



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

INFLUENCIA DE LA RUGOSIDAD DE PELICULAS DE CARBONO AMORFO EN LA ADHESION DE OSTEÓBLASTOS

Autore: Ramirez Brizuela Claudia
UNAM:
Nombre: Ramirez Brizuela Claudia
Fecha: 05 mayo 2005

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: FISICA

PRESENTA CLAUDIA RAMIREZ BRIZUELA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. SANDRA ELIZABETH RODIL POSADA



2005

M343870





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:  
"Influencia de la rugosidad de películas de carbono amorfo en la  
adhesión de osteoblastos"

realizado por Ramírez Brizuela Claudia

con número de cuenta 09550436-2 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Física

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. Sandra Elizabeth Rodil Posada

Propietario Fís. Andrés Valentín Porta Contreras

Propietario M. en C. Jesús Armando Lara Velázquez

Suplente M. en C. Alicia Zarzosa Pérez

Suplente Dr. Higinio Arzate

Consejo Departamental de Física

M. EN C. ALICIA ZARZOSA PEREZ

FACULTAD DE CIENCIAS  
FÍSICA

*A mis papas y hermano, por su amor,  
cariño, valioso apoyo,  
paciencia, motivación, por estar  
conmigo siempre, por ser el regalo más grande,  
gracias por estar conmigo en todo momento;  
de verdad  
no tengo palabras para agradecerles todo  
lo que han hecho por mí,  
todo lo que significan y son para mí 😊.*

*Papi muchas gracias por tu amor,  
apoyo, paciencia, por explicarme cuando fue  
necesario, por tus consejos y enseñanzas,  
por estar conmigo.*

*Mami muchas gracias por tu amor,  
apoyo, comprensión, paciencia, tolerancia,  
por tus consejos y enseñanzas,  
por estar conmigo.*

*Richi muchas gracias por estar conmigo  
Y apoyarme.*

*Gracias por todo a los tres,  
LOS AMO, QUIERO,  
RESPECTO, ADMIRO...*

## *Agradecimientos*

*Muy en especial y con mucho, mucho cariño a Sandra Elizabeth Rodil Posada, mi asesora, por su valiosa asesoría, por su tiempo, ayuda, consejos, apoyo, paciencia, enseñanza, por estar conmigo, por transmitirme sus conocimientos. Muchas, muchas gracias☺.*

*A mi comité sinodal, por el tiempo que tomaron para revisar este trabajo: Dra. Sandra Elizabeth Rodil Posada, M en C. Jesús Armando Lara Velásquez, Fís. Andrés Valentín Porta Contreras, M en C. Alicia Zarzosa Pérez, Dr. Higinio Arzate.*

*Andrés muchas gracias por tu tiempo, apoyo, paciencia, por escucharme, por tus sabios consejos, pero muy en especial gracias por tu amistad.*

*Armando gracias por el apoyo, por el tiempo que me has dedicado, por estar siempre, por tu amistad.*

*Higinio, muchas gracias por tu tiempo, por tu valiosa y enorme ayuda a la elaboración de este trabajo, por tu paciencia.*

*Alicia, gracias por tu tiempo en la revisión de este trabajo.*

*Gracias al Dr. Stephen Muhl Saunders, por su apoyo, enseñanza y paciencia para la realización de este trabajo.*

*Gracias al Instituto de Investigaciones en Materiales, al Instituto de Física, en especial al laboratorio de microscopía, al Dpto. de Biología Celular edificio de postgrado de la facultad de Odontología, por haberme facilitado sus instalaciones y equipo.*

*Gracias a René Olivares, por su apoyo y enseñanza, gracias al Fís. Lázaro Huerta Arcos, laboratorio de análisis de superficies, gracias a J. Jairo Olaya.*

*A mis compañeros y amigos del IIM y IF.*

*Gracias en especial al M en C. Gabriel Ángel Lara Rodríguez, por tu valiosísima y muy apreciada amistad, por todo el apoyo que me has brindado, por acompañarme, por tu tiempo, por tus palabras, por escucharme, por tu ayuda, por estar conmigo, por tu paciencia, por tu cariño, por enseñarme a pulir y por muchas cosas más. Gracias☺.*

*Gracias al M en C. Carlos Raúl Magaña Zavala, por tu tiempo y apoyo, por revisar este trabajo, por las imágenes del SEM.☺*

*A mis amigos de la licenciatura que tanto quiero y aprecio, en especial muchas gracias a Héctor y Veros por estar conmigo y escucharme, por ser mis amigos.*

*Gracias a la FACULTAD DE CIENCIAS, de mí siempre querida y recordada por sus enseñanzas, a mis profesores de la carrera por sus enseñanzas.*

*Cuando el amor es grande,  
no hacen falta las palabras; pues aún en el  
silencio más profundo el amor lo dice todo.*

*Un hombre sabio es aquel que no sufre por  
las cosas que no tiene,  
sino que disfruta de las que posee.*

<b>Resumen</b>	<b>8</b>
<b>Objetivos</b>	<b>10</b>
Objetivo general.	10
Objetivos particulares.	10
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	<b>12</b>
Metodología	15
<b>Capítulo 2. Antecedentes</b>	<b>18</b>
<b>Implantes</b>	<b>18</b>
Implantes dentales	18
Implantes ortopédicos	20
Acero inoxidable. 316L	25
<b>Modificación de superficies</b>	<b>27</b>
Películas Delgadas o recubrimientos	28
Películas de Carbono Amorfo (a-C)	28
<b>Pruebas Biológicas</b>	<b>33</b>
Cultivos Celulares	33
Adhesión celular	37
Efectos de la topografía	43
Composición Química	44
Energía superficial	45
<b>Capítulo 3. Técnicas experimentales</b>	<b>47</b>
Perfilómetro.	47
Espureo Catódico	49
Medidor de ángulo de contacto	51
Prueba Colorimétrica	53
Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).	57
Preparación de muestras para el SEM	59
Fotoemisión de rayos X (XPS).	60
<b>Capítulo 4. Desarrollo Experimental</b>	<b>63</b>
Preparación del Sustrato y Medición de la Rugosidad	63
Perfilómetro.	64
Depósito.	65
Medición de ángulo de contacto	67
Cultivo Celular	67
Conteo Celular	70
Preparación de Muestras para SEM	71

<b>Capítulo 5. Resultados y análisis</b>	<b>73</b>
<b>Rugosidad</b>	<b>73</b>
<b>Ángulo de contacto</b>	<b>75</b>
<b>Prueba Colorimétrica</b>	<b>79</b>
<b>Composición</b>	<b>83</b>
<b>Morfología Celular</b>	<b>85</b>
<b>Capítulo 6. Conclusiones</b>	<b>93</b>
<b>Glosario</b>	<b>94</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>96</b>



# Resumen

## Resumen

En este trabajo se estudia la correlación entre la rugosidad superficial y la adhesión de osteoblastos en superficies de acero inoxidable y de carbono amorfo (a-C). El objetivo es determinar cuál de las dos superficies y cual rugosidad es más eficiente para la adhesión de las células.

El primer paso en la evolución de un implante es la respuesta de las células al contacto con una nueva superficie, la que determinará su comportamiento posterior. En el laboratorio esto constituye el depósito o cultivo de las células en la superficie. La diferenciación celular y el posterior desarrollo de los tejidos dependen fundamentalmente de la manera en que las primeras células se “adhieren” a la que será la interfaz entre el implante propiamente dicho y la capa de material biocompatible en la que se pretende que se desarrollen. Además, varios estudios previos han demostrado [1, 2] que hay una intensa relación entre la topografía superficial del implante y el desarrollo de los tejidos adyacentes. En este trabajo se modifica la rugosidad superficial del acero inoxidable que sirve como sustrato para el depósito de películas de carbono amorfo, estudiando rugosidades promedio que van desde el pulido espejo, con una rugosidad promedio del orden de  $0.01 \mu\text{m}$ , hasta muestras de rugosidades entre 1 y 3 micrómetros. Para esto se pulió el sustrato con abrasivos para obtener las rugosidades mencionadas y, se determinó la rugosidad mediante el perfilómetro y el microscopio electrónico de barrido. La composición química se evaluó mediante espectroscopia de rayos X y el ángulo de contacto superficial con el medidor de ángulo de contacto. Posteriormente, para evaluar la adhesión celular, que se considera el primer nivel de interacción célula-superficie, se cultivaron células óseas humanas en las superficies de acero y de acero recubierto con carbono amorfo por periodos de 24 horas. El número de células adheridas en las superficies se determinó mediante una técnica colorimétrica, la cual relaciona la absorción de luz a una longitud de onda determinada con el número de células adheridas, cuya membrana celular ha sido previamente teñida. Además, se observaron los cambios morfológicos de las células en función del tiempo de incubación por medio del microscopio electrónico de barrido. Se discute la relación entre la topografía de la superficie, el ángulo de contacto, la composición superficial y la adhesión celular.

# Objetivos

## **Objetivos**

### **Objetivo general.**

Estudiar los efectos de la superficie de un material para implante ortopédico en la adhesión celular, donde las variables estudiadas de la superficie son topografía, composición y energía superficial.

### **Objetivos particulares.**

1. Estudiar el efecto de la rugosidad de superficies de carbono amorfo en la adhesión de osteoblastos humanos.
2. Comparar la diferencia en adhesión celular entre una superficie metálica y el carbono amorfo, lo que nos dará información sobre el efecto de la composición superficial en la adhesión celular.
3. Determinar el efecto de la rugosidad y la composición superficial en la energía superficial por medio del estudio del ángulo de contacto.
4. Observar si existe relación entre el ángulo de contacto y la adhesión de osteoblastos humanos; tal como la observada en otros sistemas celulares, en los que a menor ángulo de contacto hay mayor adhesión celular y viceversa.

# Capítulo 1

## Capítulo 1. Introducción

Los implantes en seres humanos han sido desde hace tiempo una necesidad y, en estos términos se han logrado grandes avances. Sin embargo, aún se necesita mejorar los diseños y las propiedades de los materiales para hacer los implantes más seguros, duraderos y funcionales. Un implante es un dispositivo diseñado para reemplazar una parte del cuerpo que falta o ayuda a que una parte del cuerpo funcione mejor.

Un primer requisito que deben cumplir los implantes es que deben de ser biocompatibles, esto es, deben ser “seguros” para el paciente, Donde la definición de biocompatibilidad o de seguridad depende en gran parte de la aplicación de dicho implante. De manera general se define la biocompatibilidad como la habilidad de un material para funcionar con una respuesta apropiada en su aplicación específica [3]. De manera más específica se espera que un material biocompatible genere solo un mínimo (ya que ningún material es totalmente inerte) de alteraciones en la proliferación y funcionalidad celular. Desde el punto de vista de las pruebas biomédicas, un material seguro es aquel que no causa efectos tóxicos a nivel celular, es decir, no causa muerte o alteraciones en la membrana celular o inhibe funciones metabólicas claves. Un dispositivo que sea implantado en el cuerpo humano no debe afectar al sujeto, esto es, debe ser biocompatible con los tejidos. La biocompatibilidad es una prueba necesaria para los materiales o dispositivos con el fin de garantizar el máximo beneficio con el mínimo riesgo para el paciente. Los gobiernos de todo el mundo se han puesto de acuerdo en normas internacionales que deben cumplir todos los materiales y dispositivos que estén en contacto con seres humanos. Antes de ser utilizados, es necesario ejecutar una serie consecutiva de exámenes que evalúen la biocompatibilidad de los materiales. Esta serie depende de la utilización del implante mismo, los cuales se han clasificado en tres grandes grupos [4]:

- Dispositivos en contacto con la superficie externa. Electrodo, bandas de compresión, lentes de contacto, catéteres urinarios, etc.
- Dispositivos de comunicación externa. Cementos dentales, catéteres intra vasculares, tubos de diálisis, etc.
- Dispositivos de implante interno. Prótesis de rodilla y codo, marcapasos, tendones artificiales, válvulas cardíacas, etc.

Dentro del grupo de dispositivos de implantes, existen varios tipos de implantes: óseos, de piel, de músculo, etc. El objetivo general del proyecto en el que estoy colaborando es la evaluación de recubrimientos de carbono amorfo (a-C) para su uso en implantes óseos. Las pruebas básicas de citotoxicidad han demostrado que el carbono amorfo (a-C) no es tóxico para células óseas (osteoblastos) y musculares (fibroblastos). Incluso se ha mostrado que las superficies cubiertas con a-C promueven la adhesión y proliferación de osteoblastos [5,6].

En un implante óseo en contacto directo con el hueso es necesario que se dé una unión fuerte entre el hueso y el implante, ya que es en esta zona donde se acumulan las fuerzas mecánicas. Ejemplos de este tipo de implantes incluye los implantes odontológicos y ortopédicos. El éxito o falla del implante depende en gran medida de que tanto se integra el implante al hueso circundante. Este proceso se conoce como óseo-integración [7]. Sin embargo, éste no es el único requisito que deben cumplir los implantes; el dispositivo debe ser mecánicamente estable, y resistente a los ataques químicos derivados de su constante contacto con los fluidos corporales tales como sangre y saliva.

En el laboratorio, la viabilidad de un material se analiza realizando una batería de ensayos *in-Vitro* o de cultivo celular. En el caso de materiales para implantes óseos es importante evaluar la interacción de la superficie con células adecuadas, es decir osteoblastos. En los estudios previos realizados por mi supervisora y colaboradores (Dra. Rodil Posada, Dr. Higinio Arzate) sobre las superficies de carbono amorfo se encontró que la respuesta biológica variaba de acuerdo al terminado superficial, es decir a la topografía de las muestras. Sin embargo, como no se tuvo ningún control sobre la topografía no era posible evaluar cuantitativamente dicho efecto. Por esto uno de los objetivos básicos de mi trabajo es la evaluación del efecto de la topografía en la respuesta biológica o bio-reacción. Una bio-reacción es definida como la respuesta observada debido a la interacción de un material con un sistema biológico que contiene biomoléculas, en nuestro caso los osteoblastos.

Ahora bien, las bio-reacciones están controladas por las propiedades físico-químicas de la superficie, tales como, hidrofobicidad o hidrofiliidad, química superficial, grupos funcionales presentes en la superficie, propiedades eléctricas, rugosidad, porosidad, etc. El conjunto de bio-reacciones que pueden ocurrir es también bastante extenso, y en nuestro

caso nos concentraremos en aquellas reacciones involucradas en la adhesión celular. Esto porque la adhesión celular es el primer paso en la cadena de eventos que conducen a la fijación del implante con el hueso circundante [8]. La adhesión celular involucra el contacto y dispersión de las células sobre la superficie, seguido por la diferenciación y proliferación celular. El mecanismo de adhesión celular es complejo y se ha demostrado que depende de las propiedades físico-químicas de la superficie y de su topografía [9,10]. Esta sinergia entre propiedades superficiales y respuesta biológica es la fuerza motriz de muchas investigaciones concernientes a la modificación superficial de bio-materiales con el fin de promover una cierta bio-reacción. La idea básica es mantener las propiedades físicas claves del material en bulto (Ej. mecánicas) mientras se modifican las capas externas para influenciar una reacción deseada. Una modificación adecuada retendrá las propiedades mecánicas y la funcionalidad del dispositivo mejorando la biocompatibilidad relacionada con la interfaz tejido-implante [11]. Los métodos más estudiados de modificación de superficies son a) alteración física o química de los átomos o moléculas superficiales y b) recubrir la superficie existente con un material de composición totalmente diferente. Nuestro estudio se refiere al punto b) en el que se está modificando la superficie de acero a través del depósito de un recubrimiento de carbono amorfo. El acero inoxidable de grado médico, tal como el acero 316L es una aleación que ha demostrado ser biocompatible, es poco reactiva y resistente a las condiciones de pH de los diversos fluidos corporales, e incluso las propiedades mecánicas para implantes ortopédicos u odontológicos son bastante aceptables [12]. Sin embargo, su uso en implantes ortopédicos u odontológicos es cada vez menos común. En gran parte al éxito que han tenido las aleaciones de titanio para dichas aplicaciones, pero también debido a reportes de fallas debido a corrosión del material [13].

La alternativa que se estudia en éste trabajo es modificar la superficie del acero mediante el depósito de un recubrimiento de carbono amorfo, que se espera cumpla dos funciones: aumentar la resistencia contra los efectos de la corrosión del acero y promover el proceso biológico de óseo-integración. Estudios morfológicos referentes a la adhesión de osteoblastos en a-C muestran una respuesta adecuada así como un buen desarrollo de las células sin aparente deterioro en sus funciones. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, es necesario estudiar el efecto de la topografía superficial en la respuesta biológica con el fin de seleccionar el mejor terminado superficial que deben tener las



muestras para su posterior evaluación. Las películas de a-C son depositadas sobre sustratos de acero AISI316L por medio de un sistema de erosión catódica [14] (magnetron sputtering) y se sabe que la topografía final del recubrimiento está determinada por la topografía del sustrato [15]. De modo que para estudiar diferentes topografías es necesario trabajar con sustratos con diferentes terminados superficiales. Dichos terminados se producen tratando al acero con polvos abrasivos de diferente tamaño para lograr diferentes rugosidades.

La adhesión celular resultante se evaluará para las diferentes rugosidades, pero también se compara la respuesta biológica de la superficie de acero con la superficie de a-C, lo que permitirá observar el efecto de la composición y energía superficial.

### **Metodología**

A continuación se describe la metodología utilizada para la realización de este trabajo.

- Generar la rugosidad deseada para lo cual se preparan los sustratos de acero y se mide la rugosidad con el perfilómetro.
- Limpiar los sustratos.
- Depositar las películas de a-C con un sistema de magnetron sputtering.
- Medir la rugosidad después del depósito.
- Medir la composición superficial antes y después del depósito utilizando XPS (X-Ray Photoelectron Spectroscopy).
- Medir el ángulo de contacto para la superficie de acero y de carbono amorfo.
- Cultivar las células de osteoblastos sobre las superficies, por períodos comprendidos entre ½ hr – 24 hrs.
- Observar la topografía de las muestras con el SEM (Scanning Electron Microscope).
- Determinar el porcentaje de células adheridas utilizando una técnica colorimétrica, basada en un ensayo de detección de enzimas. Utilizando el lector de absorción para la prueba colorimétrica (ELISA, Enzyme Linked Immune Assay).

- Preparar las células para su observación en el microscopio de barrido electrónico.
- Estudiar la morfología celular observando las muestras con el SEM.
- Análisis de resultados.

# Capítulo 2

## Capítulo 2. Antecedentes

### **Implantes**

Un implante [16] es una prótesis (del griego: pro, antes; tesis, posición. Substitución o adición de órganos o piezas del cuerpo por elementos artificiales) colocada de manera permanente en unión con algún tipo de tejido humano para sustituir artificialmente un órgano o parte de él. Existen diferentes tipos de implantes, como el implante de mama que sirve para reemplazar un seno, los implantes dentales que reemplazan a un diente natural o implantes ortopédicos que sustituyen una articulación (la unión entre dos huesos donde se realiza el movimiento) como el codo, la muñeca, rodilla o cadera.

### *Implantes dentales*

Los implantes dentales [17], aunque parezca una técnica muy reciente, se han usado a lo largo de la historia de la humanidad. En diferentes épocas y civilizaciones se intentó suplir la pérdida de uno o varias piezas dentales por dientes implantados utilizando diferentes materiales como metales, diferentes tipos de piedras, incluso dientes de otros animales, etc.

Actualmente, los implantes dentales constan de una raíz metálica artificial [18] que se coloca (implanta) en el hueso mandibular o maxilar, creando una base sólida sobre la que se pueden efectuar tanto restauraciones de dientes individuales, como prótesis parciales o totales y funcionan exactamente igual que los dientes naturales. Comúnmente es una estructura artificial con forma de tornillo, fabricada en titanio prácticamente puro.

Los éxitos recientes en el uso de implantes se deben principalmente al descubrimiento del profesor Branemark, de Suecia, la óseo integración [19]. La óseo integración no es más que la unión funcional y estructural entre el hueso y la superficie del implante, es decir, el hueso crece y vive de forma íntima con la superficie del implante. Un implante óseo está integrado mientras no haya pérdida del hueso que lo rodea al estar sometido a fuerzas masticadoras.

Los implantes dentales [20] consisten en una pieza de titanio en forma de cilindro, que es introducida en el interior del hueso maxilar o mandibular, mediante una pequeña intervención quirúrgica, semejante a la requerida para la extracción de un diente. Posteriormente, después de 4 - 6 meses de la colocación del implante, se procede a la confección de la corona que irá apoyada sobre el implante que se ha colocado, y que ahora esta íntimamente integrado con nuestro propio hueso (óseo-integrado).

Los implantes vienen de diferentes formas y tamaños. Los implantes que son colocados sobre el hueso son llamados implantes subperiósticos. Hay también implantes muy delgados y son llamados implantes de hoya. En la actualidad se utilizan solamente aquellos implantes que semejan la raíz de un diente. Estos son llamados implantes de forma de raíz, y pueden ser colocados dentro del hueso para actuar cómo soportes de coronas postizas.

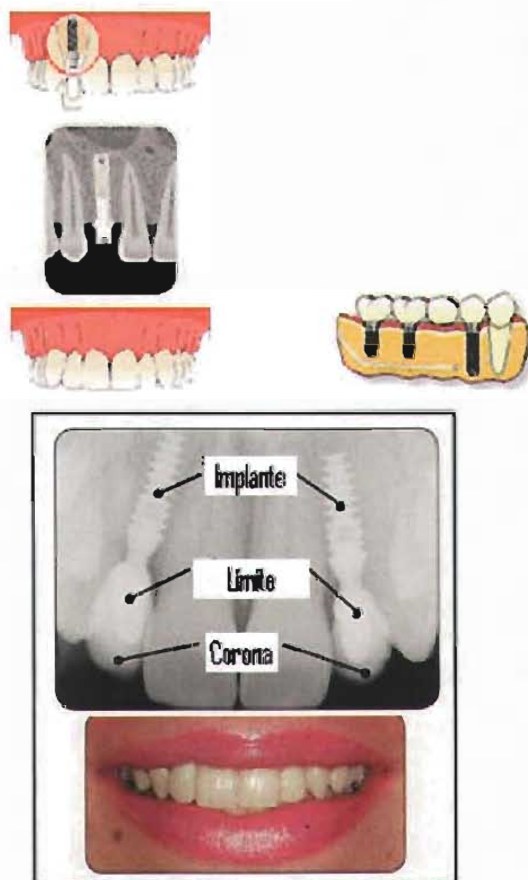


Figura 1 Ejemplo de implantes dentales

### Implantes ortopédicos

Los daños al sistema esquelético humano [21] son causados por heridas traumáticas, así como en los estados finales de enfermedades como la osteo-artritis y la artritis reumatoide. Estas dolencias conllevan a impedimentos en la locomoción y a altos niveles de dolor en los pacientes, por lo que deben ser corregidos quirúrgicamente. Entre las más comunes están las fracturas y los reemplazos de articulaciones, como la rodilla y la cadera. Las fracturas de hueso [22] son generalmente reparadas con aparatos de fijación incluyendo placas óseas o tornillos, los cuales están hechos de aleaciones metálicas. Por otro lado, las articulaciones están compuestas por los límites de dos o más huesos que están unidos por bandas elásticas y resistentes de tejido que se llaman ligamentos. Por ejemplo, la articulación de la rodilla está formada por los huesos de la pierna llamada tibia y del muslo llamado fémur. La articulación de la cadera está formada por la parte proximal del fémur, de forma redondeada, llamada cabeza y la porción distal de la pelvis en forma de una cavidad redondeada llamada acetábulo.

