



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial

Análisis de la influencia de los elementos de aleación en la
formación del biofilm sobre aleaciones de titanio
pulvimetalúrgicas

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ingeniería Biomédica

AUTOR/A: Guillén Carrillo, Lucia

Tutor/a: Amigó Borrás, Vicente

Cotutor/a: Milian Medina, Lara

Cotutor/a externo: Tormo Mas, M^a Angeles

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecerle a Vicente Amigó la oportunidad de dejarme trabajar junto a él. Por orientarme y enseñarme todo lo que ha estado en su mano con gran dedicación. Ha sido un gran mentor y un ejemplo a seguir. Agradecerle también a Irene por su paciencia y por todo lo que me ha enseñado, es una gran maestra y una suerte haber aprendido de ella estos meses.

Por otro lado, mencionar a mi pilar fundamental, mi familia. Que me han apoyado durante toda la carrera y creían en mí incluso cuando yo no lo hacía. Mi hermana, mi madre, mi padre y Óscar gracias a su confianza y su gran apoyo. No lo habría conseguido sin vosotros.

A mis amigas, porque sin saberlo han sido mi bastón durante 4 años. Gracias.

RESUMEN

En los últimos años, la demanda de implantes dentales en España ha experimentado un incremento notable, debido tanto al envejecimiento de la población como a una mayor conciencia sobre la salud bucodental. Según el Consejo General de Dentistas de España, aproximadamente un millón de personas se someten cada año a la colocación de implantes dentales, lo que representa alrededor del 12% de la población adulta. Este dato evidencia la gran relevancia de los implantes dentales como una solución cada vez más común para la pérdida de dientes (Consejo General de Dentistas de España, 2023).

En el campo de la odontología, la búsqueda de materiales biocompatibles ha cobrado gran importancia debido a posibles efectos adversos asociados a las aleaciones metálicas tradicionales como el Ti6Al4V y el Ti6Al7Nb, ampliamente utilizadas en implantes dentales. Estudios recientes han demostrado que los iones liberados por estas aleaciones pueden ser nocivos para la salud, lo que ha impulsado a la investigación de alternativas más seguras.

Durante el presente trabajo final de grado, se evalúa una nueva aleación tipo beta desarrollada por técnicas pulvimetalúrgicas convencionales. La base está compuesta de Ti-35Nb-7Zr-5Ta y en esta investigación se quiere comprobar que efectos presenta la adición de estaño y/o hafnio tanto a nivel biológico como mecánico. Para ello, se han llevado a cabo estudios para evaluar las propiedades mecánicas como el micropunzonado y se ha evaluado la viabilidad celular y biocompatibilidad del material mediante ensayos de adhesión, proliferación, citotoxicidad y expresión génica. Para realizar los ensayos se han empleado células madre de pulpa dental humana (hDPSC) y MG-63, provenientes de osteosarcoma.

Los resultados obtenidos en esta investigación reflejan que el comportamiento biológico de las aleaciones es el adecuado. La adición de estaño y/o hafnio no presenta ningún inconveniente para la viabilidad celular, e incluso mejoran la proliferación de línea celular MG-63.

Palabras clave: Titanio beta, TNZT, hafnio, estaño, microestructura, Ti-35Nb-7Zr-5Ta, estaño, hafnio, pulvimetalurgia, modulo elástico, hDPSC y MG-63.

RESUM

En els últims anys, la demanda d'implants dentals a Espanya ha experimentat un increment notable, degut tant a l'envelliment de la població com a una major consciència sobre la salut bucodental. Segons el Consell General de Dentistes d'Espanya, aproximadament un milió de persones se sotmeten cada any a la col·locació d'implants dentals, que representa al voltant del 12% de la població adulta. Aquesta dada evidència la gran rellevància dels implants dentals com una solució cada vegada més comuna per a la pèrdua del dents (Consejo General de Dentistas de España, 2023).

En el camp de l'odontologia, la cerca del materials biocompatibles ha cobrat gran importància degut a possible efectes adversos associats a les aliatges metàl·liques tradicionals com el Ti6Al4V i el Ti6Al7Nb, àmpliament utilitzades en implants dentals. Estudis recents han demostrat que els ions alliberats per aquestes aliatges poden ser nocius per a la salut, la qual cosa ha impulsat la investigació d'alternatives més segures.

Durant aquest treball final de grau, s'avalua una nova aliatge tipus beta desenvolupada per tècniques pulvimetal·lúrgies convencionals. La base està composta de Ti-35Nb-7Zr-5Ta i en aquesta investigació es vol comprovar quins efectes presenta l'addició d'estany i/o hafni tant a nivell biològic com mecànic. Per a això, s'han dut a terme estudis per a l'avaluació de les propietats mecàniques com el micropunxonat i s'ha avaluat la viabilitat cel·lular i biocompatibilitat del material mitjançant assajos d'adhesió, proliferació, citotoxicitat i expressió gènica. Per a realitzar els assajos s'han emprat cèl·lules mare de polpa dental humana (hDPSC) i MG-63, procedents d'osteosarcoma.

Els resultats obtinguts en aquesta investigació reflecteixen que el comportament biològic de les aliatges és l'adequat. L'addició d'estany i/o hafni no presenta cap inconvenient per a la viabilitat cel·lular, fins i tot milloren la proliferació de la línia cel·lular MG-63.

Paraules clau: Titani beta, TNZT, hafni, estany, microestructura, Ti-35Nb-7Zr-5Ta, estany, hafni, pulvimetal·lúrgia, mòdul elàstic, hDPSC i MG-63.

ABSTRACT

In recent years, the demand for dental implants in Spain has experienced a notable increase, due to both the aging of the population and a greater awareness of oral health. According to the General Council of Dentists of Spain, approximately one million people undergo dental implant placement each year, representing around 12% of the adult population. This data shows the great relevance of dental implants as an increasingly common solution for tooth loss (Consejo General de Dentistas de España, 2023).

In the field of dentistry, the search for biocompatible materials has gained great importance due to possible adverse effects associated with traditional metal alloys such as Ti6Al4V and Ti6Al7Nb, which are widely used in dental implants. Recent studies have shown that the ions released by these alloys can be harmful to health, which has prompted research into safer alternatives.

During this final degree work, a new beta type alloy developed by conventional powder metallurgical techniques is evaluated. The base is composed of Ti-35Nb-7Zr-5Ta and in this research we wanted to test the effects of the addition of tin and hafnium both biologically and mechanically. For this purpose, studies have been carried out to evaluate the mechanical properties such as SmallPunch and the cell viability and biocompatibility of the material have been evaluated by means of adhesion, proliferation, cytotoxicity and gene expression assays. Human dental pulp stem cells (hDPSC) and MG-63, from osteosarcoma, were used to carry out the tests.

The results obtained in this research show that the biological behavior of the alloys is adequate. The addition of tin and/or hafnium does not present any inconvenience for cell viability, and even improves the proliferation of the MG-63 cell line.

Keywords: Beta titanium, TNZT, hafnium, microstructure, Ti-35Nb-7Zr-5Ta, hafnium, powder metallurgy, elastic modulus, hDPSC, MG-63.

DOCUMENTOS CONTENIDOS EN EL TRABAJO

- Documento 1: Memoria
- Documento 2: Presupuesto

ÍNDICE DOCUMENTO 1 - MEMORIA

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.1.1. Aleaciones de titanio y biocompatibilidad	2
1.1.2. Osteointegración y complicaciones asociadas a los implantes dentales	4
1.1. Motivación	6
2. OBJETIVOS	7
3. PLANIFICACIÓN	8
Fase 1 – Diseño y fabricación de los materiales	8
Fase 2 – Caracterización mecánica de las aleaciones	10
Fase 3 – Análisis biológico	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1. Fabricación de los materiales	12
4.1.1. Selección y mezcla de los polvos	12
4.1.2. Compactación	14
4.1.3. Sinterización de los polvos compactos	15
4.1.4. Corte de las muestras	19
4.1.5. Esterilización por autoclave	19
4.1.6. Realización de los electrolitos	20
4.2. Caracterización mecánica	21
4.2.1. Micropunzonado (<i>Small Punch</i>)	21
4.3. Análisis biológico	23
4.3.1. Selección de las líneas celulares	23
4.3.2. Preparación de células en el material	24
4.3.3. Tripsinización y conteo de células DPSC y MG63	25
4.3.4. Siembra para evaluación de adhesión, proliferación, expresión génica y HRFSEM	27
4.3.5. Fijación de las células de adhesión, proliferación y HRFSEM	29
4.3.6. Protocolo para evaluación de citotoxicidad – MTS	32
4.3.7. Protocolo para evaluación de expresión génica	33
5. RESULTADOS	39
5.1. Fabricación de los materiales	39

5.1.1.	Caracterización tras la compactación.....	39
5.1.2.	Caracterización tras la sinterización.....	41
5.2.1.	Micropunzonado (Small Punch).....	45
5.3.1.	Adhesión.....	47
5.3.2.	Proliferación	49
5.3.3.	Citotoxicidad – MTS	51
5.3.4.	Expresión génica – <i>Real Time</i> PCR.....	51
5.3.5.	Imágenes en HRFESM.....	53
6.	DISCUSIÓN	54
7.	PROBLEMÁTICA	59
8.	CONCLUSIONES	61
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ÍNDICE DOCUMENTO 2 - PRESUPUESTO		
1.	CUADRO DE PRECIOS UNITARIOS.....	1
2.	CUADRO DE PRECIOS DESCOMPUESTOS.....	5
3.	PRESUPUESTO TOTAL	10

