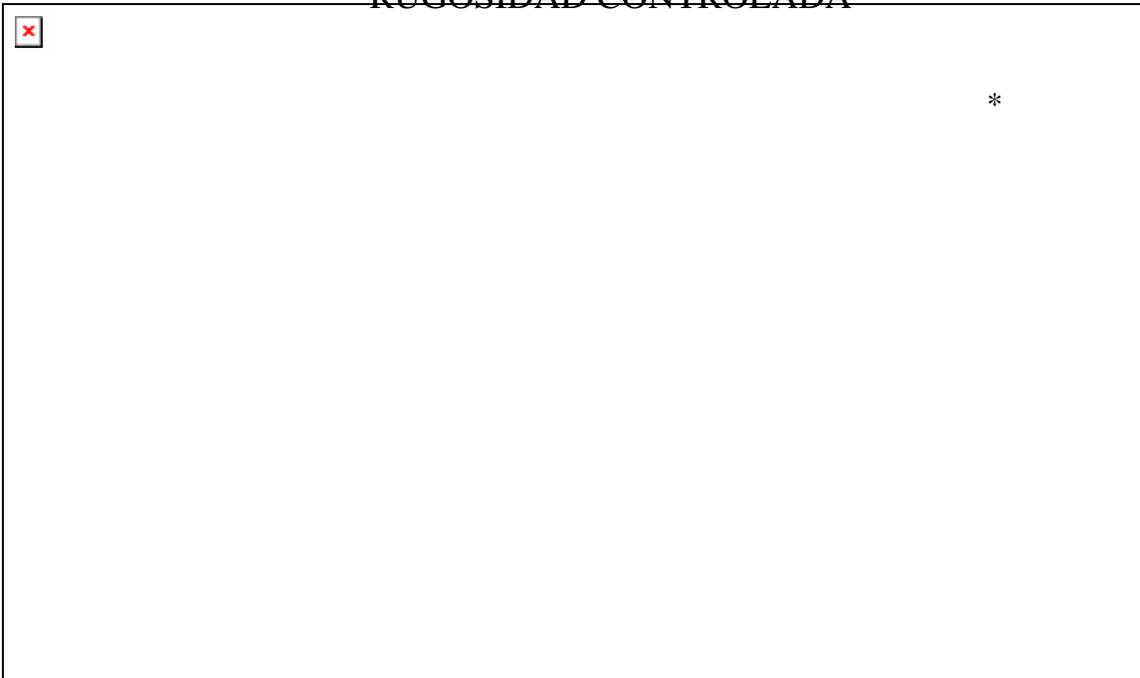
Figura 8. Se observan las diferentes rugosidades superficiales obtenidas después de la modificación de rugosidad por medio de sand-blasting en acero 316L y en superficies con películas de carbono amorfo.

Caracterización biológica de las superficies con rugosidad controlada

Adhesión celular

El ensayo de adhesión celular sobre muestras con una rugosidad controlada se realizó con el objeto de conocer si la adhesión celular se modificaba al modificar las características morfológicas de la superficie. Para este ensayo las células se incubaron por 24 horas con las condiciones señaladas previamente dejando que las células se adhirieran a las diferentes superficies. Los resultados de la adhesión celular de osteoblastos humanos sobre las superficies de acero 316L y carbono amorfo con diferentes rugosidades promedio se observan en la gráfica 5, los resultados se presentan como porcentaje del control, tomando a la superficie control como el 100%.

ADHESION CELULAR SOBRE SUPERFICIES CON RUGOSIDAD CONTROLADA



Adhesión celular sobre sustratos con rugosidad controlada.

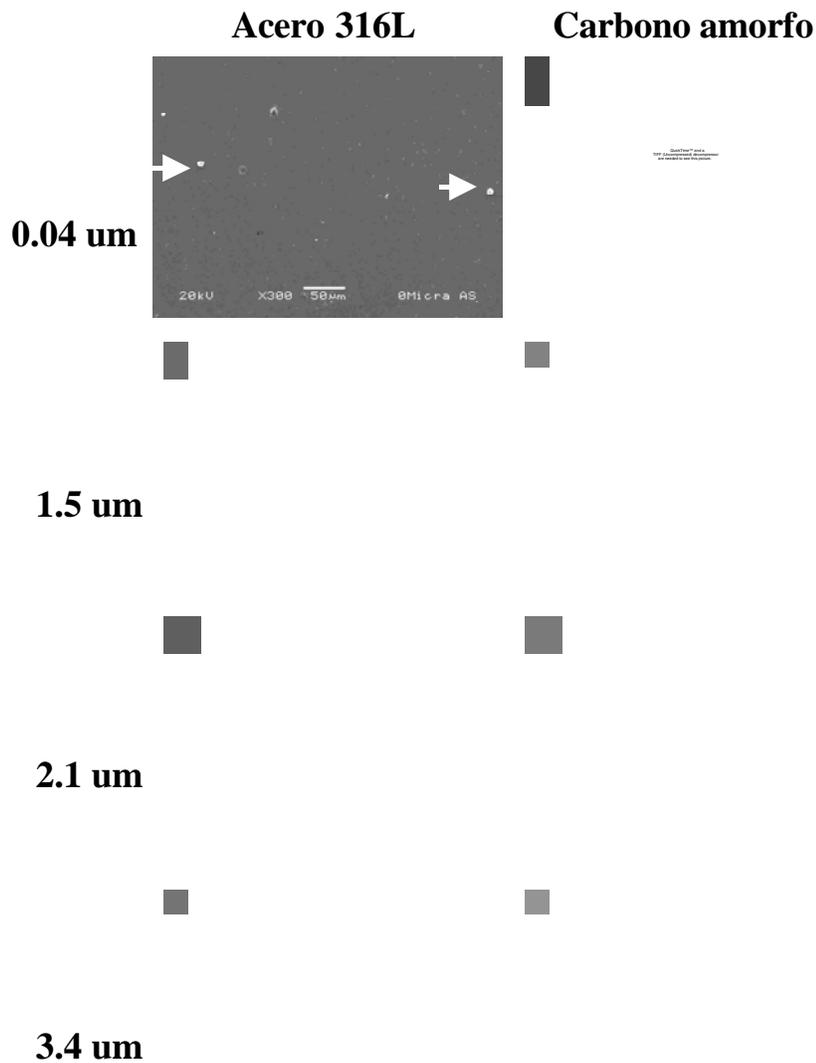
Gráfica 5. En esta gráfica se puede observar como la rugosidad afecta positivamente la adhesión de osteoblastos humanos cultivados sobre superficies de carbono amorfo, mientras que en las superficies de acero 316L no se observa un aumento en la cantidad de células adheridas a la superficie. La línea roja representa a la superficie control (100%). * $p < 0.05$.

Los resultados obtenidos de este ensayo muestran que la rugosidad superficial promedio es un factor que influye en la adhesión de osteoblastos sobre superficies de carbono amorfo. Las superficies de carbono amorfo con la menor rugosidad promedio (0.04 μm) presentaron la menor cantidad de células adheridas, conforme se aumento la rugosidad promedio (1.5 μm), (2.1 μm) se aumento la cantidad de células adheridas a las muestras, siendo las superficies con una rugosidad promedio de 3.5 μm las superficies con mayor número de células adheridas después de 24 horas de cultivo. Sin embargo, el incremento en la rugosidad superficial no influyó de la misma forma a las superficies de acero 316L, ya que en éstas superficies no se observó algún cambio significativo en cuanto al número de células adheridas a dichas superficies.

Estudio morfológico de la adhesión celular

El estudio morfológico de la adhesión de osteoblastos a superficies de carbono amorfo y acero 316L con una rugosidad controlada tuvo como finalidad, observar si existen diferencias en cuanto a la morfología celular y por lo tanto en la organización del citoesqueleto de las células a tiempos cortos de cultivo celular. La figura 9 muestra microfotografías a bajas ampliaciones y la figura 10 a altas magnificaciones, de osteoblastos adheridos a 24 horas de cultivo, sobre las superficies de acero 316L y carbono amorfo. La adhesión de osteoblastos sobre las superficies de acero 316L y carbono amorfo, fue observada por medio de SEM con la técnica de electrones secundarios, lo que nos permite observar la topografía de la muestra. Las microfotografías obtenidas de las superficies de acero 316L a bajas ampliaciones, muestran pocas células adheridas a la superficie en todas las rugosidades, éstas células se observan redondas y con pocos indicios de expansión celular. Por otro lado, se encontró

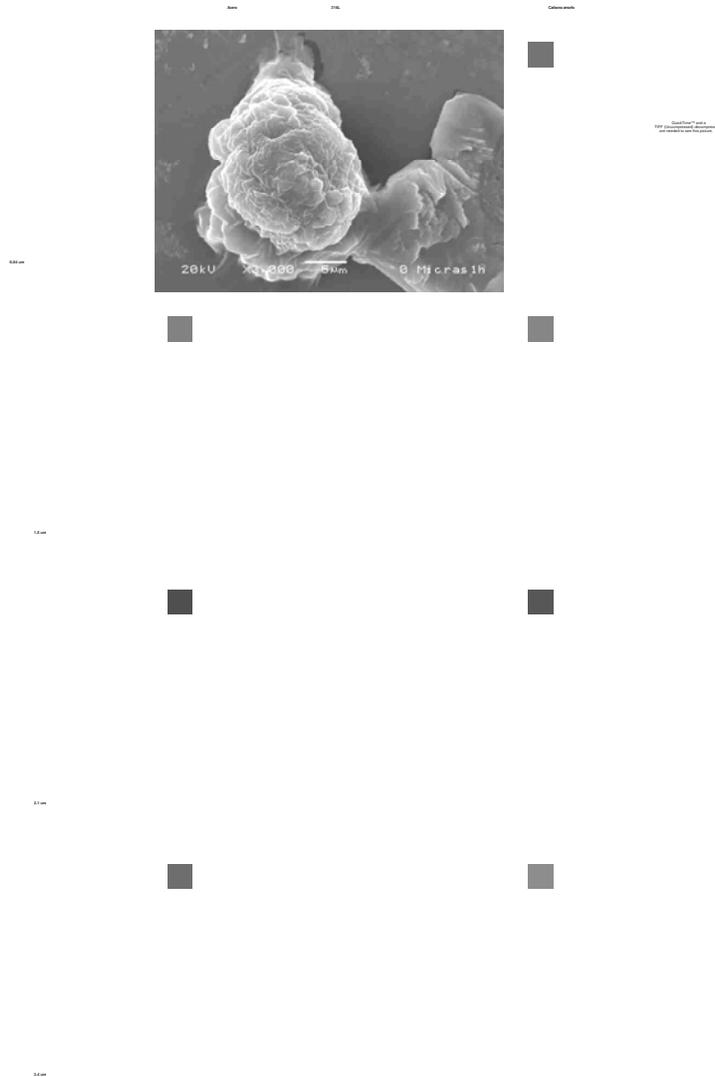
que las células observadas sobre las muestras de carbono amorfo se presentaron en un mayor número en comparación con las superficies de acero 316L y a bajas ampliaciones de observaron de forma circular de mayor tamaño que las observadas sobre las muestras de acero 316L, figura 9. Sin embargo, es difícil apreciar algún cambio de morfología en las diferentes rugosidades.



Microfotografías a bajas ampliaciones de la adhesión de osteoblastos.

Figura 9. La figura muestra la adhesión de osteoblastos sobre acero 316L y carbono amorfo en todas las rugosidades estudiadas a bajas magnificaciones después de 24 horas de cultivo. Las flechas indican células adheridas.

Cuando las células son observadas a altas ampliaciones sobre las muestras de acero 316L, se observan células redondas con prolongaciones citoplasmáticas muy pequeñas, algunas de ellas en proceso de expansión celular, figura 10. Sin embargo, no se observa una diferencia morfológica entre las células sobre las diferentes rugosidades.



Microfotografías a altas ampliaciones de la adhesión de osteoblastos.

Figura 10. *Microfotografías electrónicas de barrido a altas magnificaciones, mostrando la adhesión de osteoblastos sobre las superficies de acero 316L y de carbono amorfo después de 24 horas de cultivo celular. Se observa como en las superficies de acero 316L las células se encuentran poco expandidas, mientras que sobre las superficies de carbono, las células se encuentran en expansión y con múltiples prolongaciones.*

Las células observadas sobre las superficies de carbono a altas ampliaciones presentaron una morfología de células expandidas con prolongaciones citoplasmáticas. Sobre éstas superficies si se observó una diferencia en cuanto a la morfología celular sobre las diferentes rugosidades, siendo las superficies más rugosas las que presentaban células con un fenotipo alargado y con tactos célula-célula, figura 10.

Segunda etapa

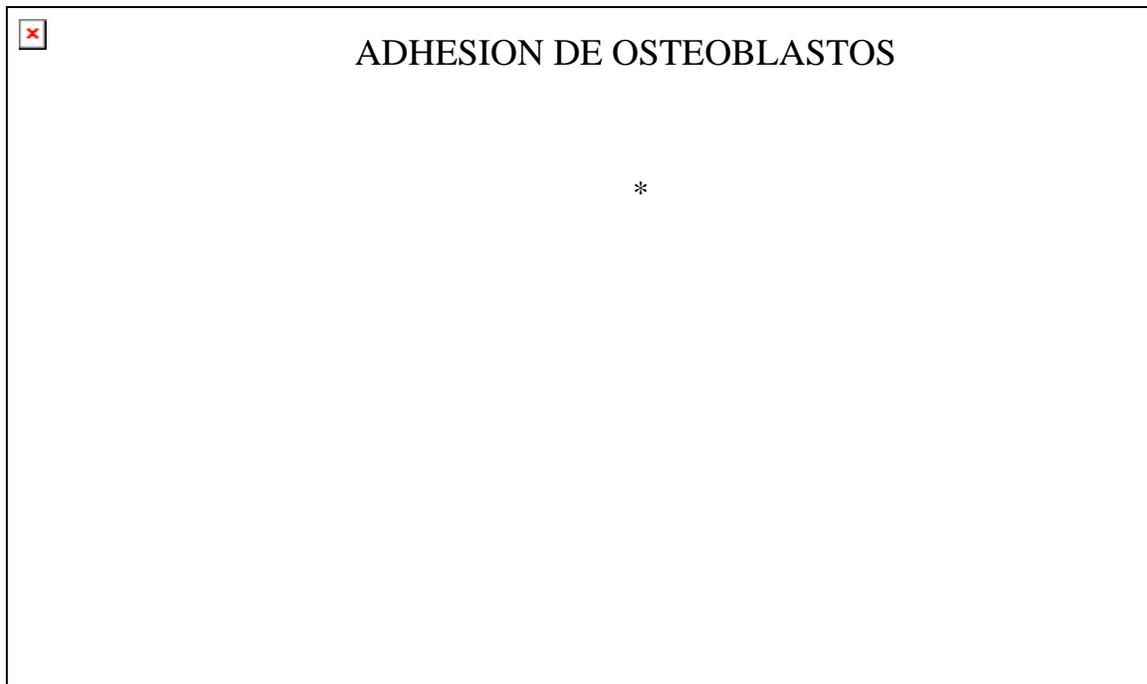
La segunda etapa tuvo como objetivo reevaluar los ensayos biológicos con una rugosidad promedio uniforme para todas las muestras experimentales, además de evaluar la capacidad de las películas de permitir la diferenciación celular y la formación de una matriz extracelular mineralizada.

Se estableció la rugosidad promedio de 2 μm , en base a los resultados previamente reportados y en la facilidad metodológica en obtener dicha rugosidad.

Adhesión celular

Los ensayos de adhesión celular tuvieron como objetivo evaluar la cantidad de osteoblastos adheridos a las diferentes superficies con una rugosidad controlada de 2 μm . Los resultados obtenidos en los ensayos de adhesión celular están representados en la gráfica 6. En dicha gráfica se observa la adhesión celular presentada como porcentaje del control de los osteoblastos humanos después de 24 horas de cultivo celular. Las superficies con un número mayor de células adheridas después del tiempo de incubación fueron las de carbono amorfo con 31% más células que el control, 20% más que las superficies de titanio y un 25% más que las superficies de acero 316L, mientras que las

superficies de titanio tuvieron valores mayores que el control y que las superficies de acero 316L, un 10% y 4% respectivamente. Es importante señalar que todas las superficies con rugosidad promedio de 2 μm , tuvieron valores superiores a los obtenidos por las muestras control.



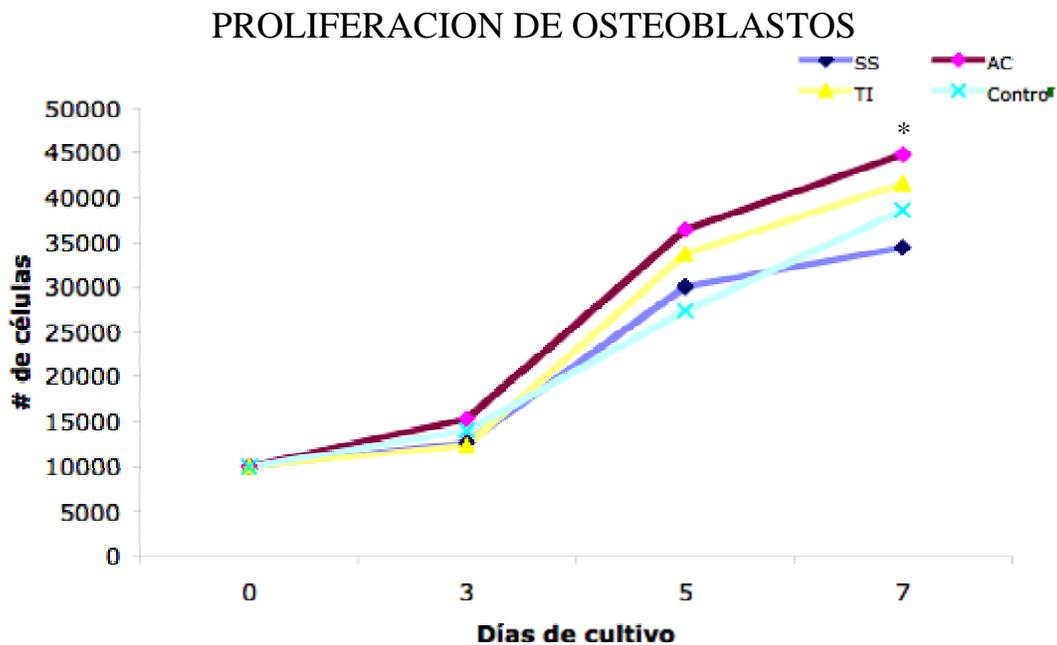
Adhesión de osteoblastos en las diferentes superficies.

Gráfica 6. La gráfica muestra los valores obtenidos en los ensayos de adhesión celular después de 24 horas de incubación. Se observa que las superficies de carbono amorfo muestran los valores más altos mientras que los valores más bajos los obtuvieron las superficies de acero 316L. Los valores son presentados como porcentaje del control. * $p < 0.05$.