Los bordes de una articulación [23] están cubiertos por un material muy suave llamado cartílago. El cartílago normal permite una movilidad con una fricción muy reducida. El resto de la superficie articular está cubierto por una línea muy fina de tejido suave llamado sinovia. La sinovia produce un líquido que actúa como lubricante para reducir la fricción y el desgaste de la articulación. Uno de los principales factores que conllevan a la necesidad de reemplazar las articulaciones es la degeneración del cartílago lo que produce mucho dolor al mover la articulación. Una de las causas más frecuentes de dolor articular es la artritis [24]. Los tipos más comunes de artritis son: osteoartritis (artritis degenerativa); artritis reumatoide, produce cambios químicos en la sinovia lo que produce un engrosamiento e inflamación; artritis post traumática, se puede desarrollar después de una lesión articular en la cual el hueso y el cartílago no se curan de manera adecuada; necrosis vascular, puede aparecer cuando el hueso se ve privado de su habitual soporte de sangre. Sin una nutrición adecuada de sangre, la estructura ósea se levanta pudiendo colapsar y dañar el cartílago. El dolor articular puede ser debido, también, a una deformidad o una lesión directa de la articulación.

Las articulaciones están presentes en cada actividad realizada. Los movimientos simples, como caminar o doblar una esquina requieren el uso de las articulaciones de

cadera y rodilla por ejemplo. Normalmente, los componentes de estas articulaciones trabajan conjuntamente y la articulación se mueve de manera fácil y sin producir dolor alguno; pero cuando las articulaciones se ven afectadas por alguna dolencia o un traumatismo, el dolor resultante puede conducir a una limitación articular severa y una dificultad para moverse.

Una sustitución protésica total de la articulación es un procedimiento quirúrgico en el que ciertas partes de la articulación lesionada (o artrósica), como la cadera o la rodilla, son extraídas y sustituidas por una prótesis que contiene partes de plástico y metal. Las prótesis se diseñan de forma que la nueva articulación con el implante artificial se pueda mover como una articulación normal sana y que no se desgaste durante el tiempo de vida del paciente.

Ejemplos de prótesis ortopédicas:

- La sustitución protésica de la rodilla [25] es una intervención en la que se sustituye la rodilla por un componente protésico. La parte inferior del fémur y la parte superior de la tibia, que forman la rodilla, se extraen a través de una incisión realizada en la parte anterior de la rodilla, y se sustituyen por un componente metálico en la parte inferior del fémur y un componente de plástico y metal en las partes superiores de la tibia. La operación tiene como finalidad disminuir el dolor y aumentar la movilidad de la rodilla.

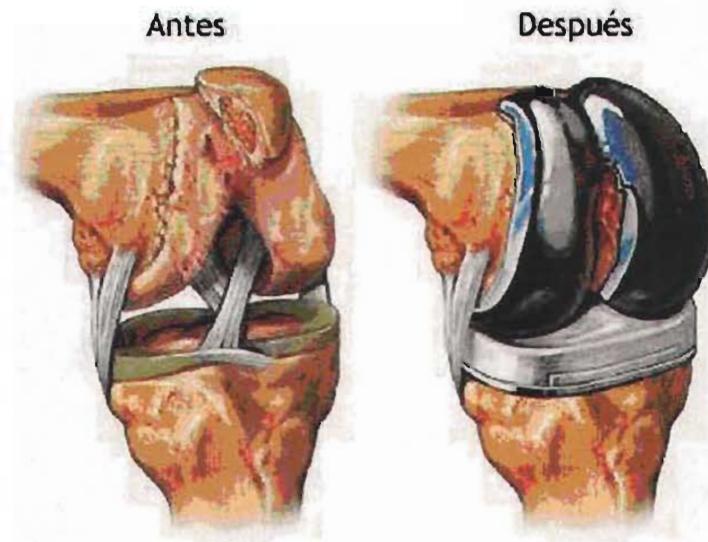


Figura 2 Prótesis de reemplazo de la articulación de la rodilla

- La sustitución de la prótesis de cadera [26] consiste en reemplazar las dos partes que conforman la articulación de la cadera. Por un lado el acetábulo o cotilio que corresponde a la parte de la pelvis de la cadera y por otro lado la cabeza de fémur. Existen múltiples tipos de prótesis de cadera, con el avance de la tecnología se han podido desarrollar nuevas prótesis con materiales de última generación, actualmente la duración de una prótesis total de la cadera es aproximadamente de 15 años.

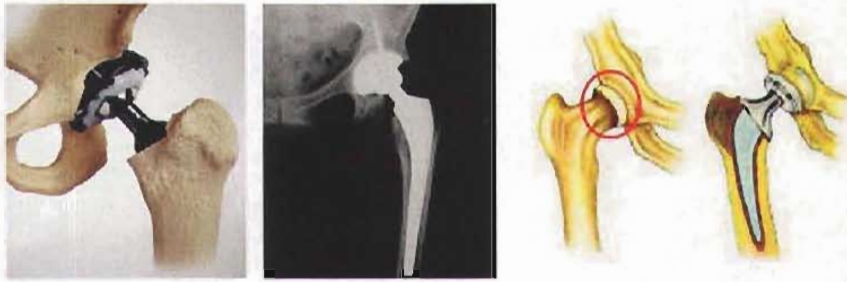


Figura 3 Prótesis de cadera

- En una prótesis de hombro total o parcial [27], el médico sustituye la cabeza erosionada del humero por un metal. La cavidad o hueso glenoideo de la escápula (omóplato) se puede sustituir también por un componente de polietileno (plástico).



Figura 4 Prótesis de hombro



Alrededor del 5% de los implantes colocados en los Estados Unidos (USA) falla cada año, siendo la principal causa de falla clínica la pérdida de contacto interfacial entre el implante y el hueso. De aquí la importancia de la investigación con respecto a las propiedades de los materiales para implantes, el tejido y la interfase implante-tejido.

El uso de implantes ortopédicos está basado en el hecho de que el tejido óseo se remodela continuamente para optimizar su respuesta a las fuerzas mecánicas de carga a las que está expuesto en la vida diaria. Hay tres factores fisiológicos [28] involucrados en el remodelamiento normal de hueso: tensión en el hueso, flujo de sangre en el hueso y la presión en la médula ósea. Al colocar un implante se añade un factor adicional que puede influenciar fuertemente el remodelamiento local del hueso. Los materiales en implantes ortopédicos pueden ejercer diferentes repuestas al sistema *in-Vivo*:

- (a) El material puede ser tóxico provocando que el tejido contiguo muera.
- (b) El material puede ser no-tóxico y biológicamente inerte, por lo que se forma una cápsula fibrosa alrededor de él y se le conoce como un biomaterial bio-tolerante.
- (c) El material puede ser no-tóxico y biológicamente activo por lo que se forma un enlace interfacial entre el implante y el hueso, esto constituye un biomaterial bioactivo.

Los requerimientos para mantener un patrón adecuado de carga en la interfase hueso-implante incluyen; la estabilidad del implante sin que se produzca daño al tejido, un contacto íntimo con el hueso y una transferencia efectiva de esfuerzo tensil del material al hueso, lo que asegura la remodelación continua del hueso alrededor del implante. En la actualidad se utilizan tres métodos de fijación para asegurar que se cumplan dichos requerimientos. El clásico consiste en la fijación del implante utilizando un cemento de base polimérica (polimetilmetacrilato, PMMA), el segundo es una fijación no-cementada y el de mayor proyección futura es la fijación biológica con recubrimientos bio-cerámicos. Los problemas asociados con los cementos óseos (PMMA) con tasas de falla de hasta el 50% en pacientes jóvenes que incluyen pérdida de fijación debido al encapsulamiento fibroso en la interfase, flujo de monómeros tóxicos dentro del cuerpo humano o falla de integración mecánica con la subsecuente formación de grietas, han demostrado que se debe buscar una alternativa. La primera de ellas fue el uso de fijación no-cementada en que la superficie del implante era alterada introduciendo rugosidad o poros con el fin de favorecer

el crecimiento del hueso dentro de ellos y formando así una fijación bio-inerte en una especie de anclaje micro-mecánico. Los resultados de éste método han sido parcialmente aceptables. Sin embargo, la introducción de mayor porosidad ha producido un incremento en la corrosión de los implantes o bien se introducen defectos superficiales que conllevan a la falla mecánica del metal por fatiga. Por lo que en la actualidad se investiga de manera extensa en la producción de superficies que induzcan la unión biológica entre el implante y el hueso y el uso de metales recubiertos con bio-cerámicos parece ser el camino adecuado. Estos bio-cerámicos son cerámicos bioactivos, que promueven la formación de hueso en la superficie del implante. Uno de los más estudiados es la hidroxiapatita, que es similar a la apatita encontrada en el hueso humano y que se cree promueve la mineralización permitiendo la formación de un enlace químico en la interfase hueso-implante. Sin embargo, las propiedades mecánicas de los materiales basados en Ca/P son bastante pobres y de allí que la búsqueda por materiales bioactivos con buenas propiedades mecánicas sea un campo activo.

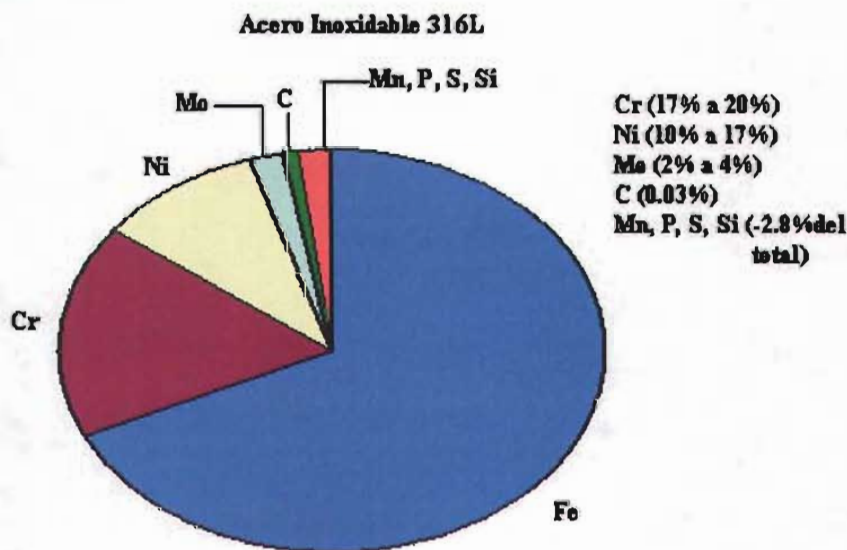
La elección de los metales en los implantes articulares totales o en implantes odontológicos se ha reducido en la actualidad a aleaciones de Titanio-Aluminio-Vanadio y aleaciones de cobalto-cromo. El uso del acero inoxidable en prótesis permanentes se ha eliminado debido a que el material falla por corrosión *in-Vivo*. La fuga de iones de níquel del acero inoxidable daña el tejido a su alrededor, por lo que su uso se reduce a implantes temporales como placas óseas o tornillos.

Las superficies de carga de las articulaciones casi siempre se fabrican con una aleación de cobalto, cromo y molibdeno, debido a su mayor resistencia al desgaste, y se utilizan con cementos óseos (PMMA). Mientras que los implantes hechos de aleaciones de titanio se usan en fijación libre de cementos debido a que se pueden formar una unión más íntima con el hueso adyacente. Este proceso de óseo integración del titanio se cree que es debido a la adsorción de proteínas por parte del óxido natural del Ti,  $TiO_2$ , el cual a su vez se enlaza con el calcio del medio y promueve la mineralización. Sin embargo, se ha demostrado que la fuga de iones de titanio es mayor que aquella en aleaciones de cromo o en el acero inoxidable. De hecho, la pérdida de fijación de los implantes es mayor con implantes hechos de aleaciones de titanio y se ha observado que el tejido circundante esta

El cromo, además de proveer la propiedad de inoxidable, también estabiliza la cristalización del hierro en la fase cúbica centrada en las caras (FCC) que, es más resistente que la fase cúbica centrada en el cuerpo (BCC), el molibdeno añade resistencia a la corrosión, mientras el silicio y el manganeso ayudan al proceso de manufactura y estabilizan la fase cúbica.

El tamaño de grano recomendado por la ASTM es del orden de 100 micrones para asegurar la aplicación adecuada en implantes. El tamaño del grano se controla mediante procesos de solidificación y aplicación de altas y bajas temperaturas de manera alternativa.

Una desventaja potencial de los implantes con acero inoxidable es su tendencia a fracturarse por corrosión. Se inicia la fractura y el proceso de corrosión se acelera dentro de esta, generalizándose al material. Sin embargo, se ha demostrado que los implantes con acero inoxidable son adecuadamente resistentes bajo condiciones de alta presión tales como implantes permanentes de femoral.



Gráfica 1 Muestra los componentes químicos del Acero Inoxidable 316L.

La gráfica muestra los elementos de los cuales y en que proporción está compuesto el acero inoxidable 316L.

oscurecido y hay evidencias de reacciones alérgicas y la presencia de macrófagos y linfocitos.

### Acero inoxidable. 316L

En este trabajo se utiliza el acero inoxidable como sustrato para las películas de carbono amorfo, por lo que a continuación se dará una descripción de su estructura y propiedades. La forma más común de acero inoxidable [29] usado en aplicaciones ortopédicas es el llamado 316L, grado 2, diseñado por la Sociedad Americana de Pruebas y Materiales (ASTM por sus siglas en inglés), especificación F138, el número “316” coloca a la aleación entre los aceros inoxidables austeníticos, la letra “L” denota la baja concentración de carbono, menor al 0.03% en peso. Además de hierro y carbono, como todos los aceros inoxidables, la aleación 316L contiene cromo, níquel y molibdeno, así como cantidades menores de manganeso, azufre, y silicio.

Los elementos que forman la aleación afectan la micro estructura, y por lo tanto las propiedades mecánicas y corrosivas del acero. El cromo forma en la micro estructura un óxido ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ), que se distribuye en la superficie de la muestra aumentando la protección contra la corrosión ya que forma una frontera pasiva entre el bulto del acero y el medio ambiente.

La concentración de carbono debe mantenerse baja en el acero 316L para mantener sus propiedades de resistencia a la corrosión, ya que el carbono tiende a combinarse con el cromo formando carburo de cromo, el cual es menos resistente a la corrosión, y lo cual limita la formación de la capa de pasivación de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ . Esta situación, denominada sensibilización, es la responsable de muchas fallas en los implantes ortopédicos, en los que la concentración de carbono ha sido relativamente alta.

La existencia de dicha frontera pasiva aumenta la protección contra la corrosión en proporciones que van desde mil a un millón de veces comparada con la protección en ausencia del óxido. Los materiales metálicos tienden a combinarse rápidamente con el oxígeno del aire, por lo tanto la barrera de óxido se forma de manera natural con la exposición de la muestra al medio ambiente, sin embargo se usan métodos estandarizados, como la inmersión en ácido nítrico, para asegurar la formación de la capa de óxido.

## **Modificación de superficies**

Debido a que la biocompatibilidad involucra la interfaz entre el dispositivo y el medio biológico las técnicas de modificación de superficies pueden ser de gran ayuda para mejorar la compatibilidad biológica de varios metales sin necesidad de recurrir a la introducción de un material nuevo. Estudios *in-Vivo* han demostrado que la habilidad de los materiales para promover la formación de hueso puede mejorarse modificando las características físicas, químicas y biológicas de la superficie. El objetivo de estas modificaciones es promover la migración de células mesenquimales (células madres del tejido conectivo) hacia el implante, promover su adhesión y proliferación, así como estimular su diferenciación a osteoblastos.

Entre las diferentes técnicas de modificación de superficies se pueden mencionar, los tratamientos superficiales por bombardeo con haz de iones, o tratamientos con plasmas. Dentro de estos últimos, existen diferentes procesos:

- (a) Variación de las especies químicas superficiales utilizando un plasma de un gas inerte.
- (b) Activación de la superficie, utilizando un plasma reactivo que crea grupos funcionales en la superficie y modifica la hidrofiliidad y la reactividad bioquímica superficial.
- (c) Depósito de una capa delgada de un material diferente sobre la superficie.

En el desarrollo de esta investigación, utilizamos la última técnica mencionada cubriendo el acero inoxidable con una capa delgada de carbono amorfo. Sin embargo, podría utilizarse otro material como sustrato tal como, una aleación de Ti-Al-V o de Co-Cr y la respuesta biológica de la película de carbono sería en principio la misma. Es solo por razones de economía que se utiliza el acero inoxidable para éste estudio [30].

### *Películas Delgadas o recubrimientos*

Las películas delgadas [31] son recubrimientos muy delgados depositados sobre un material base por la adición continua de átomos o moléculas. El espesor varía entre unos pocos nanómetros ( $1 \times 10^{-9}$  metros) hasta unas cuantas micras,  $1 \times 10^{-6}$  m.

Una de las soluciones que se han planteado para evitar la corrosión de los implantes metálicos es a través de la modificación de la superficie, por ejemplo, depositando una película delgada de otro material que tenga una mayor resistencia a la corrosión. La importancia del sistema metal-película es que se mantienen todas las propiedades mecánicas del metal, mientras que se reduce su degradación usando una película de materiales inertes. Para esto se han propuesto recubrimientos de alumina ( $Al_2O_3$ ), óxido de titanio ( $TiO_2$ ) o fosfatos de calcio. Se han probado nuevas técnicas usando otros materiales depositados, dos de los más promisorios son el fosfato de calcio (CaP) y la hidroxiapatita (HA) cuya fórmula química es  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  y que se depositan mediante diferentes técnicas como sputtering, sol-gel, plasma-spray, etc. Parece que es posible asociar los recubrimientos de CaP y HA con factores de crecimiento que podrían ayudar a aumentar la fuerza del implante y la osteointegración. Sin embargo todavía es necesaria más investigación en cultivos in Vitro y en animales para tener certeza en los resultados, hasta ahora controversiales.

### *Películas de Carbono Amorfo (a-C)*

En este trabajo se ocupa el recubrimiento de carbono amorfo como capa protectora en implantes de acero inoxidable (AISI 316L).

El motivo de utilizar películas de carbono es que los estudios preliminares realizados en este tipo de materiales han demostrado que son altamente biocompatibles e incluso bioactivas (como se muestra posteriormente) y si además funcionan como capa de protección a la corrosión se daría un gran paso en la producción de implantes médicos de alta eficiencia y bajo costo. Las películas de carbono y sus aleaciones orgánicas tienen además la ventaja de contener únicamente elementos afines a la biología humana.

Dichas películas son generalmente depositadas por métodos asistidos por plasmas, tanto en forma de depósito por evaporación física (conocido por sus siglas en inglés Physical Vapor Deposition, PVD) o por evaporación química (Chemical Vapor Deposition, CVD) o bien

una combinación de ambas. Estos métodos meta-estables de crecimiento de materiales permiten depositar películas de carbono amorfo con diferentes fracciones de enlaces tipo diamante ( $sp^3$ ) y tipo grafito ( $sp^2$ ). De modo que sus propiedades mecánicas y electro-ópticas pueden variarse en un amplio rango, desde un material metálico y suave como el grafito, hasta un material superduro y semiconductor, también conocido como cuasi-diamante (Diamond-Like-Carbon o DLC). El rango de propiedades de la película es amplio y varía dependiendo de la cantidad de uniones  $sp^3$  y del hidrógeno que contenga.

En la tabla 1, se muestran algunas propiedades de los diferentes tipos de películas de carbono amorfo en comparación con dos de las formas alotrópicas del carbono, diamante y grafito. Las películas hidrogenadas son producidas por técnicas de vaporización química asistida por plasmas (PECVD). Este tipo de procesos involucra la descomposición e ionización de un hidrocarburo, por lo que la película formada contiene hidrógeno. El porcentaje de hidrógeno en la película depende de muchos factores, entre los más importantes se encuentran el contenido de hidrógeno en el gas, la temperatura del sustrato y la energía de los iones que llegan al sustrato.

Las películas no hidrogenadas son producidas por métodos de evaporación física asistida por plasmas (PVD) en la que los átomos de carbono tienen su origen en un blanco de grafito que se “evapora” en presencia de un gas inerte, ya sea Helio o Argón.

Si en lugar de un gas inerte se usa un gas reactivo, como hidrógeno, oxígeno o metano, y se consigue la incorporación de dicho gas a la película, se formaría una aleación orgánica con el carbono, ( $a-CN$ ,  $a-CO$ ,  $a-CH$ ) o una triple aleación.

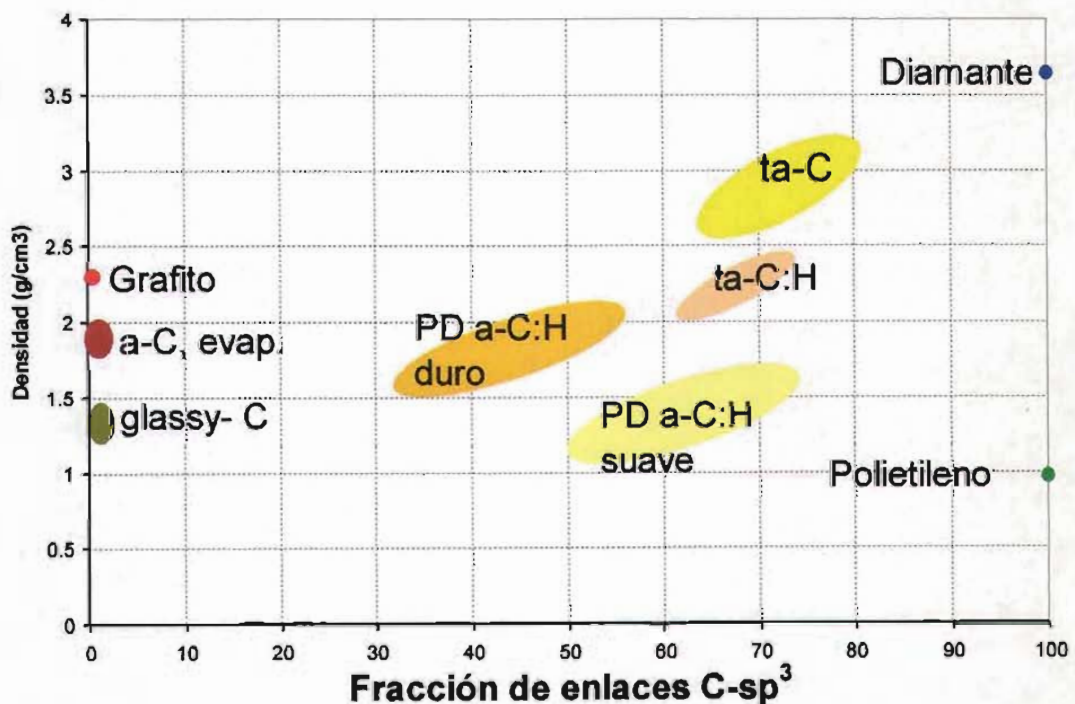
Con el fin de aumentar la fracción de átomos de carbono que forman enlaces tipo diamante se utilizan sistemas de depósito que produzcan un plasma denso y energético, es decir, con una alta concentración de iones y con energías mayores a 20 eV. Además el depósito debe hacerse a bajas temperaturas, menores a 100 °C para evitar la relajación del sistema a la fase de mayor estabilidad (enlaces grafiticos). Una de las consecuencias de éste sistema energético de depósito es que las películas crecen con altos esfuerzos residuales, lo que en algunos casos provoca fallas en la adhesión.

La adhesión es un tema crítico que hasta hace poco se creía insoluble, pero que en realidad es posible mejorar mediante el uso de interfaces graduadas.