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1: Modulo elástico de aleaciones de uso biomédico y hueso (Zhang y Chen, 2019)	3
Figura 2: Representación de la osteointegración oral desde la inserción del implante durante 24h hasta 8 semanas (Silva et al., 2022).	4
Figura 3: Formación de la biopelícula bacteriana sobre implantes dentales	5
Figura 4: Planificación del proyecto	8
Figura 5: Proceso de sinterización de los compactos.	16
Figura 6: Equipo Son-Elastic.	17
Figura 7: Equipo de medición del método Arquímedes.	18
Figura 8: Sistema de autoclave.....	19
Figura 9: Botes con las muestras y el electrolito Ringer Hartmann.....	20
Figura 10: Montaje Soporte-probeta, bola y punzón del Small Punch test (Arunkumar, 2019)	22
Figura 11: Muestra tras el ensayo Small Punch (Arunkumar, 2019)	22
Figura 12: Células MG-63 microscopio óptico.....	24
Figura 13: Células hDPSC microscopio óptico.....	24
Figura 14: Proceso tripsinización, del frasco de cultivo a bote evitando	26
Figura 15: Contador de células EVE automatic cell counter	26
Figura 16: Control de adhesión.	28
Figura 17: Disposición de las muestras para el ensayo de adhesión, proliferación y expresión génica.	29
Figura 18: Imágenes extraídas de un control de proliferación de hDPSC, a) cambio de la imagen a binaria para extraer el fondo. b) extracción de la forma de los núcleos. c) centro de cada núcleo. d)máscara sobre los núcleos.	31
Figura 19: Disposición del cultivo celular para el ensayo de citotoxicidad.	32
Figura 20: Resultados del Small Punch. Fuerza (N) vs desplazamiento (mm).....	45

Figura 21: Adhesión a) Muestra de <i>Ti6Al7Nb</i> DPSC 182 núcleos, b) Muestra de <i>Ti6Al4V</i> DPSC 229 núcleos,	47
Figura 22: Adhesión a) Muestra de TNZHTS (850°C) DPSC 127 núcleos, b) Muestra de TNZTS (850°C) DPSC 96 núcleos c) Muestra de TNZT (850°C) DPSC 46 núcleos, d) Muestra de TNZHTS (850°C) MG63 50 núcleos, e) Muestra de TNZTS (850°C) MG63 139 núcleos, f) Muestra de TNZT (850°C) MG63 231 núcleos.....	48
Figura 23: Proliferación a) Muestra de TNZHTS (850°C) DPSC 98 núcleos, b) Muestra de TNZTS (850°C) DPSC 148 núcleos c) Muestra de TNZT (850°C) DPSC 136 núcleos, d) Muestra de TNZHTS (850°C) MG63 589 núcleos, e) Muestra de TNZTS (850°C) MG63 190 núcleos, f) Muestra de TNZT (850°C) MG63 627 núcleos.....	49
Figura 24: Proliferación a) Muestra de <i>Ti6Al7Nb</i> DPSC 472 núcleos, b) Muestra de <i>Ti6Al4V</i> DPSC 422 núcleos,	50
Figura 25: Expresión de los genes en los distintos ciclos (CT) de la PCR	51
Figura 26: HRFSEM: a) TNZTS MG63, SE. b) TNZTS MG63, InLens c) <i>Ti6Al4V</i> MG63, SE. d) <i>Ti6Al4V</i> MG63, InLens.....	53
Figura 27: Comparación de la resistencia de la aleación entre el ensayo de micropunzonado realizado en el presente estudio y los ensayos de tracción y flexión de Álvarez (2023).	54
Figura 28: Promedio del módulo elástico de las aleaciones y el hueso.	54
Figura 29: Promedio del conteo de los núcleos tras el análisis de las.....	55
Figura 30: Adhesión en la muestra TNZT (850°C) a) hDPSC, b) MG63	56
Figura 31: Proliferación a) TNZTS 1300°C DPSC b) TNZTS 1300°C MG-63.....	56
Figura 32: Promedio del conteo de los núcleos tras el análisis de las.....	57
Figura 33: Gráfica correspondiente al promedio de la viabilidad de las.....	57
Figura 34: Expresión de los genes RUNX2 y COL1A1 normalizados respecto al GAPDH y el control C ⁻	58
Figura 35: Contaminación bacteriana a) <i>Ti6Al4V</i> DPSC, InLens b) TNZTS DPSC, Secundarios.	59
Figura 36: Célula con el núcleo arrancado a) TNZTS DPSC, InLens b) TNZTS DPSC, Secundarios.	60

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1: Estabilizadores de aleaciones de titanio con sus efectos y diferentes propiedades (Pesode & Barve, 2023)	2
Tabla 2: Comparación del grado de pureza, tamaño de las partículas y precio de los diferentes proveedores (500g -1000g).	9
Tabla 3: Porcentaje en peso de las aleaciones fabricadas.....	12
Tabla 4: Densidad teórica de los elementos empleados en las aleaciones.	12
Tabla 5: Densidad teórica de las aleaciones.	13
Tabla 6: Masa en gramos de las probetas	13
Tabla 7: masa en gramos de la mezcla de cada aleación.....	13
Tabla 8: Masa en gramos de cada elemento de las aleaciones.	14
Tabla 9: Masa realmente utilizada de cada elemento de las aleaciones.	14
Tabla 10: Número de muestras cortadas por cada uno de los materiales.	19
Tabla 11: Composición de la saliva artificial o electrolito Ringer-Hartmann.....	20
Tabla 12: Número de células necesarias para los ensayos de proliferación y adhesión según el material.....	24
Tabla 13: Materiales necesarios para la tripsinización de los frascos de cultivo.	25
Tabla 14: Materiales necesarios para realizar el cultivo celular sobre las muestras	27
Tabla 15: Número de células necesarias para el ensayo de.....	28
Tabla 16: Tiempo de los cultivos en implantes en proliferación según el tipo de ensayo.....	29
Tabla 17: Numero de electrolitos de cada aleación.....	32
Tabla 18: Compuestos de la mastermix para una muestra para la retrotranscripción.	35
Tabla 19: Compuestos y cantidades de la mastermix para la retrotranscripción de 57 muestras	35
Tabla 20: Características de los genes que se analizan en la qPCR	36
Tabla 21: Distribución de la placa de 285 pocillos empleada para la qPCR.....	37

Tabla 22: Contenido de cada pocillo de la qPCR.....	38
Tabla 23: Masa antes y después de la compactación y las dimensiones de las probetas	39
Tabla 24: Volumen, densidad y porosidad en verde tras la compactación.	40
Tabla 25: Dimensiones de las muestras tras el sinterizado	41
Tabla 26: Contracción de las muestras tras el sinterizado.....	41
Tabla 27: Valores del método Arquímedes: Peso en seco (D), Peso sumergido (S) y peso mojado (M).....	42
Tabla 28: Resultados del método Arquímedes, poro abierto ($\%Pa$) , poro cerrado ($\%PC$), densidad experimental (ρ_{exp}) y porosidad total ($\%Pt = \%Pa + \%PC$).....	43
Tabla 29: Resultados del Son-Elastic: Modulo elástico, Velocidad (m/s) y densidad ρ (volumen g/cm ³).....	44
Tabla 30: Fuerza máxima y espesor de la muestra promedio de cada aleación.	45
Tabla 31: Ensayo de micropunzonado, datos del espesor (mm), fuerza (N), deflexión (mm) y resultado del calculo de la resistencia a la tracción Rm (MPa).....	46
Tabla 32: Comparación entre la resistencia a tracción del a) ensayo de micropunzonado y b) ensayo de microtracción (Álvarez, 2023)	46
Tabla 33: Comparación entre la resistencia a tracción del a) ensayo de micropunzonado y c) ensayo de flexión a 4 puntos (Álvarez, 2023).	46
Tabla 34: Microlitros sembrados para el ensayo de adhesión según la muestra	47
Tabla 35: Promedio del número de células de cada una de las muestras del ensayo de adhesión	48
Tabla 36: Microlitros sembrados para el ensayo de adhesión según la muestra	49
Tabla 37: Promedio del número de células de cada una de las muestras del ensayo de proliferación.	50
Tabla 38: Ensayo de citotoxicidad, viabilidad celular de cada una de las aleaciones.....	51
Tabla 39: Expresión de los genes RUNX2, COL1A1 y BGLAP	52
Tabla 40. Cuadro de precios unitarios de mano de obra	1
Tabla 41. Cuadro de precios unitarios de materiales.....	2

Tabla 42: Cuadro de precios unitarios de maquinaria.	3
Tabla 43: Cuadro de precios unitarios de equipo y software.	4
Tabla 44. Cuadro de precios descompuestos capítulo 01	6
Tabla 45. Cuadro de precios descompuestos capítulo 02	6
Tabla 46. Cuadro de precios descompuestos capítulo 03	7
Tabla 47. Cuadro de precios descompuestos capítulo 04	9
Tabla 48: Cuadro de precios descompuestos capítulo 05	9

ABREVIATURAS Y SIGLAS

cDNA: DNA complementario

CT: Ciclo umbral

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

EEUU: Estados Unidos

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

COL1A1: Colágeno tipo I, alfa 1

RUNX2: Runt-related transcription factor 2

BGLAP: Bone gamma-carboxyglutamate protein

MEM: Medio esencial mínimo

mRNA: RNA mensajero

PBS: Tampón fosfato salino

PB: Tampón fosfato

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RNA: Ribonucleica cid (ácido ribonucleico)

RT: Retrotranscripción

HRFSEM: microscopio de barrido de campo de alta resolución

FBS: Suero fetal bovino

DOCUMENTO 1
– MEMORIA –

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La biocompatibilidad, se puede definir como la cualidad que posee un biomaterial de generar una adecuada respuesta biológica en los tejidos susceptibles al mismo (Feldman, 2019). Por ello, es imprescindible asegurar, según la norma ISO 10993-1, la biocompatibilidad de los productos sanitarios y los materiales, con el objetivo de planificar una correcta evaluación biológica (*UNE-EN ISO 10993-1:2021 Evaluación Biológica de Productos Sani. . .*, s. f.). Dicha compatibilidad puede analizarse desde diversos niveles de interacción, como la interacción entre el material y los tejidos, la reacción resultante a la degradación del propio material o los factores mecánicos, como el módulo de Young o la resistencia a la corrosión (*Biocompatibility Of Clinical Implant Materials*, s. f.).