Los resultados obtenidos en este ensayo muestran como la adhesión celular se ve incrementada con la modificación de la rugosidad promedio, puesto que en los resultados valores obtenidos en la primera etapa muestran una menor diferencia entre las superficies.

Proliferación celular

La proliferación celular fue evaluada para determinar si la rugosidad promedio controlada aunada a la química de las diferentes superficies incrementaba la proliferación celular. Para los ensayos de proliferación celular, las células fueron incubadas durante 3, 5 y 7 días. Se eliminó el día 1 del ensayo por presentar valores muy semejantes a los resultados del ensayo de adhesión celular, por lo cual se consideró que a 1 día de cultivo no existió proliferación celular. Los resultados obtenidos por todas las superficies estudiadas con rugosidad promedio de 2 μm se muestran en la gráfica 7. Estos resultados, muestran que las superficies de carbono amorfo presentan la tendencia al mayor número de células adheridas sobre las superficies en los primeros tiempos de incubación, siendo hasta el día 7 de cultivo cuando se obtiene una diferencia estadística significativa para el carbono amorfo.

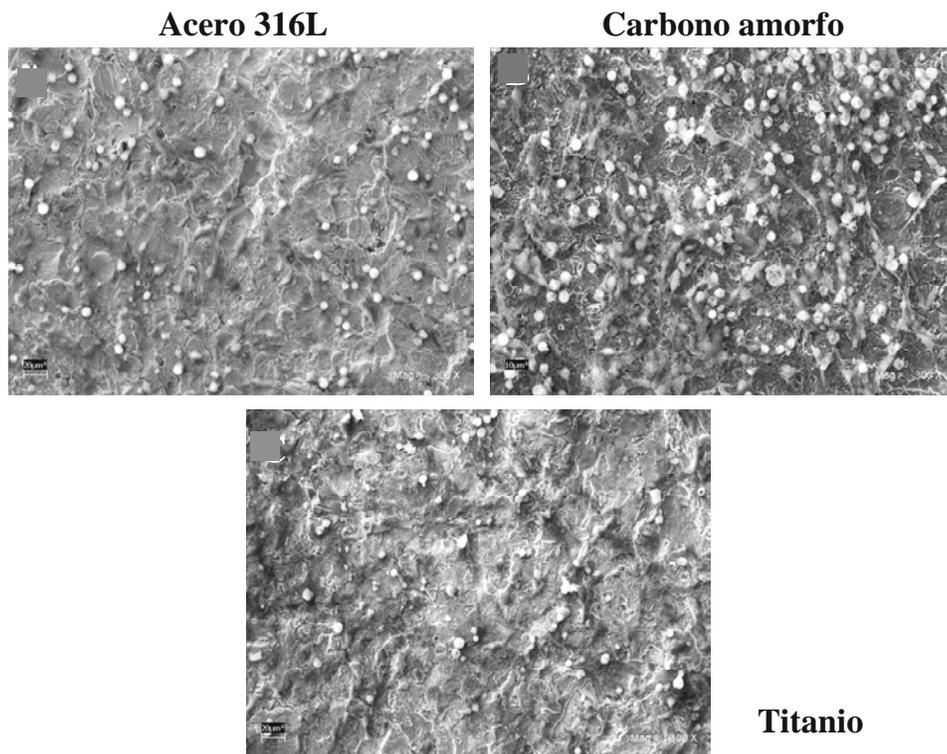


Proliferación celular de osteoblastos sobre las superficies.

Gráfica 7. La gráfica muestra la proliferación de osteoblastos sobre las diferentes superficies estudiadas durante 3, 5 y 7 días de cultivo celular. el carbono amorfo presenta una diferencia estadística significativa al día 7 de cultivo. * $p < 0.05$.

Es importante señalar que todas las superficies presentaron incremento en el número de células adheridas en todo el ensayo, lo que indica, que el aumento de la rugosidad a 2 μm favorece la proliferación celular, si se comparan con los resultados de la primera etapa de este trabajo.

Así mismo, se observaron las células adheridas a las superficies mediante microscopia electrónica de barrido, esto con el fin de observar la morfología celular en las diferentes superficies estudiadas. Las microfotografías de barrido se observan en la figura 11. En dichas microfotografías se observa un mayor número de células adheridas sobre las superficies de carbono amorfo en comparación con las superficies de acero 316L y titanio.

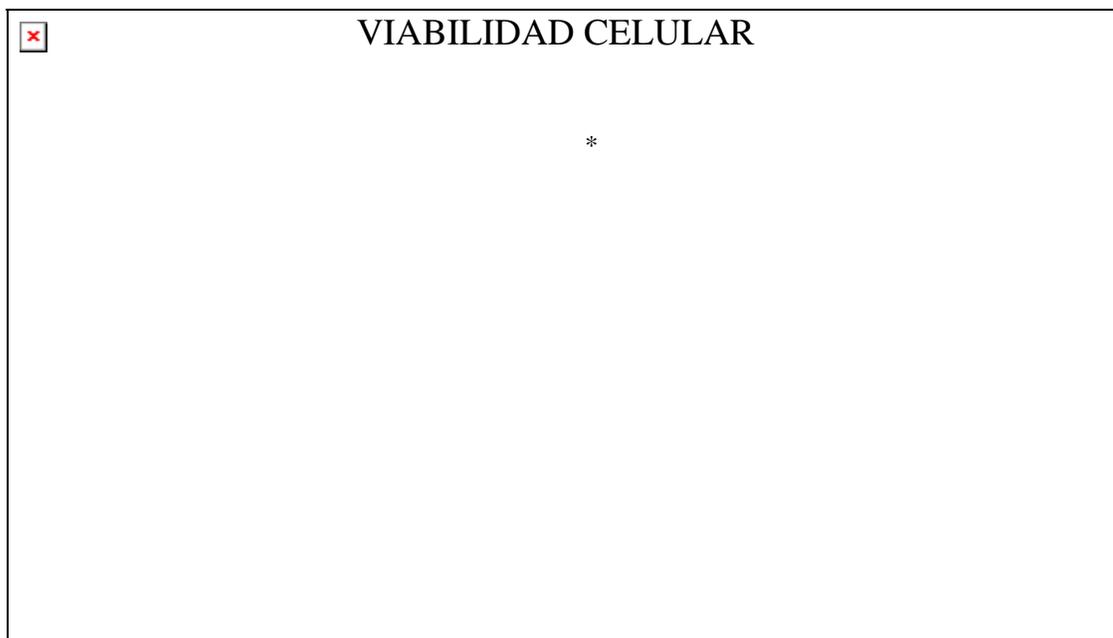


Microfotografías electrónicas de barrido de las superficies.

Figura 11. Microfotografías de barrido de las diferentes superficies después de 5 días de cultivo en el ensayo de proliferación celular. Se observa un mayor número de células en las superficies de carbono amorfo.

Viabilidad celular

La viabilidad celular fue evaluada, nuevamente en esta etapa, con el fin de observar si el cambio en la rugosidad promedio de las muestras afectaba el metabolismo de los osteoblastos. Los resultados de los ensayos de viabilidad celular son presentados como el valor de la absorbencia a 570nm del MTT. La gráfica 8 muestra los valores obtenidos por las superficies durante los diferentes periodos de incubación celular. Los resultados de estos ensayos indican, que ninguna de las superficies es tóxica para los osteoblastos humanos en contacto directo. De acuerdo a los valores de absorbencia obtenidos los osteoblastos sobre superficies de carbono amorfo y titanio registraron una mayor actividad metabólica comparada con las superficies control y acero 316L. Así, las superficies de acero 316L mostraron pocas variaciones en la absorbencia a lo largo de los tiempos de incubación estudiados.



Viabilidad celular de osteoblastos sobre las superficies.

Gráfica 8. Muestra la viabilidad de los osteoblastos humanos en cultivo sobre las diferentes superficies. Los resultados muestran que ninguna superficie es tóxica para las células a los tiempos estudiados. * $p < 0.05$.

Los resultados de este ensayo concuerdan con los obtenidos en el ensayo de viabilidad de la primera etapa, ya que ninguna superficie estudiada fue tóxica a los osteoblastos humanos, permitiendo la actividad metabólica celular.

Diferenciación celular

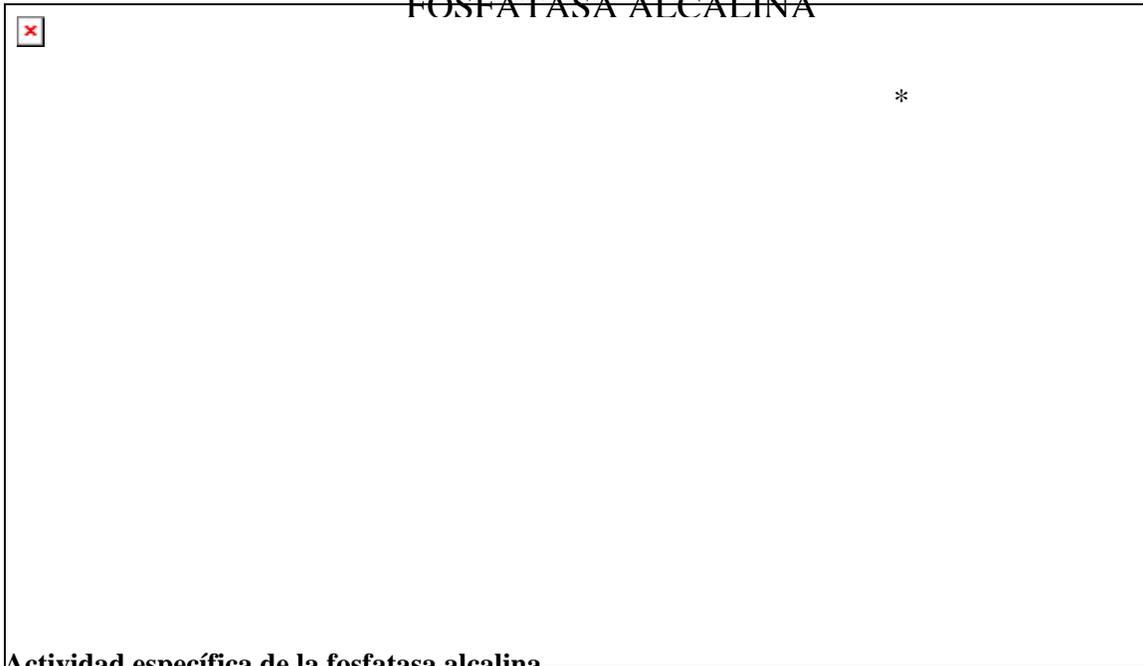
Con la finalidad de conocer si los osteoblastos en cultivo sobre las diferentes superficies producían proteínas relacionada con el proceso de la diferenciación celular e involucradas con la biomineralización, se realizaron ensayos de diferenciación celular. La evaluación de la diferenciación celular sobre las diferentes superficies consistió en 2 ensayos, actividad específica de la fosfatasa alcalina e inmunodetección por medio western blot de BSP.

Actividad específica de la fosfatasa alcalina

Este ensayo tuvo la finalidad de medir la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, debido a que esta enzima se incrementa cuando los osteoblastos comienzan a depositar minerales sobre la matriz extracelular, además, esta enzima es responsable de regular las concentraciones extracelulares de fosfatos. La actividad específica de la fosfatasa alcalina sobre las diferentes superficies estudiadas y en los diferentes tiempos de incubación se pueden observar en la gráfica 9. Los ensayos de actividad específica de la fosfatasa alcalina fueron realizados con medio de cultivo mínimo, es decir, no se agregaron o adicionaron sustancias que ejercieran un papel diferenciador en los osteoblastos humanos en cultivo. En general, los osteoblastos cultivados sobre las diferentes superficies presentaron poca actividad de la fosfatasa alcalina al día 3 de cultivo. Para el día 7 de cultivo celular se observó un incremento en la actividad de la fosfatasa alcalina en todas las superficies estudiadas. Sin embargo, para el día 14 de cultivo celular las

superficies de carbono amorfo presentaron la mayor actividad de la fosfatasa alcalina alcanzando una diferencia estadística significativa en comparación con las otras superficies.

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA FOSFATASA ALCALINA



Actividad específica de la fosfatasa alcalina.

Gráfica 9. La gráfica muestra la actividad específica de la fosfatasa alcalina en las diferentes superficies experimentales a los diferentes tiempos establecidos. Se puede observar como las superficies de carbono amorfo presentan la mayor actividad clogrando una diferencia estadística significativa a los 14 días de cultivo. * $p < 0.05$.

Todas las muestras presentaron aumento en la actividad específica de la fosfatasa alcalina en función del tiempo, esto podría deberse al tipo de célula que se utilizó. Sin embargo, la diferencia observada entre las diferentes superficies, principalmente en el día 14 de cultivo, sugiere que la composición superficial influyó en la diferenciación de los osteoblastos humanos en cultivo. Estos resultados fueron confirmados con otros tipos celulares como osteoblastos de calvaria de ratón, células MG-63 y células de médula ósea de ratón. (anexo 2)

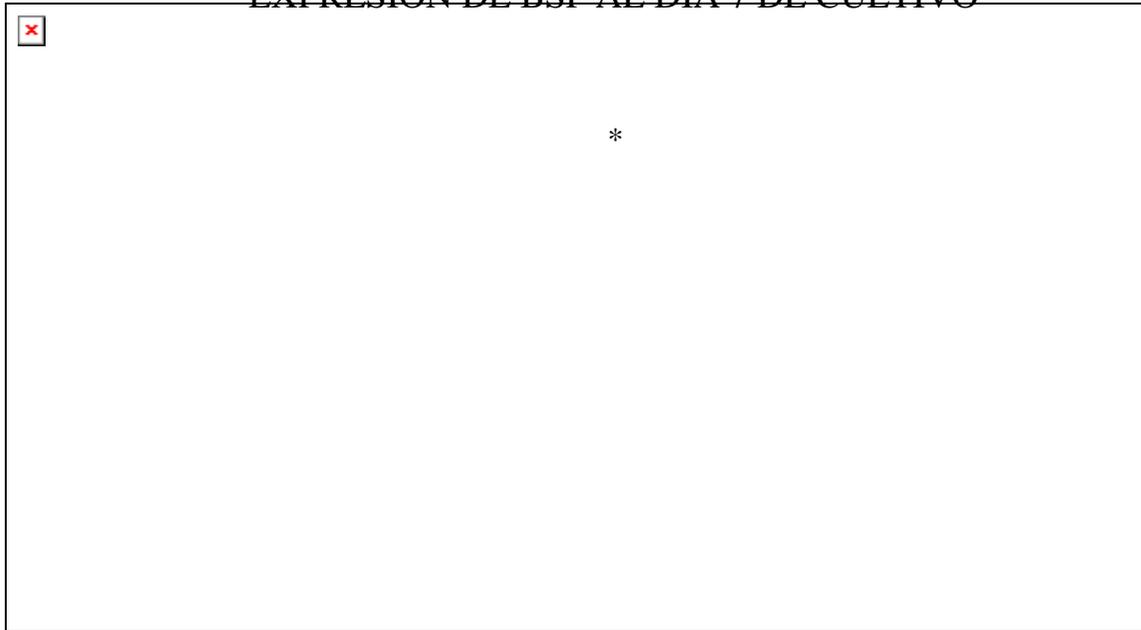
Inmunodetección por western blot de Sialoproteína Ósea (BSP)

Se utilizó la BSP como marcador de diferenciación en osteoblastos debido a que esta proteína es responsable de la nucleación de fosfatos de calcio y cristales de hidroxiapatita, función que solo pueden realizar los osteoblastos diferenciados. Nuevamente, no fueron agregados al medio de cultivo dexametrasona, ácido ascórbico y β -glicerofosfato, por lo que los resultados reflejan sólo la injerencia de la química de las superficies sobre la diferenciación de los osteoblastos.

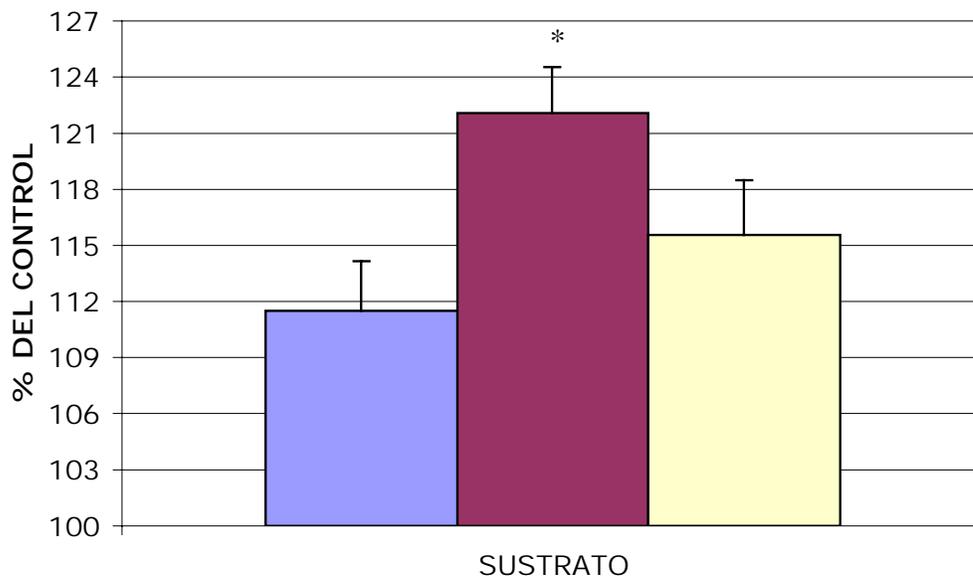
En la gráfica 10 se observan los valores obtenidos, del análisis de los valores relativos de la proteína determinada por medio de la intensidad integrada de todos los píxeles, excluyendo el fondo local, de las inmunodetecciones de BSP de las células cultivadas sobre las diferentes superficies después de 7 y 14 días de cultivo. Los resultados son presentados como porcentaje del control, donde este tiene un valor del 100%. La gráfica muestra que a los 7 días de incubación las células expresan BSP en todas las superficies. Sin embargo, sólo las células cultivadas sobre las superficies de carbono amorfo y titanio sobrepasan los valores de expresión del grupo control, siendo los osteoblastos sobre las superficies de carbono amorfo los que presentan la mayor expresión de BSP a los 7 días de cultivo. Para el día 14 de cultivo celular todas las superficies presentan valores muy superiores al control. Nuevamente, las superficies con mayor cantidad de BSP presente son las superficies de carbono amorfo, con 22% más cantidad de BSP que el control, 7% más que las superficies de titanio y 10% más que las superficies de acero 316L.

Los resultados obtenidos confirman que aunque las células expresan BSP sobre todas las muestras, existe un incremento sobre las superficies de carbono amorfo y titanio, lo que sugiere que la composición superficial está asociada a la diferenciación de osteoblastos.

EXPRESION DE BSP AL DIA 7 DE CULTIVO



EXPRESION DE BSP AL DIA 14 DE CULTIVO



Expresión de BSP sobre los diferentes sustratos a 7 y 14 días de cultivo.