	Diamante	Grafito	a-C:H	ta-C:H	a-C	ta-C
Número de Coordinación	4.0	3.0	~2.5	~2.8	2.9 - 3.3	3.4 - 3.9
Enlaces sp <sup>3</sup> (%)	100	0	20-80%	40-80%	10-50%	50-95%
H(at%)	0	0	10-60	25-35	<1	<1
Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	3.515	2.267	1.0-2.2	2.2-2.4	~2.5	2.7-3.2
Brecha óptica (eV)	5.45	-.04	0.8-4	1.7-2.2	0.4-1	1.5-3
Dureza (GPa)	100		5.0 - 20	~ 60	2.0 - 5.0	3.0 - 13.0
Modulo de Young (GPa)	1144	a =686 La= bajo	50 - 200	300	< 150	757.5
Conductividad (Scm <sup>-1</sup> )	aislante	metálico	10 <sup>-12</sup>	10 <sup>-11</sup> - 10 <sup>-8</sup>	metálico	10 <sup>-7</sup> - 10 <sup>-8</sup>

Tabla 1 Características y clasificación de las películas delgadas. Datos tomados de Dra. Rodil Posada

Una manera diferente de presentar a las películas de carbono amorfo es en término de la densidad del material y el contenido de enlaces tipo diamante (sp<sup>3</sup>), lo que se puede observar en la gráfica 2, donde cada área enmarcada corresponde a un material con propiedades físicas similares.



Gráfica 2 Se grafica la densidad contra la fracción de enlaces de carbono con hibridación sp<sup>3</sup>. Gráfica obtenida de Dra. Rodil Posada.



En la gráfica 2 se puede observar que los materiales duros corresponden a aquellos con mayor porcentaje de enlaces  $sp^3$  y mayor densidad, es decir, menor contenido de hidrógeno. Por ejemplo, el carbono amorfo no-hidrogenado con una gran proporción de uniones  $sp^3$  se denomina carbono amorfo tetraédrico (ta-C) y es de las formas que mejor resistencia mecánica presentan, con una dureza de hasta 80 GPa. Debido a sus buenas propiedades tribológicas es un buen candidato para aplicaciones en implantes de rodilla o en cabezas de femoral, donde una de las causas frecuentes de falla es el desgaste de las superficies poliméricas. Se han propuesto como recubrimientos para implantes del tipo metal-metal o metal-polímero, en ambos casos el desgaste de las superficies se reduce debido al bajo coeficiente de fricción del taC y su alta resistencia mecánica.

Otra forma de carbono amorfo que se ha presentado como un buen candidato para implantes biomédicos es el llamado carbono hidrogenado (a-CH), este material tiene una buena biotolerancia, es eficiente contra la corrosión y la metalosis en los fluidos biológicos, no es tóxico para las células, es adecuado para la interfase con sangre, ya que inhibe la trombosis (Trombo; coágulo sanguíneo en el interior de un vaso que permanece en el punto de su formación o alrededor de una vena seccionada. Trombosis; proceso de formación o desarrollo de un trombo, la que se produce por retardo de la circulación, es decir, mientras sigue circulando la sangre, la formación de trombos se puede dar en las arterias, corazón o venas) y muestra una buena integración en la cavidad oral.

En la tabla 2 se presenta una lista de las diferentes pruebas biológicas realizadas a recubrimientos de carbono amorfo y que demuestran que son excelentes candidatos para aplicaciones biomédicas [32].

Tipo de Película	Sistema de Depósito	Propiedad Estudiada	Conclusión
a-C:H	PECVD	Cultivo celular de fibroblastos y macrófagos.	No hubo respuesta toxica, ni inflamatoria de los macrófagos y los fibroblastos crecieron en la superficie.
a-C:H	CVD	-Propiedades mecánicas. -Resistencia a la corrosión. -Biotolerancia.	Buena resistencia a la corrosión y a previene la coagulación. En la solución Tyroid, protege al acero contra los procesos galvánicos.
a-C:H	CVD	-Ensayos de toxicidad usando Lactate dehydrogenase (LDH) en el cultivo celular de macrófagos, fibroblastos y osteoblastos. -Estudio óptico del crecimiento celular.	Los ensayos de LDH no mostraron evidencia de toxicidad en ninguno de los cultivos. Las imágenes de microscopia óptica no mostraron ninguna anomalía en el crecimiento celular.
a-C:H	CVD	Efecto de los fluidos biológicos en la adhesión de la película a substratos metálicos.	Agua destilada no causó cambios. Solución salina de fosfatos (PBS) provocó una falla en la adhesión.
ta-C	Arco Catódico, PVD	-Desgaste. -Terminado superficial. -Corrosión bajo diferentes condiciones de depósito. La corrosión se estudio dejando las muestras 45 días en una solución con 10% de HCl.	El mayor porcentaje de enlaces sp <sup>3</sup> produjo la menor tasa de desgaste. Al incrementar la rugosidad se aumenta el volumen desgastado y el coeficiente de fricción. Las tasas de corrosión calculadas de acuerdo a la pérdida de volumen son 100000 veces menor que el metal.
ta-C CN	Haz de iones, PVD	Estudio óptico del cultivo de osteoblastos.	Las células se adhieren, expanden y proliferan muy bien sobre ambas películas sin ningún efecto aparente en su fisiología.
ta-C	Arco catódico, PVD	Respuesta tribológica de Ti recubierto con ta-C.	Reducción en la tasa de desgaste y la formación de debris, Menor coeficiente de fricción y protección contra la oxidación severa.
a-C:H	Espurreo, PVD	-Adsorción de proteínas sanguíneas. -Adhesión de glóbulos blancos.	a-C:H funciona como un buen inhibidor para la formación de coágulos, debido a su menor rugosidad y naturaleza hidrofóbica.
DLC y CN	Diferentes	Revisión.	Compatibilidad con toda clase de tejidos ha sido demostrada por estudios <i>in-Vitro</i> . Buena compatibilidad con la sangre, evitando la formación de coágulos.

Tabla 2 Biocompatibilidad de películas delgadas. Datos obtenidos de Dra. Rodil Posada [33]

## **Pruebas Biológicas**

Hasta hace pocas décadas se creía de manera generalizada que los biomateriales destinados para implantes debían ser químicamente inertes y que no deberían jugar ningún papel activo en los procesos fisiológicos. Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que los materiales que estimulan una respuesta biológica adecuada ofrecen ventajas considerables sobre aquellos que son totalmente inertes. Un ejemplo específico son los materiales para implantes ortopédicos u odontológicos, en los que se obtienen mejores resultados cuando promueven o estimulan el crecimiento del tejido óseo sobre su superficie. Para evaluar la respuesta biológica de éste tipo de materiales (bioactivos) ha sido necesario implementar un conjunto nuevo de pruebas biológicas *in-Vitro* e *in-Vivo*, además de las pruebas clásicas de evaluación de biocompatibilidad o de citotoxicidad.

Las pruebas dependen en gran parte de la finalidad del implante, siendo diferentes para implantes ortopédicos, que para implantes oftalmológicos, por ejemplo. En cada caso se han establecido protocolos definidos y estandarizados que permiten evaluar la respuesta biológica de los biomateriales. En el caso que nos interesa: implantes ortopédicos, se realizan pruebas *in-Vitro* con cultivos celulares de osteoblastos, utilizando el método de contacto directo entre las células y el material a evaluar. Las pruebas mínimas que se realizan para determinar si el material es bioactivo, bioinerte o tóxico son: adhesión celular, proliferación celular, replicación, expresión del mRNA, diferenciación celular, morfología, fenotipo y expresión del receptor de segregación molecular. En éste trabajo nos concentramos en la adhesión celular y su dependencia con la topografía y composición superficial.

### Cultivos Celulares

Los cultivos celulares [34] son el producto de la colección de células, en este caso animales, de diferentes órganos, colocadas en condiciones especiales propicias para su sobrevivencia y multiplicación, manteniendo para esto todas sus funciones metabólicas de una manera semejante a las que tenía en el huésped.

El cultivo de células tuvo su origen en el siglo XIX. Reichlinhausen en 1866, mantuvo vivas células sanguíneas de anfibio, pero fue la utilización de bloques de agar con tejido coagulado (soporte y alimento) el inicio del cultivo de células *in Vitro*. El desarrollo

del cultivo de células de vertebrados se inició con las observaciones de Roux en 1885 en cultivos de células de embrión de pollo; posteriormente Harrison en 1907 cultivó tejido nervioso de rana el cual más adelante fue reemplazado por tejido de pollo; posteriormente, Carrel en 1912 aplicó esta técnica para el estudio en animales de sangre caliente [35]. Una serie de innovaciones como el desarrollo de medios de cultivo, el uso de antibióticos, las técnicas de tripsinización para el pasaje de células y la suplementación del medio con suero fetal bovino, permitieron el desarrollo y aplicabilidad de los cultivos de células de origen vertebrado.

En la actualidad, pueden cultivarse en el laboratorio células procedentes de una amplia gama de tejidos y organismos diferentes. En un principio, el objetivo principal era el estudio de las propias células, cómo crecen, qué necesitan para su crecimiento, cómo y cuando dejan de crecer. Este tipo de estudios tiene hoy un gran interés científico, por ejemplo, en relación con investigaciones sobre el ciclo celular, el control del crecimiento de células tumorales y la modulación de la expresión genética. Otra área de gran interés se centra en la biología del desarrollo. Los esfuerzos para explicar cómo el gran número de células presentes en los organismos maduros derivan de una sola célula a partir de la fertilización, han llevado a la búsqueda de modelos experimentales. Los recipientes para el cultivo de células estacionarias son cajas de Petri y frascos para el cultivo de tejido, entre otros, que pueden ser de material de plástico o de vidrio previamente tratado y el desprendimiento de las células, para transferirlas a superficies mayores se realizan con agentes proteolíticos como la tripsina.

Entre los usos actuales de las técnicas de cultivo celular cabe mencionar:

- El estudio de células específicas: cómo crecen, qué necesitan para su crecimiento, cómo y cuando dejan de crecer, como es su bioquímica.
- Investigaciones sobre el ciclo celular: el control del crecimiento de células tumorales y la modulación de la expresión genética.
- La búsqueda de modelos experimentales para estudios de la biología del desarrollo y la diferenciación celular.
- Inserción de genes extraños en las células receptoras (animales transgénicos).
- Ensayos de citotoxicidad.

En un medio de cultivo, así como en el cuerpo humano, las células se reproducen duplicando su contenido y dividiéndose en dos. Este ciclo de división celular es el medio fundamental por el que todas las cosas vivas se propagan. Los detalles del ciclo celular pueden variar, pero hay dos procesos básicos. Primero y más importante, para producir un par de células hijas idénticas, el DNA debe ser replicado y segundo, los cromosomas replicados deben dividirse entre las dos células separadas. El ciclo celular comprende una serie de pasos que las células deben realizar para completar estas dos tareas. En organismos unicelulares cada división celular genera un nuevo individuo, la selección natural favorece a las células que crecen con mayor rapidez y que sobreviven aún en condiciones difíciles. Sin embargo, en especies multicelulares, la selección natural no actúa en células independientes sino en el organismo como un todo. Para producir y mantener la intrincada organización del cuerpo, las células deben obedecer reglas de control estrictas que limitan su proliferación. En un instante dado, la mayoría de las células no se están dividiendo, ni creciendo sino que se encuentran en un estado de reposo realizando sus funciones específicas. De modo que aún en un medio lleno de nutrientes, las células animales no están en proliferación continua. Para que puedan crecer y dividirse, las células deben recibir señales específicas positivas de las otras células. Muchas de estas señales son proteínas, conocidas como factores de crecimiento, las cuales se unen a ciertos receptores complementarios en la membrana celular para estimular la proliferación celular. Las células de mamíferos fueron inicialmente cultivadas en coágulos de sangre y por muchas décadas todos los esfuerzos para definir los requerimientos mínimos para la proliferación fallaron, incluso en medios que contenían todos los nutrientes químicos conocidos, incluyendo glucosa, aminoácidos y vitaminas. Fue hasta la introducción del suero fetal bovino, fluido derivado de la sangre que permanece después de que la sangre se ha coagulado, que se logró estimular la proliferación celular. Posteriormente se descubrió que los componentes esenciales del suero son los factores de crecimiento, de los cuales se necesita solo una pequeña concentración para promover el crecimiento celular.

Los cultivos de células animales se han clasificado de acuerdo a su capacidad de anclaje (adherencia), si han sido aisladas de un órgano determinado o si provienen de células que han sufrido modificación.

De acuerdo a su capacidad de adherencia o no a una superficie determinada pueden crecer formando monocapa o en suspensión, respectivamente, lo que está muy asociado con el tipo de célula de la cual derivan: por lo general las células provenientes de órganos, crecen en monocapa; igualmente existen células que pueden crecer indistintamente tanto en monocapa como en suspensión, ejemplo son las células "HeLa" que son células transformadas derivadas de cultivos en monocapa.

Cuando el cultivo proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original tomado de un órgano recién sacrificado, recibe el nombre de Cultivo Primario.

Cuando este cultivo primario es sometido a procesos de transformación que le confiere capacidad ilimitada de multiplicación, reciben el nombre de Líneas Celulares.

Cuando de un cultivo primario se genera otro tipo de células que se pueden separar, recibe el nombre de Cultivo Secundario.

Cuando en el cultivo coexisten dos tipos de células de linajes diferentes que se pueden separar recibe el nombre de Cocultivo.

Las células exhiben una variedad de "comportamientos sociales", permitiendo la formación de una monocapa que cubrirá la correspondiente superficie de crecimiento (confluencia), lo que hace que su multiplicación sea inhibida cuando establecen contacto entre sí (quiescencia). Las células provenientes de cultivos primarios son las que mejor crecen en ésta condición, dada su estabilidad genética y su naturaleza diploide normal.

Se ha demostrado [36] además que en cultivos de células dependientes del anclaje, la densidad de población a la cual se detiene la proliferación se incrementa al incrementar la concentración de factores de crecimiento en el medio, esto indica que la densidad celular depende en parte de la habilidad de las células para consumir los factores del crecimiento del medio. De aquí la importancia de colocar medio fresco en cultivos celulares de varios días. Otro de los factores que afecta la tasa de división celular en cultivos es la forma que toma la célula a medida que se expande y arrastra sobre la superficie. Cuando fibroblastos o células epiteliales se cultivan en suspensión, sin permitir que se adhieran a una superficie sólida, y por lo tanto conservan una forma redonda, no se observa división celular. Varios experimentos han demostrado [37] que la frecuencia a la cual una célula se divide se incrementa a medida que la célula se extiende más. Posiblemente, al estar más expandida puede capturar mayor cantidad de factores de crecimiento, así como tomar más nutrientes

del medio de cultivo. Otros experimentos han demostrado que algunas células cultivadas en suspensión no logran proliferarse pero si dividirse, siempre y cuando establezcan un punto de contacto con la superficie, aunque el punto de adhesión sea una región muy pequeña en la que la célula no tiene espacio para expandirse. Estos resultados sugieren que el control de la división celular esta también acoplado a la organización del citoesqueleto o bien que depende de señales intracelulares generadas en los sitios de adhesión o ambas. El citoesqueleto es una red de filamentos proteicos del citosol que ocupa el interior de todas las células animales y vegetales. Adquiere una relevancia especial en los animales, que carecen de pared celular rígida, pues el citoesqueleto mantiene la estructura y la forma de la célula, actúa como bastidor para la organización de la célula y la fijación de organelos y enzimas; también, es responsable de muchos de los movimientos celulares. En muchas células, el citoesqueleto no es una estructura permanente, sino que se desmantela y se reconstruye sin cesar. Se forma a partir de tres tipos principales de filamentos proteicos: microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios, unidos entre sí y a otras estructuras celulares por diversas proteínas. Los movimientos de las células eucarióticas están casi siempre mediatizados por los filamentos de actina o los microtúbulos.

En resumen, se ha visto que las células de animales multicelulares en cultivo solo se proliferan cuando reciben señales específicas de las otras células. Estas señales son proveídas por los factores de crecimiento y la competencia por ellos limita la densidad de población. El crecimiento celular está además limitado por la habilidad que tengan las células de adherirse y expandirse sobre la superficie sólida sobre la que se cultivan. Es esta dependencia de la división celular a la adherencia lo que nos permite utilizar los cultivos celulares para investigar la respuesta de las células ante diferentes superficies [38].

### Adhesión celular

Entre los diferentes aspectos que podrían estudiarse de la interacción células-material, específicamente tratamos el de adhesión celular, ya que es el objetivo general de éste trabajo. La adhesión celular [39] se mide cualitativa y cuantitativamente en función de la rugosidad superficial y de la composición.

La adhesión celular es un proceso continuo y reversible necesario para la sobrevivencia normal de las células, su crecimiento y el control de la expresión de genes

específicos. La biocompatibilidad de los biomateriales está fuertemente relacionada al comportamiento de las células en contacto con él y particularmente con la adhesión de las células a la superficie. Características superficiales de los materiales como su topografía, química o la energía superficial juegan un papel importante en la adhesión de las células sobre el biomaterial. La adhesión celular con todos sus procesos involucrados pertenece a la primera fase de interacciones célula-material y la cualidad de esta primera fase influenciará la capacidad de las células para proliferar y diferenciarse en contacto con el implante. Por lo tanto un entendimiento más profundo de la adhesión celular y particularmente la adhesión de osteoblastos sobre los materiales es esencial para optimizar la interfase hueso-biomaterial.

El término de adhesión en el dominio de los biomateriales involucra diversos fenómenos: la fase de “pegado” que ocurre rápidamente e involucra eventos de corto plazo tales como uniones físico-químicas entre las células y el material involucrando fuerzas iónicas o de Van der Waals y luego la fase de adhesión misma, que ocurre más lentamente e involucra a muchas moléculas biológicas: las proteínas de la matriz extracelular, las proteínas de la membrana celular y las proteínas del citoesqueleto, las cuales interactúan entre sí para generar señales transductoras, promoviendo la acción de factores de transcripción y consecuentemente regulando la expresión genética.

**Matriz extracelular:** Los tejidos no están hechos únicamente de células, una gran parte de su volumen es espacio extracelular, el cual está lleno de una red intrincada de macromoléculas que constituyen a la matriz extracelular. Esta matriz está compuesta de una variedad versátil de proteínas (cadenas lineales de aminoácidos) y polisacáridos, formados por subunidades de azúcares. Ambos son secretados localmente por las células y acomodados en una rejilla organizada en asociación cercana con la superficie de las células que los producen. Las variaciones relativas en la cantidad de los diferentes tipos de macromoléculas y la manera en que estas se organizan en la matriz extracelular, da lugar a una gran diversidad de formas, cada una adaptada para los requerimientos específicos del tejido al que pertenece. La matriz se puede calcificar para formar la estructura de roca dura de los hueso y dientes, o puede formar la materia transparente de la cornea, o puede tomar la organización trenzada tipo cuerda que le da a los tendones su enorme resistencia a los esfuerzos tensiles.



La matriz juega un papel activo en regular el comportamiento de las células en contacto con ella, influenciando su desarrollo, migración, proliferación, forma y función. En la mayoría de los tejidos conectivos las macromoléculas de la matriz son secretadas por células llamadas fibroblastos. Sin embargo, para tejidos conectivos especializados como el cartílago o el hueso, las macromoléculas son secretadas por células de la familia de los fibroblastos que tienen nombres específicos; los condroblastos forman el cartílago y los osteoblastos forman el hueso. Las dos clases principales de macromoléculas que forman la matriz extracelular son (1) cadenas de polisacáridos y (2) proteínas fibrosas de dos tipos: estructurales (fibras de colágeno) y adhesivas. Los polisacáridos forman un gel que resiste los esfuerzos compresivos y permite la difusión de nutrientes, metabolitos y hormonas entre la sangre y las células del tejido, mientras que las fibras de colágeno proveen el esfuerzo tensil y ayudan a organizar la matriz. Las proteínas adhesivas ayudan a las células a adherirse a la parte apropiada de la matriz extracelular.

La mayoría de las proteínas de la matriz extracelular promueven la organización del citoesqueleto y la formación de los puntos locales de adhesión o contactos locales. Estos son andamios submembranosos que unen el citoesqueleto con la matriz extracelular.

**Citoesqueleto:** La motilidad celular es uno de los grandes logros de la evolución y el citoesqueleto, un sistema de fibras citoplasmáticas, esencial como componente de soporte para este proceso y guía del transporte de organelos intracelulares y otros elementos. Las células eucariotas tienen la capacidad de organizar movimientos directos para migrar, alimentarse, dividirse y dirigir coordinadamente el transporte de materiales intracelulares. El mecanismo y dirección del movimiento se realiza de diferentes maneras y está asociado con disipación de la energía. Los motores moleculares son los prototipos de máquinas proteicas que transportan organelos a lo largo de microtúbulos y filamentos de actina, convirtiendo la energía libre derivada de la hidrólisis del ATP (adenosín trifosfato; molécula que interviene en todas las transacciones de energía que se llevan a cabo en las células) en movimiento dirigido. Otro tipo de movimiento direccionado y que consume ATP está mediado por el ensamblaje polarizado de polímeros, principalmente actina. El citoesqueleto es una estructura proteica que permite soportar la membrana plasmática, la formación de estructuras como los lamelipodios, el movimiento de vesículas y otros elementos intracelulares.

La polimerización controlada de actina y tubulina es responsable de la movilidad de las células eucariotas y de la forma de éstas.

El movimiento de las células eucariotas es el resultado de la acción coordinada de formación de extensiones, adherencias y retracciones de la membrana, en donde la red de actina y las interacciones entre estas y los motores moleculares juegan un papel fundamental. Los microtúbulos controlan la distribución espacial de estas actividades, creando una polarización de la célula que determina la dirección del movimiento.

En el citoesqueleto se pueden encontrar tres tipos de fibras citosólicas de polímeros ordenados a partir de monómeros unidos por enlaces no covalentes: los microfilamentos con un diámetro de 7 a 9 nm, los filamentos intermedios de 10 nm de diámetro y los microtúbulos de 24 nm. Una característica del movimiento de todas las células es la polaridad, esto es, unas estructuras siempre están al frente de la célula (lamelipodio) y otras en la parte de atrás. La maquinaria que permite la migración celular está formada por el citoesqueleto de actina, que tienen un tamaño superior y variable a cualquier organelo celular. Por su capacidad de ensamblarse y desensamblarse puede cambiar fácilmente la forma de la célula.

En resumen el citoesqueleto mantiene la forma de la célula, "ancla" los organelos en su lugar y mueve parte de la célula en los procesos de crecimiento y movilidad. El citoesqueleto se presenta transparente y por lo tanto, invisible.

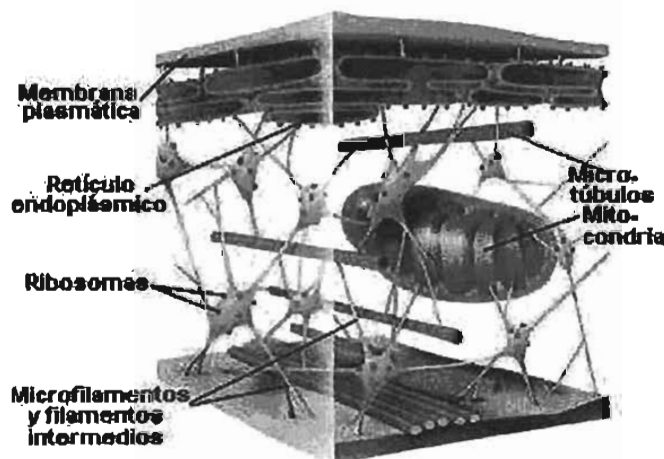


Figura 5 Citoesqueleto

Los sitios de adhesión entre las células de tejido cultivadas y la superficie del substrato son contactos focales o placas de adhesión. Estos contactos locales son uniones

cercanas en los que la distancia entre la superficie del sustrato y la membrana celular es del orden de 10-15 nm. Las caras externas de los contactos locales presentan proteínas receptoras específicas conocidas como integrinas, mientras que en las caras internas hay otra variedad de proteínas que median las interacciones entre los filamentos de actina (proteína intracelular presente en el citoesqueleto) y las integrinas. La arquitectura de la actina en el citoesqueleto es esencial para mantener la forma de la célula y la adhesión celular. La actina presenta principalmente dos arreglos dentro de la célula: uno en forma de ramillete y otro en red de filamentos entrecruzados. El primero se presenta principalmente hacia la periferia de la célula y forma unas protrusiones por el alineamiento de fibras paralelas y son la base de la formación de microvellocidades y filopodios. Las redes entrecruzadas pueden ser de dos tipos, las cercanas a la membrana que le sirven de soporte y es bidimensional formando protrusiones tipo sábana, conocidas como lamelipodio y las que ocupan todo el citosol que tienen un carácter tridimensional y que le dan características de gel.