Debido a la creciente aplicación de implantes dentales en la población, las investigaciones sobre el uso de titanio comercialmente puro (CP-Ti), se ha centrado en mejorar la biocompatibilidad y resistencia de estos. El CP-Ti, se usa habitualmente debido a su elevada biocompatibilidad y su fuerte osteointegración, además de su naturaleza libre de tóxicos. Sin embargo, su insuficiente resistencia mecánica, limita su aplicación en condiciones clínicas, debido a que estos pueden agrietarse o romperse. En consecuencia, se han realizado diversos métodos con el objetivo de aumentar dichas propiedades mecánicas, como el tratamiento de la superficie del material, el refinamiento del grano y las aleaciones (Luo et al., 2020).

El titanio usado como metal de transición puede combinarse con α -estabilizadores o β -estabilizadores, dando lugar a las aleaciones α -puras, β -puras o ($\alpha+\beta$). Las aleaciones basadas en Ti como alternativa al CP-Ti pueden considerarse alternativas viables en la fabricación de implantes dentales, debido a que le proporcionan propiedades mejoradas, como un menor módulo elástico, alta resistencia a la tracción, biocompatibilidad satisfactoria y buena resistencia a la corrosión y desgaste. En concreto, la adición de Vanadio y Aluminio formando Ti6Al4V, proporciona una estructura bifásica ($\alpha+\beta$) caracterizada por unas mejoradas propiedades mecánicas como mayor resistencia, ductilidad y resistencia a la fatiga de ciclo bajo. Por todo ello, es la aleación de Ti más usada para aplicaciones biomédicas (Cordeiro & Barão, 2017).

Clínicamente, el titanio puro junto con sus aleaciones de Aluminio y Vanadio (Ti6Al4V), se usan para fabricar implantes dentales, debido a que el titanio en presencia de oxígeno experimenta la formación de una capa pasiva de TiO₂, que conduce a una elevada biocompatibilidad y que induce a una alta resistencia a la corrosión, además del mantenimiento de la osteointegración del implante dental. Sin embargo, si dicha capa se rompe debido al desgaste mecánico o productos químicos, podría provocar la exposición de la subestructura de Ti, afectando negativamente a los tejidos periimplantarios (Kandaswamy et al., 2024). Además, existe una reciente evidencia científica de los problemas asociados a las aleaciones de Ti6Al4V, debido a su posterior liberación de iones de Al y V. Se ha relacionado la adición de estos con efectos negativos sobre la viabilidad celular (Okazaki et al. 1998). Teniendo en cuenta las evidencias que existen de la relación entre la exposición al aluminio con la enfermedad del Alzheimer, así como la fragilidad ósea, se asocia al aluminio con efectos neurotóxicos significativos (Mjöberg et al., 1997; Cordeiro & Barão, 2017). Asimismo, la exposición al vanadio se ha relacionado con efectos nefrotóxicos, hepatotóxicos, carcinogénicos, efectos adversos sobre la reproducción y el desarrollo de los fetos y lactantes (García, s. f.).

Estos informes han incentivado a la búsqueda de nuevos materiales, con el objetivo de sustituir a la aleación Ti6Al4V, por lo que cada vez más autores desarrollan investigaciones sobre aleaciones de titanio tipo- β (Niinomi, 2010; Mohammed et al., 2015).

1.1.1. Aleaciones de titanio y biocompatibilidad

Como se ha comentado anteriormente, las aleaciones β -titanio son la combinación resultante de Ti y un mayor porcentaje de β -estabilizadores. Dichos estabilizadores, como su propio nombre indica, pretenden estabilizar las fases del material mediante el aumento o descenso de la temperatura de transición (Zhang et al., 2019).

Elementos estabilizadores	Impacto en la temperatura de transición	Efectos sobre las propiedades del titanio
<i>Estabilizadores α: O, C, Al, N</i>	Aumentar	Endurecimiento
<i>Estabilizadores β: Cr, Mo, Co, V, Fe, Ni y Nb</i>	Disminuir	Refinadores de granos
<i>Neutro: Zr y Sn</i>	Ningún impacto notable	Endurecimiento

Tabla 1: Estabilizadores de aleaciones de titanio con sus efectos y diferentes propiedades (Pesode & Barve, 2023)

Las aleaciones tipo β ofrecen diversos beneficios en comparación a otras aleaciones de titanio, debido a que estas presentan un módulo de elasticidad es más cercano al hueso natural, lo que reduce el efecto del apantallamiento de tensiones “(*stress shielding*)”, fenómeno que podría llevar a la pérdida de la masa ósea. Dichas aleaciones presentan una elevada resistencia mecánica, lo que las hace ideales para aplicaciones que conlleven soportar cargas elevadas. Otro aspecto destacable, es su buena biocompatibilidad, ya que los elementos que presentan se consideran no tóxicos. Asimismo, destacan por su excelente resistencia a la corrosión en ambientes corporales, lo que prolonga la vida útil del implante. A su vez, la ausencia de fases intermetálicas en las aleaciones, contribuye a una mayor homogeneidad y a propiedades mecánicas consistentes (Pesode & Barve, 2023).

De las características nombradas anteriormente, cabe destacar la importancia de que estas nuevas aleaciones presenten un bajo módulo de Young, debido a que la similitud de este valor entre el hueso y el material empleado conlleva a una menor probabilidad de que se produzca el fenómeno de apantallamiento de tensiones que resulta en la atrofia ósea y el fallo del implante (Niinomi y Nakai, 2011, Lario et al., 2021).

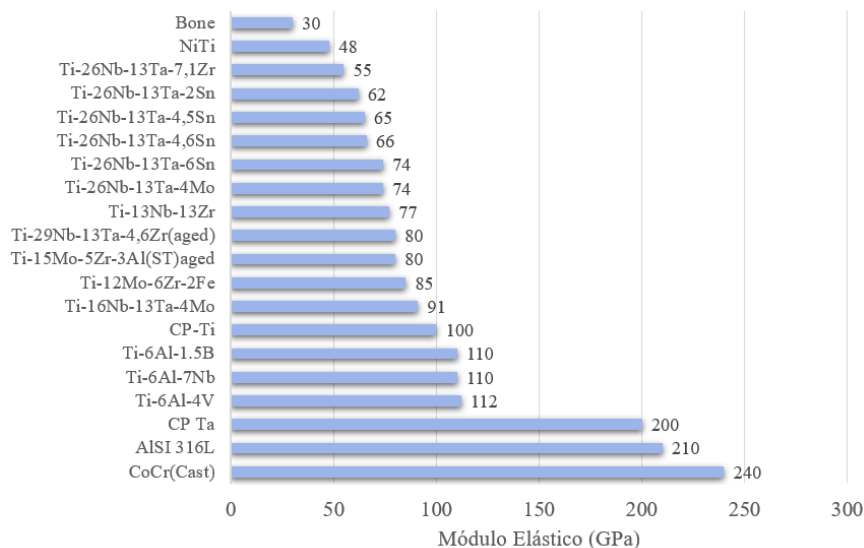


Figura 1: Módulo elástico de aleaciones de uso biomédico y hueso (Zhang y Chen, 2019)

Una de las aleaciones presente en diversas investigaciones, es la aleación tipo- β Ti-Nb-Zr-Ta (TNZT). Dicha aleación está compuesta por elementos libres de toxicidad, biocompatible y que, además, posee un módulo de Young de 55GPa (Figura 1). Por todo ello, con la necesidad de obtener ciertas resistencias mecánicas, manteniendo un bajo módulo de Young y biocompatible, instiga a los investigadores a desarrollar aleaciones TNZT junto a elementos que puedan mejorar dichas propiedades mecánicas (Niinomi y Nakai, 2011).

Usando el TNZT como aleación base, investigadores como Zareidoost y Yousefpour (2020), consideran la adición del estaño. Con este, se muestra una mejora en las propiedades mecánicas como la tensión en la estructura cristalina, y además presenta una adecuada biocompatibilidad con las células y tejidos del cuerpo humano. Cabe destacar, que un estudio realizado por Datta et al. (2016), demuestra que la adición de una elevada concentración de β -estabilizadores, podía reducir la resistencia de material, mientras que menores cantidades obtienen un aumento de la resistencia.

Por otro lado, autores como Gonzalez y colaboradores (2011) o Herranz y colaboradores (2015), han investigado sobre la adición del hafnio a aleaciones de titanio. En cuyos resultados sobre la caracterización mecánica se observa un buen comportamiento de deformación plástica sin aumentar sobremanera el módulo de Young, obteniendo un módulo elástico más bajo (42GPa), manteniendo una resistencia a tracción similar a la del Ti6Al4V y una mejora en la resistencia a la corrosión, además cabe destacar, que su composición química no provoca actividad citotóxica (González et al., 2014).

Todas las características nombradas anteriormente indican los beneficios de dichas aleaciones, por lo que se podría considerar que la adición tanto de estaño como hafnio, a una aleación base de TNZT podría ser una alternativa a la ya usada Ti-6Al-4V.

1.1.2. Osteointegración y complicaciones asociadas a los implantes dentales

Es imperativo que los materiales empleados en implantes no solo deben presentar propiedades mecánicas mejoradas, sino además deben de ser compatibles con los tejidos vivos. Para ello, es necesaria una unión firme entre el implante y tejido óseo, así como presentar una colonización bacteriana desfavorable y promover o no interferir en la osteointegración y regeneración ósea (Cordeiro & Barão, 2017).