Gráfica 10. La gráfica muestra los valores obtenidos por el análisis de densidad realizado a las inmunodetecciones contra BSP del extracto celular obtenido de osteoblastos humanos cultivados sobre diferentes superficies por 7 y 14 días. Se puede observar que la BSP esta en mayor cantidad en las superficies de carbono amorfo. La línea roja, en la gráfica de 7 días corresponde al valor de la superficie control (100%). * $p < 0.05$.

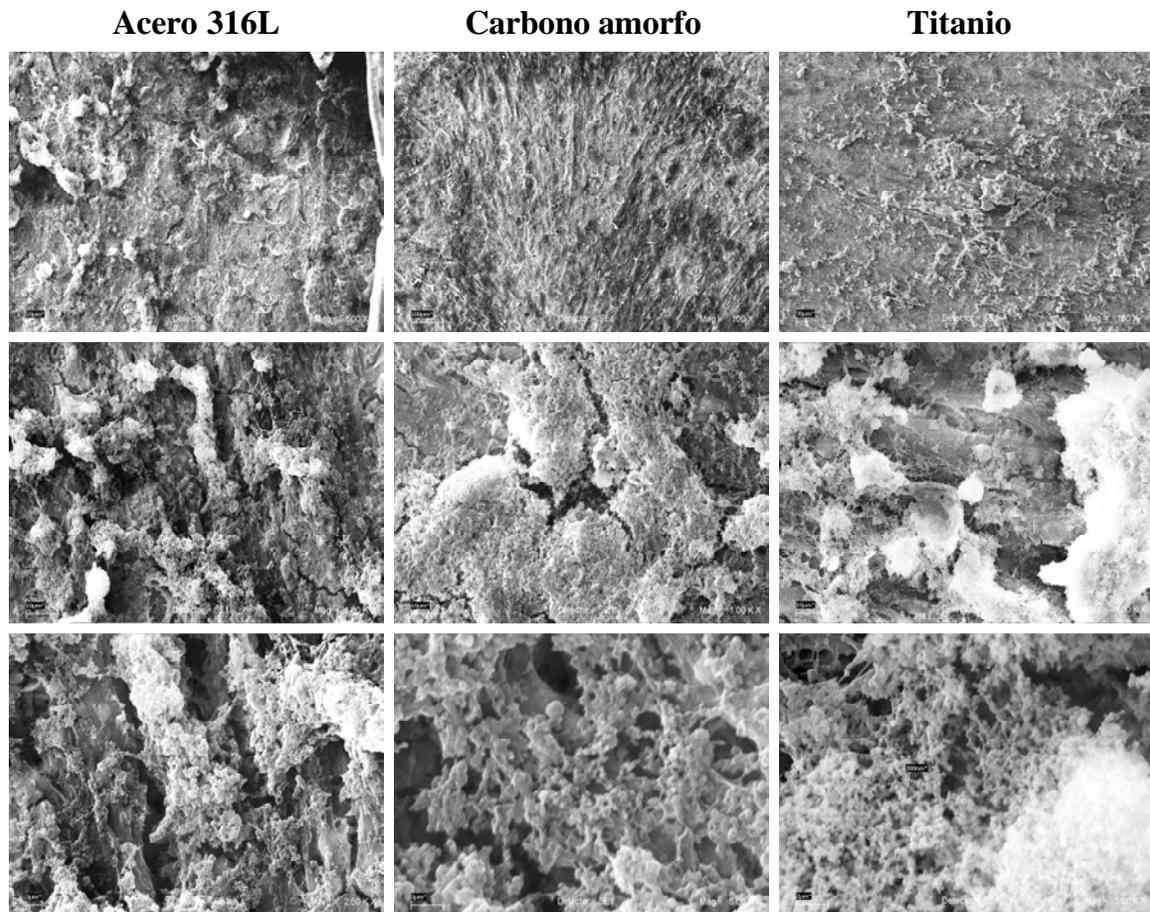
Biom mineralización

Este estudio fue realizado con la finalidad de observar la matriz extracelular y los nódulos mineralizados inmersos en ella, además de localizar la BSP y OCN en esta matriz extracelular por medio de inmunofluorescencia. Este estudio se dividió en 2 partes, el análisis morfológico de la matriz extracelular formada, por medio de microscopía electrónica de barrido y la localización por inmunofluorescencia de BSP y OCN. Los 2 estudios fueron realizados con un medio suplementado con dexametasona, 10 mM β -glicerofosfato y ácido ascórbico (50 μ g/mL) para favorecer la diferenciación celular e incrementar la cantidad de nódulos minerales. Sin embargo, a diferencia del ensayo de biom mineralización en la primera etapa, dicho medio fue agregado después de que las células sobre las superficies control alcanzaron confluencia y posteriormente cultivadas por 14 y 21 días.

Análisis morfológico

El análisis morfológico se realizó con el objeto de observar las células, la matriz extracelular y los nódulos mineralizados sobre las diferentes muestras. La figura 12 muestra las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de las diferentes superficies estudiadas a los 14 días de cultivo celular. Las microfotografías muestran que las células forman una capa regular por toda la superficie de las muestras estudiadas, incluso en algunos sitios estas forman multicapas y desarrollan una extensa y profunda matriz extracelular. Dentro de la matriz se observan estructuras fibrilares que se originan en un punto de la matriz extracelular y se insertan en otro, adheridas a estas estructuras se encontraron nódulos pequeños que a altas ampliaciones se observan formando estructuras en racimos. Estos racimos son similares en morfología a los observados en la

primera etapa de este trabajo, a pesar de ello, al encontrarse entre la matriz extracelular se dificulta su localización.



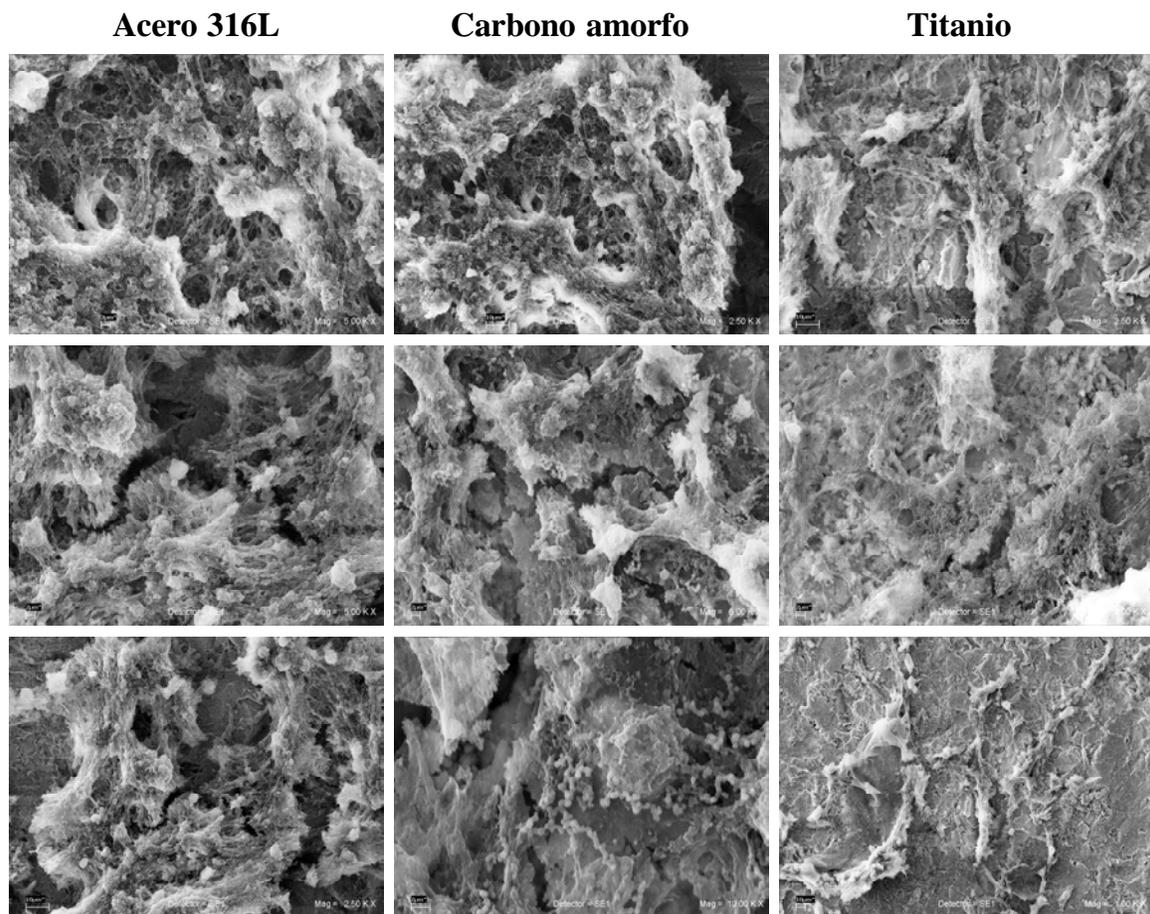
Micrografías electrónicas de barrido a los 14 días de cultivo.

Figura 12. Microfotografías electrónicas de barrido, a diferentes ampliaciones, de las diferentes superficies evaluadas en los ensayos de biomineralización a los 14 días de cultivo se puede observar la compleja matriz extracelular con sus nódulos y estructuras fibrilares.

A bajas ampliaciones es posible observar un acomodamiento de las células y de la matriz extracelular sobre las superficies, sin embargo, dicha orientación se pierde cuando las muestras son observadas a altas ampliaciones, esto también se puede apreciar en las microfotografías a bajas ampliaciones por la técnica de electrones retro-dispersados de la primera etapa. En todas las superficies se encontraron nódulos mineralizados, sin embargo, dada la dificultad en observar diferencias es imposible determinar si existe

algún efecto directo de la química del sustrato sobre la formación de la matriz extracelular, así como del porcentaje y composición de los nódulos mineralizados.

Las muestras observadas después del día 21 presentaron características morfológicas muy parecidas a las muestras observadas a los 14 días de cultivo. La figura 13, muestra las microfotografías electrónicas de barrido obtenidas por la técnica de electrones secundarios de las superficies estudiadas, después de 21 días de cultivo celular.



Microfotografías electrónicas de barrido a los 21 días de cultivo.

Figura 13. La imagen muestra las microfotografías electrónicas de barrido obtenidas de las superficies después de 21 días de cultivo.

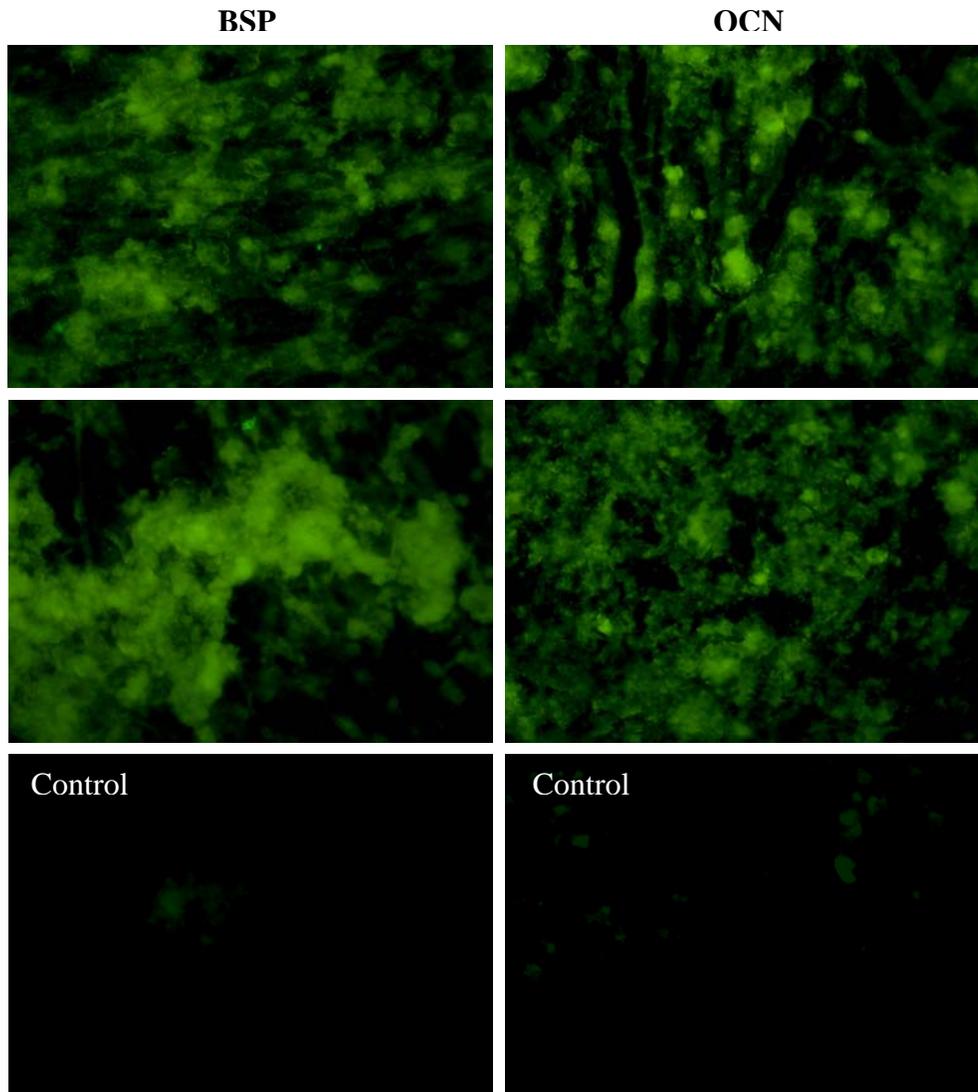
En las microfotografías obtenidas después de 21 días de cultivo tampoco se encontraron diferencias morfológicas importantes que nos indiquen que alguna superficie favorezca la

formación y mineralización de la matriz extracelular. Se puede observar, en todas las muestras, que las células cubren la superficie, mientras que la matriz extracelular sigue estando formada por estructuras fibrilares y presenta formación de nódulos mineralizados sobre ella y entre ella. Las células son difíciles de distinguir, debido a la cantidad de matriz extracelular, esta es abundante y cubre toda la superficie haciendo poco notable la rugosidad propia de los sustratos.

Inmunolocalización de BSP y OCN

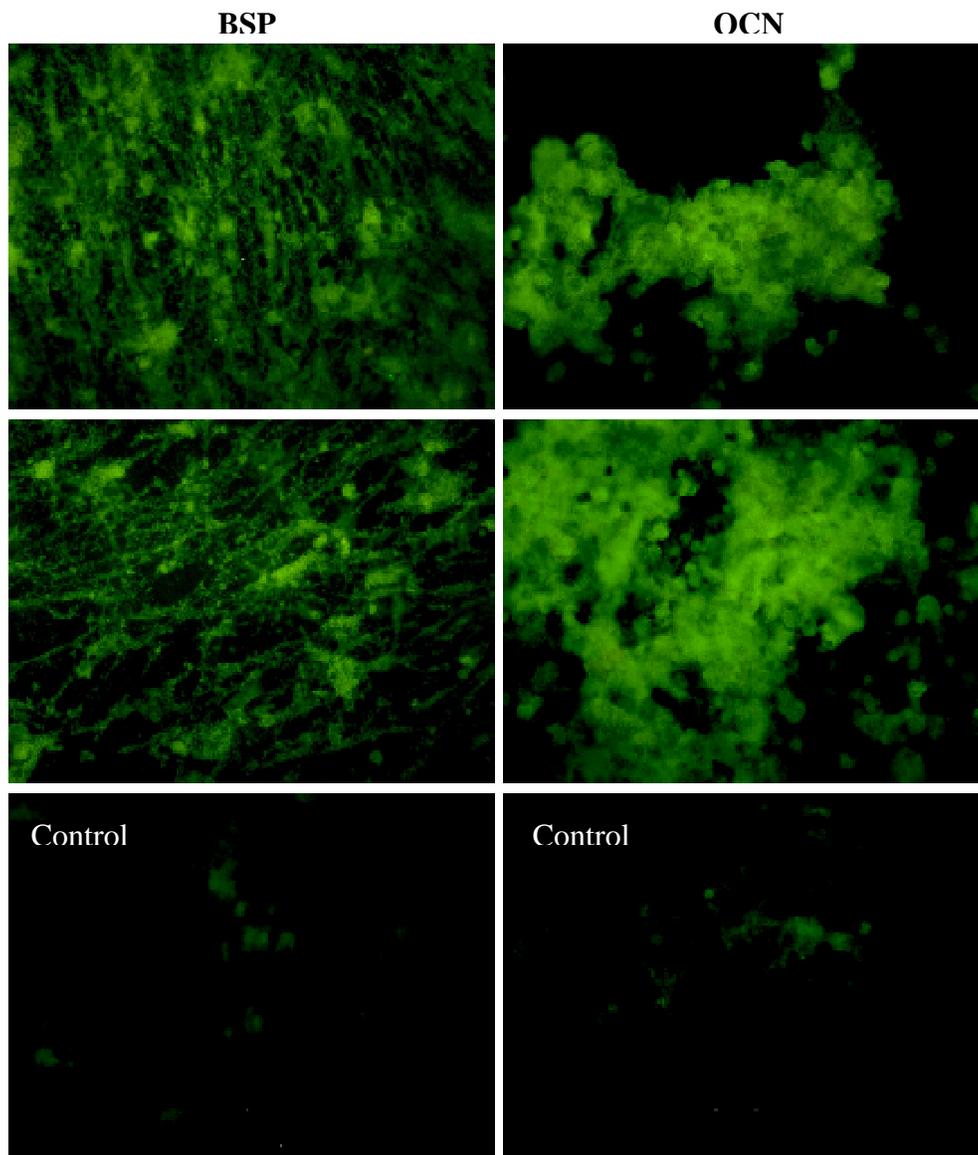
Estos ensayos fueron realizados con el objetivo de localizar espacialmente a BSP y OCN en la matriz extracelular durante el proceso de mineralización sobre las superficies estudiadas. Las inmunolocalizaciones fueron realizadas a los 14 y 21 días de cultivo celular de osteoblastos humanos. Las figuras 14, 15 y 16 presentan las inmunolocalizaciones para BSP y OCN en las diferentes superficies después de 14 días de cultivo. Las inmunolocalizaciones de BSP a los 14 días de cultivo, para todas las superficies, muestran que la BSP se encuentra principalmente en las porciones fibrilares de la matriz extracelular, presentando un menor marcaje en la zona de los nódulos mineralizados de todas las superficies. De igual forma la OCN se encuentra presente en todas las superficies, sin embargo, esta se encuentra principalmente en los nódulos mineralizados de la matriz extracelular y en menor medida en las porciones fibrilares de la misma. Las muestras estudiadas a los 21 días de cultivo celular con inmunolocalizaciones para BSP y OCN se observan en las figuras 17, 18 y 19. En las inmunolocalizaciones realizadas después de los 21 días de cultivo celular, se encontró, al igual que a los 14 días de cultivo, la presencia de BSP en todas las superficies, volviéndose a encontrar un marcaje más fuerte en las porciones fibrilares de la matriz

extracelular, sin embargo, para esta etapa la matriz extracelular presenta menos porciones fibrilares. Esta proteína también fue inmonolocalizada en las porciones correspondientes a los nódulos mineralizados observados en las micrografías electrónicas de barrido, aunque este marcaje resultó más tenue que el presentado en las porciones fibrilares.