Proteínas adhesivas: Además de la matriz extracelular y la organización del citoesqueleto, el otro factor determinante en la adhesión celular lo constituyen las proteínas adhesivas, de las que pueden distinguirse cuatro clases diferentes: (1) Las integrinas que determinan la adhesión entre las células y el sustrato o la matriz extracelular, se unen a la matriz con moléculas de fibronectina o laminina. Median interacciones bidireccionales entre la matriz y el citoesqueleto y actúan como transductor de señal. (2) Las cadherinas que median a la adhesión célula-célula. Conectan los filamentos de actina de los citoesqueletos de las células adyacentes, manteniéndolas unidas. (3) las conexinas que forman uniones de comunicantes (GAP junctions). Permiten el paso directo de pequeñas moléculas entre las células. Se observan como regiones en las que las membranas de dos células adyacentes se encuentran separadas por un espacio uniforme de 2-4 nm. Median la comunicación intercelular al permitir el paso de iones inorgánicos y otras pequeñas moléculas hidrosolubles, azúcares, aminoácidos, nucleótidos y vitaminas entre los respectivos citoplasmas. (4) la superfamilia de inmunoglobulinas.

Este conjunto de proteínas regulan además de la adhesión celular, a la expresión genética a través de la transducción de señales, las cuales dependen de la forma celular adoptada según la organización de las actinas del citoesqueleto. De modo que las

interacciones que ocurren durante la adhesión celular a una superficie influyen en la morfología celular y a su vez en la capacidad de las células para proliferar y diferenciarse.

Al colocar a un material de implante en un sistema biológico, éste es cubierto por proteínas, lípidos, iones y azúcares que determinan la clase de células que pueden adherirse. Las células mismas juegan un papel importante, ellas modifican la superficie a la cual se adhieren a través de la producción de matriz extracelular, factores de crecimiento y otros mediadores, lo que resulta en una regulación autocrina de las células que es dependiente de la superficie. Analicemos con más detalle las propiedades de la superficie y la forma en que estas afectan a la adhesión celular.

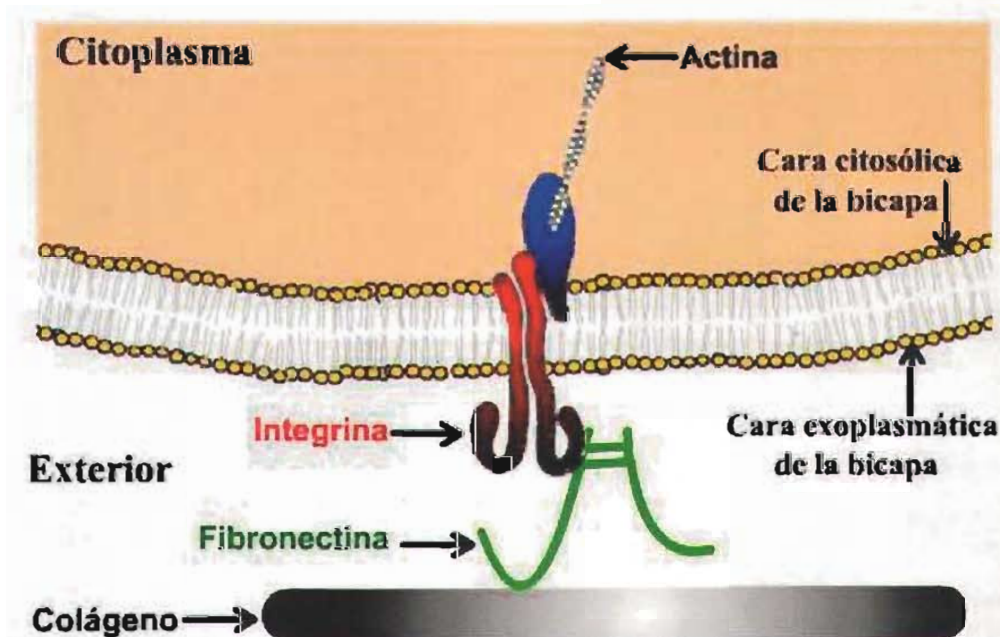


Figura 6. Esquema simplificado de la matriz celular, que muestra una de las relaciones entre componentes de la matriz y componentes del citoesqueleto.

### *Efectos de la topografía*

La topografía superficial es un factor importante que afecta varias funciones celulares (forma, migración, adhesión y organización de tejido)

En sistemas in Vitro se ha reportado en la literatura [40] que existe un mayor grado de formación de hueso en las superficies de implantes con una textura de morfología rugosa. Esto en parte se debe al anclaje mecánico que se forma cuando las superficies tienen una topografía macro-rugosa, mayor a 25  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, se ha hecho cada vez más claro que las células osteogénicas responden incluso a micro rugosidades. Para que esto ocurra es necesario que cada célula sea capaz de percibir la rugosidad, esto es, las dimensiones de la rugosidad deben ser del orden del tamaño de las células. En estudios realizados por Boyan y colaboradores [9, 10] referentes a la topografía de la superficie se ha visto que los osteoblastos perciben una superficie como rugosa cuando la altura de los picos es mayor a 2  $\mu\text{m}$  y cuando la distancia entre picos o su altura no excede la longitud de la célula, aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ . En estos estudios se demostró que la proliferación y diferenciación de los osteoblastos variaba según el grado de rugosidad.

Hay mucha evidencia sobre el efecto de las diferentes dimensiones morfológicas en el proceso de integración de implantes:

- (1) Dimensiones laterales y verticales mayores a 100  $\mu\text{m}$  son importantes para el anclaje mecánico del tejido óseo, lo que provee estabilidad mecánica a los implantes.
- (2) Dimensiones laterales y verticales del orden entre 1 y 100  $\mu\text{m}$  influyen la formación de hueso, la polaridad, la adhesión, orientación y morfología celular.
- (3) Dimensiones laterales menores a 1  $\mu\text{m}$  influyen los contactos locales y el arreglo del citoesqueleto, afectando nuevamente a la adhesión celular y su morfología. Principalmente afecta la conformación de bio-moléculas, como las proteínas.
- (4) Dimensiones verticales entre 0.05 a unos cuantas micras, afectan principalmente la orientación celular.

Las conclusiones de todos estos trabajos son que los detalles de la topografía en el rango entre micras y manómetros afectan la activación, adhesión, orientación, morfología y

movimiento de las células, así como su expresión genética. El entendimiento de los detalles de estas interacciones es bastante difícil y aún no está resuelto. Los estudios *in-Vivo* con implantes ortopédicos difícilmente darán la respuesta sobre cómo las células pueden reconocer la topografía, debido a la gran complejidad y factores que intervienen. Por lo que es a través de estudios *in-Vitro* con superficies de topografía definida que se podría entender estos procesos y sobre todo encontrar la superficie perfecta, que reclute las células deseadas, manipule su orientación y morfología y manipule la expresión genética lo que daría como resultado la formación del tejido deseado.

### *Composición Química*

La capacidad de las células para diferenciar entre diferentes composiciones químicas ha sido ampliamente demostrada a través de los estudios de citocompatibilidad de diferentes materiales, en los que se observan respuestas biológicas diferentes, en el aspecto morfológico, en la capacidad de crecimiento y en el estado de diferenciación celular de acuerdo a la composición química del material estudiado. Las superficies de los materiales son siempre diferentes al bulto, debido a que las superficies contienen enlaces no saturados que promueven la formación de capas reactivas o de contaminación superficial, cada superficie estará compuesta por grupos funcionales específicos. Se ha demostrado claramente que los grupos funcionales que se encuentran en la superficie, afectan la adhesión y proliferación celular. La incorporación de iones en una superficie puede cambiar la orientación de las proteínas que permiten la fijación de las células, por lo que modifican el enlace de ellas con el material. Algunos estudios en los que se ha variado la razón de iones colocados sobre una superficie inerte han mostrado que, después del implante o de la exposición a líquidos semejantes a los fluidos corporales, la superficie cambia llegando a formar capas de iones.

Los estudios realizados hasta el momento [41], demuestran que las células son capaces de discriminar entre diferentes sustancias o iones que se encuentren en su medio de crecimiento. Otros estudios han mostrado inclusive [42], la capacidad de las células, básicamente del tipo de osteoblastos, para discriminar entre superficies de la misma composición química pero con diferente tipo de cristalización.

### *Energía superficial*

La energía de superficie de un biomaterial se define por la densidad de carga eléctrica y la polaridad neta. Esto es, una superficie con una carga neta positiva o negativa puede adoptar un carácter hidrofílico, mientras que una superficie con carga neta cero, tenderá a ser más hidrofóbica. El efecto neto de la carga superficial es el de generar un ambiente con una tensión superficial específica que determina la energía de adhesión. La fuerza relativa con la que los constituyentes del suero interactúan con la superficie determinarán la respuesta biológica. La energía de superficie puede conceptualizarse como la energía libre de la interfase.

Un número extenso de grupos ha estudiado [43] el efecto de la energía superficial en las interacciones de las especies biológicas con sustratos sólidos. El ángulo de contacto es un indicador de la energía superficial, la cual se mide normalmente con un goniómetro (método estático) o una balanza de Wilhem (método dinámico). Ángulos de contacto menores ( $<50^\circ$ ) corresponden a superficies con mayor energía superficial y se les llama hidrofílicas, mientras que las superficies hidrofóbicas tienen una menor energía superficial y un ángulo de contacto mayor a  $50^\circ$ . El estudio de la adhesión celular en diferentes superficies, sobre todo superficies poliméricas con diferentes energías superficiales, ha demostrado que en términos generales las células se adhieren mejor a superficies hidrofílicas. Aunque la explicación de dicho resultado experimental aún se está investigando [9, 10].

# Capítulo 3



### Capítulo 3. Técnicas experimentales

En este capítulo se describen las diferentes técnicas de producción y caracterización utilizadas, así como la importancia de cada una de ellas para este trabajo:

Perfilómetro (rugosidad de la muestra), magnetron sputtering, medidor de ángulo de contacto, prueba colorimétrica (adhesión celular), Microscopio electrónico de barrido SEM, espectroscopia de fotoelectrones XPS.

#### Perfilómetro.

La perfilometría es una técnica sencilla y precisa, que nos permite determinar los espesores y las rugosidades. El Perfilómetro [44] mide con mucha exactitud las características en la dirección vertical de la película, mide alturas que van desde los 100  $\mu\text{m}$  a 50  $\text{Å}$ , en una variedad muy extensa de sustratos.

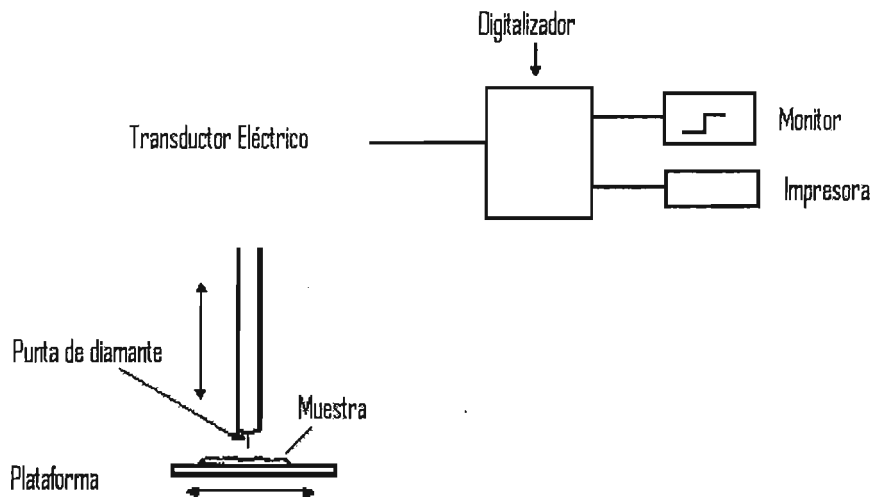


Figura 7. Esquema del funcionamiento de un perfilómetro

Las mediciones se llevan a cabo con un dispositivo electromagnético, moviendo la muestra por debajo de una aguja de punta de diamante (figura 7). Este aparato cuenta con una plataforma que se mueve en sentido horizontal, a una rapidez y longitud de barrido de antemano programadas. La aguja se aproxima a la superficie de la muestra casi hasta tocarla y se desplaza siguiendo la morfología de la superficie debido a las fuerzas de Van der Waals. Un transductor que se encuentra acoplado a la aguja genera señales eléctricas proporcionales al cambio en su posición. Las señales son amplificadas, digitalizadas y almacenadas en la memoria del perfilómetro, estas se pueden entonces analizar e imprimir.

La plataforma debe permanecer bien nivelada para que una lectura de dos puntos que se encuentran a la misma altura sobre la superficie de la muestra, correspondan así en la lectura de la aguja, y en la gráfica de los datos. Esto se puede llevar a cabo indicándole al programa dos puntos que se ubican al mismo nivel (figura 8).

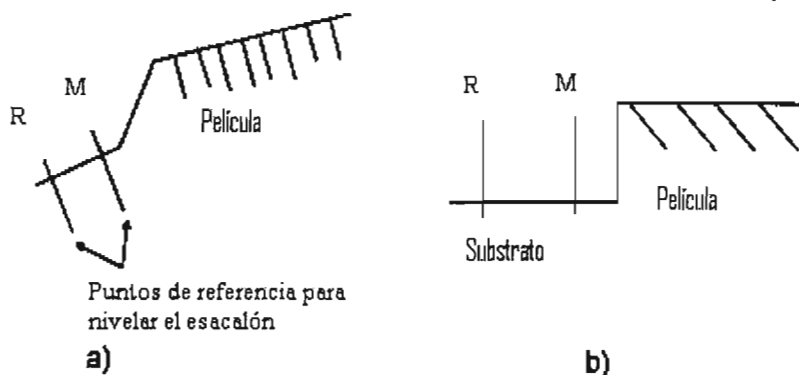


Figura 8. Esquema donde se muestran los cursores R y M necesarios para poder nivelar el barrido.

La pantalla del monitor presenta tanto el barrido como la gráfica que corresponde a la medición.

La resolución del instrumento es directamente proporcional a la rapidez y longitud con que se lleva a cabo el barrido. El dato de barrido es registrado a una razón constante de 40 mediciones por segundo. Así, para la rapidez media y una longitud de barrido de  $50 \mu\text{m}$  se tiene una resolución horizontal de  $0.1 \mu\text{m}/\text{muestra}$ .

Con el Perfilómetro se puede determinar también la rugosidad de la superficie, haciendo un barrido horizontal y calculando la rugosidad promedio en micrómetros como  $R_a$  [45] definida de la siguiente manera:

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |z_i| \quad \text{Ec. 1}$$

donde  $z_i$  es la altura con respecto a un nivel de la superficie tomado como referencia.

### **Espurreo Catódico**

Las películas de carbono amorfo se depositaron con un sistema de espurreo magnetron o magnetron sputtering de corriente directa.

El proceso de Espurreo Catódico [46], de manera muy general, consiste en la extracción de átomos de la superficie de un electrodo o cátodo (blanco) debido al intercambio de momento con iones provenientes del plasma que bombardea a los átomos del blanco. A partir de esta definición se observa, que el proceso de sputtering es básicamente un proceso de ataque físico, frecuentemente utilizado para la limpieza de superficies. Sin embargo, como en el proceso de sputtering se produce vapor del material del blanco, es también un método utilizado en la deposición de películas.

Como se nota en la descripción anterior la “evaporación” del blanco se realiza por la acción de un plasma que es activado dentro de la cámara de vacío utilizando esta como ánodo y el blanco de grafito como cátodo.

Se conoce como plasma [47] a un gas ionizado, es decir es un gas compuesto de especies neutras y de especies eléctricamente cargadas que presentan un comportamiento colectivo. El término especie designa una partícula del plasma que puede ser un átomo, un electrón, una molécula, etc.

En general las propiedades de un plasma dependen fuertemente de aspectos como son el tipo de átomos y moléculas presentes; densidad y energía de los constituyentes y grado de ionización. Sin embargo, existe una característica universal de los plasmas: la libertad que tienen las partículas cargadas para moverse en respuesta a cualquier campo eléctrico.

El uso de plasmas para la modificación de superficies ya sea por ataque (erosión) o depósito de películas delgadas se debe a dos características importantes de los plasmas:

(1) En un plasma se producen de manera eficiente especies químicamente activas (radicales), que son generadas por los electrones del plasma al colisionar con las distintas especies que lo forman.

(2) Un plasma genera iones que pueden ser acelerados a energías de 50 a 1000 eV en la vecindad del material a erosionar o a depositar. Esta propiedad permite la existencia del fenómeno de espurreo.

Para formar y sostener un plasma se requiere una fuente de energía que produzca la ionización del gas. La mayoría de los plasmas usados en las distintas técnicas de preparación de películas delgadas son iniciados y sostenidos por campos eléctricos y producidos por fuentes de poder que pueden ser de corriente directa o alterna (usualmente radio frecuencia). A este tipo de plasmas se les conoce como descargas luminiscentes o simplemente descargas debido a la radiación que emiten, la cual es característica de los átomos constituyentes.

Para este trabajo se utilizó un sistema de magnetron sputtering o espurreo catódico con magnetrón; donde la palabra magnetrón se refiere a que se utiliza un conjunto de imanes colocados detrás del blanco cuya utilidad es mejorar la eficiencia del proceso de erosión por medio del confinamiento del plasma a su alrededor.

El blanco utilizado para el depósito de películas de aC es de grafito de alta pureza y como gas se utilizó el argón.

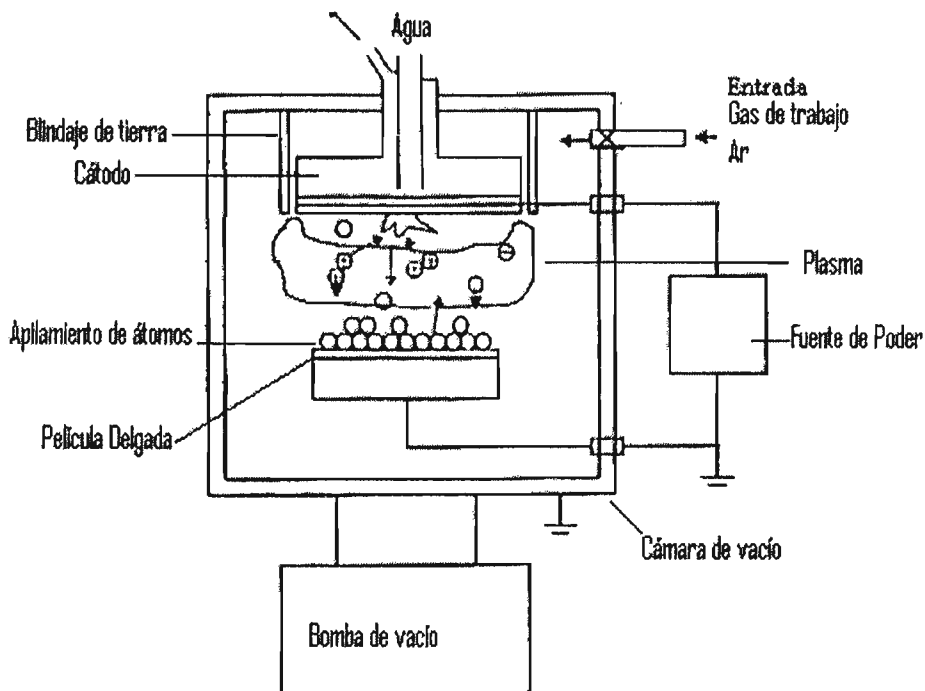


Figura 9. Dibujo esquemático donde se muestran las partes de un sistema de Magnetron Sputtering. Obtenido de [36]

Se forma el plasma de argón, los iones de argón bombardean el blanco de grafito, arrancando átomos de carbono, los cuales son transportados por el plasma hacia el sustrato donde se condensan formando la película (figura 9). Algunos átomos de carbono son ionizados en la trayectoria e inciden sobre el sustrato con mayor energía.

El espurreo catódico es ampliamente utilizado a pesar de tener bajas tasas de depósito, de todos los iones que son arrancados del blanco solo el 5% de estos es lo que de manera real se deposita sobre el sustrato, el resto de material se pierde en el plasma. El motivo de su amplio uso es su simplicidad y la relativa facilidad para fabricar un blanco plano de una amplia variedad de materiales y obtener películas con alta uniformidad en el grosor [47].

### Medidor de ángulo de contacto

El medidor de ángulo de contacto [48], conocido también como goniómetro, es un dispositivo por el cual se mide el ángulo de contacto, esto es, el ángulo que se forma entre una gota de líquido y una superficie sólida; para con él conocer algunas características de la superficie [49]. El goniómetro consiste en un telescopio con el objetivo dirigido hacia una

platina en la que se coloca el material que se va a analizar, sobre este material se deposita una gota de líquido. El goniómetro dispone de un par de reglillas ajustables en el campo de visión, una de ellas se deja paralela a la superficie del material y otra se ajusta hasta que su posición es tangente a la gota en la zona de contacto con el sólido, de ahí obtenemos por lectura directa el ángulo de contacto.

El ángulo de contacto es el ángulo formado entre la tangente del límite de la gota y la tangente de la superficie de la intersección de vapor-líquido-sólido, el ángulo de contacto nos indica que tan “mojada” esta la superficie de la muestra. Este es un indicador de las propiedades superficiales de modo que:

Un ángulo de contacto pequeño indica que la superficie es hidrofílica y que tiene una energía superficial alta (figura 10).

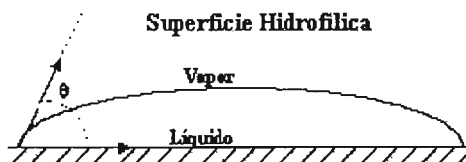


Figura 10. Esquema del comportamiento de un líquido sobre una superficie hidrofílica

Cuando un ángulo de contacto es grande, indica que la superficie es hidrofóbica teniendo una energía superficial baja (figura 11).

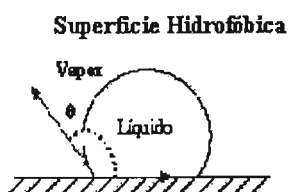


Figura 11. Esquema del comportamiento del líquido sobre una superficie hidrofóbica

Empíricamente se ha probado que en muchos materiales cuyo ángulo de contacto es pequeño la adhesión celular en la superficie es mayor y, por el contrario si se tiene un ángulo de contacto grande la adhesión celular es baja. De aquí la importancia de estudiar el ángulo de contacto en dichas superficies.

Si una gota de agua cae sobre una superficie, alrededor de ella actúan diferentes fuerzas físicas, la tensión superficial, que tenderá a cerrar la gota sobre sí misma o a permitirle que se extienda. El ángulo de contacto  $\theta$ , expresa el equilibrio logrado entre las distintas tensiones actuantes. Cuanto mayor es la tensión superficial de la superficie menor será el ángulo  $\theta$ . La energía de superficie es una característica importante de los materiales, sin embargo, no se puede medir directamente se calcula mediante el ángulo de contacto utilizando líquidos diferentes en una zona determinada. Además, la forma de la gota y el ángulo de contacto revelan información sobre la naturaleza de los enlaces químicos en la superficie. De hecho, en el proceso de limpieza del sustrato un material con ángulo de contacto grande se limpia mejor, ya que el agua no se junta en gotas, sino que escurre con facilidad [50].