El fenómeno de osteointegración puede definirse como un contacto funcional entre la prótesis y el hueso, de esta manera en dicho fenómeno intervienen una secuencia de eventos biológicos. Tras la inserción del implante se producen respuestas inmunes e inflamatorias, seguidas de angiogénesis y osteogénesis (Schnitman, 1990). En primer lugar, las características fisicoquímicas del implante permitirán el anclaje de proteínas sanguíneas. Tras el paso de 2 a 4 días de la implantación, llegan los monocitos y macrófagos, los cuales son esenciales para la homeostasis gracias a la liberación de factores de crecimiento y citoquinas que inducen a la deposición de matriz de colágeno, así como a la formación de tejido óseo (Wang et al., 2015). Para que haya una mayor efectividad en la osteointegración del implante, se pueden modificar características específicas del mismo, como la rugosidad, los materiales y modificaciones estructurales en la superficie. Dichas modificaciones pueden englobar desde cambios estructurales en la superficie del implante hasta la bioactivación con moléculas para acelerar el proceso de osteointegración y prevenir complicaciones como la periimplantitis.

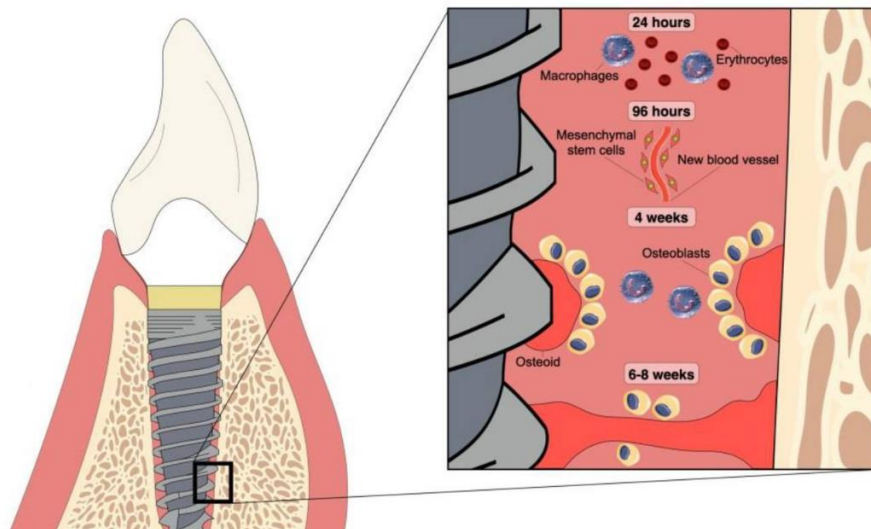


Figura 2: Representación de la osteointegración oral desde la inserción del implante durante 24h hasta 8 semanas (Silva et al., 2022).

Complicaciones infecciosas

Las infecciones microbianas dificultan el proceso de osteointegración, pudiendo causar la pérdida del implante. Las principales complicaciones infecciosas son las conocidas como periimplantitis y mucositis periimplantaria, las cuales se consideran una respuesta inmune del paciente que lleva a cabo un proceso inflamatorio en el hueso cercano al implante y la mucosa, ambas están asociadas con microorganismos. La mucositis periimplantaria es una inflamación reversible de los tejidos blandos alrededor del implante y la periimplantitis es la reacción inflamatoria de la mucosa periimplantaria que causa, alrededor del implante, la pérdida

progresiva del hueso de soporte (J. C. M. Gómez et al., 2022). Se estima alrededor de un 30% de frecuencia de dichas enfermedades, siendo considerablemente mayor en fumadores.

El microbioma oral consta con aproximadamente 700 especies de microorganismos como bacterias, hongos, virus y protozoos que interactúan entre sí. Dichos microorganismos se adhieren entre sí y a la matriz biótica o abiótica, formando una agregación denominada biopelícula como la representada en la figura 3 (Radaic & Kapila, 2021).

Estos microorganismos son capaces de adherirse a las superficies de titanio, por lo que pueden ser significativos en la colonización de implantes dentales e infecciones posteriores. Investigaciones como la de Dhir (2013), presenta la problemática sobre las biopelículas, debido a que estas son las responsables de aproximadamente el 65% de las enfermedades, incluidas la periimplantitis y la periodontitis. Por lo tanto, los ataques microbianos son una causa alarmante del fracaso de los implantes dentales (Silva et al., 2022).

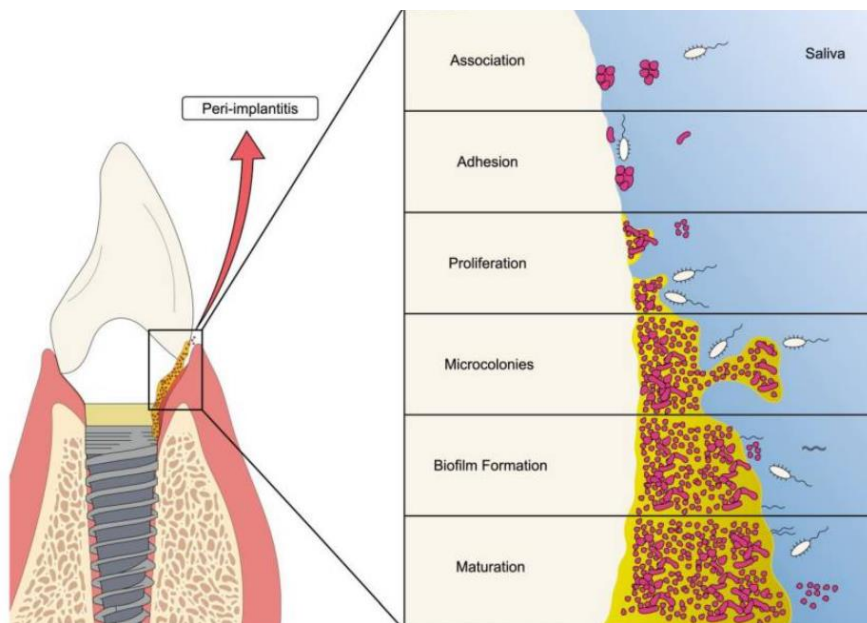


Figura 3: Formación de la biopelícula bacteriana sobre implantes dentales

1.1.Motivación

La biocompatibilidad de las aleaciones se relaciona con la respuesta del organismo a sus elementos, por lo que es imprescindible que los componentes de las aleaciones sean casi inertes a los tejidos circundantes y no presenten toxicidad. En concreto, las partículas metálicas de Ti, Zr, Sn, Nb y Ta no afectan a la tasa de crecimiento de las células humanas y según investigaciones como Cordeiro y Barão, 2017, solo presentan una pequeña cantidad de liberación de iones al medio, al contrario que Al y V, que reducen la viabilidad de forma dependiente a su concentración. Durante la presente investigación, se va a comprobar, por un lado, el efecto que tienen dichos elementos sobre la viabilidad celular y si la liberación de iones tanto del aluminio y vanadio como el resto de los elementos, presentan una elevada citotoxicidad mediante el ensayo de MTS.

En general las aleaciones de titanio demuestran una biocompatibilidad mejorada, la cual está directamente relacionada con los elementos que la componen. Sin embargo, es imprescindible no aumentar sobremanera la cantidad de los elementos en la aleación para asegurar una adecuada respuesta tisular. Debido a que, en algunos casos la aleación puede perder biocompatibilidad por el aumento de iones en el medio ambiente. Por lo que, es importante equilibrar la incorporación de dichos elementos en las aleaciones de titanio para asegurar una adecuada biocompatibilidad manteniendo unas buenas propiedades mecánicas (Cordeiro & Barão, 2017).

Una característica fundamental en un implante tanto dental como ortopédico es su buena osteointegración, para ello además de la biocompatibilidad es imprescindible que no favorezca la aparición de biofilms bacterianos pudiendo causar enfermedades infecciosas como la periimplantitis, la cual afecta a un 19,83% de los pacientes a los que se le ha realizado una cirugía para colocar un dispositivo endóseo (J. C. M. Gómez et al., 2022). Existe un campo abierto a la investigación sobre cómo prevenir dichas enfermedades como el diseño de superficies sobre el material que frene la creación de la capa bacteriana. Cabe destacar que diversas investigaciones han desarrollado superficies más rugosas para aumentar la rapidez del contacto hueso-implante (Vanegas et al., 2009), lo que además reduciría el tiempo de carga de los implantes. Sin embargo, investigaciones como Teughels et al. (2006) y colaboradores, demuestran que cuanto mayor es la rugosidad, mayor es la tasa de formación de biopelícula alrededor del implante.

Todo esto motiva a los investigadores al desarrollo de aleaciones de tipo beta, ya que se abre la posibilidad de encontrar nuevos materiales con características similares al hueso humano y biocompatibles. Para ello, investigaciones como la del presente trabajo final de grado se centran en continuar estudiando aleaciones como la formada por Ti-35Nb-7Zr-5Ta-4Sn con adición de hafnio y/o estaño, con el propósito de progresar en la búsqueda de nuevos materiales con elevada biocompatibilidad y propiedades mecánicas mejoradas.

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo de fin de grado se basa en el análisis de la viabilidad celular de las aleaciones tipo- β , partiendo de la aleación base Ti-35Nb-7Zr-5Ta con la adición de estaño y/o hafnio. Así como añadir al estudio ya realizado sobre sus efectos a nivel mecánico, microestructural y químico, ensayos con los que se ampliará su conocimiento sobre sus propiedades mecánicas.

Así, se logra establecer una serie de objetivos concretos, entre los cuales se destacan:

- Mediante la mezcla de polvos elementales, partiendo de la aleación base Ti-35Nb-7Zr-5Ta, diseñar las aleaciones Ti-35Nb-7Zr-5Ta-4Sn y Ti-35Nb-4Zr-3Hf-5Ta-4Sn, agregando hafnio y/o estaño.
- Añadir información sobre las propiedades mecánicas de estas aleaciones mediante el ensayo micropunzonado y comparar con el estudio final de grado realizado anteriormente de estas aleaciones.
- Analizar el comportamiento celular sobre cada una de las aleaciones, comparándolo con dos tipos de titanio empleados actualmente para la fabricación de implantes Ti6Al4V y Ti6Al7Nb.
- Analizar la citotoxicidad del material diseñado mediante el electrolito realizado con saliva artificial Ringer- Hartmann.
- Determinar la expresión génica de las aleaciones, mediante el ensayo de qPCR.