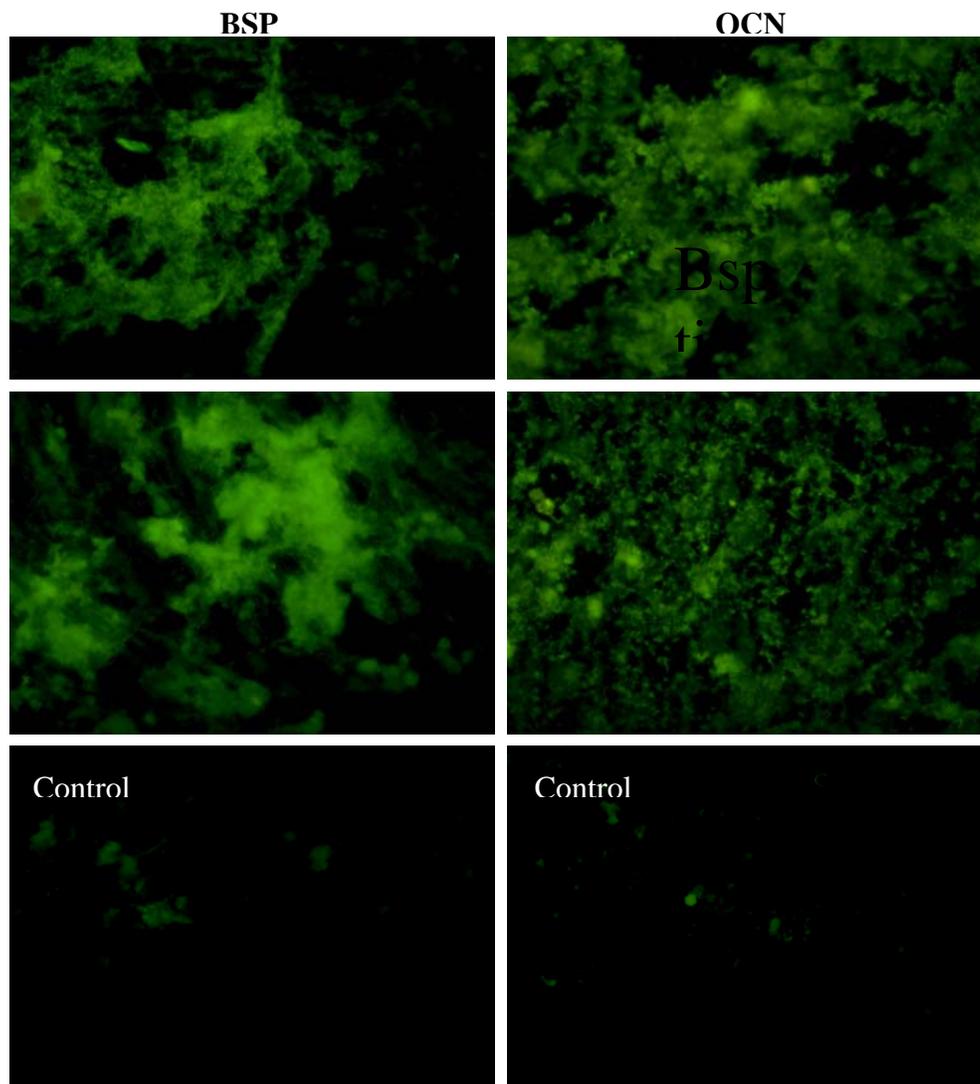
Inmunolocalizaciones de BSP y OCN sobre acero 316L después de 14 días de cultivo.

Figura 14. *Inmunolocalizaciones de BSP y OCN sobre superficies de acero 316L a los 14 días de cultivo celular. La localización de BSP es más amplia en la matriz extracelular y define estructuras de forma fibrilar, por otro lado, la OCN se localiza en estructuras con forma de nódulo y de menor manera en las estructuras fibrilares.*



Inmunolocalizaciones de BSP y OCN sobre carbono amorfo después de 14 días de cultivo.

Figura 15. La figura muestra las inmunolocalizaciones de las proteínas BSP y OCN sobre superficies de carbono amorfo después de 14 días de cultivo celular de osteoblastos humanos. Se observa como las estructuras donde se localiza BSP son generalmente fibrilares aunque también esta localizada en las porciones de los nódulos, mientras que OCN se encuentra presente en las zonas nodulares, dichos nódulos comienzan a formar estructuras en forma de racimos.

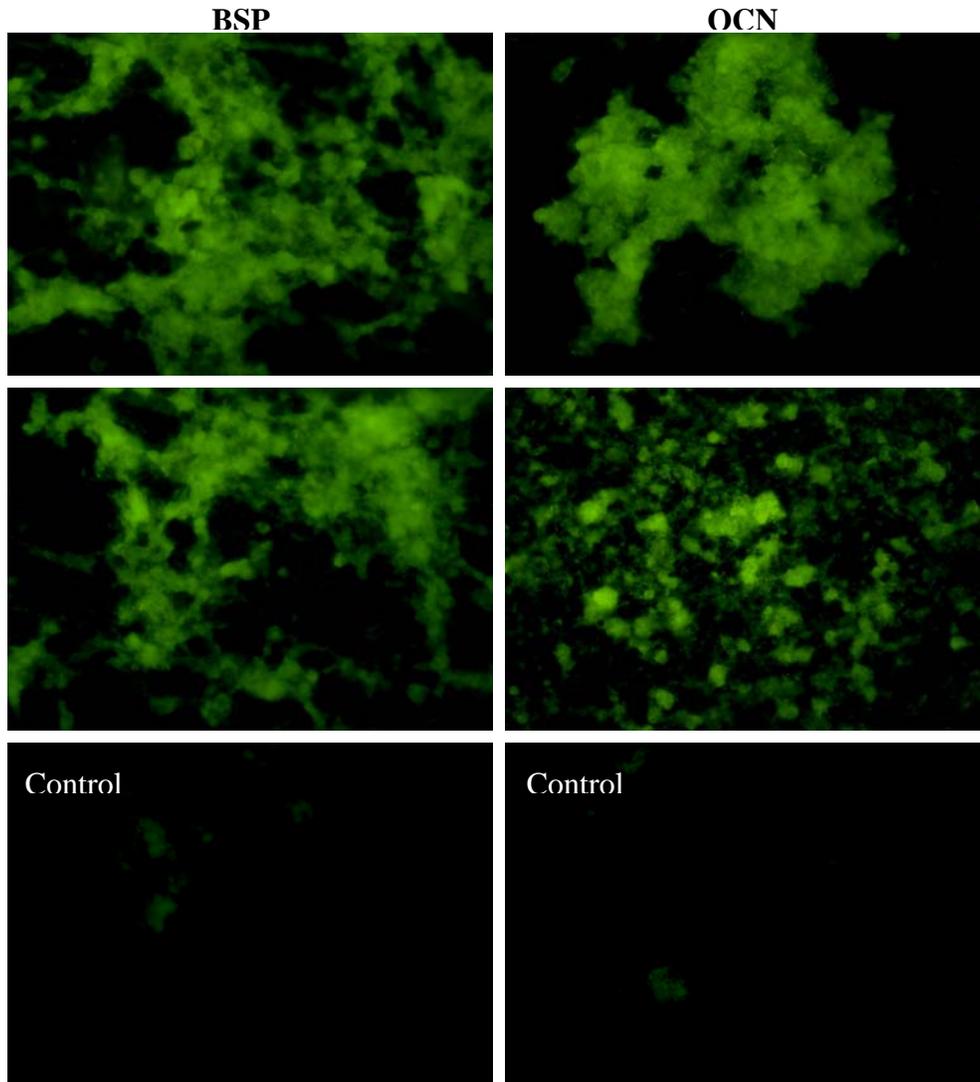


Inmunolocalizaciones de BSP y OCN sobre titanio después de 14 días de cultivo.

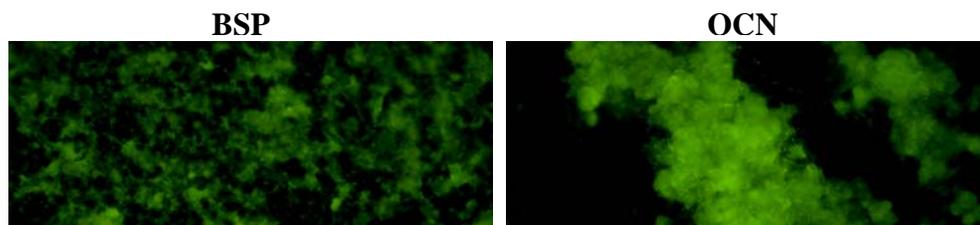
Figura 16. La imagen muestra las inmunolocalizaciones de BSP y OCN sobre superficies de titanio a los 14 días de cultivo celular. Se observan las diferentes estructuras reconocidas por el anticuerpo, en donde la BSP está presente en mayores porciones de la matriz extracelular y la OCN se encuentra en estructuras en forma de nódulos

La inmunolocalización de la OCN después de 21 días de cultivo celular se presentó, en todas las superficies. Esta localización se observó en estructuras nodulares de la matriz extracelular, comparándolas con las microfotografías electrónicas de barrido, estas estructuras corresponden a los nódulos mineralizados.

En comparación con las inmunolocalizaciones obtenidas del día 14 de cultivo celular, los nódulos se encontraron formando estructuras más grandes en forma de racimos. También esta proteína se localizó en estructuras fibrilares que rodeaban o se encontraban adheridas a los nódulos, sin embargo, este marcaje fue más tenue y en menor proporción que en los nódulos.



Inmunolocalizaciones de BSP y OCN sobre acero 316L después de 21 días de cultivo.
Figura 17. Microfotografías obtenidas por inmunolocalización de las proteínas BSP y OCN sobre las superficies de acero 316L. La BSP se localizó en más porciones de la matriz extracelular, principalmente en estructuras fibrilares, mientras que la OCN se localizó principalmente en estructuras nodulares.

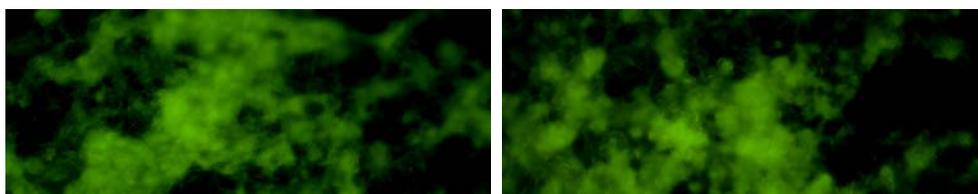


Inmunolocalizaciones de BSP y OCN sobre carbono amorfo después de 21 días de cultivo.

Figura 18. La figura muestra las inmunolocalizaciones de BSP y OCN sobre las muestras de carbono amorfo cultivadas por un período de 21 días con osteoblastos humanos. Las microfotografías muestran diversas estructuras en las cuales se localiza BSP, dentro de estas estructuras podemos observar formaciones fibrilares de la matriz extracelular y en menor medida nódulos. La localización de OCN se da principalmente en estructuras en forma de racimos nodulares.

BSP

OCN



Inmunolocalizaciones de BSP y OCN sobre titanio después de 21 días de cultivo.

Figura 19. *La figura muestra las inmunolocalizaciones y los controles de las proteínas BSP y OCN sobre las superficies de titanio después de 21 días de cultivo celular. En ellas se observa como la BSP se localiza de manera mas uniforme en la matriz extracelular mientras que la OCN se localiza más en las estructuras nodulares.*

Discusión

El presente estudio describe la respuesta biológica *in vitro* de osteoblastos humanos cultivados en contacto directo con superficies de diferente composición química, principalmente la respuesta de células osteoblásticas ante superficies recubiertas con películas de carbono amorfo y su comparación con 2 superficies ampliamente estudiadas y de uso actual en implantes dentales y ortopédicos: el acero 316L y el titanio.

Se desarrollaron estudios a corto plazo para evaluar la toxicidad del material y la capacidad del mismo para favorecer los procesos biológicos de las células que llevan al contacto íntimo entre el material implantado y el tejido óseo. Se sabe, que la oseointegración es un proceso complejo que involucra el reclutamiento de células osteoprogenitoras, su adhesión y proliferación, así como la consecuente mineralización de la matriz extracelular.

En este trabajo se evaluaron diversos procesos celulares como la adhesión, proliferación, viabilidad y diferenciación celular , así como la mineralización de la matriz extracelular de osteoblastos en cultivo celular *in vitro*. Dichos procesos celulares son discutidos uno por uno en esta parte del trabajo.

La adhesión celular sobre los biomateriales se puede evaluar con diferentes técnicas, algunas miden cuantitativamente la fuerza de adhesión de las células al sustrato (Anselme 1999), otras se basan en aspectos morfológicos de las células adheridas sobre el sustrato (Kieswetter 1996, Anselme 2000) y algunas otras realizan el conteo del número de células adheridas al sustrato sembradas por un periodo corto de tiempo (Boyan 1998).

Este estudio se basó en la última técnica mencionada. Los resultados de todos los ensayos de adhesión celular muestran que las superficies de carbono y titanio facilitan la adhesión

celular de osteoblastos humanos en mayor medida que las superficies de acero 316L. Una posible explicación al hecho de que existe una mayor adhesión celular sobre el carbono amorfo y titanio puede ser que éstas superficies permiten una mayor absorción de proteínas presentes en el medio de cultivo. Esto puede explicarse en términos de las diferentes fases de adhesión celular de los osteoblastos. La adhesión celular primaria está controlada por la formación de uniones físico-químicas entre la superficie y las proteínas del medio de cultivo o del medio en el que está inmerso dicho material (Siebers 2005, Anselme 2000), donde la energía superficial del material juega un papel importante. Esta unión primaria es afectada por la química de la superficie ya que esta puede favorecer la adhesión de ciertas proteínas que a su vez afectan la adhesión celular secundaria o de largo plazo (Schwartz 1994, Boyan 1996). Asimismo, la adhesión a largo plazo y la proliferación celular están asociadas a la presencia de proteínas específicas o moléculas que se adhieren modificando sus características superficiales, estas moléculas a su vez interaccionan con las células que están migrando desde los tejidos adyacentes al implante. Como ejemplo tenemos a la fibronectina, la cual se adhiere a la superficie de los implantes en fracciones de segundo (Pearson 1988) y se ha demostrado que esta proteína media la adhesión celular así como la expansión de las células sobre los sustratos artificiales a través de interacciones con proteínas o receptores de membrana (Doillon 1987, Siebers 2005). Este es un ejemplo específico, sin embargo, no es posible determinar la cantidad total de proteínas y cuáles se adhieren a la superficie de cada material, ya que se sabe que al menos en sangre existen más de 150 proteínas presentes (Dee 2002), sin contar hormonas, ni factores de crecimiento. De modo que no se conocen con certeza todas las proteínas que interaccionan y favorecen la adhesión celular, por este

motivo el estudio de la adhesión de las células sobre diferentes materiales se realiza en función de cuantas células se logran adherir a la superficie en un tiempo determinado.

Este trabajo propone un estudio que podría ser útil para entender el porqué existe una mayor adhesión de osteoblastos sobre carbono amorfo y titanio, el ensayo consistiría en cuantificar las proteínas totales adheridas a estos materiales, ya que las características energéticas superficiales son diferentes en el titanio, carbono amorfo y acero 316L, estas características podrían favorecer la adhesión de un mayor número de proteínas. Así mismo, se podría saber la proporción exacta de la cantidad de proteínas asociadas al proceso de adhesión celular presentes en las proteínas totales adheridas a dichos sustratos.

Algunos estudios han sido realizados evaluando la adhesión de osteoblastos sobre superficies específicas, como titanio y aleaciones de titanio (Monsees 2005, Galli 2005, Goto 2004, Rosa 2003) mientras que otros han comparado la adhesión celular en función de la química superficial (Cheng 2005, Clupper 2004, Lee 2002, Yang 2003). De estos últimos, se ha observado que las superficies de fosfatos de calcio o de hidroxiapatita presentan mejor adhesión celular que las superficies de titanio o de sus aleaciones y cuando se comparan diversos materiales como el acero 316L y aleaciones de titanio (Anselme 1999) no se presenta ninguna diferencia significativa que indique que la química de la superficie pueda afectar la adhesión celular de osteoblastos humanos.

Un gran porcentaje de estos estudios han relacionado otra característica superficial como es la rugosidad con la adhesión celular de osteoblastos, así, dichos estudios han llegado a la conclusión de que la adhesión celular de osteoblastos sobre titanio se ve favorecida al

utilizar superficies que presenten una rugosidad promedio mayor a 4 μm (Zinger 2005, Prado 2003, Boyan 2003, Schwartz 2001).

En este trabajo, también se valoró el aspecto de la rugosidad, y los resultados de estos ensayos confirman los estudios antes establecidos, de que al aumentar la rugosidad superficial promedio existe un incremento en la adhesión celular de los osteoblastos. Además se encontró que la morfología celular se modificaba conforme se incrementaba la rugosidad promedio, así, las superficies con mayor rugosidad presentaban una morfología elongada con múltiples prolongaciones. No se conoce el porqué los osteoblastos aumentan su adhesión celular en superficies rugosas, sin embargo, esta tesis propone que puede deberse al aumento del área de la superficie de la muestra, lo que aumentaría la cantidad de proteínas adheridas a dicha superficie, por ende el aumento del área de contacto de la célula, y probablemente la organización más rápida del citoesqueleto sobre las superficies rugosas.

Un evento que está íntimamente relacionado con la adhesión celular es la proliferación celular, ya que una vez que la célula se ha adherido y organizado su citoesqueleto, continua con su actividad biológica y por lo tanto con la división celular. De manera similar a la adhesión celular, se han realizado diversos estudios en los que se busca la relación entre las características superficiales de los materiales de implantación, con la proliferación celular. En dichos trabajos se ha experimentado con diferentes rugosidades, los resultados han sido controversiales debido a que en algunos trabajos se ha observado que la rugosidad superficial disminuye la proliferación celular (Lossdorfer 2003, Zhao 2005), mientras que en otros se observa un aumento de la proliferación (Anselme 2002, Galli 2005). En estudios referentes al efecto de la química de superficie con la

proliferación celular se ha experimentado con materiales como la hidroxiapatita fosfatos de calcio (Yuasa 2005, Thian 2005, Bigi 2005, Oliveira 2002), y algunos de ellos con materiales alternativos (Allen 2001, Schroeder 2000, Du 1998) o aceros inoxidable (Fini 2004, Hao 2004, Fini 2003, Schmidt 2001). En general, todos ellos presentan resultados favorables en la proliferación celular cuando son comparados con los controles, a pesar de ello, pocos hacen una comparación de sus superficies con los materiales actualmente utilizados en implantes ortopédicos o dentales.