Experimentalmente se obtienen dos mediciones, de acuerdo a si el volumen de la gota se aumenta o disminuye sobre de la superficie. La gota de líquido se coloca mediante una micropipeta de volumen graduado, al aumentar el volumen se observa que el ángulo de contacto se modifica y, el nuevo ángulo se denomina ángulo de avance. Al contrario, si a la gota original se le quita una pequeña cantidad de volumen, al nuevo ángulo obtenido se le da el nombre de ángulo de retroceso. En un material isotrópico y con una superficie plana y homogénea se espera que ambos ángulos coincidan, de modo que cualquier diferencia entre estos valores da información respecto a la topografía.

### **Prueba Colorimétrica**

Esta técnica se basa en la cuantificación de la concentración de una sustancia debido a la absorción de la luz.

La espectroscopia es un método que mide la cantidad de luz absorbida o transmitida por una sustancia en solución. Todas las sustancias en solución absorben luz de ciertas longitudes de onda o transmiten luz de otras longitudes, por lo tanto, la absorbancia es una característica de cada sustancia; dada que la absorción se relaciona con la cantidad de sustancia en solución, puede utilizarse para la determinación cuantitativa de la concentración de las sustancias disueltas.

La prueba colorimétrica [51], utilizada en éste trabajo para determinar el número de células adheridas a las superficies consiste en hacer un teñido de la membrana celular con el fin de tener absorción de luz en una longitud de onda específica y a partir del valor de absorbancia obtenerle número de células.

En estudios cuantitativos involucrando absorción de radiación, se necesita una medida experimental que pueda caracterizar la cantidad de radiación electromagnética absorbida por una muestra. Esta cantidad corresponde a lo que se llama potencia radiante, o sea, la cantidad de energía característica de la radiación por unidad de tiempo. La unidad de potencia es el Watt, y su magnitud puede variar con la dirección. Así, se hace conveniente definir la potencia radiante como función de un plano perpendicular a la dirección del flujo de la radiación. Experimentalmente, la radiación absorbida por una muestra es determinada comparándose la potencia radiante del haz transmitido en la ausencia de especies absorbentes, con la potencia radiante transmitida en la presencia de estas especies. Aunque las medidas experimentales sean realizadas en función de la potencia radiante, usualmente se trabaja con la intensidad de la radiación. Estas dos cantidades no corresponden a la misma cosa, pero están relacionadas entre sí. La Intensidad de radiación,  $I$ , es definida como la razón entre la potencia radiante y el *ángulo sólido* de incidencia. Cuando el área iluminada, el ángulo sólido y el volumen de la especie absorbente son pequeños, tal como es el caso de las medidas con fines analíticos, la potencia de la radiación puede ser tomada como la intensidad.

Cuando un haz de radiación *monocromática*, con intensidad  $I_0$ , incide sobre una cubeta conteniendo una solución, varios fenómenos pueden ocurrir. El efecto más significativo ocurre cuando parte de la radiación es absorbida por el medio que está siendo analizado. Sin embargo, este no es el único efecto que puede ser observado. Parte de la radiación incidente puede ser reflejada, dependiendo de la especie absorbente o de las diferencias entre el índice de refracción del medio donde la radiación se propaga y del medio que está siendo analizado (inclusive por las paredes de la cubeta), al mismo tiempo que otra parte podrá simplemente ser dispersada, en el caso de que el medio no sea transparente y homogéneo. En consecuencia, la intensidad del haz que es medida después de atravesar la muestra (intensidad transmitida,  $I_t$ ) será menor que la intensidad inicial,  $I_0$ . Todos estos



efectos asociados con la intensidad de radiación, están relacionados entre sí por una expresión linear descrita por la ecuación:

$$I_o = I_r + I_e + I_a + I_t \quad \text{Ec. 2}$$

$I_o$  = Intensidad del haz incidente,

$I_r$  = Intensidad del haz reflejado, resultado de las diferencias del índice de refracción entre la especie absorbente y el ambiente,

$I_d$  = Intensidad del haz dispersado, resultado de un medio no homogéneo (suspensión) y/o de fluctuaciones térmicas,

$I_a$  = Intensidad del haz absorbido por el medio

$I_t$  = Intensidad del haz transmitido.

En el análisis colorimétrico se utiliza un lector de Elisa [52] en el que la intensidad reflejada y dispersada se pueden despreciar, de modo que midiendo la intensidad incidente y la transmitida, se puede calcular la luz absorbida por la muestra, la cual se expresa en términos de la Absorbancia  $A$ . Se define la absorbancia como el logaritmo decimal del cociente de la intensidad del haz incidente entre la intensidad del haz transmitido.

$$A \equiv \log \frac{I_o}{I} \quad \text{Ec. 3}$$

De acuerdo a la Ley de Beer, sabemos que la relación entre las intensidades de los haces incidente y transmitido y el número de entidades (en nuestro caso, las células) capaces de absorber la luz ( $N$ ) está dada por:

$$I = I_o e^{-Nz} \quad \text{Ec. 4}$$

Donde  $z$  es la profundidad de la solución en que se encuentra el cultivo de células, de aquí:

$$\frac{I}{I_o} = e^{-Nz} \quad \text{Ec. 5}$$

Tomando logaritmos en ambos lados de la ecuación:

$$\text{Ln} \frac{I}{I_o} = -Nz \quad \text{Ec. 6}$$

$$\text{Ln} \frac{I_0}{I} = Nz \text{ Ec. 7}$$

De donde:

$$N = \frac{1}{z} \text{Ln} \frac{I_0}{I} \text{ Ec. 8}$$

Transformando a logaritmos decimales, tenemos:

$$N = \frac{2.303}{z} \log \frac{I_0}{I} \text{ Ec. 9}$$

Y, por la definición de absorbancia:

$$N = kA \text{ Ec. 10}$$

Expresión en la que  $k$  es una constante de proporcionalidad, definida como  $2.303/z$  y el valor de  $z$  es conocido, ya que puede medirse directamente, la expresión final muestra que, en efecto, el número de células  $N$  en la solución es proporcional a la absorbancia, esto es:

$$A \propto \text{Número\_de\_células} \text{ Ec. 11}$$

El siguiente paso consiste en calibrar el aparato para obtener el valor de proporcionalidad  $k$ , cuando utilizamos un volumen constante de solución. Esto se realizó contando el número de células en una muestra dada, usando una técnica diferente, y midiendo la absorbancia de dicha muestra, una vez realizado el teñido celular. Al graficar los datos ( $A$  vs Número de células) se obtiene una línea recta con cuya ecuación se puede interpolar o extrapolar la relación para obtener el número de células correspondientes a una absorbancia medida.

## Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es extraordinariamente útil para estudiar las características morfológicas y topográficas de la muestra (figura 12).

El microscopio electrónico de barrido presenta de manera general un haz de electrones con una potencia entre 1 y 50 KV y un vacío de  $10^{-7}$  bars, el cual hace incidir sobre una muestra gruesa, opaca a los electrones. Este haz se focaliza sobre la superficie de la muestra, barriéndose a lo largo de un conjunto de líneas paralelas. Como resultado de la interacción entre los electrones incidentes y la muestra, se producen una serie de fenómenos: la emisión de electrones secundarios con energías de unas pocas decenas de electrón-voltios y la reflexión de los electrones primarios que dan lugar a un haz de electrones retrodispersados de alta energía. La intensidad de la emisión de estos 2 haces depende fuertemente del ángulo de incidencia del haz de electrones sobre la superficie del material, sin embargo, la resolución del equipo dependerá directamente del tamaño del haz de electrones que se emplee para hacer el barrido.

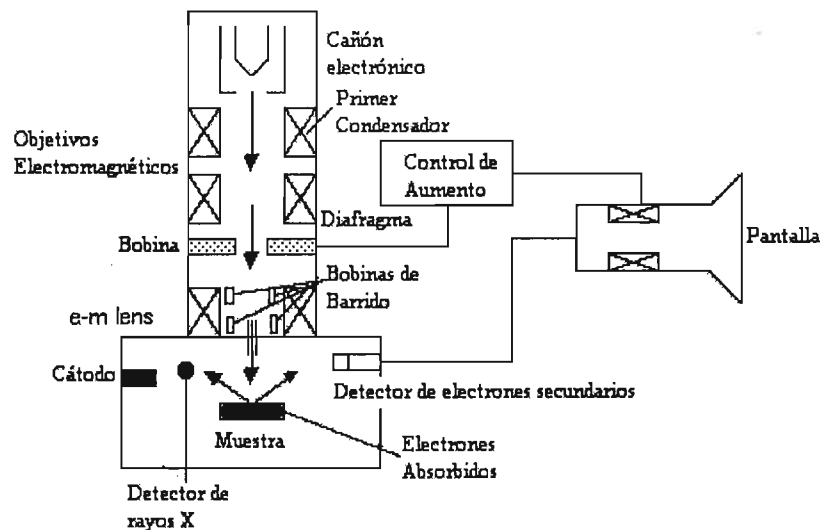


Figura 12. Esquema de las unidades que componen un microscopio de barrido

Al barrer la muestra con un haz electrónico de sección transversal pequeña y de alta energía, se va generando una imagen punto a punto de ella, de esta manera se establece una correspondencia uno a uno entre la cantidad de electrones detectada y la intensidad del punto correspondiente en la pantalla del tubo de rayos catódicos. Si repetimos la operación varias veces y empezamos a barrer la muestra, esa imagen punto a punto representara las características topográficas de la superficie de esta. Por lo tanto, la imagen en la pantalla de rayos catódicos del microscopio electrónico de barrido es un mapa de las intensidades de los electrones secundarios o retrodispersados, emitidos por la superficie de la muestra en observación.

Cuando el haz de electrones impacta la muestra, se generan varios tipos de señales, como lo mencionamos anteriormente. Sin embargo, las señales recibidas en el detector colocado por encima de la superficie que golpea el haz electrónico, no son confinadas solo a la superficie de la muestra, sino a un volumen dentro de esta, puesto que el haz electrónico experimenta varias colisiones penetrando el material, antes de perder completamente su energía. Ya que el desparrame de estas colisiones semejan una botella esférica por debajo de la superficie, cuyo volumen se incrementa con la energía del haz y decrece con el número atómico del elemento que forma la muestra, las emisiones características serán bastante diferentes que las que producen los elementos de la superficie.

Los electrones retrodispersados provienen de una región que se encuentra a  $0.5 \mu\text{m}$  por debajo de la superficie. Los electrones secundarios provienen aproximadamente de 5 a 10 nm por debajo de la superficie de la muestra. La resolución que se logra con electrones secundarios para formar imágenes de la superficie de la muestra es mucho mayor, por lo tanto, si queremos estudiar la superficie de la muestra, generalmente utilizaremos electrones secundarios para formar su imagen [47].

### Preparación de muestras para el SEM

Para observar muestras biológicas en el microscopio se tienen que fijar los tejidos celulares, deshidratar y desecar las células, se recubren con una capa metálica delgada ya sea de oro, plata, platino, cobre, pues es necesario que las muestras sean conductoras y así evitar la acumulación de carga; en este caso el recubrimiento se hizo con oro.



Figura 13. Imagen del Microscopio Electrónico de Barrido.

Para este trabajo el fijador químico empleado fue el glutaraldehído, que es un fijador de tipo aditivo, no coagulante, pues reacciona con los radicales de las moléculas orgánicas proporcionando estabilidad química y cohesión física. La elección del fijador químico depende de varias cosas, entre ellas, depende del tipo de muestra que se utiliza, el fijador tiene que ser una solución isotónica con el tejido, para evitar que el tejido, por choques osmóticos se deshidrate o haya ruptura del tejido celular; el fijador tiene que tener una velocidad de penetración elevada para tener un fijado inmediato de las estructuras celulares; tiene también que tener un pH constante durante todo el proceso de fijación. Hay también que tomar en cuenta la concentración del fijador, la temperatura y el tiempo de fijación. Generalmente el proceso de fijación lleva de unos 30 a 60 minutos a una temperatura de entre 0° a 4 °C aquí la actividad citolítica (conjunto de reacciones metabólicas) es mínima [53].

## Fotoemisión de rayos X (XPS).

### Espectroscopía de fotoelectrones por rayos X

Esta técnica es utilizada para obtener la composición química superficial de distintos materiales con aproximadamente 1nm de profundidad. Es posible determinar si el material se encuentra oxidado superficialmente, si contiene hierro o carbón, etc. Es posible detectar a la mayoría de los elementos, excepción hecha del hidrógeno. Nuestro interés principal es el de encontrar la composición, esto es, el porcentaje atómico de cada uno de los componentes.

Cada electrón que se desprende de la muestra lleva una identificación con su energía característica correspondiente a cada elemento químico que lo forma. La meta consiste en capturar a los electrones para saber de qué átomo proceden. Para poder liberarlos de la fuerza atractiva del núcleo se excitan mediante la exposición al bombardeo de rayos X.

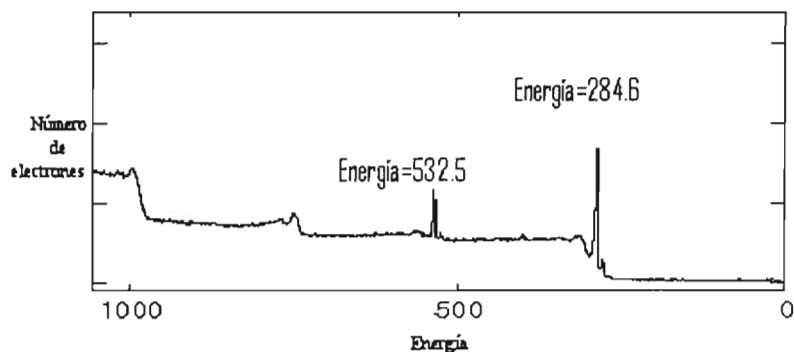


Figura 14. Espectro característico de XPS

Esta radiación les da la suficiente energía para liberarlos del núcleo. Una vez liberados, algunos de ellos viajan a través de la materia y alcanzan la superficie del material. Aquellos electrones que llegan a la superficie con suficiente energía pueden dejar la materia sólida para llegar al vacío que la rodea.



Figura 15. Fotografía del equipo XPS

Una vez en el vacío son colectados por un analizador de electrones. Luego son clasificados de acuerdo a su energía. La información que interesa para éste análisis es la energía de amarre que tenían antes de abandonar el átomo. Solo resta contar estos electrones contra la energía de amarre y se obtiene un espectro como el que se muestra [54] (figura 13).

# Capítulo 4



## Capítulo 4. Desarrollo Experimental

El desarrollo experimental se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Preparación del Sustrato.
- Medición de la Rugosidad.
- Perfilómetro.
- Depósito de películas delgadas.
- Medición de ángulo de contacto.
- Cultivo celular.
- Preparación de muestras para el SEM.
- Prueba colorimétrica. Conteo celular.
- Observación en el SEM.

### **Preparación del Sustrato y Medición de la Rugosidad**

Lo primero que se realizó fue el lijado de las muestras para obtener las diferentes rugosidades, (P.E, 1, 2, 3) micras, los sustratos que se usaron fueron de acero inoxidable 316L, con dimensiones 1cm × 1cm.

El pulido espejo (0.01  $\mu\text{m}$ ) se obtuvo de la siguiente manera: el sustrato de acero inoxidable se lija con diferentes gruesos de lija empezando desde la más gruesa a la más fina, los números de lija usados fueron: 100, 240, 320, 400, 600, 1500, 2000, cada uno de los lijados se hace hasta que deje en el sustrato líneas orientadas en la misma dirección y se hace en las cuatro direcciones del sustrato. Una vez terminado este lijado, los sustratos se enjuagan en un sistema de ultrasonido, 15 minutos en acetona y 15 minutos en isopropanol y se secan con aire a presión. Finalmente se llevan a la pulidora; taller de laminación encargado Maestro en Ciencias Gabriel Lara, IIM, para obtener el pulido espejo, este pulido se hizo tanto con alumina de 1 $\mu\text{m}$  como con polvo de diamante de 1 $\mu\text{m}$  y se lleva alrededor de 40 minutos por muestra una vez obtenido el pulido espejo se enjuagan las muestras en el ultrasonido, alrededor de 30 minutos, con acetona e isopropanol

respectivamente, secándolas con aire a presión, para evitar que queden restos del material desprendido junto con el material con el que se pulió.

Las otras rugosidades (1, 2, 3)  $\mu\text{m}$  se obtuvieron de la siguiente manera:

Se preparó una mezcla con el tamaño del esmeril indicado y 10ml de agua, se colocó dicha mezcla en una superficie plana en donde el sustrato se estuvo tallando directamente con la mezcla aproximadamente 15 minutos por muestra. Una vez terminado este tallado se enjuagan los sustratos en el ultrasonido por 30 minutos, 15 minutos en acetona y 15 minutos en isopropanol, secándolas con aire a presión [32].

Cabe señalar que se utilizó el mismo procedimiento para cada una de las rugosidades lo que se cambio fue el tamaño de grano del esmeril, en todos los casos se ocupó carburo de silicio.

Para la rugosidad de 1  $\mu\text{m}$  se ocupó esmeril de carburo de silicio, C-120, para 2  $\mu\text{m}$  se ocupó esmeril C-100, para 3  $\mu\text{m}$  esmeril C-36.

### Perfilómetro.

La rugosidad se determina con el perfilómetro. Para cada muestra se hicieron 12 mediciones en total, 6 mediciones en la dirección x y 6 en la dirección y, con una longitud de barrido de 1mm, como se esquematiza en la figura 15. El perfilómetro que se ocupó para realizar este trabajo se encuentra en el Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM.

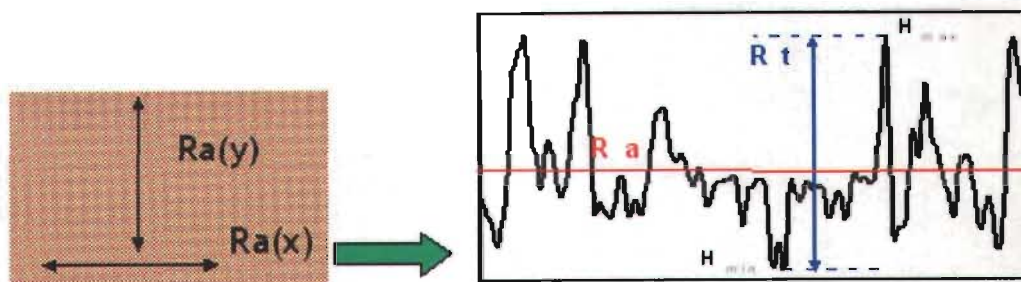


Figura 16. Espectro característico de la rugosidad de una superficie medida con un perfilómetro

Para cada barrido y dirección se calculó la rugosidad promedio  $R_a$ .

### Depósito.

Previo a cada depósito es muy importante el lavado de los sustratos, para evitar se desprendan contaminantes, degrade, etc., durante los procesos a los cuales las películas serán sometidas [47]. La limpieza se realizó con el baño ultrasónico en acetona e isopropanol 15 minutos en cada una.

Una vez obtenidas los sustratos con las diferentes rugosidades, se depositó primero una capa de titanio para mejorar la adhesión entre la superficie metálica y la película de carbono amorfo y posteriormente se realizó el depósito de carbono amorfo (figura 16), ambos depósitos se obtuvieron con sistemas magnetron sputtering.

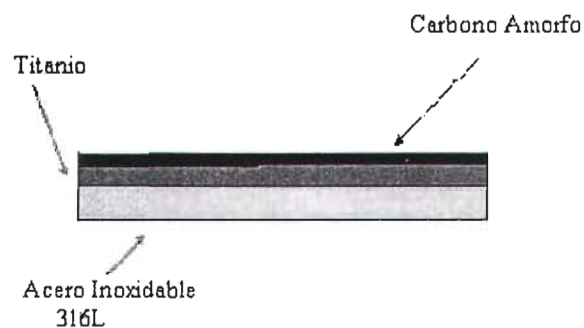


Figura 17. Esquema donde se muestra el sustrato de acero inoxidable 316L recubierto por las películas delgadas de titanio y carbono amorfo respectivamente

Para hacer el depósito de la película de titanio se introduce la muestra en la pre-cámara para tener un pre-vacío de  $10^{-2}$  Torr, posteriormente se mete la muestra en la cámara y se espera hasta tener un vacío de aproximadamente  $10^{-6}$  Torr. Una vez alcanzado el vacío deseado se hace el depósito de la película de titanio, terminando el tiempo de depósito se saca la muestra, para posteriormente depositar la película de a-C.

Las condiciones de depósito para el recubrimiento con titanio, fueron las siguientes: fuente pulsada (DC) a una frecuencia de 250 kHz, el pulso 496 ns, potencia 200 W, 0.2 A, flujo de argón de 10 sccm, la presión de 4 mTorr, la distancia del blanco a la muestra fue de 5cm, un tiempo total de depósito de 460 s; con una tasa de depósito 0.8 nm/s; entonces aproximadamente el espesor del recubrimiento de titanio es de 300 nm.

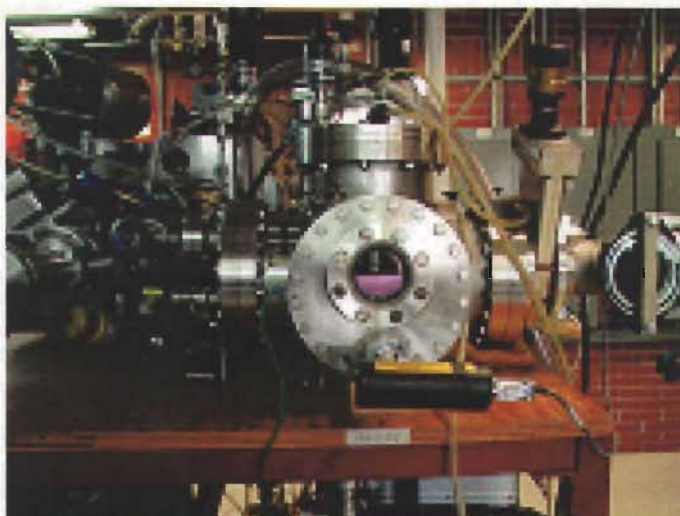


Figura 18. Imagen del Magnetron Sputtering del IIM.

El depósito de la película de carbono también se hizo con el sistema de magnetron sputtering (DC), con alto vacío, aproximadamente  $1 \times 10^{-6}$  Torr usando como cátodo grafito puro (de alta pureza) con 4 pulgadas de diámetro. Antes del depósito se limpia la superficie del sustrato con un plasma de argón por 10 minutos con el fin de remover impurezas. Las condiciones de limpieza fueron 220 W, 556 V, 0.40A, 20.0 sccm, 30.0 mTorr, 10 minutos. Para el depósito de la película las condiciones fueron 250-260 W, 640 V, 0.40 A, 20.0 sccm, 30.0-32.0 mTorr, 10 minutos. La tasa de depósito es de aproximadamente 0.4 nm/s que da un espesor de 240nm. (figura 18).