3. PLANIFICACIÓN

Para la realización de los objetivos planteados en el trabajo, se realizará una planificación como la indicada en la figura 4, la cual se dividirá en 3 fases.



Figura 4: Planificación del proyecto

Fase 1 – Diseño y fabricación de los materiales

La primera tarea para llevar a cabo el estudio planteado es definir las composiciones de las aleaciones que se van a realizar. Se utilizará una aleación base de TNZT a la cual se le añadirá estaño (Sn) y hafnio (Hf). Como se ha comentado anteriormente, una concentración elevada de Sn a la aleación reduce la ductilidad y la resistencia a tracción (Cordeiro & Barão, 2017). Por lo que, la concentración de estaño según diversas investigaciones debe encontrarse en un rango entre el 2% y 7.5% (Hao et al., 2006; Gu et al., 2022; Kuroda et al., 1998), estableciendo en el presente estudio un valor del 4% del mismo. En lo que respecta a la concentración del hafnio, este estudio se ha basado en la investigación de Yang y colaboradores (2019) y el trabajo final de grado realizado anteriormente de estas mismas aleaciones (Álvarez, 2023).

Para llevar a cabo esta primera fase, la subdividimos en seis tareas:

Tarea 1.1 – Selección de polvos.

En primer lugar, se deberá seleccionar el proveedor y el tipo de polvo que se usará para la fabricación de las muestras, algunos de los proveedores con los que trabaja el laboratorio (ITM) son: AEE (Atlantic Equipment Engineers), GoodFellow, Alfa Aesar, Sigma Aldrich o AEM (Changsha Advanced Engineering Materials Limited). Para la selección de estos, se debe tener en cuenta; el presupuesto, la disponibilidad y las características específicas de los polvos.

Proveedor	Ti	Nb	Zr	Hf	Ta	Sn
AEE	99.7% < 20µm 11.45€	99.8% 1-5µm Desconocido	95% 1.7-2.3µm Desconocido	99.5% 44µm Desconocido	99.8% 44-105µm Desconocido	99.9% 1-5µm 79.78€
GoodFellow	99.5% 5- 150µm 41374- 2258 €	99.85% 74µm 994-1596€	99.2% 45µm 2585-4373€	95% 45µm 337-886€ (10g-50g)	99.9% 75µm 3061.01€	99.9% 45- 150µm 494.78€
Alfa Aesar	99.4% 150µm 320€	99.8% 44µm 778€	98%	-	99.9% 2µm 362€ (50g)	Desconocido 44µm 129€
AEM	99%-99.9% 44-250µm	99.8% 44- 105µm	92%-96% 4- 20µm	99.5% 37- 250µm	99.9% 1.5- 6µm	-

Tabla 2: Comparación del grado de pureza, tamaño de las partículas y precio de los diferentes proveedores (500g -1000g).

Tarea 1.2 – Mezclado de polvos.

Una vez seleccionados los polvos a emplear para cada una de las tres aleaciones, se procederá a realizar la mezcla. Para ello, es necesario saber las densidades de cada uno de estos y el número de muestras que se necesitan en el estudio. Dado la cantidad de ensayos que se van a realizar, será necesaria la fabricación de 7 muestras por cada aleación, teniendo un total de 21 muestras. Tras definir estos dos parámetros se procederá a calcular la cantidad en microgramos de cada uno de los elementos gracias a la densidad teórica de las aleaciones, utilizando el porcentaje en peso deseado de cada elemento y la densidad teórica del material a utilizar.

A continuación, se definirá la masa de cada muestra de las distintas aleaciones. La masa de la probeta depende del tamaño del que se realice la muestra, en este caso, se fabricarán muestras con una matriz de dimensiones 30x12 mm con un espesor de 5 mm, con lo que se obtendrán muestras de 1.8 cm³. Una vez se haya obtenido la masa total de cada probeta y se hayan definido el número de muestras, así como el porcentaje en peso de cada elemento, se obtendrá el valor en microgramos de cada elemento de la aleación.

Tras haber realizado todos los cálculos necesarios y teniendo claro la cantidad de cada polvo que se debe de utilizar para fabricar las diferentes aleaciones, se procederá a la mezcla de los polvos. Este proceso se realizará en una cámara de guantes con atmosfera controlada. Es imprescindible realizar las mezclas en este ambiente, debido a la alta reactividad que presentan los polvos metálicos. Se realizarán las mezclas en recipientes de plástico y se introducirán esferas de acero inoxidable para la correcta homogenización.

Tarea 1.3 – Compactación de las muestras.

Una vez homogeneizados los polvos de cada una de las aleaciones, se realizará la compactación de las probetas. Para la compactación, se utilizará una matriz de 30x12 mm y se aplicará una fuerza de compresión uniaxial en la superficie superior e inferior de la probeta. Una vez obtenidas las probetas de los compactos, se realizará la medición y el pesaje con los que se puede determinar las propiedades porosas en verde y densitométricas de las muestras.

Tarea 1.4 – Sinterización de los compactos

Para finalizar la preparación de las muestras, se realizará la sinterización de las mismas. Con la sinterización se logra mejorar las propiedades mecánicas de los materiales aplicando presión a una elevada temperatura y con ciertas especificaciones como la variable del tiempo teniendo en cuenta la temperatura de fusión del material y la atmósfera. Es necesario que la temperatura se encuentre entre el 50-80% de la temperatura de fusión del material.

Una vez realizada la sinterización se realizarán dos ensayos. A continuación, se medirá el módulo elástico de las muestras mediante el Son-Elastic ([ATCP Ingeniería Física](#), Brasil) y posteriormente, con el objetivo de obtener el porcentaje de poro abierto y cerrado de las muestras, se realizará el método de Arquímedes, con el cual, siguiendo la norma ASTM C373-14 (ASTM C373-14, 2014), se obtendrá, en primer lugar, el peso de la muestra en seco (P_D) y tras rellenar los poros de la probeta con agua, se medirá el peso de la muestra sumergida (P_S) y peso de la muestra mojada (P_M). Con dichos valores se podrán establecer las propiedades de porosidad de los materiales.

Tarea 1.5 – Corte de las muestras y esterilización

Para poder realizar los ensayos celulares en las muestras, será necesario cortar las probetas para poder obtener rectángulos de alrededor de 2 mm de espesor, donde poder realizar los cultivos. Además de los rectángulos de las propias aleaciones, se obtendrá material de la empresa ZimVie Biomet, quienes proporcionaron barras de titanio Ti6Al4V y Ti6Al7Nb, que deben de ser cortados en discos también de 2 mm de espesor. Para tal fin, se utilizará un disco de diamante y una cortadora metalográfica de precisión. Además de cortar las muestras para realizar los ensayos biológicos, también se cortarán muestras de un espesor de alrededor de 0,5 mm para llevar a cabo el SmallPunch.

Una vez cortadas todas las probetas, se procederá su esterilización. Para ello, tras ser lavadas con etanol, se depositarán en bolsas específicas en el equipo de limpieza por ultrasonidos y se introducirán en el autoclave.

Tarea 1.6 – Realización de los electrolitos

Esta última fase de preparación de materiales se realiza con el objetivo de poder analizar la citotoxicidad de las aleaciones. Para ello, se introducirán las diferentes muestras en botes con saliva artificial Ringer-Hartmann durante un periodo de 812 horas en una estufa de incubación. Estos líquidos resultantes son los que se usarán en el posterior ensayo de citotoxicidad.

Fase 2 – Caracterización mecánica de las aleaciones

La caracterización mecánica permite determinar las propiedades mecánicas de los materiales, tales como la elasticidad, resistencia a fractura o rigidez. Estudios como Álvarez (2023) ya han determinado las propiedades de estas aleaciones mediante ensayos de flexión a 4 puntos y ensayos de tracción.

En el presente estudio se realizará un ensayo de micropunzonado “(*Small Punch*)” con el que a partir de pequeñas muestras de grosor 0,5 mm, se pueden determinar parámetros como la resistencia a la fractura, ductilidad, límite elástico y resistencia última entre otros.

Fase 3 – Análisis biológico

Una vez esterilizadas las muestras, comienza la última fase del estudio, en la que se realizarán los cultivos celulares para evaluar cual es la biocompatibilidad de las aleaciones. Para ello, se dividirá esta tercera fase en cinco tareas.

Tarea 3.1 – Selección de las líneas celulares. Una vez esterilizadas las muestras, se debe evaluar qué líneas celulares se usarán durante la investigación. Concretamente, en este estudio se utilizarán células madre de pulpa dental (hDPSC) y células de osteosarcoma humano (MG-63).

Tarea 3.2 – Cultivo para proliferación y adhesión. Se realizarán dos tipos de cultivos celulares, proliferación y adhesión, que facilitan información sobre la interacción de las células con la aleación planteada, así como su capacidad para crecer y multiplicarse, la compatibilidad con el material, demostrando ser un indicador de la funcionalidad celular.

Tarea 3.3 – Ensayo de citotoxicidad (MTS). Mediante el cual se evaluará si la aleación propuesta libera iones, compuestos o subproductos que pueden ser tóxicos para las células.

Tarea 3.4 – Cultivo para expresión génica y qPCR. Tras realizar un cultivo específico para este ensayo, con una concentración menor a los anteriormente realizados, y dejarlo en proliferación durante 2 semanas, se procederá a realizar el último ensayo, con el que se obtendrá cuáles de los genes a evaluar se expresan en contacto con las aleaciones. Para ello, se usará como control endógeno el housekeeping gene (GAPDH). Con dicho ensayo se observará cómo la expresión de genes específicos cambia a lo largo del tiempo.