Los resultados, de los ensayos de proliferación de este trabajo, indican que si bien casi todas las superficies permiten la proliferación celular, esta difiere mucho de una superficie a otra, observando que las superficies de carbono amorfo y titanio presentaron mayor proliferación celular. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los ensayos de adhesión celular, puesto que al favorecerse la adhesión celular sobre las superficies de carbono amorfo y titanio, el arreglo del citoesqueleto se presentaría más temprano, permitiendo a las células comenzar su división celular a tiempos más tempranos, y siguiendo los procesos celulares normales, la mineralización de la matriz extracelular se daría en periodos más cortos de tiempo. Esto no indica que a mayores tiempos de cultivo se tendría la misma cantidad de células en todas las superficies, ya que a cierta densidad celular se activan procesos de diferenciación celular los cuales inhiben la proliferación.

Los ensayos de adhesión y proliferación celular proporcionan información acerca de la toxicidad del material, puesto que un material tóxico impide los eventos tempranos de la interacción célula-material o bien comienza a liberar a corto plazo sustancias o iones que comprometen las funciones celulares. Estos ensayos se complementan con estudios que

evalúan la actividad metabólica de las células proporcionando la información necesaria para indicar si el material está actuando sobre las funciones celulares básicas. Uno de los ensayos más comunmente utilizados para evaluar la citotoxicidad o viabilidad celular es la prueba de MTT, este ensayo se basa en la actividad metabólica de una deshidrogenasa presente en la mitocondria. Diversos estudios se han realizado con esta técnica para evaluar superficies modificadas con carbono y su compatibilidad celular (Okpalugo 2004, Thomson 1991, Mitura 1994, Olborska 1994, Butter 1994, Chandra 1994, Du 1998, Jones 2000, Cui 2000, Allen 2001, Linder 2002). Los resultados de todos estos autores indican que la modificación superficial con carbono no afecta de ninguna forma la actividad celular, esto realizado sobre diversos tipos celulares.

Los resultados obtenidos de los ensayos de viabilidad celular de este trabajo, muestran que todas las superficies valoradas en este estudio permiten a las células realizar las funciones metabólicas básicas. Existiendo una buena correlación entre los resultados de los ensayos de proliferación celular y los de viabilidad celular, puesto que las superficies con mayor número de células adheridas también presentaron mayor actividad metabólica. Este trabajo plantea que esta alta actividad metabólica podría estar asociada a una mayor producción de proteínas de matriz extracelular, puesto que las células ya han proliferado y colonizado la mayor parte de la superficie, y de acuerdo con las funciones básicas de los osteoblastos es indispensable para estas células mineralizar la matriz extracelular. Para que esta mineralización se lleve a cabo es necesaria la producción de varias proteínas que jugarán un papel principal en la formación y mineralización de la matriz extracelular. En este estudio se tomaron en cuenta 3 proteínas muy importantes en el proceso de diferenciación osteoblástica y en la mineralización de la matriz extracelular:

sialoproteína ósea (BSP), fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OCN). El estudio de estas proteínas proporcionó suficiente información sobre cuáles superficies favorecen la diferenciación celular a cortos periodos de tiempo, y en cuáles comienzan a aparecer las proteínas relacionadas con la diferenciación celular tardía.

La mayor parte de la investigación existente sobre la diferenciación celular de osteoblastos se ha realizado en superficies de titanio y sus aleaciones a diferentes rugosidades (Monsees 2005, Galli 2005, Boyan 2003), y existen algunos trabajos donde también se estudian superficies osteoconductoras como la hidroxiapatita y los fosfatos de calcio (Yuasa 2005, Inoue 2004, Knabe 2004). La forma en que se han realizado estos estudios es principalmente centrándose en el estudio de 2 proteínas: la fosfatasa alcalina y la osteocalcina (Boyan 2003, Tosatti 2004, Mustafa 2001). Los resultados de estos experimentos indican que las superficies osteoconductoras favorecen la diferenciación celular al tener más actividad de fosfatasa alcalina en periodos más cortos de tiempo que las superficies de titanio, además de expresar altas cantidades de osteocalcina (Bigi 2005, Knabe 2004, Ramires 2001). Sin embargo, cuando los estudios se realizan solamente en superficies metálicas se ha observado que las superficies de titanio son las que favorecen una temprana diferenciación celular, además, si se comparan diferentes rugosidades superficiales de titanio, las superficies con rugosidades promedio de 4 μm y las que han sido modificadas por sand-blasting, seguidas por un grabado ácido son las superficies más exitosas en este tipo de estudios (Boyan 2003, Schwartz 1999, Links 1998, Martín 1995). Por regla general, se ha asociado una alta actividad de fosfatasa alcalina con una etapa de diferenciación celular temprana de osteoblastos, debido a que esta enzima

favorece la concentración de fosfatos que se cree formarán parte de los fosfatos de calcio y posteriormente de la hidroxiapatita.

Los resultados presentados en este trabajo correspondientes a la actividad específica de fosfatasa alcalina muestran que las superficies con la mayor actividad de esta enzima son las superficies de carbono amorfo. Nosotros planteamos la posibilidad de que la alta actividad enzimática podría estar asociada a los procesos celulares antes mencionados, ya que éstos se dan en etapas más tempranas o de manera más rápida sobre las superficies de carbono amorfo, por lo que las células llegarían de manera más temprana al proceso de la diferenciación celular.

Además de la fosfatasa alcalina y la osteocalcina, existen otras proteínas que se han estudiado como parte del proceso de diferenciación celular y de la formación de un microambiente favorable para la mineralización de la matriz extracelular como colágena tipo I, factor de crecimiento transformante β (TGF- β), osteoprotegerina (OPG), ligando del receptor del activador nuclear kappa- β (Rank-L) y OPN (Lossdorfer 2004, Zhao 2005, Mustafa 2003, de Oliveira 2004). Sin embargo, algunos trabajos han relacionado la cantidad de BSP con la diferenciación celular y la mineralización de la matriz extracelular (de Oliveira 2004, Zhang 2004)).

Los ensayos de este trabajo evaluaron la expresión de BSP en los cultivos celulares, ya que la función principal de esta proteína es la de nuclear hidroxiapatita y fosfatos de calcio (Ganss 1999, Aubin 1996), por lo tanto la actividad de BSP se da temporalmente junto con el aumento en la actividad de fosfatasa alcalina. Los resultados obtenidos indican que esta proteína está presente en todas las muestras desde el día 7 de cultivo celular. Sin embargo, existe una mayor expresión sobre de dicha proteína sobre las

superficies de carbono amorfo. Estos resultados concuerdan, tanto temporalmente como cuantitativamente, con los obtenidos en los ensayos de actividad específica de fosfatasa alcalina. Así mismo, se realizaron ensayos en donde se localizó espacialmente la BSP y la OCN en los cultivos de osteoblastos sobre las superficies por medio de inmunolocalizaciones y su asociación con la formación de tejido mineralizado, así como el análisis morfológico y elemental en los ensayos de biomineralización por medio de SEM y EDX.

Estudios morfológicos realizados por otros investigadores muestran que las superficies de titanio permiten la formación y mineralización de la matriz extracelular (Wang 2005, Rodríguez 2003, Schneider 2003, Boyan 2002, Wieland 2005). Los resultados de estos trabajos varían considerablemente y los hacen prácticamente incomparables debido a las diversas técnicas utilizadas para detectar y analizar los nódulos mineralizados, sin embargo, muy pocos estudios refieren un análisis de composición elemental.

Los resultados obtenidos de los ensayos de biomineralización en esta tesis mostraron que todas las superficies permiten la formación de tejido mineralizado. Este tejido mineralizado, con forma de nódulos fue sometido a un análisis elemental y los resultados muestran la existencia de dichos nódulos en todas las superficies. Estos nódulos son ricos en calcio y fósforo, con razones Ca/P muy cercanas a las de la hidroxiapatita y al hueso humano. Estos nódulos crecen generalmente entre y sobre la matriz extracelular y se co-localizan con la OCN y en menor grado con la BSP, ya que esta última está localizada en estructuras fibrilares de la matriz extracelular. Estos resultados demuestran como la BSP se asocia con estructuras fibrilares como la colágena y en algún momento comienza la nucleación de minerales sobre esta matriz extracelular (Ganss 1999, Aubin 1996),

mientras que la osteocalcina, al encontrarse localizada principalmente en las estructuras nodulares, se relaciona con la forma y el tamaño del cristal, puesto que su principal función es la de inhibir el crecimiento de los cristales de hidroxapatita determinando así el tamaño y la forma estructural de dicho cristal (Ducy 1996, Price 1989, Roach 1994).

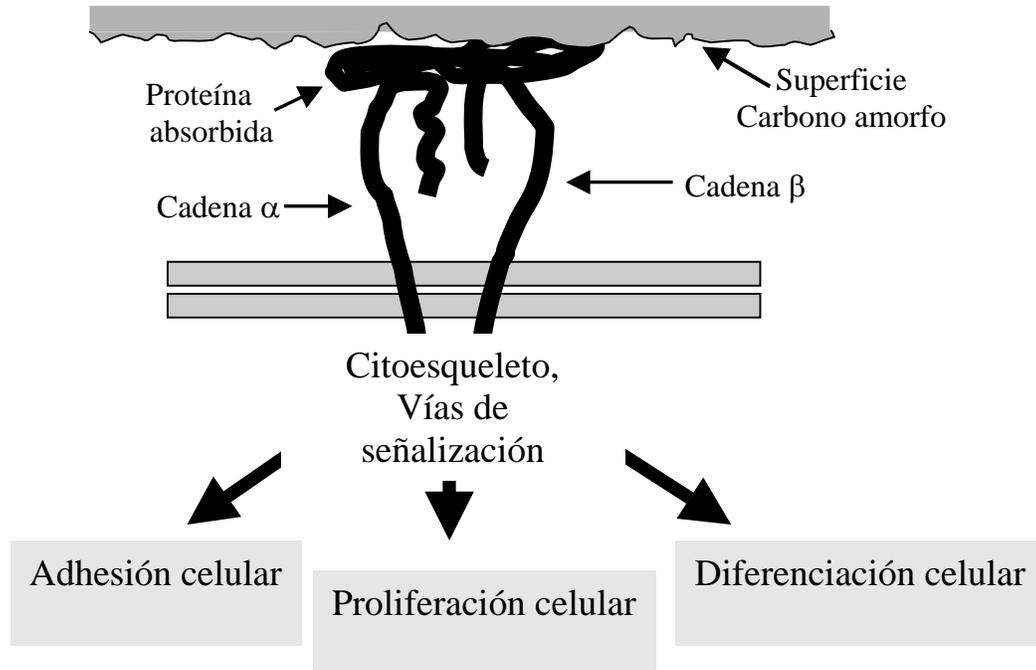
A diferencia de otros trabajos en los que sólo se ha estudiado la morfología de los nódulos mineralizados o la morfología de las estructuras mineralizadas, en esta investigación se ha demostrado la mineralización asociando el aspecto morfológico con la composición elemental y la localización espacial de proteínas relacionadas con este proceso. Todos los resultados indican que las superficies de carbono amorfo favorecen los procesos por los cuales un material de implantación ortopédica se oseointegra al tejido, sin embargo, aún es difícil explicar la razón por la cual esta superficie favorece la oseointegración. Sin duda, la primera respuesta es la composición química superficial, puesto que esta superficie es de carbono, es muy posible que las proteínas y moléculas que interaccionan en primera instancia con ella sean completamente diferentes a las que pueden interactuar con las superficies metálicas convencionales, esta modificación de la superficie por moléculas y proteínas favorecen la interacción de diversos receptores celulares y estos a su vez desencadenan una cascada de eventos celulares y moleculares que afectan de forma positiva o negativa el proceso de la oseointegración.

En base a estudios preliminares (anexo 3) este trabajo propone a las integrinas como responsables de favorecer los eventos celulares que conllevan a la oseointegración. Se sabe que las integrinas interactúan con las moléculas adsorbidas en la superficie para que los osteoblastos puedan adherirse a los materiales de implantación (Anselme 2000). Sin embargo, la función de las integrinas no termina en la adhesión celular, ellas participan

de forma importante en la organización del citoesqueleto e interaccionan con la matriz extracelular (Anselme 2000, Siebers 2005). Las integrinas consisten de subunidades formadas por 2 glicoproteínas transmembrana, la cadena α y la cadena β . Las porciones extracelulares de las cadenas interactúan una con otra formando un heterodímero funcional (Albelda 1990, Hynes 1992). Existen múltiples combinaciones de heterodímeros gracias a la gran diversidad de integrinas, 24 cadenas α y 8 cadenas β (Siebers 2005). Algunos estudios han descrito, la expresión de integrinas en osteoblastos y se ha demostrado que estas células son capaces de expresar subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv , $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 5$ (Cowles 2000, Sinha 1996, Gronowicz 1996, Bennett 2001). Sin embargo, no todas estas subunidades son expresadas constantemente y esta expresión puede variar dependiendo del estado de diferenciación o maduración del osteoblasto (Schneider 1994). Las integrinas interactúan con la matriz extracelular a través de sus dominios extracelulares, mientras que los dominios intracelulares interactúan con el citoesqueleto y con moléculas de señalización. Por lo antes señalado se propone que las superficies de carbono amorfo adsorben moléculas que interactúan con las integrinas y éstas a su vez regulan el proceso de adhesión, proliferación y diferenciación celular (figura 20), y estos procesos propician el microambiente necesario para que se lleve a cabo la mineralización de la matriz extracelular.

La estructura amorfa de la superficie de carbono amorfo comparada con las superficies metálicas cristalinas puede ser la responsable de una mayor interacción entre esta superficie y proteínas que favorecen los procesos biológicos de los osteoblastos, sin embargo, se deben realizar diversos estudios para soportar esta hipótesis. Así mismo, estudios como inmunodetección de integrinas y su posterior cuantificación, análisis de

expresión de mensajeros de integrinas, sobre-expresión de integrinas, así como la inhibición de su función utilizando interferencia de los RNA mensajeros podrían ayudar a dilucidar el papel del carbono amorfo en la expresión de las integrinas.



Esquema propuesto.

Figura 20. *Esquema propuesto del comportamiento de osteoblastos humanos sobre superficies de carbono amorfo, en este modelo las integrinas juegan un papel principal en los procesos biológicos que se desarrollan sobre los implantes dentales u ortopédicos, hasta concluir con la osteointegración del material implantado.*

Conclusiones

En base a los resultados obtenidos, esta tesis concluye que el carbono amorfo podría funcionar como un recubrimiento superficial alternativo para los implantes dentales y ortopédicos tradicionales de titanio y de acero 316. Los resultados presentados en este trabajo mostraron que las superficies de carbono amorfo presentaron un alto porcentaje de células adheridas, una proliferación más rápida, con un porcentaje proporcional de actividad metabólica en comparación con el poliestireno, acero inoxidable y titanio. Además, se observó que la diferenciación de osteoblastos se veía favorecida sobre el carbono amorfo, ya que la actividad y expresión de las proteínas asociadas a este proceso es mayor que en las otras superficies.

Entre los diferentes tipos de películas de carbono obtenidas (a-CN y a-C) se puede concluir que el a-C presenta una buena respuesta biológica, resultando ser la única estable, tanto en su producción, como en los ensayos biológicos realizados.

El carbono amorfo en forma de película delgada depositada sobre un sustrato adecuado es un material biocompatible.

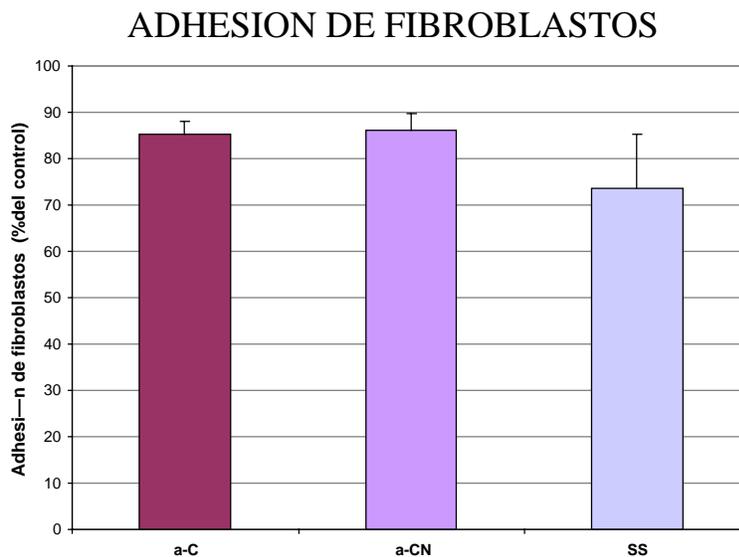
Así mismo, se concluye que la composición química de la superficie influye en la adhesión, proliferación, viabilidad y diferenciación de los osteoblastos humanos en cultivos celulares.

La morfología superficial, medida en rugosidad, tiene un efecto significativo en la adhesión celular sobre el carbono amorfo, ya que se aumentó el porcentaje de células adheridas al aumentar la rugosidad, mientras que en el acero no se obtuvo un cambio significativo.

Por último, una conclusión importante de este trabajo es que las modificaciones con películas delgadas pueden ser una alternativa para alargar el tiempo de vida de implantes, así como proveer una respuesta biológica específica a los materiales actualmente utilizados.

Anexo 1.

se realizaron ensayos de adhesión celular de fibroblastos gingivales con la finalidad de observar si la respuesta de adhesión celular en las superficies estudiadas es específica de los osteoblastos o es común a todas las células. La adhesión celular se evaluó después de 24 horas de cultivo, con fibroblastos gingivales humanos. Los resultados de estos ensayos pueden observarse en la gráfica 11. La adhesión celular se ve incrementada en las superficies de carbono amorfo y de nitruro de carbono en comparación con las superficies de acero 316L, sin embargo, el porcentaje de células adheridas de todas las superficies se encontró por debajo del control, esto puede ser debido a que los fibroblastos son células que prefieren superficies lisas, como las muestras control. La gráfica permite observar, como las células logran adherirse después de 24 horas de cultivo, por lo que las películas de carbono permiten la adhesión y el funcionamiento de la célula, por lo cual son biocompatibles.



Adhesión celular de fibroblastos gingivales.

Gráfica 11. Muestra la adhesión de fibroblastos gingivales humanos sobre diferentes superficies. Se puede observar que las superficies con películas de carbono presentan un porcentaje mayor de adhesión celular en comparación con el acero 316L, Sin embargo, todas las superficies presentan porcentajes por debajo del control (línea roja).

Anexo 2.