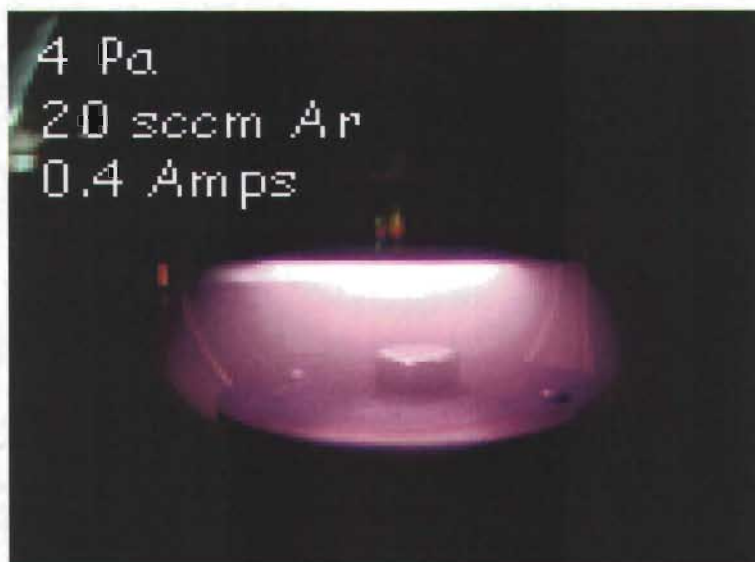


Figura 19. Imagen del plasma de argón al depositar la película de carbono amorfo

Cabe señalar que tanto para el depósito de la película de titanio, como para la película de carbono amorfo se tiene que tener la válvula de agua abierta del sistema de enfriamiento de las cámaras.

Para realizar el recubrimiento de películas delgadas se ocupó el magnetron sputtering del laboratorio de síntesis a cargo del Dr. Muhl y la Dra. Rodil Posada, ubicado en el Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM.

### **Medición de ángulo de contacto**

Las mediciones de ángulo de contacto se realizaron sobre los sustratos antes y después del depósito para cada una de las rugosidades utilizando agua destilada y un volumen de líquido de 10 microlitros. Este volumen se escogió después de que en pruebas preliminares encontramos que no había mayor variación del ángulo medido con volúmenes entre 6-16  $\mu\text{L}$ .

Las mediciones se llevaron a cabo con el medidor de ángulo de contacto ubicado en el Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM.

### **Cultivo Celular**

#### **Esterilización**

Primero se esterilizaron los sustratos, para eliminar, lo más posible, a los agentes patógenos, esto se realizó en la autoclave, aproximadamente durante 100 minutos.

Para poner las muestras en el autoclave se chequea el nivel de agua (ver figura 19), se enciende el interruptor y se espera a que la válvula 1 llegue a 20 lb, esto tarda aproximadamente 20 minutos, transcurrido este tiempo se pone el ciclo en esterilizar, y se espera a que la válvula 2 llegue a 20 lb, este procedimiento tarda 30 minutos, posteriormente como se está trabajando con muestras sólidas el ciclo se pone en expulsión rápida, que son aproximadamente 25 minutos, se pone el ciclo en secado, 30 minutos, ponemos el ciclo en terminar, aquí el proceso en la autoclave termina, se apaga el interruptor y se deja enfriar el sistema para poder sacar las muestras. Al sacar las muestras de la autoclave se llevan inmediatamente a la campana en donde se va a hacer el cultivo para que no se contaminen.

De acuerdo al procedimiento mencionado, la esterilización se lleva a cabo mediante calor húmedo y presión, llevando las muestras a una temperatura de 121 °C en una atmósfera de vapor de agua.

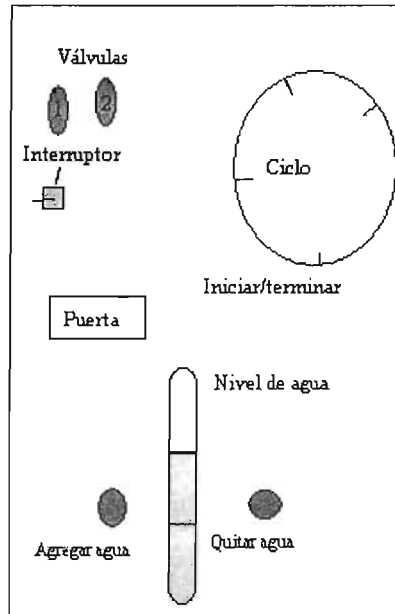


Figura 20. Esquema de la carátula de un autoclave

### Obtención de células

Las células de osteoblastos humanos son obtenidas por una técnica de explante, liberadas de una porción del hueso alveolar. Estas se conservan en la incubadora con el medio fisiológico adecuado en condiciones estables y controladas.

Para obtener las células que se sembrarán en las superficies se deben desprender del frasco de cultivo; primero se elimina el medio del frasco, se le agrega tripsina (enzima) para despegar las células del frasco de incubación y se mete a la incubadora por 5 minutos a 37 °C. Posteriormente se inhibe la tripsina agregando medio de cultivo con suero fetal de bovino, despegadas las células se colocan en un tubo de ensayo, se ponen en la centrifuga por unos 10 minutos a 1500 rpm, con la misma cantidad de agua enfrente del tubo con células (ver figura 20).

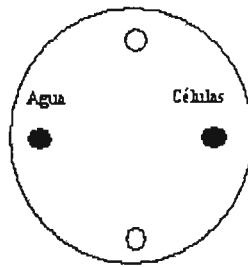


Figura 21. Esquema del balanceo de una centrifuga

### Estudio de Adhesión

Para los estudios de adhesión celular sobre las superficies, las muestras se separaron de la siguiente manera:

(1) Un grupo de sustratos de acero inoxidable sin película, pero con las diferentes rugosidades, P.E, 1 2 y 3  $\mu\text{m}$  se sembró de células que fueron incubadas por 24 horas. En éste grupo se realizó el conteo celular por triplicado y se observó la morfología celular mediante el SEM.

(2) El otro grupo de cultivo celular se realizó en sustratos con las cuatro rugosidades diferentes y con película de carbono. Se dividió a su vez en cinco subgrupos con el fin de observar la adhesión celular a diferentes periodos de tiempo: 30 min., 1 hora, 2 horas, 4 horas y 24 horas. Los primeros cuatro subgrupos solo fueron analizados mediante el SEM y el subgrupo a 24 horas de cultivo fue analizado mediante el SEM y conteo celular por triplicado. (ver tabla 3).

Tiempo de Incubación (min.)	a-C	Acero	Control
30	1 cultivo para SEM		
60	1 cultivo para SEM		
120	1 cultivo para SEM		
240	1 cultivo para SEM		
1440	1 cultivo para SEM 1 cultivo para hacer conteo celular	1 cultivo para SEM 1 cultivo para hacer conteo celular	1 cultivo para hacer conteo celular

Tabla 3 Tiempo de incubación y tipo de superficie

Las células se sembraron con una pipeta sobre cada una de las superficies a una densidad celular de 10,000 células para los sustratos con recubrimiento de carbono amorfo y de 30,000 células para los sustratos de acero inoxidable, expandiendo la gota uniformemente sobre la superficie. Para el estudio a 24 horas, se dejan las células en gota durante tres horas y posteriormente se añade el medio.

### **Conteo Celular**

Para realizar el conteo celular de las células adheridas a 24 horas, se lavan los sustratos con PBS, con el fin de que las células no adheridas se desprendan de la superficie. Se coloca una solución de azul de toluidina con formaldehído al 3.7 % para fijar las células que se adhirieron a la superficie y teñirlas. Después de cuatro horas se elimina la solución y se lava para quitar el exceso de colorante, se coloca la solución de SDS, (detergente) al 1% y se agita durante media hora y se extraen 100  $\mu$ l de cada muestra. Esta solución se coloca en las placas del lector ELISA para leer la absorbancia a 600 nm (figura 21).



Figura 22. Medidor de porcentaje de luz absorbida en el lector de ELISA



Tanto la esterilización como el conteo celular se llevaron a cabo en el laboratorio de biología celular a cargo del Dr. Higinio Arzate, de la Facultad de Odontología, edificio de posgrado, UNAM.

### **Preparación de Muestras para SEM**

El procedimiento de fijación celular consiste en: fijar las células con gluteraldehído en buffer, lavado con buffer de 15 a 30 minutos. Luego se hace la deshidratación en alcohol etílico graduado 35 %, 50 %, 75 %, hasta llegar al 100 % 15 minutos en cada concentración. Las muestras se dejan secar en una cámara de vacío por 24 horas y, posteriormente se recubren con oro, aproximadamente 6 capas atómicas. El recubrimiento en oro se hace con un magnetron sputtering, diferente al utilizado para hacer el recubrimiento de a-C y de titanio, se espera a que se haga vacío aproximadamente unos 5 minutos, una vez transcurrido este tiempo, se deja fijo el voltaje en 0.8 V y se varía la corriente hasta llegar a 11 mA, el tiempo de depósito es de 4 minutos para tener el recubrimiento de oro requerido.

Las muestras, para observarlas en el SEM son colocadas en porta-substratos para microscopía, se introducen en el SEM y se observan utilizando electrones primarios con 20 KeV de aceleración.

El microscopio electrónico utilizado para este trabajo fue: Jeol 5600 LV, 20 KV de aceleración y resolución de 5 nm. Manejado por el maestro en Ciencias Carlos Magaña Zavala, laboratorio de microscopía, Instituto de Física, UNAM.

# Capítulo 5

## Capítulo 5. Resultados y análisis

### Rugosidad

El primer análisis de caracterización que se realizó en los sustratos fue medir la rugosidad promedio de la muestra, antes y después del recubrimiento.

En cada muestra se tomaron 12 mediciones, 6 para la dirección X y 6 para la dirección Y; con esto se pudo ver cuantitativamente que se tienen muestras isotrópicas, ya que se tiene el mismo valor promedio de rugosidad en ambas direcciones.

En la tabla 4 se muestran los resultados de la caracterización por perfilómetro de la rugosidad promedio  $R_a$  en las muestras de acero inoxidable puro. En la tabla 5 se muestran los resultados de caracterización por perfilómetro de la rugosidad promedio  $R_a$  a los sustratos con película.

Otro parámetro que representa la morfología medida por el perfilómetro es el valor  $R_t$  el cual mide la amplitud pico a pico en la zona elegida. Sin embargo, se observó que el valor  $R_t$  no es un parámetro adecuado para representar la rugosidad en estas muestras, ya que la poca variación que existe para las tres muestras rugosas aún con una variación significativa de  $R_a$ , (ver tabla 6) sugiere que en algunos valles la punta del perfilómetro no entra.

Muestra ( $\mu\text{m}$ )	$R_a(x)$	( $\pm$ ) desv. estandard	$R_a(y)$	( $\pm$ ) desv. estandard
Pulido Espejo	0.042	0.008	0.044	0.012
1	1.539	0.128	1.454	0.074
2	2.143	0.141	2.201	0.094
3	3.493	0.354	3.795	0.341

Tabla 4 Rugosidad promedio  $R_a$  en acero inoxidable puro

Muestra ( $\mu\text{m}$ )	$R_a(x)$	( $\pm$ ) desv. estandard	$R_a(y)$	( $\pm$ ) desv. estandard
Pulido Espejo	0.018	0.005	0.020	0.005
1	1.557	0.274	1.574	0.193
2	2.284	0.150	2.268	0.270
3	3.500	0.330	3.461	0.377

Tabla 5 Rugosidad promedio  $R_a$  en los sustratos con recubrimiento de carbono amorfo

Muestra ( $\mu$ )	$R_t(x)$	( $\pm$ ) desv. estandard	$R_t(y)$	( $\pm$ ) desv. estandard
Pulido Espejo	0.374	0.260	0.436	0.274
1	10.057	2.216	11.138	1.098
2	9.109	1.800	10.570	2.530
3	13.127	3.279	16.963	5.906

Tabla 6 Rugosidad de alturas máximas  $R_t$  en los sustratos con recubrimiento de carbono amorfo

La topografía de las muestras se observó también con microscopía electrónica y las micrografías antes y después del depósito se muestran en las figuras 22 y 23, respectivamente. Es interesante hacer notar que los sustratos conservan la topología de la superficie antes y después del recubrimiento con carbono amorfo, sólo en las muestras de pulido espejo se ve que la película suaviza a las líneas que tiene la muestra antes del recubrimiento. También se ve que el recubrimiento de carbono amorfo no altera la rugosidad de la superficie, ya que esta se conservó aún con la película.

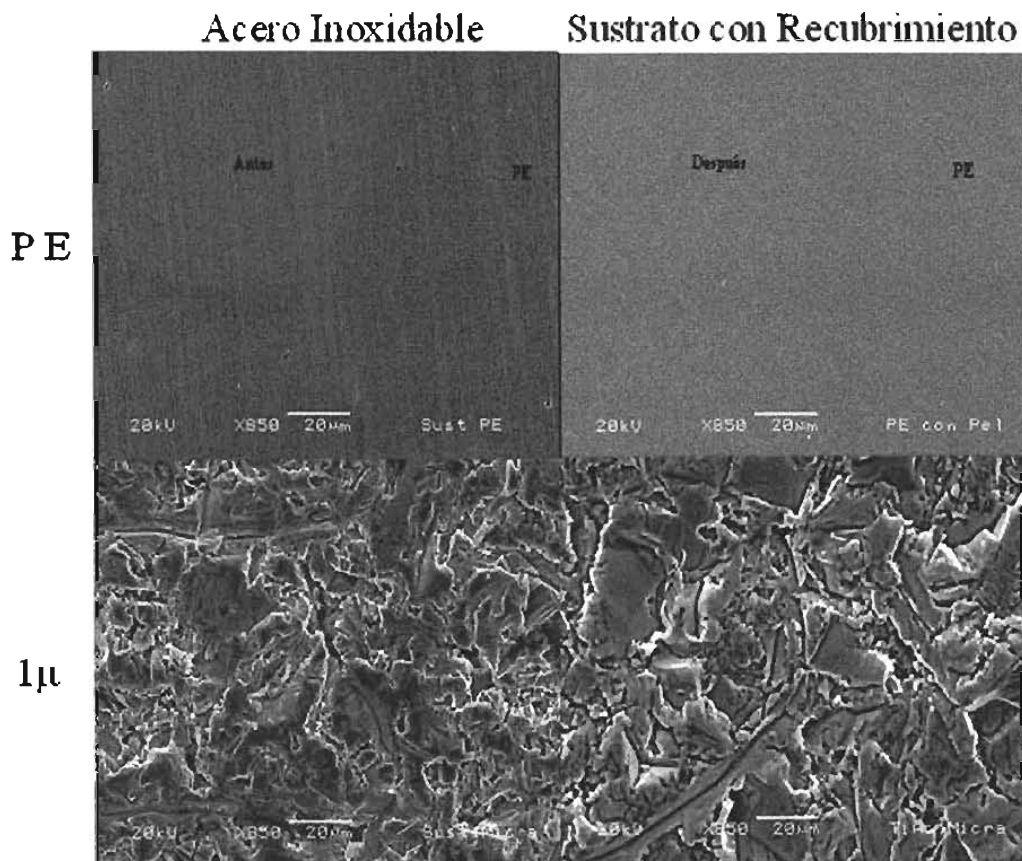


Figura 23 En las superficies izquierdas están los sustratos sin recubrimiento, en las superficies derechas se tiene el recubrimiento de a-C para pulido espejo y 1 micra

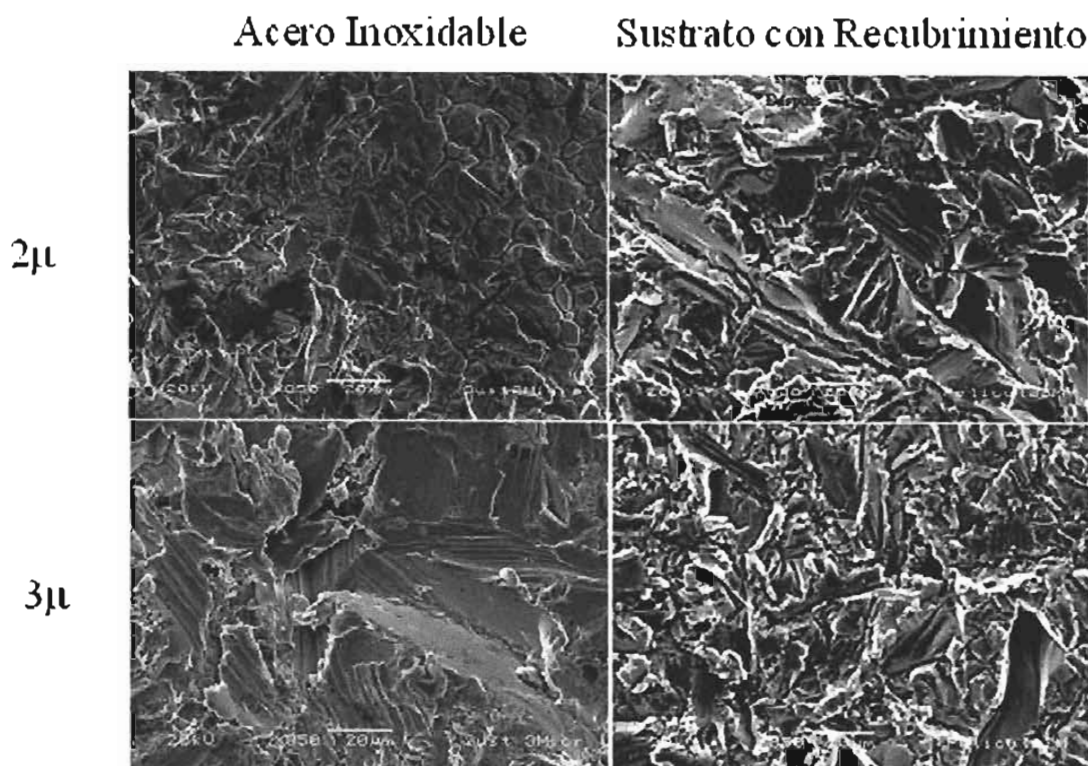


Figura 24 En las superficies izquierdas están los sustratos sin recubrimiento, en las superficies derechas se tiene el recubrimiento de a-C para pulido espejo y 1 micra

### Ángulo de contacto

El segundo análisis de caracterización que se realizó fue medir el ángulo de contacto, que nos indica qué tanto se moja la superficie y así saber que tipo de superficie se tiene, si hay un ángulo de contacto pequeño la superficie es hidrofílica y si el ángulo de contacto es grande la superficie es hidrofóbica [55].

Antes de realizar las mediciones del ángulo de contacto, las muestras se limpiaron de la siguiente manera, se enjuagaron con acetona, después con isopropanol y por último en agua destilada en el ultrasónico 15 minutos en cada una [28]. Las mediciones se llevaron a cabo a una temperatura de 23 °C.

El primer paso fue determinar si existía alguna dependencia del ángulo de contacto con el volumen del líquido utilizado. En la tabla 7, se muestran los datos de ángulo de contacto para las superficies de acero inoxidable puro, se muestran los promedios del ángulo de avance  $\theta_a$  (agregando líquido a la muestra) y del ángulo de retroceso  $\theta_r$  (quitando líquido a la muestra), con los errores correspondientes. En éstos resultados se muestran las

mediciones a diferentes volúmenes del líquido y se observa que la variación de ambos ángulos con el volumen del líquido resulta ser mínima.

Volumen de agua ( $\mu\text{l}$ )	$\theta_a$	$\theta_a$ ( $\pm$ ) desv.estandard	$\theta_r$	$\theta_r$ ( $\pm$ ) desv.estandard
6	89.5	7.091	81.5	7.010
8	89.25	6.187	83.25	6.187
10	89.5	4.900	85.0	4.880
12	89.5	3.047	87.5	3.047
14	90.0	2.370	89.25	2.360
16	90.0	2.450	90.0	2.070

Tabla 7 Ángulo de contacto para acero inoxidable puro, con diferentes volúmenes de líquido

En el conjunto de tablas 8, se muestran los resultados de la medición de ángulo de contacto para los sustratos de acero inoxidable puro, con un volumen fijo de 10 micro-litros de agua destilada, para pulido espejo, 1  $\mu\text{m}$ , 2  $\mu\text{m}$  y 3  $\mu\text{m}$ , los datos se tomaron a una temperatura de 23 °C.

P.E	$\theta_a$ ( $^\circ$ )	$\theta_r$ ( $^\circ$ )
	61	60
	61	60
	63	63
	61	60
	62	60
	61	59
	62	61
	61	60
	60	59
	62	60
Promedio	61.4	60.2
Desv.estandard	0.843	1.135

Pulido Espejo (8a)

1 $\mu\text{m}$	$\theta_a$ ( $^\circ$ )	$\theta_r$ ( $^\circ$ )
	46	45
	47	46
	46	45
	48	47
	44	43
	46	47
	46	47
	47	47
	47	48
	48	45
Promedio	46.5	46.0
Desv.estandard	1.178	1.490

1 Micrómetro (8b)

2 $\mu\text{m}$	$\theta_a$ ( $^\circ$ )	$\theta_r$ ( $^\circ$ )
	43	41
	43	42
	43	41
	42	42
	41	40
	43	42
	42	41
	43	40
	44	42
	41	40
Promedio	42.5	41.1
Desv.estandard	0.971	0.875

2 Micrómetro (8c)

3 $\mu\text{m}$	$\theta_a$ ( $^\circ$ )	$\theta_r$ ( $^\circ$ )
	37	35
	36	34
	36	35
	37	37
	38	36
	38	36
	37	35
	36	35
	37	35
	38	37
Promedio	37.0	35.5
Desv.estandard	0.816	0.971

3 Micrómetro (8d)

Tabla 8. Muestran el ángulo de contacto para acero inoxidable puro con volumen fijo de 10 $\mu\text{l}$  para: a) pulido espejo, b) 1  $\mu\text{m}$ , c) 2  $\mu\text{m}$  y d) 3  $\mu\text{m}$ .

El conjunto de tablas 9, muestra los resultados para ángulo de contacto en los sustratos con recubrimiento de a-C para volumen fijo de 10  $\mu\text{L}$ , para pulido espejo, 1, 2 y 3  $\mu\text{m}$ , las mediciones se tomaron a una temperatura de 25  $^{\circ}\text{C}$ .

Pulido Espejo	$\theta_A(^{\circ})$	$\theta_r(^{\circ})$
	61	60
	62	62
	62	61
	63	62
<b>Promedio</b>	<b>62.0</b>	<b>61.25</b>
<b>Desv.estandard</b>	<b>0.816</b>	<b>0.960</b>

(9 a)

2 $\mu\text{m}$	$\theta_A(^{\circ})$	$\theta_r(^{\circ})$
	54	52
	53	52
	53	53
	54	51
<b>Promedio</b>	<b>53.5</b>	<b>52.0</b>
<b>Desv.estandard</b>	<b>0.577</b>	<b>0.816</b>

(9 c)

1 $\mu\text{m}$	$\theta_A(^{\circ})$	$\theta_r(^{\circ})$
	57	55
	58	57
	57	56
	59	58
<b>Promedio</b>	<b>57.75</b>	<b>56.5</b>
<b>Desv.estandard</b>	<b>0.957</b>	<b>1.290</b>

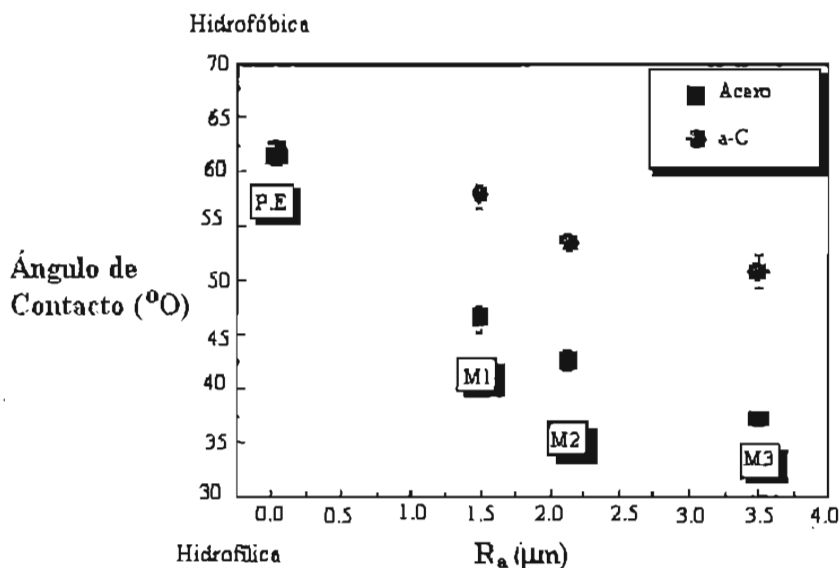
(9 b)

3 $\mu\text{m}$	$\theta_A(^{\circ})$	$\theta_r(^{\circ})$
	50	50
	49	48
	52	51
	52	51
<b>Promedio</b>	<b>50.75</b>	<b>50.0</b>
<b>Desv.estandard</b>	<b>1.5</b>	<b>1.414</b>

(9 d)

Tabla 9. Ángulo de contacto para los sustratos con película a-C, con volumen fijo de Líquido de 10  $\mu\text{l}$  para: a) pulido espejo, b) 1  $\mu\text{m}$ , c) 2  $\mu\text{m}$  y d) 3  $\mu\text{m}$ .