Tarea 3.5 – Obtención de imágenes. Por último, se realizará la inmunofluorescencia, con la que se determina la presencia de unas determinadas moléculas: núcleos y citoplasmas. Se utilizará DAPI y Faloidina-rodamina para su posterior visualización en el microscopio de fluorescencia Leica DM4000B.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente apartado se describe en detalle los materiales y los equipos utilizados en el proyecto, así como los procedimientos y métodos que se han empleado para obtener los resultados de los diferentes ensayos realizados. El desarrollo del estudio se ha llevado a cabo, por un lado, en el Instituto de Tecnología de Materiales (ITM) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV), junto con el Servicio de Microscopía Electrónica, y por otro, en la Universidad de Valencia (UV), en el Departamento de Biología Patológica de la Facultad de Medicina.

4.1. Fabricación de los materiales

En primer lugar, se debe seleccionar la composición de los diferentes elementos para fabricar las aleaciones. Para ello, como se puede observar en la tabla 3, se utiliza una primera aleación base Ti-35Nb-7Zr-5Ta (TNZT). Para la segunda aleación se añade un 4% de estaño obteniendo así Ti-35Nb-7Zr-5Ta-4Sn (TNZTS) y, por último, se varía la cantidad de circonio y se añade 3% hafnio, resultando Ti-35Nb-4Zr-3Hf-5Ta-4Sn (TNZHTS).

	Ti	Nb	Zr	Hf	Ta	Sn
Ti-35Nb-7Zr-5Ta	53	35	7	-	5	-
Ti-35Nb-7Zr-5Ta-4Sn	49	35	7	-	5	4
Ti-35Nb-4Zr-3Hf-5Ta-4Sn	49	35	4	3	5	4

Tabla 3: Porcentaje en peso de las aleaciones fabricadas.

4.1.1. Selección y mezcla de los polvos

Como se ha comentado en la descripción de la *tarea 1.2. Mezclado de polvos*, se realizará un total de 21 probetas, 7 por cada una de las aleaciones. Para iniciar los cálculos, es necesario saber la densidad teórica de los elementos que componen las aleaciones, representados en la tabla 4.

Elemento	Densidad (g/cm ³)
<i>Ti</i>	4,507
<i>Nb</i>	8,57
<i>Zr</i>	6,505
<i>Hf</i>	13,31
<i>Ta</i>	16,67
<i>Sn</i>	7,365

Tabla 4: Densidad teórica de los elementos empleados en las aleaciones.

Los polvos empleados para realizar las mezclas fueron suministrados por diversas casas comerciales. De Advanced Engineering Materials (AEM) se empleó el titanio con pureza 99,5% y 44 μm de tamaño de partícula; el hafnio con una pureza del 99,9%, con tamaño de partícula <150 μm ; el tántalo de 99,9% de pureza y partículas de 1,5-6 μm y el estaño con una pureza del 99,9% y un tamaño de 1-5 μm . Por otro lado, Alfa Aesar suministró el circonio y niobio con una pureza 99,5% y del 99,8% y un tamaño de partícula de 2-3 μm y 44 μm , respectivamente.

Mediante los datos de la densidad teórica de los elementos (tabla 4) y el porcentaje en peso de las aleaciones (tabla 3), se define la densidad teórica de las muestras de las 3 aleaciones

mediante la ecuación 1, donde ρ_{Tm} es la densidad teórica de las muestras, $\%W_e$ es el porcentaje en peso de los elementos y ρ_e es la densidad teórica de cada elemento.

$$\rho_{Tm} = \frac{100}{\sum \frac{\%W_e}{\rho_e}} \quad (1)$$

Aplicando la ecuación 1, se obtienen las densidades teóricas de las aleaciones recogidas en la tabla 5.

Aleación	Densidad teórica (g/cm ³)
Ti-35Nb-7Zr-5Ta	5,807
Ti-35Nb-7Zr-5Ta-4Sn	5,926
Ti-35Nb-4Zr-3Hf-5Ta-4Sn	6,213

Tabla 5: Densidad teórica de las aleaciones.

Una vez obtenida la densidad teórica de la mezcla, se calcula la masa en gramos de cada una de las probetas (m_p) a realizar (tabla 6) mediante la ecuación 2.

$$m_p = \frac{V_{probeta}}{\rho_{Tp}} \quad (2)$$

Siendo el $V_{probeta} = largo (mm) \cdot ancho (mm) \cdot alto (mm) = 1,8 \text{ cm}^3$

Aleación	Masa _{probeta} (g)
Ti-35Nb-7Zr-5Ta	10,453
Ti-35Nb-7Zr-5Ta-4Sn	10,667
Ti-35Nb-4Zr-3Hf-5Ta-4Sn	11,183

Tabla 6: Masa en gramos de las probetas

Por otro lado, habiendo definido el número de probetas deseadas, se define la cantidad total de la masa de la mezcla que se va a utilizar multiplicando por la cantidad de probetas que se necesitan fabricar. Obteniendo la tabla 7 donde se encuentran la masa total que se necesitará para fabricar las 7 probetas de cada aleación.

Aleación	Masa _{probeta} (g)
Ti-35Nb-7Zr-5Ta	73,173
Ti-35Nb-7Zr-5Ta-4Sn	74,666
Ti-35Nb-4Zr-3Hf-5Ta-4Sn	78,279

Tabla 7: masa en gramos de la mezcla de cada aleación.

Por último, se calcula la masa individual de cada uno de los elementos de las aleaciones. Dicha masa se calcula a partir de la masa total de la mezcla y el porcentaje en peso, según la ecuación 3.

$$m_{elemento} = \frac{(m_{mezcla} \cdot \%peso)}{100} \quad (3)$$

	Ti	Nb	Zr	Hf	Ta	Sn
Ti-35Nb-7Zr-5Ta	38,782	25,610	5,122	-	3,659	-
Ti-35Nb-7Zr-5Ta-4Sn	36,586	26,133	5,227	-	3,733	2,987
Ti-35Nb-4Zr-3Hf-5Ta-4Sn	38,357	27,398	3,131	2,348	3,914	3,131

Tabla 8: Masa en gramos de cada elemento de las aleaciones.

Una vez obtenida la masa que se debe utilizar de cada uno de los elementos, recogidas en la tabla 8, para fabricar cada una de las aleaciones, se procede a la realización de las muestras. La mezcla de los polvos se realiza en una caja de guantes con atmósfera controlada, utilizándose, en este caso, la marca Jacomex, modelo GP [Campus], disponible en el laboratorio de materiales. El uso de esta es debido a la alta reactividad de los elementos en presencia de oxígeno, por lo que dicha caja de guantes es idónea, ya que está presurizada con gas argón 99.999%, lo que excluye oxígeno, humedad y otras impurezas del aire que podrían reaccionar con los polvos metálicos sensibles, sobre todo con el titanio, hafnio y zirconio.

Con los cálculos realizados, en el interior de la campana se preparan todos los elementos que se deben utilizar, evitando posibles contaminaciones en todo momento. Mediante una balanza de precisión 0,001g, se comienzan a pesar los polvos con las medidas correspondientes. Debido a la pequeña cantidad de los valores involucrados de algunos elementos, es necesario registrar con precisión la masa realmente utilizada para que pueda ser referencia en cálculos futuros, debido a que no siempre se podrán obtener las medidas exactas. Dichos valores están representados en la tabla 9.

	Ti	Nb	Zr	Hf	Ta	Sn
Ti-35Nb-7Zr-5Ta	38,703	25,535	5,107	-	3,689	-
Ti-35Nb-7Zr-5Ta-4Sn	36,587	26,128	5,226	-	3,764	2,968
Ti-35Nb-4Zr-3Hf-5Ta-4Sn	38,354	27,380	3,127	2,338	3,911	2,291

Tabla 9: Masa realmente utilizada de cada elemento de las aleaciones.

Los polvos se van introduciendo en 3 botes de plástico, uno por cada aleación, y una vez finalizadas las tres aleaciones, se introducen tres esferas de acero inoxidable para la correcta homogenización de la mezcla y se sellan con Parafilm. Una vez sellados los botes, se extraen de la caja de guantes y se procede al mezclado de estos durante 20 minutos mediante una turbula Inversina de Bioengineering, funcionando a 70 rpm.

4.1.2. Compactación

Tras finalizar los 20 minutos de homogenización de las muestras, se procede a la compactación de los polvos con los que se formarán las probetas. Para ello, se utilizará una matriz flotante de 30x12x5 mm y una prensa hidráulica WPP 50 de Metallkraft. En primer lugar, se divide el contenido total de la mezcla en 7 partes iguales y se procede a pesar con una balanza de precisión los polvos a emplear para cada una de las muestras. Una vez pesada la mezcla a utilizar, se introduce en la matriz, previamente lubricada con estearato de cinc evitando así el rozamiento entre los polvos y la pared de la matriz y facilitando la extracción de la probeta una vez compactada. En la prensa, se aplica una tensión de compresión $\approx 1000\text{MPa}$ durante 6 segundos.