Se realizaron ensayos de actividad específica de fosfatasa alcalina en otros tipos celulares para observar si las superficies afectaban de igual forma a células osteoblasticas con una etapa de maduración más temprana que los osteoblastos derivados de hueso alveolar. Las células utilizadas para estos ensayos fueron: osteoblastos de calvaria de ratón, MG-63 y de médula ósea. Estos tipos celulares, presentan características fenotípicas de osteoblasto inmaduro, por lo que son modelos muy utilizados para observar la diferenciación celular. Los ensayos con los osteoblastos de calvaria y MG-63, fueron realizados con el medio de cultivo convencional, es decir, sin la adición de sustancias que favorecieran la diferenciación a osteoblastos, mientras que a los ensayos realizados con las células de médula ósea de ratón, les fue adicionado dexametasona al medio de cultivo con el fin de dirigir la diferenciación celular a un fenotipo osteoblástico. Los resultados obtenidos de los ensayos de actividad específica de fosfatasa alcalina en las células de calvaria de ratón están representados en la gráfica 12.

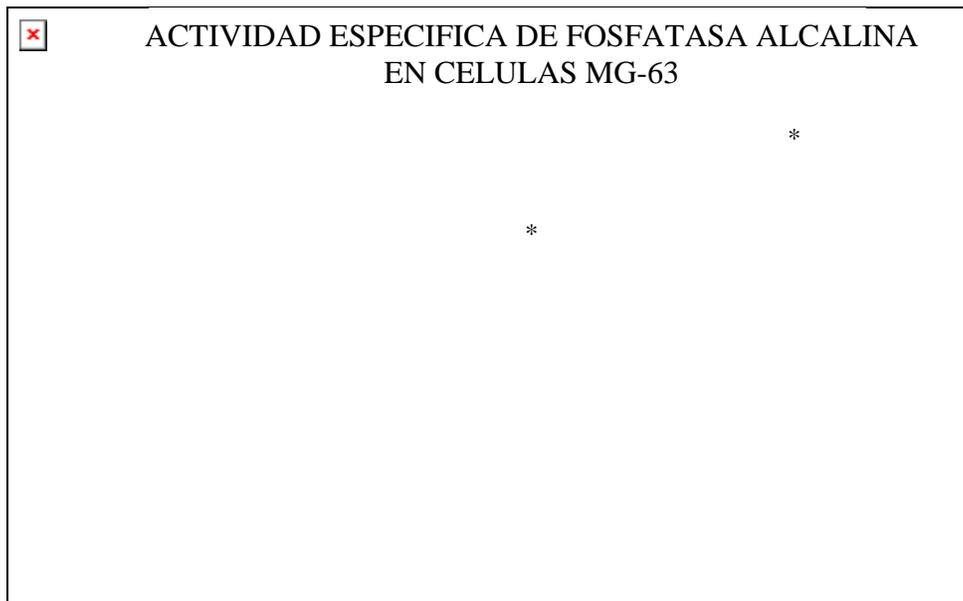
En la gráfica 12 se observa que las células cultivadas sobre las superficies de carbono amorfo presentan mayor actividad específica de fosfatasa alcalina en comparación con las demás superficies estudiadas. La actividad de la fosfatasa alcalina aumenta, en general, en cada tiempo de cultivo estudiado, en todas las superficies. Sin embargo, es notable el aumento de esta actividad, en las células cultivadas sobre carbono amorfo.

Los resultados de la actividad específica de fosfatasa alcalina en células MG-63 están representados en la gráfica 13.

| x | ACTIVIDAD ESPECIFICA DE FOSFATASA ALCALINA EN CELULAS DE CALVARIA DE RATON | 2 |
|---|---|---|
| | * | |
| | * | |

Actividad específica de la fosfatasa alcalina en células de calvaria de ratón.

Gráfica 12. La gráfica presenta la actividad específica de la fosfatasa alcalina en osteoblastos de calvaria de ratón a 3, 7 y 14 días. Se observa que las células cultivadas sobre las superficies de carbono amorfo presentan mayor actividad de fosfatasa alcalina en comparación con las otras superficies estudiadas, $*p < 0.05$.



Actividad específica de la fosfatasa alcalina en células MG-63.

Gráfica 13. Se observan los resultados de la actividad específica de la fosfatasa alcalina en células MG-63. Los resultados muestran que la actividad específica de fosfatasa alcalina fue mayor sobre las superficies de carbono amorfo en los 3 periodos de tiempo evaluados. Esta actividad mostró incremento en cada tiempo de incubación evaluado. $*p < 0.05$.

Los resultados obtenidos en los ensayos de actividad específica de fosfatasa alcalina en células MG-63, las cuales son una línea celular de un osteosarcoma de humano, presentan

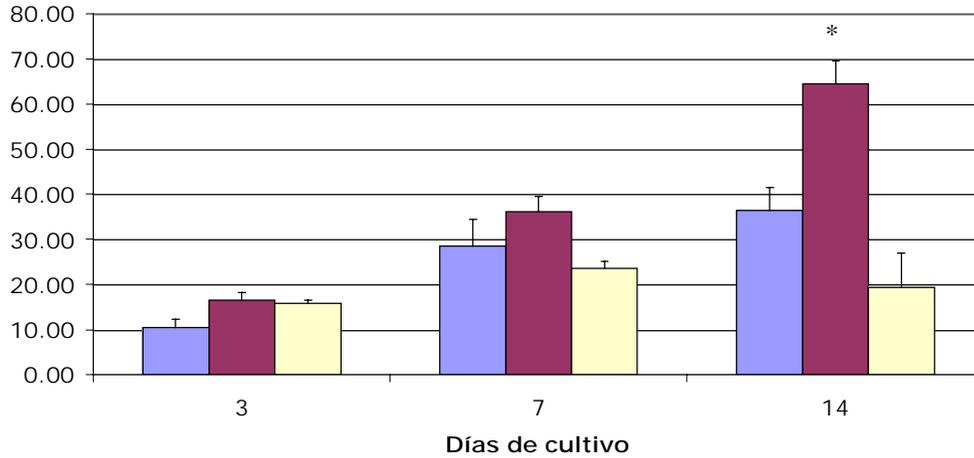
una mayor actividad sobre las superficies de carbono amorfo en todos los tiempos evaluados, dicha actividad fue incrementando conforme pasaban los días de cultivo, teniendo la mayor actividad a los 14 días de cultivo. Este comportamiento también fue observado en las superficies de titanio, aunque en menor magnitud. Las superficies control y acero 316L no mostraron un incremento en la actividad específica conforme aumentaban los días de cultivo.

Hasta ahora se observaron los comportamientos en relación a la actividad de fosfatasa alcalina en células osteoblásticas, pero surgió la interrogante de si ocasionaba el mismo comportamiento en células menos diferenciadas, como las células de médula ósea, por lo que fueron realizados ensayos de actividad específica de fosfatasa alcalina en células de médula ósea de ratón, propiciando un microambiente con dexametasona, que según la literatura, los llevara a un fenotipo de células osteoblásticas. Los resultados de dichos ensayos están representados en la gráfica 14. En esta, se puede observar un claro aumento en la actividad específica de la fosfatasa alcalina con relación al tiempo de cultivo. Si bien el incremento se observó en todas las superficies, el incremento en las superficies de carbono amorfo fue mucho mayor al observado en las superficies de titanio y control en los 3 tiempos de cultivo establecidos.

Los resultados obtenidos en los ensayos de actividad específica de fosfatasa alcalina con las células MG-63, de médula ósea y osteoblastos de calvaria de ratón, concuerdan con los reportados en este trabajo con osteoblastos derivados de hueso alveolar humano. Estos resultados reafirman que las superficies de carbono amorfo favorecen la diferenciación de osteoblastos sin importar la etapa de maduración en la que se encuentren. En estos ensayos se trabajo con células de calvaria, las cuales presentan

diferentes etapas de maduración osteoblástica, células MG-63, las cuales presentan un fenotipo de osteoblastos inmaduros, con alta actividad de fosfatasa alcalina; y células de médula ósea, las cuales representan una población heterogénea..

ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE FOSFATASA ALCALINA EN CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA



Actividad específica de la fosfatasa alcalina en células de médula ósea.

Gráfica 14. Se observan los resultados de la actividad específica de fosfatasa alcalina en células de médula ósea de ratón. Se observa un incremento en la actividad en relación al tiempo de cultivo en todas las superficies, sin embargo, las superficies de carbono amorfo presentaron un notable incremento en dicha actividad, superior a las superficies de titanio y control. * $p < 0.05$.

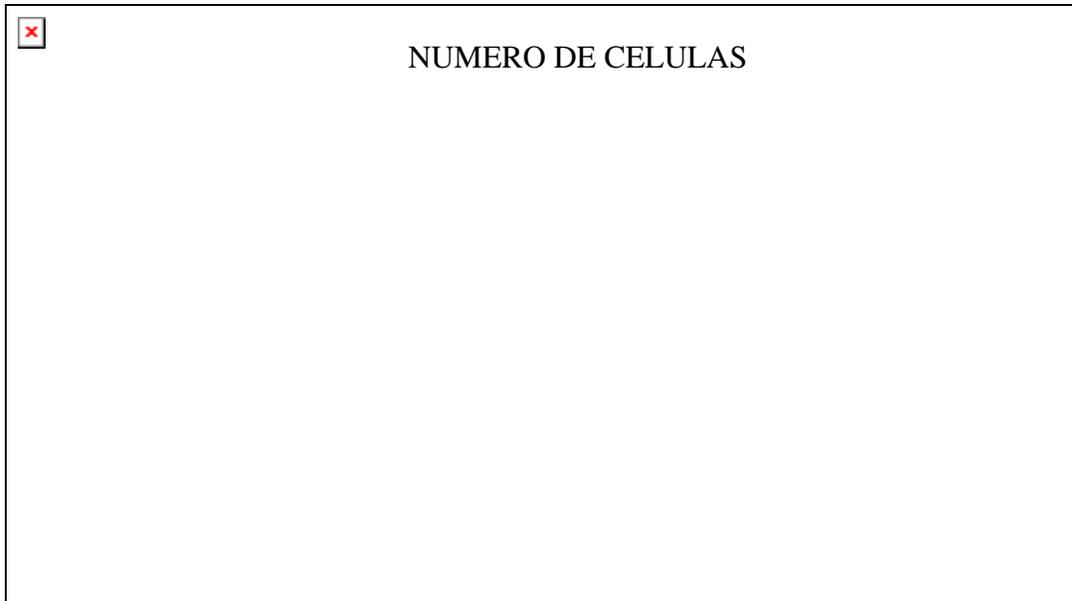
Anexo 3.

Este anexo muestra la importancia de la integrina β -1 en la interacción célula-sustrato. Se presenta en 2 trabajos, el primero realizado en la estancia de investigación en el Georgia institute of technology y el segundo como la base para futuras investigaciones.

En la primera serie de trabajos, realizado en el laboratorio de la Dra. Boyan, se realizó el silenciamiento de la integrina β -1, es decir la pérdida de la capacidad de la célula de producir dicha proteína por el bloqueo del RNA mensajero para dicha proteína, por medio de RNA de interferencia, en células MG-63, y se observaron las consecuencias de dicho silenciamiento en la proliferación y diferenciación celular, dichos estudios fueron realizados después de 7 días de cultivo. Se utilizaron 4 tipos de superficies, las cuales variaban su topografía superficial, teniéndose así las superficies control (plástico), PT (titanio puro), TPS (titanio modificado por sand-blasting) y SLA (titanio modificado por sand-blasting y grabado ácido). Así mismo, se utilizaron células MG-63 silenciadas para integrina β -1 (silencing), células no silenciadas (wild type) y células con una secuencia que no afectaba la producción de la integrina β -1 (scrambled gene).

Los resultados observados en dichos experimentos, mostraron que la proliferación celular, después de 7 días de cultivo, se ve afectada en las células que no producían la integrina β -1, teniendo el menor número de células en cada una de las superficies estudiadas, además no existió variación en cuanto al número de células y la topografía de superficie ya que prácticamente mostró el mismo número de células en todas las superficies, mientras que las células normales y las células scrambled gene presentaron mayor número de células en cada una de las superficies y este número variaba

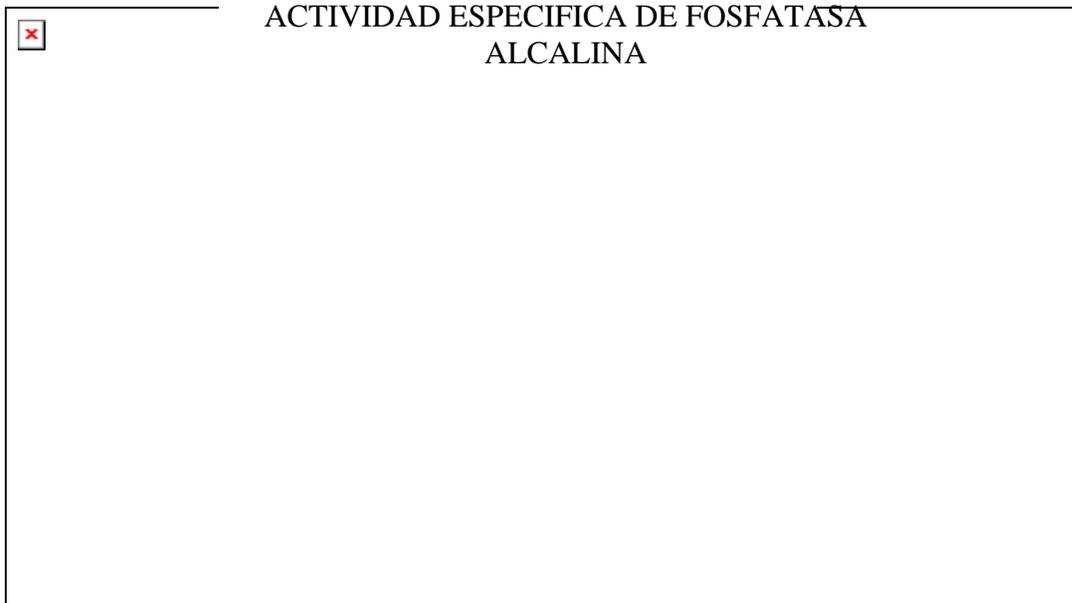
dependiendo de la topografía superficial de la muestra. Los resultados de la proliferación celular después de 7 días de cultivo se observan en la gráfica 15.



Número de células adheridas a las diferentes superficies de titanio.

Gráfica 15. *La gráfica muestra el número de células presente sobre las superficies después de 7 días de cultivo. Se observa como las células silenciadas para la integrina b-1 tienen el menor número de células presentes, por lo que este silenciamiento afecta la proliferación celular.*

Los resultados de los ensayos de la actividad específica de fosfatasa alcalina, después de 7 días de cultivo, mostraron que las células silenciadas, para la integrina β -1, presentan muy poca actividad de dicha enzima en comparación con las células normales y las scrambled gene, además los valores de esta actividad son similares en todas las superficies estudiadas, mientras que las células normales y las scrambled gene presentan una alta actividad de esta enzima y variaciones en los valores de esta actividad dependiendo de la topografía superficial de los sustratos. La gráfica 16 presenta los resultados de los ensayos de actividad específica de fosfatasa alcalina después de 7 días de cultivo.



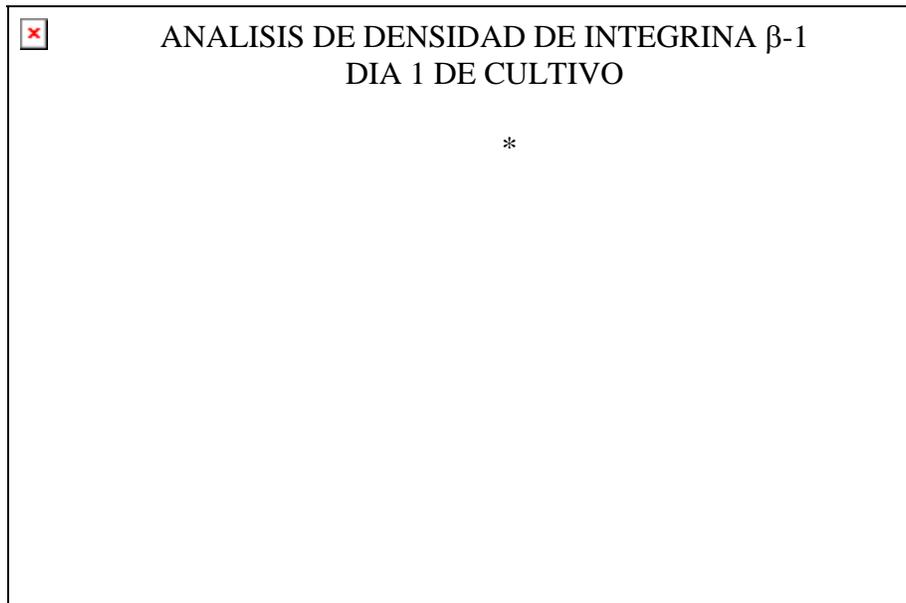
Actividad específica de la fosfatasa alcalina sobre diferentes muestras de titanio.

Gráfica 16. *Se observa la actividad específica de la fosfatasa alcalina después de 7 días de cultivo. Los resultados muestran claramente que las células silenciadas para la integrina β -1 se ven afectadas y prácticamente no tienen actividad de fosfatasa alcalina en comparación con las células normales y srcrambled gene.*

Estos resultados, aunque fueron obtenidos en superficies de titanio con diferentes topografías superficiales, demuestran que la integrina β -1 juega un papel muy importante en la interacción célula-sustrato, desde los procesos más tempranos de dicha interacción, como la proliferación celular hasta la diferenciación celular. Esta última, evaluada en relación a la actividad específica de la fosfatasa alcalina. Se observó, que las células silenciadas pierden la capacidad de distinguir entre las diferentes rugosidades superficiales, presentando una disminución en la proliferación celular y una baja actividad específica de fosfatasa alcalina. Sin embargo, no resulta claro en que tiempo afecta más la interacción de esta proteína con las proteínas adheridas al sustrato, así mismo, si se da un incremento de la expresión de esta proteína en diferentes sustratos y si este aumento en la expresión se presenta en etapas tempranas o en todo el tiempo de la

interacción célula-sustrato. Estos cuestionamientos alentaron la realización de otro juego de estudios, cuyo objetivo fue observar la expresión de la integrina β -1 en células MG-63 a 1 y 5 días de cultivo, así como su localización espacial.

La expresión de la integrina β -1 a 1 y 5 días de cultivo fue evaluada mediante la inmunodetección por western-blot. Los resultados de la expresión de esta proteína a 1 día de cultivo se observa en la gráfica 17.