En la gráfica 3, se muestra la relación que hay entre el ángulo de contacto y la rugosidad, tanto para los sustratos de acero inoxidable puro, como para los sustratos con recubrimiento de a-C.



Gráfica 3 En la gráfica se muestra como a mayor rugosidad, menor ángulo de contacto.

Se observa que el ángulo de contacto en las superficies de a-C es mayor que en las muestras de acero inoxidable para rugosidades entre 1 – 3 μm. Aunque el valor para las muestras a pulido espejo coincide para ambas superficies.

Se observa que en las muestras de acero inoxidable el ángulo de contacto decae rápidamente al aumentar la rugosidad. Mientras que en el carbono amorfo la disminución es más gradual. En ambos materiales la superficie cambia de un carácter hidrofóbico a hidrofílico.



### Prueba Colorimétrica

Se muestran ahora los datos cuantitativos del porcentaje de adhesión celular obtenidas mediante la prueba Colorimétrica.

En las tablas 10 y 11, se presentan la absorbancia medida durante la prueba colorimétrica, para cada una de las rugosidades, junto con el control, para el carbono amorfo y el acero inoxidable, respectivamente.

	Control	0 $\mu\text{m}$	1 $\mu\text{m}$	2 $\mu\text{m}$	3 $\mu\text{m}$
A1	0.773	0.649	0.933	0.642	1.018
A2	0.742	0.752	0.668	0.979	1.643
A3	0.709	0.376	0.961	0.966	1.017
Promedio	0.741	0.592	0.854	0.862	1.226
Desv.estandard	0.032	0.194	0.161	0.190	0.361

Tabla 10 Datos de la prueba colorimétrica para las muestras con a-C

	Control	0 micras	1 micra	2 micras	3 micras
A1	2.305	1.063	1.314	1.220	1.227
A2	2.298	1.042	1.297	1.236	1.108
A3	2.378	1.159	1.129	1.092	1.153
Promedio	2.327	1.088	1.247	1.183	1.163
Desv.estandard	0.044	0.062	0.102	0.076	0.060

Tabla 11 Datos de la prueba colorimétrica para las muestras de acero inoxidable

El porcentaje de adhesión celular se calculó asumiendo que el número de células adheridas a la caja de cultivo, es decir el “control”, después de 24 horas de incubación, fue del 100%. También es necesario normalizar el valor de absorbancia al área, ya que en el caso del control se utiliza todo el fondo de la placa de cultivo, mientras que para las muestras sólo se considera un área de  $1 \text{ cm}^2$  determinada por la forma cuadrada de los substratos de acero inoxidable.

El área del control está dada por el diámetro de los pozos de cultivo:

$$\text{Area} = \pi r^2 = \pi(0.75)^2 = 1.76 \text{ cm}^2 \text{ Ec. 12}$$

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Para el caso de las películas de aC se sembraron inicialmente 10,000 células y la absorbancia promedio fue de 0.741, entonces la absorbancia normalizada está dada por

$$\frac{0.741}{abs} = \frac{1.76cm^2}{1cm^2}$$

De donde

$$\frac{abs}{\acute{a}rea} = 0.421 \frac{abs}{cm^2} \quad \text{Ec. 13}$$

Este valor corresponde a un 100% de células adheridas.

En el caso del acero inoxidable, en el que se sembraron inicialmente 30,000 células, la absorbancia fue de 2.3, esto es:

$$abs. 2.3 \text{ es a } 1.76cm^2$$

Y, por el procedimiento anterior, se obtiene la absorbancia normalizada que corresponde al 100% de células adheridas es

$$\frac{abs}{\acute{a}rea} = 1.3 \frac{abs}{cm^2} \quad \text{Ec. 14}$$

Donde los coeficientes 0.421 y 1.3 respectivamente proporcionan el valor normalizado de la absorbancia por unidad de superficie. Cabe señalar que como en el caso del acero el número de células cultivadas fue mayor, lo que implica que la absorbancia del control es mayor y la absorbancia normalizada también.

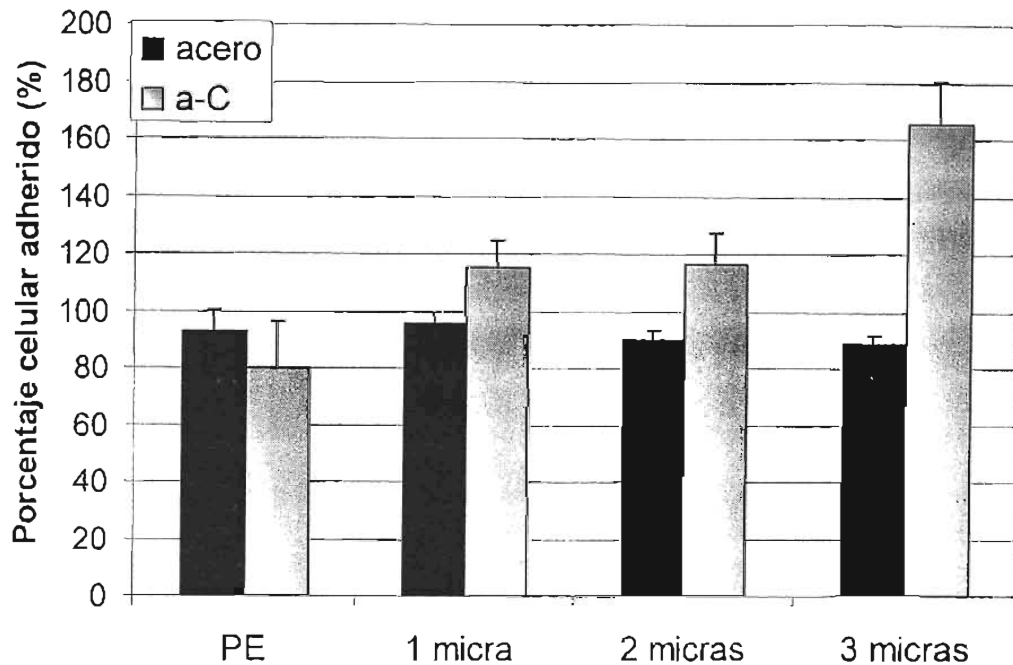
Considerando los promedios de absorbancia para cada rugosidad y el equivalente al 100% de adhesión se puede calcular el porcentaje de células adheridas en cada superficie, lo que se reporta en la tabla 12, comparando los sustratos de acero inoxidable puro contra los sustratos con recubrimiento y las diferentes rugosidades.

Muestra (μm)	Acero Inoxidable Puro (%)	Sustrato con recubrimiento a-C (%)
Control	100.000	100.000
Pulido Espejo	92.884	80.000
1	95.383	115.250
2	90.487	116.330
3	88.956	165.452

Tabla 12 Se muestra el porcentaje de adhesión celular mediante la prueba de prueba colorimétrica

En la gráfica 4, se muestra el porcentaje de adhesión celular, comparando los sustratos de acero inoxidable puro contra los sustratos con recubrimiento de a-C, en donde

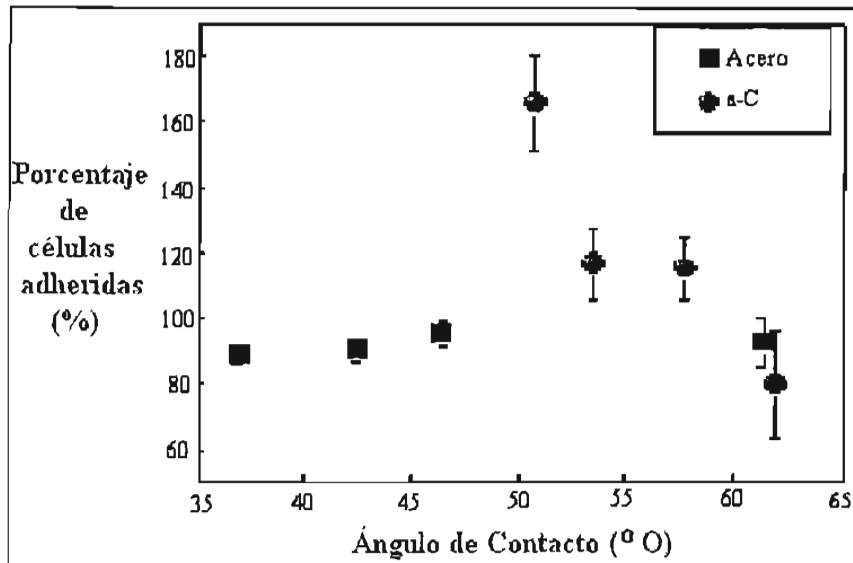
claramente se ve que los sustratos con recubrimiento son mucho más eficaces para la adhesión de células de osteoblasto humano, y de éstos es mayor el porcentaje de adhesión de dichas células para la rugosidad de 3 micras.



Gráfica 4 Adhesión celular, después de 24 horas del cultivo. Se compara el porcentaje de adhesión celular para las superficies de acero inoxidable, contra las superficies con recubrimiento de a-C

Se observa que en los sustratos con recubrimiento de a-C el porcentaje de adhesión celular varía notablemente de acuerdo a la rugosidad. Mientras que en los sustratos de acero inoxidable puro el porcentaje de adhesión no varía notablemente entre las diferentes rugosidades.

La gráfica 4 muestra que hay mucha mejor adhesión en los sustratos con recubrimiento de a-C, pues todos pasan del 100%, excepto en pulido espejo. Se puede concluir que la adhesión es eficaz en la superficie de a-C, mientras que en los sustratos de acero inoxidable puro, la adhesión celular es poco eficiente pues ninguna llega al 100%.



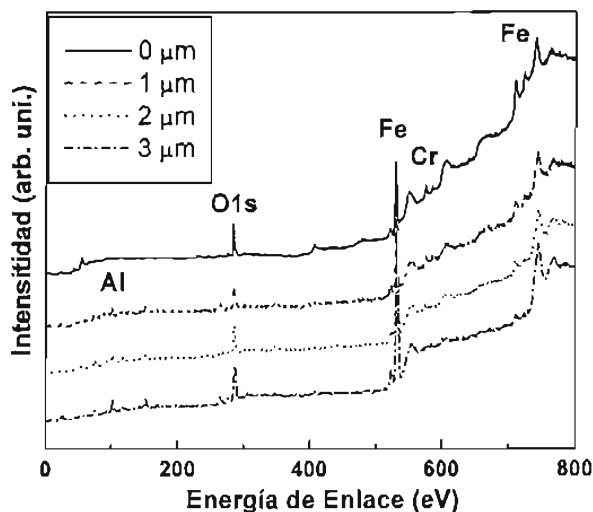
Gráfica 5 Se muestra la relación que existe entre el porcentaje de adhesión celular y el ángulo de contacto

Además, se observa que para los sustratos de acero inoxidable las células no tienen preferencia por las diferentes rugosidades, pues básicamente tienen el mismo número de células adheridas y este no rebasa por mucho el 50% de adhesión. Por otro lado se observa que para los sustratos con recubrimiento de a-C, la adhesión celular incrementa drásticamente conforme aumenta la rugosidad, alcanzando hasta un 160% de adhesión para una rugosidad de 3 micrómetros. El significado de un valor mayor al 100 %, es que se tiene un control, con una superficie tratada para que haya un 100% de adhesión, con lo cual al analizar las muestras después del cultivo y del tiempo de incubación se tuvo un número mayor de células de las que fueron sembradas en las muestras. Con lo cual podemos resumir para éste trabajo que las células de osteoblastos humanos se adhieren mejor en las superficies con recubrimiento de a-C con una rugosidad de 3 micras.

Por otro lado, si combinamos los resultados de rugosidad, ángulo de contacto y adhesión celular, se puede obtener la grafica 5 que muestra la variación de adhesión celular en función del ángulo de contacto. De esta manera se ve que para las superficies de a-C la adhesión celular es mayor mientras más pequeño sea el ángulo de contacto. Sin embargo, este resultado no puede generalizarse, ya que en el caso de acero, no se observa ninguna relación, a pesar de que la variación en ángulo de contacto es mayor.

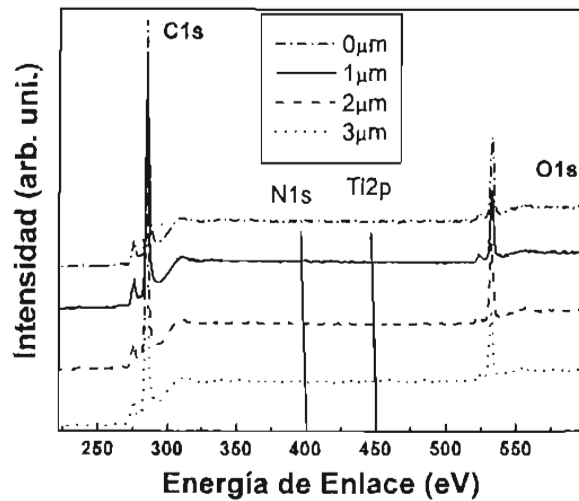
## Composición

En la gráfica 6 se muestra la composición de las superficies de acero inoxidable para las diferentes rugosidades estudiadas con espectroscopia de fotoelectrones. Los principales elementos y compuestos que se detectan en la superficie son: Fe, Cr, FeO<sub>x</sub>, CrO<sub>x</sub> y Al<sub>x</sub>O<sub>y</sub>. Se observa que la composición es prácticamente la misma tanto para las muestras rugosas como para las de pulido espejo, excepto porque la presencia de Al<sub>x</sub>O<sub>y</sub> que solo se encuentra en las muestras pulidas con el esmeril de carburo de silicio, pero que sospechamos tenga algún contaminante de alúmina.



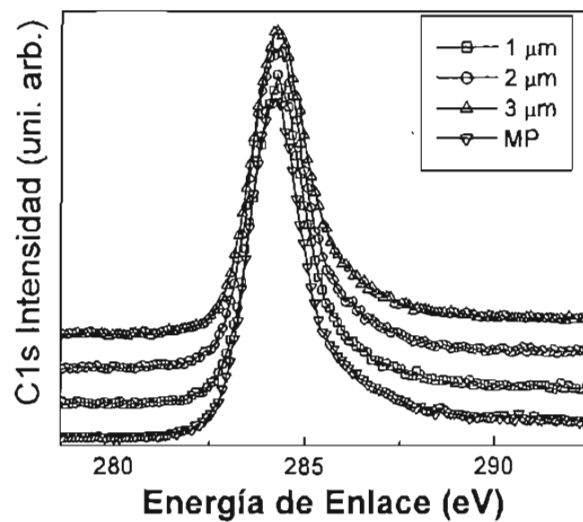
Gráfica 6 Se muestra el espectro de la composición química para las diferentes rugosidades

Por otro lado, en la gráfica 7 las muestras con el recubrimiento de la película de carbono amorfo se observa principalmente la señal de carbono a 285 eV y de oxígeno a 533 eV, el cual es seguramente proveniente de especies adsorbidas en la superficie. No se observó ninguna señal de los metales del sustrato (Fe o Cr), ni del recubrimiento de Titanio. Lo cual indica que el recubrimiento cubre totalmente la superficie de las muestras. La importancia de estos resultados es mostrar que la rugosidad no afecta la composición química.



Gráfica 7 Energía de enlace

En la gráfica 8 se muestra la señal del carbono (C1s) a alta resolución, para las superficies de las diferentes muestras, desde el pulido espejo hasta la rugosidad de 3 micras. La energía de enlace determina las características químicas de la muestra, y se puede ver que tanto el valor numérico de la energía, que es aproximadamente 285 eV, como la intensidad relativa y el ancho del pico son los mismos para las diferentes topografías estudiadas, esto también significa que las características químicas del recubrimiento no se modifican por el cambio en la topografía. Este hecho es importante en el presente estudio, ya que si las propiedades químicas del recubrimiento son las mismas, entonces se espera que la respuesta del comportamiento de los osteoblastos se deba únicamente a las diferentes rugosidades usadas.



Gráfica 8 Intensidad de la energía de enlace.

### Morfología Celular

Finalmente se analizó la adhesión celular de manera cualitativa. En carbono amorfo se estudió la morfología a diferentes períodos de tiempo y rugosidades. Mientras que en acero inoxidable solo se observa la morfología después de 24 horas de cultivo.

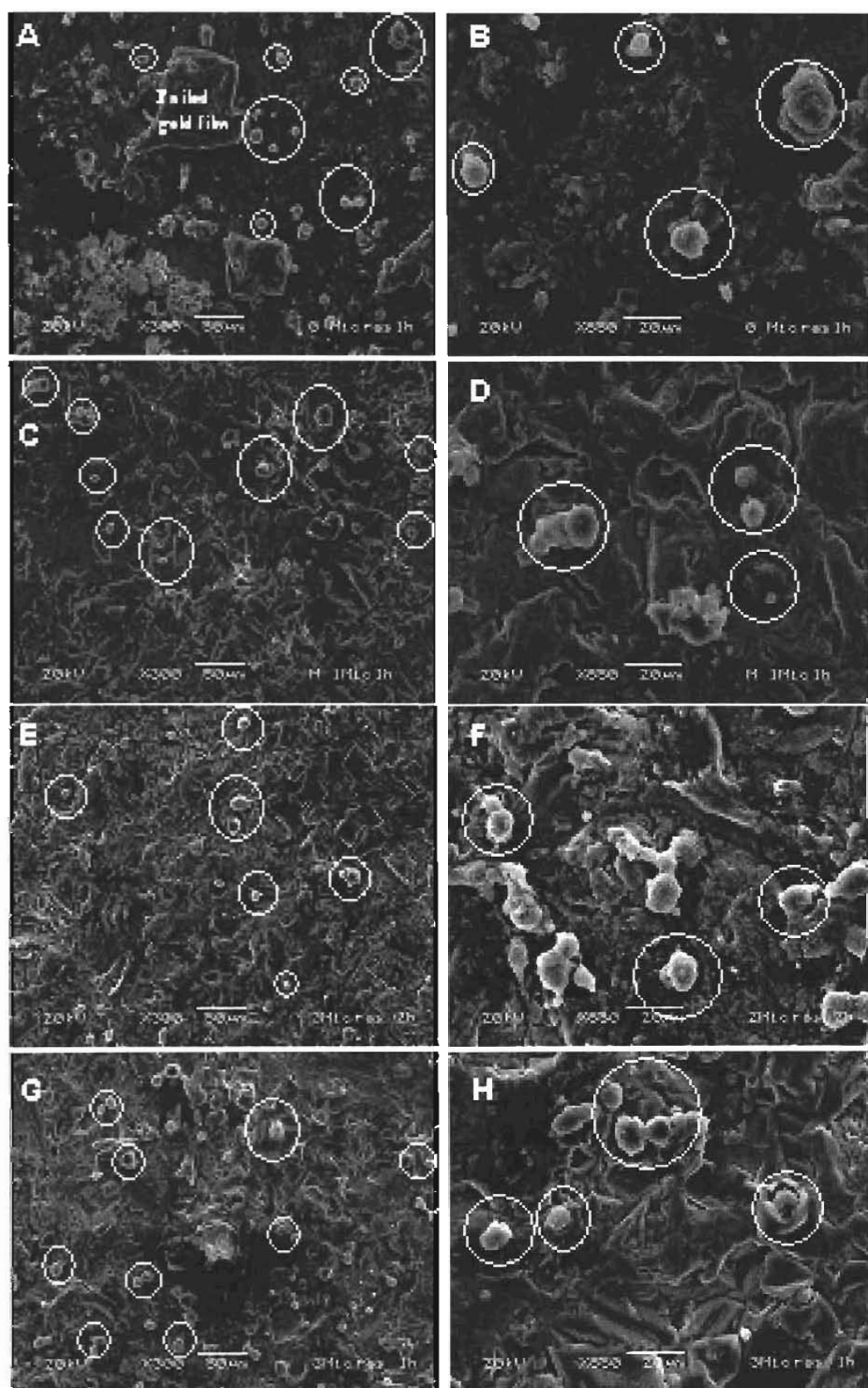


Figura 25. Sustratos con a-C, a 1hr.



En las imágenes del SEM (figura 25) se observan ampliificaciones de x300 y x850, aquí se tiene el cultivo de las células a una hora.

En A y B el cultivo es en los sustratos con recubrimiento de la película de a-C en pulido espejo, se ve claramente como hay una densidad grande de células y todas ellas están en forma esférica, es decir, todavía sin extenderse, las filopodias no se ven alargadas todavía y no hay tejido trabecular.

En C y D el cultivo es en los sustratos con recubrimiento con una rugosidad de 1 micra, también se ve una alta densidad de células, pero ninguna célula extendida. En E y F el cultivo es en los sustratos con recubrimiento (1hr) con rugosidad de 2 micras aquí hay también un alta densidad de células todas ellas redondas. G y H el cultivo es a una hora con recubrimiento con una rugosidad de 3 micras, hay una alta densidad de células redondas.

Como se ve en las imágenes en el cultivo en las cuatro rugosidades distintas hay una alta densidad de células redondas.

Esta morfología fue muy similar para periodos entre  $\frac{1}{2}$  - 4 horas.