Tras la compactación, es imprescindible pesar y tomar medidas de las probetas, para así poder determinar su volumen en verde (Vol_{verde}) en cm^3 mediante la ecuación 4.

$$Vol_{verde} = \frac{largo (mm) \cdot ancho (mm) \cdot espesor (mm)}{1000} \quad (4)$$

Además del volumen el verde, se puede calcular también la densidad en verde y la porosidad, para poder compararlo posteriormente con los resultados obtenidos tras la sinterización. Por un lado, se calcula la densidad en verde (ρ_{verde} g/cm³) mediante la ecuación 5, y a continuación la porosidad en verde (%) utilizando de la ecuación 6.

$$\rho_{verde} = \frac{Masa_{Despues_compactacion}}{Vol_{verde}} \quad (5)$$

$$Porosidad_{verde} = \left(1 - \left(\frac{\rho_{verde}}{\rho_{Tm}}\right)\right) \cdot 100 \quad (6)$$

4.1.3. Sinterización de los polvos compactos

Una vez tomadas las medidas pertinentes, se procede a realizar la sinterización de los compactos. Para ello, se va a utilizar un horno tubular de alto vacío Carbolite HVT 15-75-450. Cabe destacar que la fabricación de estas muestras se ha realizado en dos ciclos distintos, como se puede ver representado en la figura 5, por lo que en este punto se dividen las condiciones de las probetas.

Por un lado, se realiza una sinterización en 5 de las probetas, que consta de un ciclo de 850°C durante 60 minutos, con una velocidad de calentamiento de 10°/min. Este primer paso a menor temperatura se utiliza para eliminar impurezas residuales, así como para iniciar el proceso de densificación de la aleación, además ayuda a reducir la porosidad y mejorar el contacto entre partículas metálicas.

En la siguiente etapa, la temperatura asciende a 1300°C obteniendo una densificación completa del material, donde las partículas se difunden y consolidan completamente, un tiempo prolongado, en este caso 240 minutos, asegura que la estructura interna alcance un equilibrio con una distribución uniforme de los elementos. Por otro lado, es necesario un calentamiento controlado, por lo que los 7°C/min permite un equilibrio entre el tiempo de proceso y la calidad del material final, garantizando que la aleación se sinterice sin introducir defectos internos como grietas en la estructura (German, 1996).

Por último, se realizarán 2 probetas más de cada aleación únicamente con el segundo paso explicado anteriormente, es decir, ascenderá la temperatura a 1300°C durante 240 minutos, con una velocidad de calentamiento de 7°/min.

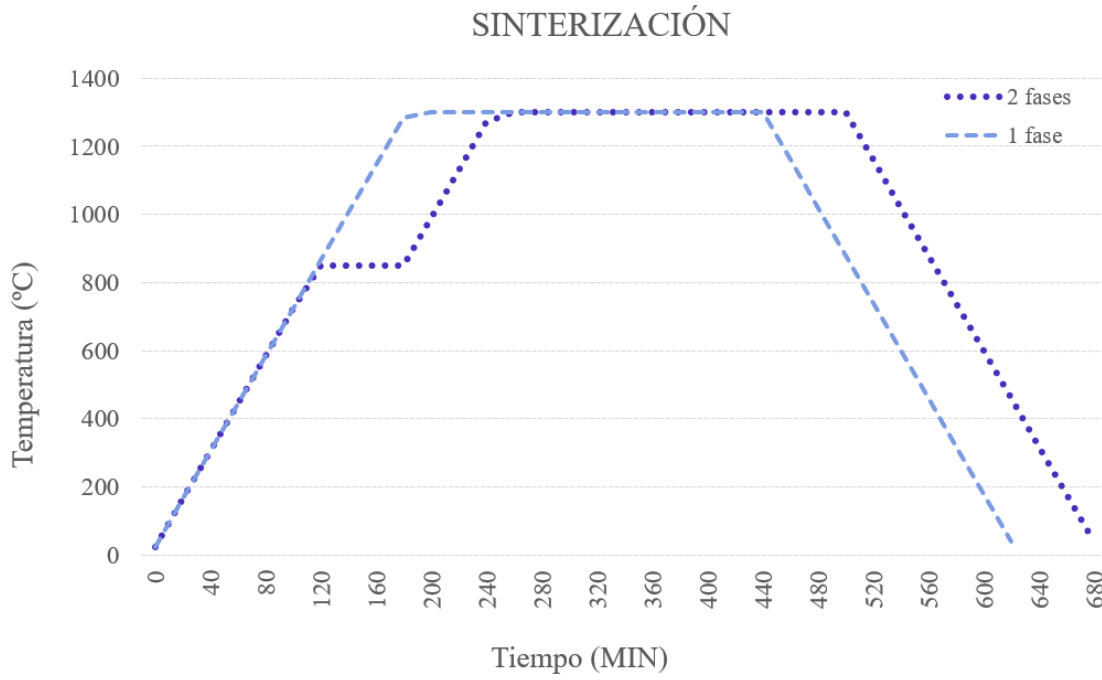


Figura 5: Proceso de sinterización de los compactos.

Pasado el tiempo de sinterizado, se extraen las muestras y se procede a medirlas de nuevo, para evaluar la contracción tras sinterizado. Se calcula el nuevo volumen de las probetas y la contracción del largo, ancho, espesor y volumen de cada una de las muestras mediante las ecuaciones 7, 8, 9 y 10 respectivamente, así como su promedio.

$$\Delta Largo = \frac{Largo_{verde} - Largo_{sinterizado}}{Largo_{verde} * 100} \quad (7)$$

$$\Delta Ancho = \frac{Ancho_{verde} - Ancho_{sinterizado}}{Ancho_{verde} * 100} \quad (8)$$

$$\Delta Espesor = \frac{Espesor_{verde} - Espesor_{sinterizado}}{Espesor_{verde} * 100} \quad (9)$$

$$\Delta Vol = \frac{vol_{verde} - vol_{sinterización}}{vol_{verde} * 100} \quad (10)$$

Tras haber realizado las mediciones pertinentes tras la sinterización, se realizan dos ensayos más; Son-Elastic y método Arquímedes

I. Son-Elastic

En primer lugar, se medirá el módulo elástico mediante el sistema Son-Elastic, este ensayo no destructivo se usa para determinar las propiedades elásticas de los materiales. El módulo de elasticidad (o de Young), es particularmente útil para evaluar la rigidez.

Se basa en un equipo que mide las frecuencias de resonancia natural de un material cuando es sometido a una vibración. En este caso, la probeta se somete a una excitación mecánica, es decir, un golpe que induce ondas sonoras a través del material. Dichas vibraciones, se propagan a través de la probeta y el equipo, representado en la figura 6, mide las frecuencias, dichas frecuencias dependen del tamaño, la masa y la forma de la probeta, parámetros que son necesarios introducir en el programa.

A partir de las frecuencias de resonancia detectadas, el sistema Son-Elastic puede calcular el módulo elástico del material utilizando fórmulas que relacionan la frecuencia con las propiedades mecánicas del material.

Este ensayo es de gran ayuda para determinar propiedades mecánicas de la aleación. El módulo elástico nos va a permitir determinar la rigidez del material, así como la homogeneidad y la calidad del proceso de fabricación, ya que, elevadas variaciones del módulo elástico entre probetas pueden indicar inconsistencias en la microestructura, la composición o defectos internos. Además, permite comparar la aleación fabricada y otros materiales con el módulo de Young del hueso, al cual nos interesa aproximarnos.



Figura 6: Equipo Son-Elastic.

II. Método Arquímedes

El ensayo de Arquímedes es un método ampliamente utilizado no solo para determinar la densidad relativa de un material sólido, sino también para evaluar la porosidad de los materiales, en este caso la porosidad de las probetas tras el sinterizado. Este ensayo se basa en el principio de Arquímedes, que establece que un objeto sumergido en un fluido experimenta un empuje hacia arriba equivalente al peso del fluido desplazado por el objeto.

Para realizar el ensayo se utilizará una báscula de precisión Kern ABJ-NM/ABS-N de 0,0001g, representada en la figura 7, que consta de unas pantallas que evita el paso del aire y su consecuente interferencia sobre la medida. En primer lugar, se mide el peso de la probeta en el aire, registrada como peso en seco (P_D), a continuación, se sumerge completamente la probeta en agua destilada y se introduce en un desecador al vacío durante 20 minutos, con el objetivo de extraer la mayor cantidad de aire posible de la muestra. Pasado dicho tiempo, se mide su peso sumergido (P_S) introduciendo la muestra dentro de la balanza sumergida en agua destilada mediante el mecanismo del equipo, que permite pesar únicamente la muestra. Por último, se elimina de forma superficial el agua de la probeta y se pesa la muestra de nuevo, obteniendo así el peso de la muestra mojada (P_M).



Figura 7: Equipo de medición del método Arquímedes.

Una vez obtenidos los datos de los pesos de las probetas, se procede a realizar los cálculos con los que se podrá determinar el porcentaje de poro abierto y cerrado, así como la densidad relativa y experimental de cada una de las muestras. Para ello, se utilizarán las ecuaciones descritas a continuación.

En primer lugar, se calculan los volúmenes (cm^3), teórico (V_{te}), exterior (V_{Ext}), de poro abierto (V_{op}) y poro cerrado (V_d), mediante las siguientes ecuaciones.

$$V_{te} = \frac{P_D}{\rho_{Tm}} \quad (11)$$

$$V_{Ext} = P_M - P_S \quad (12)$$

$$V_{op} = P_M - P_D \quad (13)$$

$$V_d = V_{Ext} - V_{te} - V_{op} \quad (14)$$

Calculados los volúmenes, se procede a calcular el porcentaje de poros abiertos y cerrados, mediante las ecuaciones 15 y 16 respectivamente.

$$\%P_{Abierto} = \frac{100 \cdot (V_{op})}{(V_{Ext})} \quad (15)$$

$$\%P_{Cerrado} = \frac{100 \cdot (V_d)}{(V_{Ext})} \quad (16)$$

Con los resultados obtenidos, también es posible calcular la densidad experimental y relativa de las muestras.

$$\rho_{experimental} = \frac{P_D}{V_{Ext}} \text{ (g/cm}^3\text{)} \quad (17)$$

$$\rho_{relativa} = \frac{\rho_{experimental}}{\rho_{Tm}} \text{ (\%)} \quad (18)$$

4.1.4. Corte de las muestras

Una vez se han realizado todos los ensayos que implican tener las probetas completas, se puede continuar con el preparado de las muestras para el análisis biológico. El siguiente paso es cortar las muestras con un tamaño adecuado para que se puedan introducir en los pocillos que se utilizarán posteriormente para los cultivos celulares.