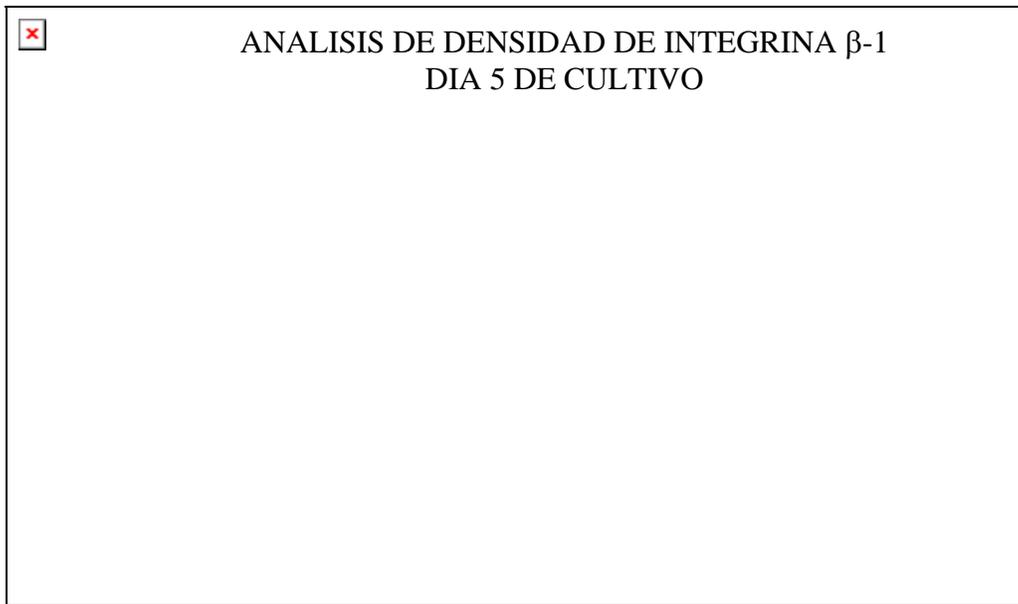
Expresión de la integrina β -1 sobre las superficies después de 1 día de cultivo.

Gráfica 17. Se observa la expresión de la integrina β -1 después de 1 día de cultivo celular. Los resultados muestran como existe un incremento en la expresión de esta proteína sobre las superficies de carbono amorfo en comparación con las muestras de acero 316L y titanio. $p < 0.05$.

Los resultados muestran que la expresión de la integrina β -1, después de 1 día de cultivo, se incremento considerablemente en comparación con las superficies de acero 316L y titanio, siendo 6% mayor que los sustratos de titanio y 10% mayor que los sustratos de acero 316L.

Los resultados para el día 5 de cultivo se presentan en la gráfica 18. Aquí, se observa que la expresión de la integrina β -1 sigue siendo mayor en las superficies de carbono amorfo,

sin embargo, existe una menor diferencia con respecto a los porcentajes obtenidos por los sustratos de titanio y acero 316L. Esto puede ser debido a una disminución en la expresión de la integrina β -1 por parte de las células cultivadas sobre el carbono amorfo, o bien, un aumento de la expresión de dicha proteína en las células cultivadas sobre el titanio o el acero 316L.

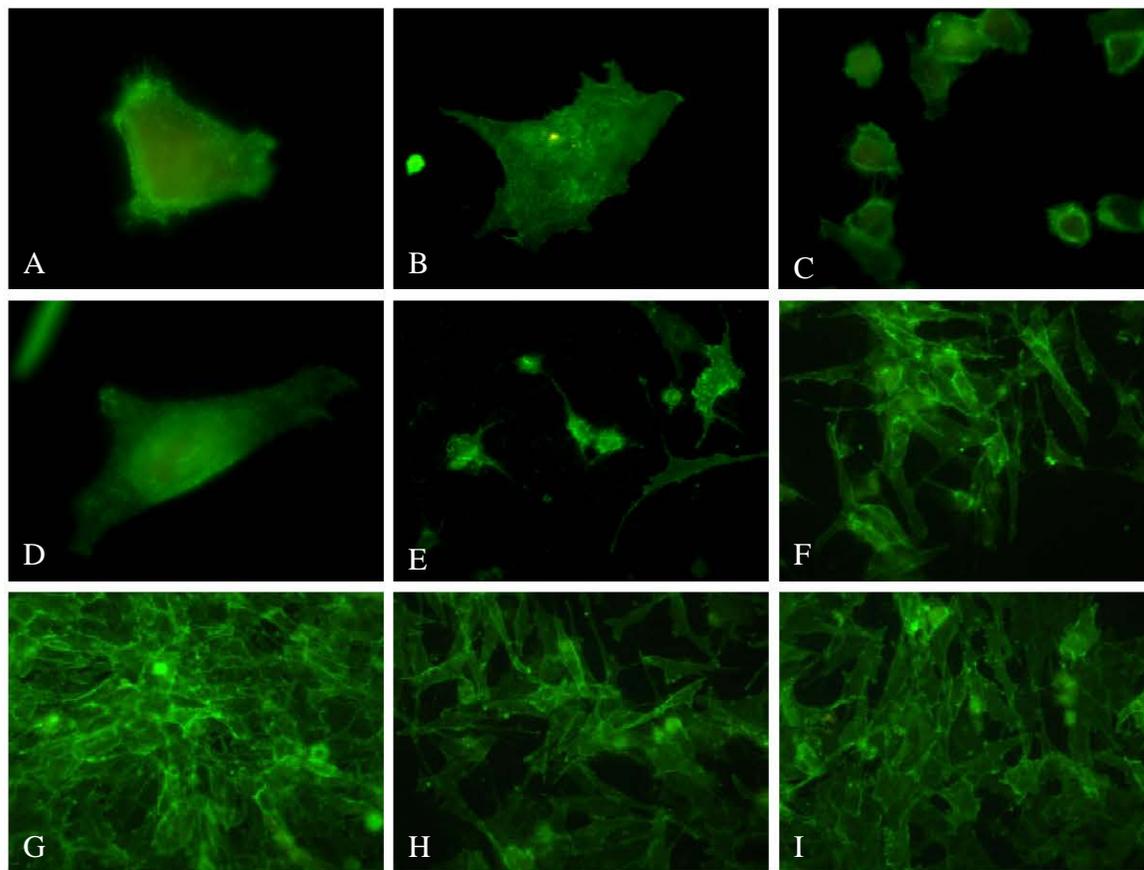


Expresión de la integrina β -1 sobre las superficies después de 5 días de cultivo.

Gráfica 18. *La gráfica muestra la expresión de la integrina β -1 después de 5 días de cultivo. Se observa que las superficies de carbono amorfo presentan la mayor expresión de dicha proteína en comparación con las superficies de titanio y acero 316L.*

La localización espacial de la integrina β -1 se realizó por la técnica de inmunofluorescencia. La figura 21, muestra diversas imágenes de la inmunolocalización de esta proteína en células MG-63, en diversos periodos de tiempo.

La integrina β -1 fue localizada en toda la membrana celular de las células MG-63 si una aparente diferencia entre los diferentes periodos de incubación evaluados.



Inmunolocalización de la integrina β -1 en osteoblastos cultivados sobre carbono amorfo.

Figura 21. Se observan diversas imágenes de la inmunolocalización de la integrina β -1 en células MG-63 cultivadas sobre carbono amorfo a diferentes tiempos de cultivo. La localización se observó en toda la membrana celular. Las imágenes A, B, C corresponden a la inmunolocalización después de 1 hora de cultivo, las imágenes D y E a células después de 4 horas de incubación, la imagen F a 24 horas de cultivo, finalmente las imágenes G, H e I, a células después de 5 días de incubación.

Los resultados anteriores indican que existe una mayor expresión de la integrina β -1 en las células cultivadas sobre carbono amorfo, por lo que se plantea, que esta superficie podría favorecer la adhesión de proteínas que interactúen con este receptor, y a su vez, desencadenarían una cascada de señalizaciones que favorecerían la proliferación y diferenciación celular. Por lo tanto, esta proteína puede estar asociada a las interacciones célula-sustrato desde etapas muy tempranas, pasando por la diferenciación celular y por ende, regulando de una forma indirecta la mineralización de la matriz extracelular.

Bibliografía

Affatato S, Frigo M, Toni A. An in vitro investigation of diamond-like carbon as a femoral head coating. *J Biomed Mater Res.* (2000) 53: 221-226.

Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* (1990) 4: 2868–2880.

Allen M, Myer B, Rushton N. In vitro and in vivo investigations into the biocompatibility of diamond-like carbon (DLC) coatings for orthopedic applications. *J Biomed Mater Res.* (2001) 58: 319-328.

Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Iost A, Hardouin P. Effect of grooved titanium substratum on human osteoblastic cell growth. *J Biomed Mater Res.* (2002) 60: 529-540.

Anselme K, Noel B, Hardouin P. Human osteoblast adhesion on titanium alloy, stainless steel, glass and plastic substrates with the same surface topography. *J Mater Sci-Mater Med.* (1999) 10: 815-819.

Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials.* (2000) 21: 667-681.

Aparicio C, Gil FJ, Planell JA, Engel E. Human-osteoblast proliferation and differentiation on grit-blasted and bioactive titanium for dental applications.

Aubin JE, Gupta AK, Zirngbl R, Rossant J. Knockout mice lacking bone sialoprotein expression have bone abnormalities. *J Bone Miner Res.* (1996) supplement 1;11: S102.

Aubin JE, Triffitt JT. Mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation. En Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. *Principles of Bone biology* (vol 1) San Diego, Academic Press. Pp. 59-81.

Bauerlein E. *Biom mineralization: from biology to biotechnology and medical application.* Weinheim, Alemania. Wiley-VCH. 2000.

Bennett JH, Carter DH, Alavi AL, Beresford JN, Walsh S. Patterns of integrin expression in a human mandibular explant model of osteoblast differentiation. *Arch Oral Biol.* (2001) 46: 229–238.

Bernex F, Mazzucotelli JP, Roudiere JL, Benhaiem-Sigaux N, Leandri J, Loisançe D. In vitro endothelization of carbon-coated dacron vascular grafts. *Int J Artif Organs.* (1992) 15: 172-180.

Bhushan B. Chemical, mechanical and tribological characterization of ultra-thin and hard amorphous carbon coatings as thin as 3.5 nm: recent developments. *Diamond Relat Mater.* (1999) 8: 1985-2015.

Bigi A, Bracci B, Cuisinier F, Elkaim R, Fini M, Mayer I, Mihailescu IN, Socol G, Sturba L, Torricelli P. Human osteoblast response to pulsed laser deposited calcium phosphate coatings. *Biomaterials.* (2005) 26: 2381-2389.

Bigi A, Bracci B, Cuisinier F, Elkaim R, Fini M, Mayer I, Mihailescu IN, Socol G, Sturba L, Torricelli P. Human osteoblast response to pulsed laser deposited calcium phosphate coatings. *Biomaterials*. (2005) 26: 2381-2389.

Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (Eds.). *Principles of bone biology*. (Vol. 1). San Diego: Academic Press. 2002.

Black J. *Biological Performance of Materials: Fundamentals of Biocompatibility*, 2a edición, Dekker Press New York Basel Hong Kong. 1992.

Bonucci E. *Calcification in biological systems*. Florida, Estados Unidos. CRC press. 1992.

Boskey AL. Biom mineralization: an overview. *Connective Tissue Res*. (2003) 44 (1): 5-9.

Boyan BD, Batzer R, Kieswetter K, Liu Y, Cochran DL, Szmuckler-Moncler S, Dean DD, Schwartz Z. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG-63 osteoblast-like cells to $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$. *J Biomed Mater Res*. (1998) 39: 77-85.

Boyan BD, Bonewald LF, Paschalis EP, Lohmann CH, Rosser J, Cochran DL, Dean DD, Schwartz Z, Boskey AL. Osteoblast-mediated mineral deposition in culture is dependent on surface microtopography. *Calcif Tissue Int*. (2002) 71: 519-29.

Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*. (1996) 17: 137-146.

Boyan BD, Lossdorfer S, Wang L, Zhao G, Lohmann CH, Cochran DL, Schwartz Z. Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. *Eur Cell Mater*. (2003) 6: 22-27.

Boyan BD, Lohmann CH, Dean DD, Sylvia VL, Cochran DL, Schwartz Z. Mechanisms involved in osteoblast response to implant surface morphology. *Annu Rev Mater Res*. (2001) 31: 357-371.

Boyer R, Welsch G, Collings EW. *Materials Properties Handbook: Titanium Alloys*. ASM International Metals Park. Ohio. 1994.

Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P. *Titanium in Medicine*. Berlin & Heidelberg: Springer-Verlag. 2001: 25-51.

Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P. *Titanium in medicine*. Springer, Berlin. (2001) 231-266.

Butler WT, Ridall AL, McKee MD. Osteopontin. In Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. In *Principles of Bone Biology*. (1996) San Diego. Academic Press., 167-181.

Butter R, Allen M, Chandra L, Lettington AH, Rushton N. In vitro studies of DLC coatings with silicon intermediate layer. *Diamond Relat Mater*, (1994) 4: 857-861.

Chandra L, Allen M, Butter R, Rushton N, Lettington AH, Clyne TW. The effect of biological fluids on the adhesion of diamond-like carbon films to metallic substrates. *Diamond-like carbon coatings for biomedical applications*. *Diamond Relat Mater*. (1994) 4: 852-856.

Cheng K, Weng W, Wang H, Zhang S. In vitro behavior of osteoblast-like cells on fluoridated hydroxyapatite coatings. *Biomaterials*. (2005) 32 : 6288-6295.

Chow JW, Wilson AJ, Chambers TJ, Fox SW. Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old rats. *J Bone Miner Res* (1998) 13:1760-1767.

Clupper DC, Gough JE, Embanga PM, Notingher I, Hench LL, Hall MM. Bioactive evaluation of 45S5 bioactive glass fibres and preliminary study of human osteoblast attachment. *J Mater Sci Mater Med*. (2004) 7: 803-808.

Collings EW. Physical metallurgy of titanium alloys. En: Boyer R, Welsch G, Collings EW, eds. *Materials Properties Handbook: Titanium Alloys*. Materials Park, OH: ASM Intl., 1994: 3-122.

Cowles EA, Brailey LL, Gronowicz GA, Integrin-mediated signaling regulates AP-1 transcription factors and proliferation in osteoblasts. *J Biomed Mater Res*. (2000) 52: 725-737.

Cowles EA, De Rome ME, Pastizzo G, Brailey LL, Gronowicz GA. Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development. *Calcif. Tissue Int*. (1998) 62:74-82.

Cui FZ, Li DJ. A review of investigations on biocompatibility of diamond-like carbon and carbon nitride films. *Surf Coat Technol*. (2000) 131: 481-487.

Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1997) 96: 3092-3097.

Davies JE. *Bone engineering*. Em squared incorporated. Toronto, Canada. 2000.

de Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials*. (2004) 25: 403-413.

Dee KC, Puleo DA, Bizios R. An introduction to tissue-biomaterials interactions. Chapter 3: Protein surface interactions. Edit Wiley-Liss. New Jersey. 2002 : 37-52.

Denhardt DT, Noda M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Bio Chem Sup*. (1998) 30/31: 92-102.

Doillon CJ, Silver FH, Berg RA. Fibroblast growth on a porous collagen sponge containing hyaluronic acid and fibronectin. *Biomaterials*. (1987) 8: 195-200.

Du C, Su XW, Cui FZ, Zhu XD. Morphological behaviour of osteoblasts on diamond-like carbon coating and amorphous C-N film in organ culture. *Biomaterials*. (1998) 19: 651-658.

Ducy P. Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Developmental Dynamics*. (2000) 219: 461-471.

Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* (1996) 382: 448-452.

Ducy P, Karsenty G. Skeletal Gla proteins: gene structure, regulation of expression, and function in Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. Principles in bone biology. San Diego, Academic Press (1996) 183-185.

Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M, Karsenty G. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. Genes Dev. (1999) 13: 1025-1036.

Ertel SI, Ratner BD, Horbett TA. Radiofrequency plasma deposition of oxygen-containing films on polystyrene and poly(ethylene terephthalate) substrates improves endothelial cell growth. J Biomed Mater Res. (1990) 24: 1637-1659.

Everts V, Delaisse JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, Beertsen W. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. J Bone Miner Res (2002) 17:77-90.

Eyre DR, Dickson IR, Van Ness K. Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age-related changes in content of mature hydroxypyridinium residues. J Biochem. (1988) 252:495-500.

Fini M, Giavaresi G, Giardino R, Lenger H, Bernauer J, Rimondini L, Torricelli P, Borsari V, Chiusoli L, Chiesa R, Cigada A. A new austenitic stainless steel with a negligible amount of nickel: an in vitro study in view of its clinical application in osteoporotic bone. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. (2004) 71: 30-37.

Fini M, Nicoli Aldini N, Torricelli P, Giavaresi G, Borsari V, Lenger H, Bernauer J, Giardino R, Chiesa R, Cigada A. A new austenitic stainless steel with negligible nickel content: an in vitro and in vivo comparative investigation. Biomaterials. (2003) 24: 4929-4239.

Galante JO, Lemons J, Spector M, Wilson PD, Wright TM. J. Orthopedic Research. (1991) 9: 760-775.

Galli C, Guizzardi S, Passeri G, Martini D, Tinti A, Mauro G, Macaluso GM. Comparison of human mandibular osteoblasts grown on two commercially available titanium implant surfaces. J Periodontol. (2005) 76: 364-372.

Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. Crit Rev Oral Biol Med. (1999) 10: 79-98.
Gehron P. Cell-mediated calcification *in vitro*. En: Bonucci E. Calcification in biological systems. Florida, Estados Unidos. CRC press. 1992.

Giachelli CM, Schwartz SM, Liaw L. Molecular and cellular biology of osteopontin: Potential role in cardiovascular disease. Trends Cardiovasc Med. (1995) 5:88-95.

Gilmour DT, Lyon GJ, Carlton MB, Sanes JR, Cunningham JM, Anderson JR, Hogan BL, Evans MJ, Colledge WH. Mice deficient for the secreted glycoprotein SPARC/osteonectin/BM40 develop normally but show severe age-onset cataract formation and disruption of the lens. EMBO J. (1998) 17: 1860-1870.

Glowacki J, Rey C, Cox K, Lian J. Effects of bone matrix components on osteoclast differentiation. Connect Tissue Res. (1989) 21: 121-129.

Gluszek J, Jedrkowiak J, Markowski J, Masalski J. Galvanic couples of 316L steel with Ti and ion plated TiN coatings in Ringer's solutions. *Biomaterials*. (1990) 11: 330-335.

Goldberg HA, Hunter GK. The inhibitory activity of osteopontin on hydroxyapatite formation in vitro. *Ann NY Acad Sci*. (1995) 760: 305-308.

Goto T, Yoshinari M, Kobayashi S, Tanaka T. The initial attachment and subsequent behavior of osteoblastic cells and oral epithelial cells on titanium.

Grill A. From Tribological Coatings to low-k dielectrics for ULSI interconnects. *Thin Solid Films*. (2001) 398-399: 527-532.

Gronowicz GA, McCarthy MB. Response of human osteoblasts to implant materials: integrin-mediated adhesion. *J Orthop Res*. (1996) 14: 878-887.

Hao L, Lawrence J, Phua YF, Chian KS, Lim GC, Zheng HY. Enhanced human osteoblast cell adhesion and proliferation on 316 LS stainless steel by means of CO₂ laser surface treatment. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. (2005) 73: 148-156.

Hauert R. A review of modified DLC coatings for biological applications. *Diamond and Relat Mater*. (2003) 12: 583-589.