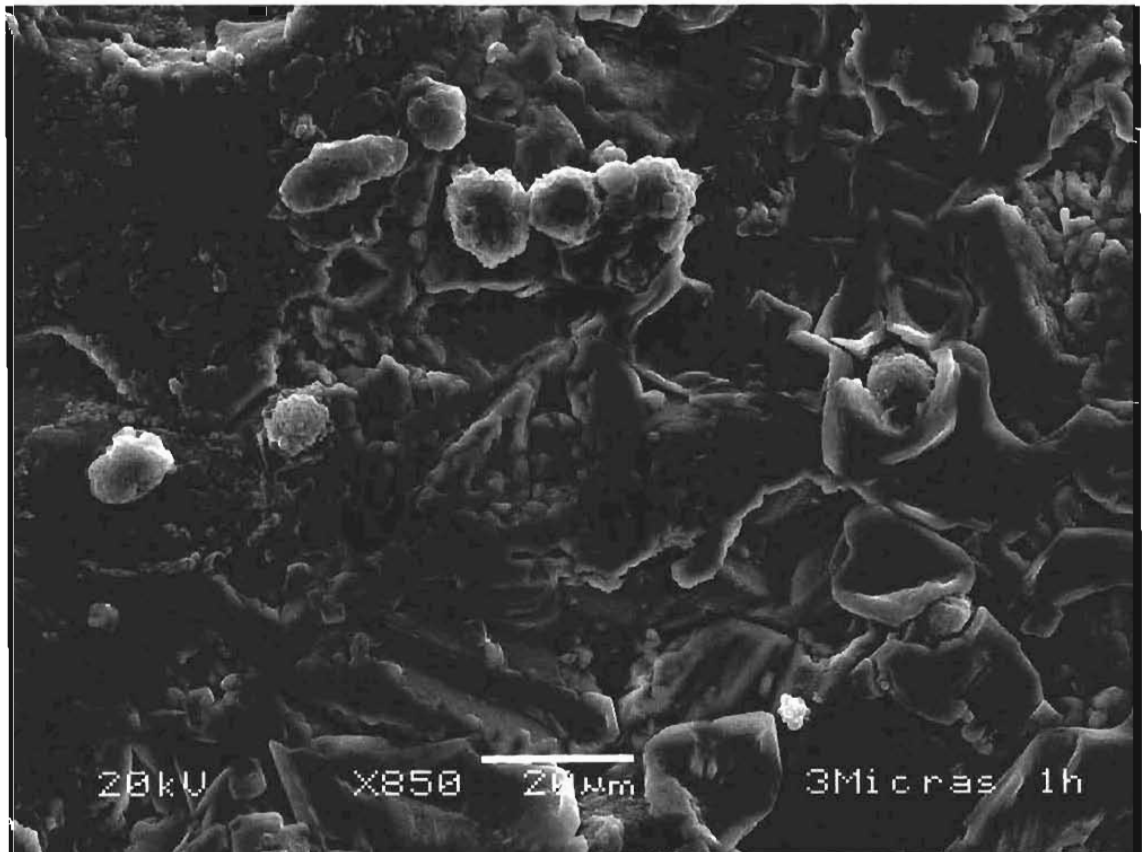


Figura 26 Sustratos con a-C, a  $\frac{1}{2}$  hr.

En las siguientes imágenes (figura 27) se tiene el cultivo a 24 horas en los sustratos con recubrimiento de a-C a diferentes rugosidades, se observa alta densidad de células, la mayoría de ellas tiene ya una morfología diferente, pues están ya extendidas, y se ve un alto porcentaje de tejido trabecular, sobre todo en las imágenes de 3 micras G y H.

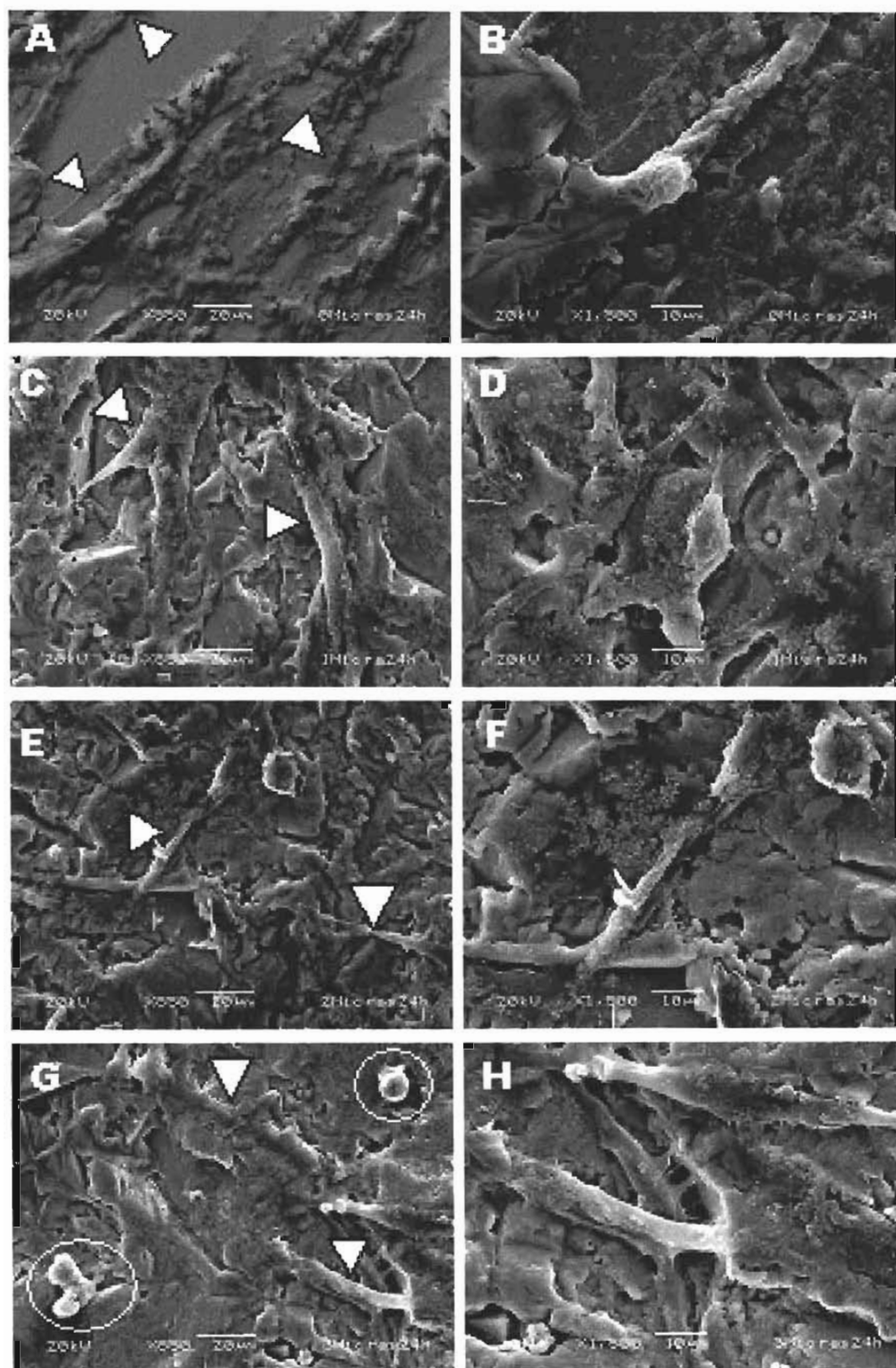


Figura 27 En A y B se tiene pulido espejo; en C y D es rugosidad de 1 micra; E y F se tiene la rugosidad de 2 micras y G y H son las superficies de 3 micras.

En las imágenes de la figura 27, se tiene el cultivo a 24 horas en los sustratos de acero inoxidable puro claramente se ve como la densidad de células es muy baja, y todas las células presentes en los diferentes rugosidades tienen forma redonda con lamelipodia alrededor, pero ninguna de ellas está ya alargada a pesar que son 24 horas de cultivo.

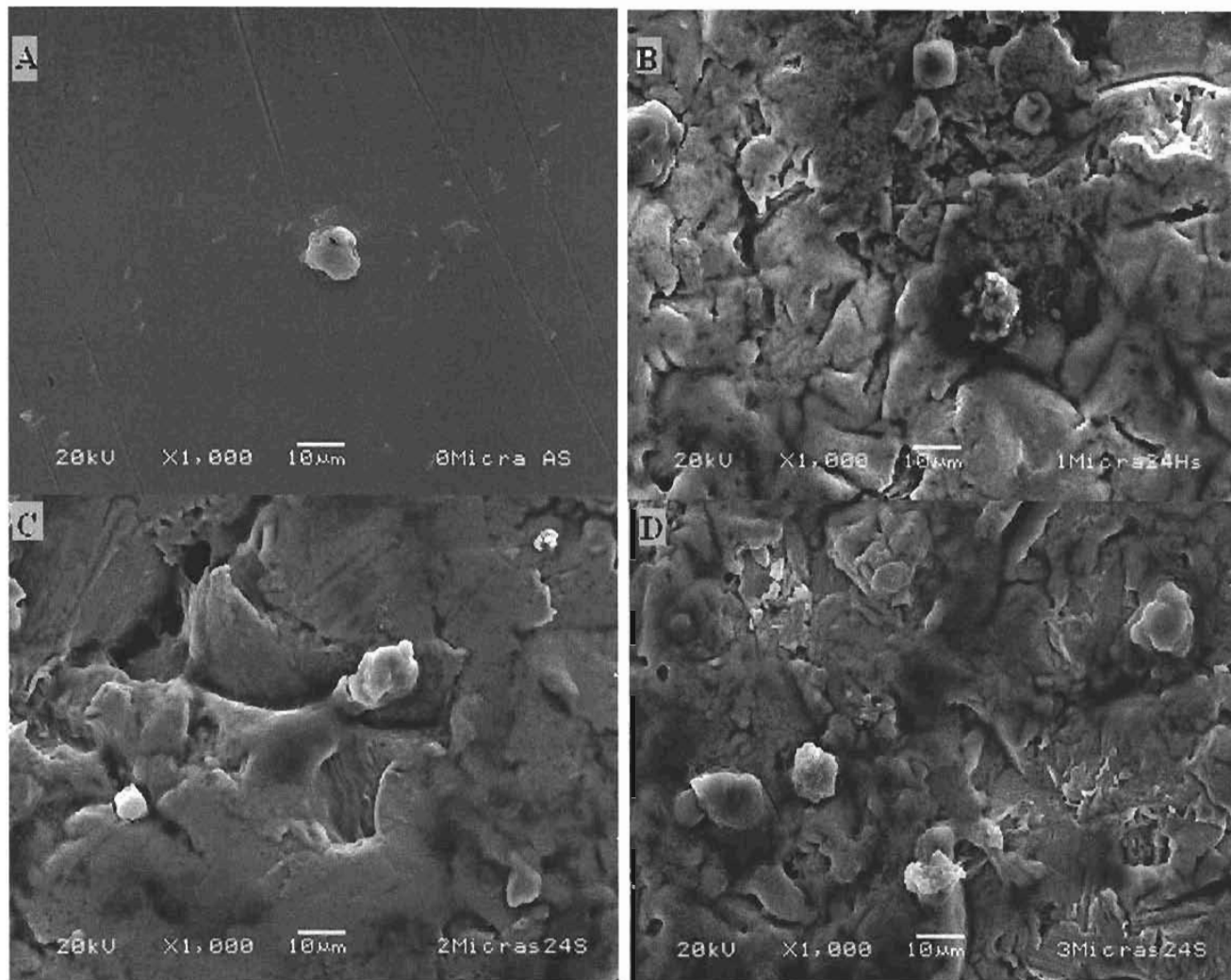


Figura 28 Muestras en acero inoxidable a 24 hrs. Después del cultivo. A pulido espejo; B 1 micra; C 2 micras y D 3 micras.

La forma de una célula cambia a medida que esta se esparce y arrastra sobre un sustrato para ocupar el espacio vacío, y esto tiene un gran impacto en el crecimiento, división y la sobrevivencia celular. La mayoría de las células necesitan adherirse para crecer y proliferar, lo cual se conoce como la dependencia al anclaje, ejemplos típicos son los fibroblastos, osteoblastos y las células epiteliales. En estos casos, las células que se esparcen sobre

grandes áreas sobreviven y proliferan mejor que aquellas que no se expanden. Factores externos, como la topografía superficial o la composición del sustrato son factores importantes que controlan la forma de esparcirse de las células y su orientación en el espacio. Los cambios morfológicos que ocurren durante la adhesión y esparcimiento de las células corresponden a la reorganización del citoesqueleto, estructura que juega un papel importante en el control de la forma y el comportamiento celular. Los resultados de este estudio muestran, a través de observar la morfología celular con el microscopio de barrido electrónico, que los osteoblastos cultivados en superficies de carbono amorfo se “esparcieron” sobre la superficie expandiéndose completamente, independientemente de la rugosidad promedio. Mientras que sobre el acero inoxidable, todas las células mantuvieron su forma redonda. Esta diferencia también se ve reflejada en las medidas cuantitativas del número de células adheridas, demostrando que la forma celular tuvo una fuerte influencia en la adhesión celular al sustrato.

# Capítulo 6

## Capítulo 6. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir que:

- Se observó que en las películas de carbono amorfo, las células de osteoblastos se adhirieron en mayor cantidad que en el sustrato metálico.
- La presencia de la película de carbono amorfo favorece el crecimiento de las células de osteoblastos.
- El porcentaje de células adheridas en las superficies con recubrimiento de carbono amorfo es aproximadamente 50% mayor, que en las superficies sin recubrimiento.
- El grado de rugosidad en la superficie del sustrato es un factor importante para la adhesión de las células de osteoblastos. En éste trabajo se encontró que la rugosidad más eficiente esta dada por 3 micras. Este resultado es consistente ya que hay más área de contacto en la superficie del sustrato donde la célula tiene mayor adhesión.
- La superficie rugosa incrementa el carácter hidrofílico tanto del recubrimiento de carbono amorfo, como del sustrato de acero inoxidable.
- Las células adheridas en aceros recubiertos con carbono amorfo adoptan una morfología más alargada, es decir, extienden el citoesqueleto, que aquellas células adheridas en superficies sin recubrimiento.
- La topografía de la superficie con recubrimiento mejora la adhesión celular que se incrementa conforme aumenta la rugosidad, al menos hasta 3 micras. Por otro lado, en las superficies de acero sin recubrimiento, la rugosidad no es significativa en la adhesión celular.
- Se encontró que el ni grado de rugosidad, ni el ángulo de contacto afectan la adhesión de osteoblastos en los sustratos de acero inoxidable, lo que parece indicar que en dicho caso es la composición química el principal factor que determina la respuesta biológica.

## Glosario.

- *Biotolerancia*, capacidad del material para aceptar los factores biológicos sin alterarse.
- *Cadherinas*, son moléculas de transmembrana que tienen un papel clave en la adhesión celular por medio del establecimiento de interacciones calcio dependientes. También conectan el ambiente extracelular al citoesqueleto interactuando con algunas proteínas.
- *CAM*, (Moléculas de adhesión celular) Son glicoproteínas ubicadas en la superficie celular que constituyen receptores celulares. Tienen en un extremo un grupo carboxilo, el llamado carboxi-terminal, que se encuentra fijo en el citoplasma y en el cito-esqueleto. A continuación del carboxi-terminal se encuentra la región transmembrana, que atraviesa la membrana celular. El resto de la glicoproteína se ubica extracelularmente y termina en un grupo amino, el amino-terminal que da la especificidad a la molécula para unirse a otras CAMs. Se ha descrito intervención de las CAMs en múltiples enfermedades, y los reportes bibliográficos son cada vez más numerosos. La diseminación de metástasis estaría dada por la alteración de las CAMs en las células tumorales y se están comunicando alteraciones de estas moléculas en diferentes enfermedades malignas. También se relacionan estos receptores con enfermedades reumatológicas.
- *Cigote*, (gr. *Zygotes*, yugado). Célula formada por la unión de dos gametos.
- *Célula*, (del latín *cella*, cámara) la más pequeña unidad estructural de los seres vivos capaz de funcionar independientemente.
- *Citosol*, partes sin estructura del citoplasma; matriz citoplásmica que aloja los organelos.
- *Diploide*, (del griego *di*, doble; *ploion*, nave) organismo o fase nuclear que tiene los dos juegos de cromosomas. Número cigótico de cromosomas ( $2n$ ), por oposición al número gamético ( $n$ ) o haploide.
- *Filopodio*, eje de un tallo formado por bases de tejido fusionado.
- *Hidrofílico*, (del latín *hydro*, agua; *philios*, amigo) término aplicable a las moléculas polares que pueden formar puentes de hidrógeno con el agua.



- *Hidrofóbico*, (del latín *hydro* = agua, del griego *phobeo* = "yo temo") Término aplicable a las moléculas apolares que no pueden formar puentes hidrógeno con el agua.
- *Integrinas*, son las principales clases de Moléculas de Adhesión Celular que interaccionan entre la célula y la matriz (aunque las selectinas y proteoglucanos también intervienen en la fijación). Las integrinas están compuestas por dos subunidades diferentes (heterodímeros) que toman el nombre de alfa (con 17 tipos diferentes) y beta (con ocho tipos diferentes), lo cual permite un gran número de combinaciones. Un gran número de virus y bacterias suelen utilizarlas para penetrar en las células.
- *Lamelipodio*, prolongaciones emitidas por fibroblastos que sirven para generar un movimiento fibroblástico
- *Linfocitos*, son células responsables de las respuestas inmunitarias (inmune, del latín, libre de carga). Se desarrollan a partir de progenitores linfoides inmaduros y se dividen en dos grandes grupos, linfocitos B y linfocitos T.
- *Macrófago*, son células que se caracterizan por su capacidad de degradar material.
- *Monómero*, (del griego monos, solo; meros, parte) molécula pequeña que se encuentra respectivamente en otra más grande.
- *Osteoblasto*, Célula productora de tejido óseo.
- *Tejido Trabecular*, es el tejido que forma la red interna de los huesos, representa un 25 % del esqueleto.

## Bibliografía

---

- 1 Gurley A.M, Ruth S. I, *Bone*, ed. Histology for Pathologists. NY, 1992. 61-80.
- 2 Jaime y col 1996 Puzas J.E, *The Osteoblast. Metabolic bone diseases and disorders of Mineral Metabolism*, 2a edición, Raven Press, NY, 1993, 15-20.
- 3 A. Grill, *Diamond-like carbon coatings as biocompatible materials-an overview*. Diamond and Related Materials (2003).
- 4 G. Ciapetti, et. al. *In vitro testing of cytotoxicity of Materials*, Biomaterials and Bioengineering handbook. Marcel Dekker,, ed. D.L. Wise. NY 2000.
- 5 P. K Chu., et. all., *Plasma-surface modification of biomaterials*, Materials Science and Engineering R 36 (2002)143-206.
- 6 Armin Bolz, *Applications of thin-film technology in biomedical engineering*, D. L Wise, D. J. Trantolo, *Encyclopedic handbook of biomaterials and engineering*, N. Y 1995.
- 7 Von Recum A, Jacobi JE, *Handbook of biomaterials evaluation: Scientific, technical and clinical testing of implant materials*, ed 2. Philadelphia, PA, Taylor & Francis, 1999.
- 8 K. Anselme, et. all. *Improvement in the morphology of Ti-based surfaces: a new process to increase in vitro human osteoblast response*, Biomaterials 23 (2002) 1563-1577
- 9 Boyan B, et all. *Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response*, Elsevier science limited, 1996.
- 10 Boyan B y Schwartz Z. *Modulation of osteogenesis via implant surface design*.
- 11 Burstein AH, Wright TM, *Fundamentals of Orthopaedic Biomechanics*. Baltimore, MD, Williams & Wilkins, 1994.
- 12 American Society for Testing and Materials. *1998 ASTM Book of Standards*, Volume 13.01 *Medical Devices and Services*. West Conshohocken, PA.
- 13 B. D Boyan, et. al. *Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition*, Biomaterials 19 (1998) 2219-2232.
- 14 N C. Cooper, et. al, *Surface Structure and sputtering in amorphous carbon thin films a tight-binding study of film deposition*, J Phys.: Condens. Matter 14 (2002) 723-730.
- 15 B. Chehroudi and DM. Brunette, *Effects of Surface Topography on Cell Behavior*, Biomaterials and Bioengineering Handbook, Marcel Dekker, ed. D. L Wise N. Y 2000.

- 
- 16 <http://www2.udec.cl>. Implantes
- 17 <http://www.protesisdental.info>. Implantes Dentales
- 18 <http://www.dentalcolombia.com>. Estructura de Implantes Dentales.
- 19 Branenmark Lian JB, Stein GS, *Concepts of osteoblasts growth and differentiation: Basis for modulation of bone cell development and tissue, Biomateriales*; 332: 305 – 311 (1995).
- 20 <http://www.detalqb.com>. Estructura de Implantes Dentales.
- 21 Tartsman J. P. y Saha S. J. *Bone Joint Surg*; 501A, 419 – 425 (1977).
- 22 Kawanabe, K ; Tamura, T ; Nakamura, T ; Kokubo, T y Yushihara, S, *Biomateriales* ; 4, 135 – 141 (1993).
- 23 Quiroz Gutiérrez F. *Anatomía Humana*, Editorial Porrúa, México 1985.
- 24 <http://arrakis.es>. Implantes Ortopédicos, enfermedades degenerativas.
- 25 <http://www.protesisrodilla.cl>. Implantes Ortopédicos, rodilla.
- 26 <http://www.protesiscadera.cl>. Implantes Ortopédicos, cadera.
- 27 <http://www.protesiscaderahm.cl>. Implantes Ortopédicos, hombro.
- 28 Rodil S.E, et. al, *Properties of carbon films and their biocompatibility using in vitro tests*. *Diamond and related material* 12 (2003) 931-937.
- 29 Jee, W; Webster S. S. *Integrated Bone Tissue Physiology: Anatomy and Physiology*. University of Utah, 2001.
- 30 Kohn, D. H. *Structure – Property Relations of biomaterials for hard Tissue Replacement*, University of Michigan, 1998.
- 31 Jee, W; Webster S. S. *Integrated Bone Tissue Physiology: Anatomy and Physiology*. University of Utah, 2001.
- 32 Rodil S. E., et. al, *In vitro studies of the mineralization in amorphous carbon films*. *Surface and Coatings Technology* 177-178 (2004) 758-764.
- 33 S.E Rodil, R Olivares, H. Arzate, *Biomedical materials and engineering* 15: 101 (2005).
- 34 González – Muron M; *Técnicas en Biología Celular, Teoría y Práctica*. Agt. Edition, 1996.
- 35 Byers PD, Woods CG; *The Growth, Arquitectura and Structure of bone*. *Surface and Coatings Technology*, 1994: 509 – 526.

- 
- 36 <http://www.ncbi.nlm.gov>. Biología Molecular
- 37 Caviedes Bucheli J, Ayala Muñoz M; *Estandarización de cultivo de fibroblastos de tejido pulpar humano*, Journal of Endodontics, 2002.
- 38 <http://www.detalqb.com>. Biología Molecular, cultivos celulares.
- 39 Tartsman J. P. y Saha S. J. *Bone Joint Surg*; 501A, 419 – 425 (1977).
- 40 Evans SC, Ferris BD; *Airport metal detectors and orthopaedic implants*. Acta Orthop Scand 64: 643, 1994.
- 41 Pérez Ybarra R, Las células madre somáticas son capaces de generar osteoblastos, Genética, 2002
- 42 Mow VC, Soslowsky LJ; *Basic Orthopaedic Biomechanics*, Raven, NY, 245 – 292 (1991).
- 43 Chu PK, Chen JY, Wang LP, Huang N, *Plasma-surface modification of biomaterials*, Materials Science and Engineering 36: 143 – 206 (2002)
- 44 Manual operacional de perfilometría.
- 45 Bennet J y Mattsson L. *Introduction to Surface Roughness and Setting*. Optical Society of America, Washington, D. C, 1989
- 46 Flores M. M. *Recubrimientos de TiN/Ti depositados sobre zinalco por espurreo*, Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, 1997
- 47 Magaña Zavala Carlos Raúl, *Obtención y Caracterización de Películas Delgadas Electrocrómicas de Oxido de Niquel, a partir de la Técnica de Magnetron Sputtering o Espurreo Catódico*, Tesis de maestría, UNAM mayo 2002.
- 48 Drelich J y Millar J. *The effect of solid surface heterogeneity and roughness on the contact angle/drop (bubble) size relationship*, journal, 1994
- 49 Smith TJ, *Colloid Interface Sci*; 75, 51 (1980).
- 50 Surface electro optics. *Contact angle and surface tension analyzer*. Cheadle, Cheshire, England, s/f
- 51 <http://redquimica.pquim.unam.mx>. Óptica.
- 52 Harper G, *Accuracy validativa in ELISA test*, Biologicals, 31: 231 ( 2003).
- 53 Vázquez G y Echeverría O. *Introducción a la microscopia electrónica aplicada a las ciencias biológicas*. Facultad de Ciencias, UNAM, 2000.

---

54 <http://omega.ilce.edu>. Fotoemisión de rayos X.

55 Miller R. *Rapid method for determining the degree of cleanliness of metal surfaces. protection and Performance*. Mayo 1973