Hayashi K, Matsugushi N, Uenoyama K, Kanemaru T, Sugioka Y. Evaluation of metal implants coated with several types of ceramics as biomaterials. *J Biomed Mater Res*. (1989) 23: 1247-1259.

Hayashi K, Noda I, Uenoyama K, Sugioka Y. Breakdown corrosion potential of ceramic coated metal implants. *J Biomed Mater Res*. (1990) 24: 1111-1113.

Hayman EG, Engvall E, A'Hearn E, Barnes D, Pierschbacher M, Ruoslahti E. Cell attachment on replicas of SDS polyacrylamide gels reveals two adhesive plasma proteins. *J Cell Biol*. (1982) 95: 20-23.

Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, Ruoslahti E. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor- β . *Biochem J*. (1994) 302:527-534.

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. (1992) 69: 11-25.

Imam MA, Fraker AC. En: *Medical Applications of Titanium and its Alloys: The Material and Biological Issues*. Edited por Brown SA, Lemons JE. ASTM STP 1272 (1996) 3-14.

Inoue M, LeGeros RZ, Inoue M, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Yamamoto T, Nagai N. In vitro response of osteoblast-like and odontoblast-like cells to unsubstituted and substituted apatites. *J Biomed Mater Res A*. (2004) 70: 585-593.

Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res* (1998)13:793-802.

Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Robertson P, Parfitt AM, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest* (1999) 104:439-446.

Jones MI, McColl IR, Grant DM, Parker KG, Parker TL. Protein adsorption and platelet attachment and activation, on TiN, TiC, and DLC coatings on titanium for cardiovascular applications. *J Biomed Mater Res.* (2000) 52: 413-21.

Jones SJ, Gray C, Sakamaki H, Aurora M, Boyde A, Gourdie R, Green C. the incidence and size of gap junctions between the bone cells in rat calvaria. *Anat Embryol* (1993) 187:343-352.

Jorgensen NR, Henriksen Z, Sorensen OH, Civitelli R. Dexamethasone, BMP-2, and 1,25-dihydroxyvitamin D enhance a more differentiated osteoblast phenotype: validation of an in vitro model for human bone marrow-derived primary osteoblasts. *Steroids.* (2004) 69: 219-26.

Karsenty G. The genetic transformation of bone biology. *Gene Dev.* (1999) 13: 3037-3051.

Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral diseases.* (2002) 8: 147-159.

Keating FH. Chromium-Nickel Austenitic Steels. Butterworths, London, 1986.

Keller JC, Lautenschlager EP. En: Handbook of Biomaterials Evaluation. Edited by von Recum AF. Macmillan Publishing Company. New York (1986) 3-23.

Kieswetter K, Schwartz Z, Hummert TW, Cochran DL, Simpson J, Dean DD, Boyan BD. Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. *J Biomed Mater Res.* (1996) 32: 55-63

Knabe C, Berger G, Gildenhaar R, Klar F, Zreiqat H. The modulation of osteogenesis in vitro by calcium titanium phosphate coatings. *Biomaterials.* (2004) 25: 4911-4919.

Kobayashi T, Kronenberg H. Minireview: transcriptional regulation development of bone. *Endocrinology.* (2005) 146 (3): 1012-1017.

Kummer FJ, Ricci JL, Blumenthal NC. RF plasma treatment of metallic implant surfaces. *J Applied Biom.* (1992) 3: 39-44.

Lane TF, Sage EH. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J.* (1994) 8: 163-173.

LeClair P, Berera GP, Moodera JS. Titanium nitride thin films obtained by a modified physical vapor deposition process. *Thin Solid Films.* (2000) 376: 9-15.

Lee TM, Tsai RS, Chang E, Yang CY, Yang MR. The cell attachment and morphology of neonatal rat calvarial osteoblasts on the surface of Ti-6Al-4V and plasma-sprayed HA coating: effect of surface roughness and serum contents. *J Mater Sci Mater Med.* (2002) 4: 341-350.

Liaw I, Birk DE, Ballas CB, Whitsitt JS, Davidson JM, Hogan BL. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene. *J Clin Invest* (1998) 101: 1468-1478.

Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR, Lohmann CH, Liu Y, Cochran DL, Dean DD, Schwartz Z. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials*. (1998) 19: 2219-2232.

Linder S, Pinkowski W, Aepfelbacher M. Adhesion, cytoskeletal architecture and activation status of primary human macrophages on a diamond-like carbon coated surface. *Biomaterials*. (2002) 23:7 67-73.

Lopez GP, Ratner BD, Tidwell CD, Haycox CL, Rapoza RJ, Horbett TA. Glow discharge plasma deposition of tetraethylene glycol dimethyl ether for fouling-resistance biomaterial surface. *J Biomed Mater Res*. (1992) 26: 415-439.

Lossdorfer S, Schwartz Z, Wang L, Lohmann CH, Turner JD, Wieland M, Cochran DL, Boyan BD. Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. *J Biomed Mater Res A*. (2004) 70: 361-369.

Low MG. The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*. (1989) 988: 427-454.

Mackie EJ. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell*. (2003) 35: 1301-1305.

Marroti G, Ferreti M, Muglia MA, Palumbo C, Palazzini S. A quantitative evaluation of osteoblast-osteocyte relationships on growing endosteal surface of rabbit tibiae. (1992) *bone* 13:363-368.

Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J Jr, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res*. (1995) 29: 389-401.

Martin RB. Toward a unifying theory of bone remodeling. (2000) *Bone* 26:1-6.

McKee MD, Nanci A. Secretion of osteopontin by macrophages and its accumulation at tissue surfaces during wound healing in mineralized tissues: A potential requirement for macrophage adhesion and phagocytosis. *Anat Rec* (1996) 245: 394-409.

Mitura E, Mitura S, Niedzielski P, Has Z, Wolowiec R, Jakubowski A, Szmids J, Sokoowska A, Louda P, Marciniak J, Koczy B. Diamond-like carbon coatings for biomedical applications. *Diamond Relat Mater*. (1994) 3: 896-898.

Monsees TK, Barth K, Tippelt S, Heidel K, Gorbunov A, Pompe W, Funk RH. Effects of different titanium alloys and nanosize surface patterning on adhesion, differentiation, and orientation of osteoblast-like cells. *Cells Tissues Organs*. (2005) 2: 81-95.

Mori S, Burr, DB increased intracortical remodeling following fatigue damage, *Bone*. (1993) 14: 103-109.

Musil J. Hard and superhard nanocomposite coating. *Surf. Coat. Technol*. (2000) 125: 322-330.

Mustafa K, Rubinstein J, Lopez BS, Arvidson K. Production of transforming growth factor beta1 and prostaglandin E2 by osteoblast-like cells cultured on titanium surfaces blasted with TiO₂ particles. *Clin Oral Implants Res.* (2003) 14: 50-56.

Mustafa K, Wennerberg A, Wroblewski J, Hultenby K, Lopez BS, Arvidson K. Determining optimal surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clin Oral Implants Res.* (2001) 12: 515-525.

Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens and collagen-related diseases. *Ann Med* 2001;33:7–21.

Naji A, Harmand MF. Cytocompatibility of two coating materials, amorphous alumina and silicon carbide using human differentiated cell cultures. *Biomaterials.* (1986) 7: 403-422.

Nakashima K, Zhou X, Kunkel G. The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* (2000) 108: 17-29.

Narisawa S, Frohlander N, Millan JL. Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev Dyn.* (1997) 208: 432-446.

Ohring M (Ed.). *Materials Sciences of Thin Film: Deposition and Structure.* Academic Press Ltd. USA. 2002.

Okazaki Y, Rao S, Tateishi T, Ito Y. Cytocompatibility of various metal and development of new titanium alloys for medical implants. *Materials Science and Engineering A - Structural Materials Properties Microstructure and Processing* 1998; 243 (1-2): 250-256.

Okpalugo TI, McKenna E, Magee AC, McLaughlin J, Brown NM. The MTT assays of bovine retinal pericytes and human microvascular endothelial cells on DLC and Si-DLC-coated TCPS. *J Biomed Mater Res A.* (2004) 71:201-208.

Okpalugo TI, Ogwu AA, Maguire PD, McLaughlin JA. Platelet adhesion on silicon modified hydrogenated amorphous carbon films. *Biomaterials.* (2004) 25: 239-245.

Olborska A, Swider M, Wolowiec R, Niedzielski P, Rylski A, Mitura S. Amorphous carbon — Biomaterial for implant coatings. *Diamond-like carbon coatings for biomedical applications. Diamond Relat Mater.*(1994) 3: 899-901.

Oliveira AL, Alves CM, Reis RL. Cell adhesion and proliferation on biomimetic calcium-phosphate coatings produced by a sodium silicate gel methodology. *J Mater Sci Mater Med.* (2002) 12: 1181-1188.

Pardoe H, Dobson J. Magnetic iron biomineralization in rat brains: effects of iron loading. *BioMetals.* (1999) 12: 77

Park JB, Lakes RS. *Biomaterials, an introduction.* 2^a Edición. Plenum Press. New York and London. 1992.

Patarca R, Saavedra RA, Cantor H. Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: The role of the early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. *Crit Rev Immunol* (1993) 13:225–246.

Pearson BS, Klebe RJ, Boyan BD, Moskowitz D. Comments on the clinical application of fibronectin in dentistry. *J Dent Res.* (1998) 67: 515-517.

Peterkofsky B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr.* (1991) 54 (6): 1135S-1140S.

Popov C, Kulisch W, Jelinek M, Bock A, Strnad J. Nanocrystalline diamond/amorphous carbon composite films for applications in tribology, optics and biomedicine. *Thin solid films.* (2005) 494: 92-97.

Prado Da Silva MH, Soares GD, Elias CN, Best SM, Gibson IR, DiSilvio L, Dalby MJ. In vitro cellular response to titanium electrochemically coated with hydroxyapatite compared to titanium with three different levels of surface roughness.

Prêle CM, Horton MA, Caterina P, Stenbeck G. Identification of the molecular mechanisms contributing to polarized trafficking in osteoblasts. *Exp. Cell. Res.* (2003) 282: 24–34.

Price PA. GLA containing proteins in bone. *Connect Tissue Res* (1989) 21 (1-4): 51-57.

Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surfaces roughness. *J Biomed Mater Res.* (2000) 49; 155-166.

Ramires PA, Romito A, Cosentino F, Milella E. The influence of titania/hydroxyapatite composite coatings on in vitro osteoblasts behaviour. *Biomaterials.* (2001) 22: 1467-1474.

Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. *Biomaterials Science.* Academic Press. San Diego. 1996.

Reed CC, Iozzo RV. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconjugate J.* (2003) 19: 249-255.

Rieu J, Pichat A, Rabbe LM, Rambert A, Chabrol C, Robelet M. Ion implantation effects on friction and wear of joint prosthesis materials. (1991) 12: 139-143.

Rittling SR, Denhardt DT. Osteopontin (OPN) function in pathology: Lessons from OPN-deficient mice. *Exp Nephrol.* (1999) 7 (2): 103-113.

Rittling SR, Matsumoto HN, McKeeMD, Nanci A, An XR, Novick KE, Kowalski AJ, Noda M, Denhardt DT. Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *Bone Miner Res* (1998) 13: 11101-11111.

Roach HI. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralization and resorption. *Cell Biology International.* (1994) 6: 617-628.

Robertson J. Diamond-like amorphous carbon. *Mater Sci Eng R: Reports.* (2002) 37: 129-281.

Rodriguez R, Kim K, Ong JL. In vitro osteoblast response to anodized titanium and anodized titanium followed by hydrothermal treatment. *J Biomed Mater Res A.* (2003) 65: 352-358.

Rodil SE. Carbono amorfo y cuasidiamante. En prensa. (2005)

Rosa AL, Beloti MM. Rat bone marrow cell response to titanium and titanium alloy with different surface roughness. *Clin Oral Implants Res.* (2003) 1: 43-48.

Salonen J, Domenicucci C, Goldberg HA, Sodek J. Immunohistochemical localization of SPARC protein (osteonectin) and denatured collagen and their relationship to tissue remodeling in rat dental tissues. *Arch Oral Biol* (1990) 35: 337-346.

Santavirta S. Compatibility of the totally replaced hip. Reduction of wear by amorphous diamond coating. *Acta Orthop Scand Suppl.* (2003) 74 :1-19.

Schmidt C, Ignatius AA, Claes LE. Proliferation and differentiation parameters of human osteoblasts on titanium and steel surfaces. *J Biomed Mater Res.* (2001) 54 : 209-215.

Schneider G, Burridge K. Formation of focal adhesions by osteoblasts adhering to different substrata. *Exp Cell Res.* (1994) 214: 264–269.

Schneider GB, Perinpanayagam H, Clegg M, Zaharias R, Seabold D, Keller J, Stanford C. Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. *J Dent Res.* (2003) 82: 372-376.

Schönherr E, Broszat M, Brandan E, Bruckner P, Kresse H. Decorin core protein fragment Leu 155-Val260 interacts with TGF- β but does not compete for decorin binding to type I collagen. *Arch Biochem Biophys.* (1998) 35: 241–248.

Schroeder A, Francz G, Bruinink A, Hauert R, Mayer J, Wintermantel E. Titanium containing amorphous hydrogenated carbon films (a-C: H/Ti): surface analysis and evaluation of cellular reactions using bone marrow cell cultures in vitro. *Biomaterials.* (2000) 21:449-456.

Schwartz Z, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *J Cell Biochem.* (1994) 56: 340-347.

Schwartz Z, Lohmann CH, Oefinger J, Bonewald LF, Dean DD, Boyan BD. Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage. *Adv Dent Res.* (1999) 13: 38-48.

Schwartz Z, Lohmann CH, Sisk M, Cochran DL, Sylvia VL, Simpson J, Dean DD, Boyan BD. Local factor production by MG63 osteoblast-like cells in response to surface roughness and 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ is mediated via protein kinase C- and protein kinase A-dependent pathways. *Biomaterials.* (2001) 7: 731-741.

Sela J, Schwartz Z, Swain LD, Boyan BD. The role of matrix vesicles in calcification. En: Bonucci E. *Calcification in biological systems.* Florida, Estados Unidos. CRC press. 1992.

Siebers MC, ter Brugge PJ, Walboomers XF, Jansen JA. Integrins as linker proteins between osteoblast and bone replacing materials. A critical review. *Biomaterials.* (2005) 26: 137-146.

Siebers MC, ter Brugge PJ, Walboomers XF, Jansen JA. Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review. *Biomaterials.* (2005) 26: 137-46.

Sinha RK, Tuan RS. Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials. *Bone.* (1996) 18: 451–457.

- Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med.* (2000) 11(3): 279-303.
- Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontology* 2000. (2000) 24: 99-126.
- Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J.* (1990) 4: 3111.
- Steinemann SG. *Periodontology*2000. (1998) 17: 7-21.
- Suttie JW. Vitamin K-dependent carboxylase. *Annu Rev Biochem.* (1985) 54:459-477.
- Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclast. *Science* (2000) 289:1504-1508.
- Thian ES, Huang J, Best SM, Barber ZH, Bonfield W. Magnetron co-sputtered silicon-containing hydroxyapatite thin films--an in vitro study. *Biomaterials.* (2005) 26: 2947-2956.
- Thomson LA, Law FC, Rushton N, Franks J. Biocompatibility of diamond like carbon coating. *Biomaterials.* (1991) 12: 37-40.
- Tosatti S, Schwartz Z, Campbell C, Cochran DL, VandeVondele S, Hubbell JA, Denzer A, Simpson J, Wieland M, Lohmann CH, Textor M, Boyan BD. RGD-containing peptide GCRGYGRGDSPG reduces enhancement of osteoblast differentiation by poly(L-lysine)-graft-poly(ethylene glycol)-coated titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A.* (2004) 68: 458-472.
- Wang H, Gerbaudo VH, Hobbs LW, Spector M. Quantitation of osteoblast-like cell mineralization on tissue culture polystyrene and Ti-6Al-4V alloy disks by Tc-99m-MDP labeling and imaging in vitro. *Bone.* (2005) 36: 84-92.
- Wang DY, Chang YY, Chang CL, Huang YW. Deposition of diamond-like carbon films containing metal elements on biomedical Ti alloys. *Surface Coat Tech.* (2005) 200: 2175-2180.
- Weiner S, Traub W. Organization of hydroxyapatite crystals within collagen fibrils. *FEBS Lett.* (1986) 206: 262-266.
- Whyte MP. Alkaline phosphatase: physiological role explored in hypophosphatasia. En Peck WA. *Bone and Mineral Research.* Amsterdam. Holanda. Elsevier. (1989) 6: 175-218.
- Wieland M, Textor M, Chehroudi B, Brunette DM. Synergistic interaction of topographic features in the production of bone-like nodules on Ti surfaces by rat osteoblasts. *Biomaterials.* (2005) 26: 1119-1130.
- Williams DF, Black J, Doherty PJ. En: *Biomaterial-Tissue Interfaces: Advances in Biomaterials.* Editado por: Doherty PJ, Williams RL, Williams DF, Lee AJC. Elsevier Science Publishers B.V. 1992. 525-533.
- Xaus J, Comalada M, Cardó M, Valledor AF, Celada A. Decorin inhibits macrophage colony-stimulating factor proliferation of macrophages and enhances cell survival through induction of p27Kip1 and p21Waf1. *Blood.* (2001) 98: 2124-2133.

Xu T, Bianco P, Fisher LW, Longenecker G, Smith E, Goldstein S, Bonadio J, Boskey A, Heegaard AM, Sommer B, Satomura K, Dominguez P, Zhao C, Kulkarni AB, Robey PG, Young MF. Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nat Genet.* (1998) 20: 78-82.

Xuanyong L, Paul K, Chu D, Chuanxian D. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Mater Sci Eng R: Reports.* (2004) 47: 49-121.

Yang Y, Bumgardner JD, Cavin R, Carnes DL, Ong JL. Osteoblast precursor cell attachment on heat-treated calcium phosphate coatings. *J Dent Res.* (2003) 6: 449-453.

Yeh YS, Iriyama Y, Matsuazawa Y, Hanson SR, Yasuda H. Blood compatibility of surfaces modified by plasma polymerization. *J Biomed Mater Res.* (1988) 22: 795-818.

Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci* (1999) 96: 8156-8160.

Yuasa T, Miyamoto Y, Kon M, Ishikawa K, Takechi M, Momota Y, Tatehara S, Takano H, Mimamiguchi S, Nagayama M. Proliferation and differentiation of cultured MC3T3-E1 osteoblasts on surface-layer modified hydroxyapatite ceramic with acid and heat treatments. *Dent Mater J.* (2005) 24: 207-212.

Zhang H, Lewis CG, Aronow MS, Gronowicz GA. The effects of patient age on human osteoblasts' response to Ti-6Al-4V implants in vitro. *J Orthop Res.* (2004) 22: 30-38.

Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, Boyan BD. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A.* (2005) 74: 49-58.

Zinger O, Zhao G, Schwartz Z, Simpson J, Wieland M, Landolt D, Boyan B. Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. *Biomaterials.* (2005) 14: 1837-1847.