Para cortar las muestras se utilizará una cortadora metalográfica de precisión Accutom 10 de Struers y se escogerá un disco de diamante 357CA.

Para realizar los cortes se debe ajustar la cortadora con la medida deseada. En el presente estudio se realizarán cortes de 2,5mm de espesor para poder extraer la mayor cantidad de piezas posibles de una probeta, incluyendo las barras de titanio (Ti6Al4V y Ti6Al7Nb) proporcionadas por ZimVie. Por otro lado, para el ensayo de micropunzonado se cortarán 5 muestras de cada material con un espesor de 1,5mm que, al finalizar el corte debido al espesor del propio disco, resulta en 0,5mm. Finalmente, el número de muestras resultante se recoge en la tabla 10.

Ensayo	Nº Muestras/material
Análisis biológico	30
SmallPunch y electrolito	5

Tabla 10: Número de muestras cortadas por cada uno de los materiales.

4.1.5. Esterilización por autoclave

Una vez obtenidos todos los cortes, se procede a realizar una limpieza por ultrasonidos en un baño Elma. Para ello, se introducen las muestras en un frasco con etanol y se dejan en el baño durante 10 minutos con el ultrasonido activado. A continuación, se secan superficialmente las muestras y se introducen en bolsas específicas para el esterilizado por autoclave, que constan de una zona de papel y una película plástica. Estas se colocan en el sistema autoclave de icanCLAV, dicho sistema se trata del mecanismo de destrucción de baterías más efectivo por su capacidad de penetración, fiabilidad, rapidez y coste. Consiste en la inyección de vapor seco a presión a temperatura entre 121°C-134°C.

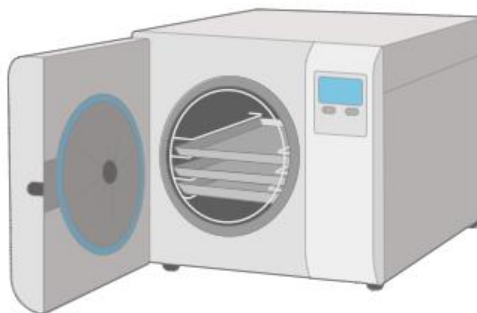


Figura 8: Sistema de autoclave.

4.1.6. Realización de los electrolitos

Las muestras reservadas para el micropunzonado “(*SmallPunch*)”, son las que también se usarán para la realización del electrolito. Por lo que, una vez finalizado dicho ensayo de caracterización mecánica se procede a realizar los electrolitos que se usarán posteriormente en los ensayos biológicos.

Para realizar el electrolito, se emplearán: botes de plástico, cinta adhesiva, las muestras y una estufa de incubación modelo 2000207 del fabricante SELECTA.

En primer lugar, se realiza un orificio tanto en la tapa del bote de plástico como en la muestra, mediante la Taladradora-fresadora OPTIMUM. A continuación, se cuelga la muestra con nylon a la tapa pasando por dichos agujeros, como se representa en la figura 9. Las muestras deben ir colgadas dentro de los botes y en cada uno de ellos se introduce 35ml de Electrolito Ringer-Hartmann o saliva artificial.



Figura 9: Botes con las muestras y el electrolito Ringer Hartmann

Ensayo	Elementos	Cantidad/L
<i>Electrolito Ringer-Hartmann</i>	NaCl	6g
	KCl	0,3718 g
	CaCl ₂	0,2297 g
	Lactato	5,146ml

Tabla 11: Composición de la saliva artificial o electrolito Ringer-Hartmann

Por último, se introducen todos los botes en el incubador, durante un total de 811 horas y 14 minutos a 37°C.

Una vez pasado el tiempo mencionado, se extraen las muestras del medio y se reservan los frascos bien sellados para su posterior uso en el ensayo de citotoxicidad. Al disponer de 3 muestras por cada aleación, se obtendrán 15 botes como los representados en la figura 9, con la suspensión de los iones liberados por cada muestra y la saliva artificial Ringer-Hartmann.

4.2. Caracterización mecánica

Durante la realización del presente trabajo se han realizado numerosos ensayos para caracterizar el material, en cambio, para la caracterización mecánica contamos con los ensayos realizados en el trabajo final de grado realizado de estas mismas aleaciones (Álvarez, 2023), en el que se han realizado ensayos de flexión a 4 puntos y ensayos de micro tracción, completándose la caracterización mecánica mediante el ensayo de micropunzonado.

4.2.1. Micropunzonado (*Small Punch*)

El ensayo Small Punch (SP) es un ensayo mecánico en el cual se utiliza una muestra de un espesor de alrededor de 0,5mm, para evaluar sus propiedades mecánicas. Dicho método es especialmente útil cuando se dispone de una cantidad de material limitada, como el estudio de algunos biomateriales o aleaciones metálicas avanzadas como la del presente estudio. El ensayo se caracteriza por aplicar una carga a la muestra a través de un punzón, lo que permite determinar características como la ductilidad, resistencia a la fractura y el comportamiento a la deformación. (Bruchhausen et al., 2016; Arunkumar, 2019).

Para realizar el Small Punch, se van a emplear tres muestras de cada aleación (Ti-35Nb-7Zr-5Ta, Ti-35Nb-7Zr-5Ta-4Sn y Ti-35Nb-4Zr-3Hf-5Ta-4Sn) y tres muestras de cada tipo de titanio (Ti6Al7Nb y Ti6Al4V), siguiendo la norma UNE-EN 10371.

Para la realización del ensayo, las muestras deben limpiarse y manipularse con cuidado. A continuación, se colocan en una matriz que las sujeta firmemente, la cual consta de un orificio por el que se introduce una bola de carburo de tungsteno, el diámetro de esta varía en función del material a emplear, en este caso se empleará una bola alrededor de 2,5mm de diámetro.

Se introduce el montaje de soporte-probeta en el equipo de ensayos Shimadzu Autograph AG-100 KN Xplus, el cual aplica una carga de compresión con una velocidad de 0,5 mm/min sobre la parte superior del montaje hasta la rotura del material, dicho equipo es controlado mediante un software llamado Trepezium X.

Una vez las muestras están aseguradas en el soporte e introducida la bola, el siguiente paso es calibrar el equipo, lo cual implica fijar la posición exacta de la muestra y asegurarse de que la fuerza inicial esté en 0 N. Se puede aplicar a la probeta una pequeña precarga, siempre que sea inferior al 10% de la fuerza del ensayo, con el objetivo de mantener la carga alineada con el centro de la probeta. Pero antes de comenzar se debe definir la fuerza igual a 0N.

Tras ser calibrado, se puede iniciar el ensayo. La fuerza se debe aplicar de forma gradual sin golpes, de acuerdo con el sistema de aplicación de fuerza incorporado a la máquina de ensayo. Una vez comience el ensayo el desplazamiento será monitoreado cada 0,1 segundos utilizando un extensómetro óptico. A medida que el punzón va avanzando, en el software se va registrando la curva la fuerza empleada en función del desplazamiento del propio punzón, es decir, la curva de tensión-deformación, además de proporcionar los valores de la tensión máxima y la tensión de rotura que se obtengan durante el ensayo.

Tras finalizar el ensayo, se obtendrán muestras como las que se observan en la figura 11, con una fractura en el centro producida por la bola del ensayo, estas muestras son las que se usarán posteriormente para realizar los electrolitos del ensayo de citotoxicidad mencionados en el apartado 4.1.6 *Realización de los electrolitos*.

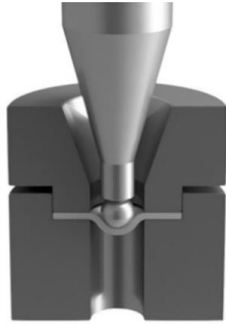


Figura 10: Montaje Soporte-probeta, bola y punzón del Small Punch test (Arunkumar, 2019)



Figura 11: Muestra tras el ensayo Small Punch (Arunkumar, 2019)

Una vez obtenidos los resultados, el software Trepezium X va a proporcionar la fuerza (N), la deflexión (mm) y el tiempo (s) y además se dispone del espesor de cada una de las muestras empleadas en el ensayo. El ensayo de micropunzonado permite estimar la resistencia a la tracción (R_m) mediante la fórmula 19.

$$R_m = \beta_{Rm} \cdot F_m / (h_0 \cdot u_m) \quad (19)$$

Siendo β_{Rm} una constante que para los aceros es 0,278, h_0 el espesor y u_m el desplazamiento del extensómetro

De esta forma, se pueden comparar los resultados obtenidos con el estudio realizado por Álvarez, (2023) de estas mismas aleaciones.

4.3. Análisis biológico

La siguiente parte del estudio se realiza en colaboración a la Universidad de Valencia, concretamente en el departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina. Durante la cual se pretende comprobar la viabilidad celular y por ende la biocompatibilidad de las aleaciones fabricadas (Ti-35Nb-7Zr-5Ta, Ti-35Nb-7Zr-5Ta-4Sn y Ti-35Nb-4Zr-3Hf-5Ta-4Sn) en comparación a las ya existentes (Ti6Al4V y Ti6Al7Nb).

4.3.1. Selección de las líneas celulares

El primer paso para iniciar el análisis biológico es seleccionar las líneas celulares que se van a emplear. Por un lado, como se quiere comprobar la efectividad del material para el uso odontológico, así como para la fabricación de implantes en general, se ha seleccionado las células madre procedentes de pulpa dental humana o hDPSC. Estas células están obtenidas de pacientes donantes que se aislaron y preservaron en nitrógeno líquido previamente a este trabajo, tal y como explican Mata et al. (2022).

Dichas células son reconocidas por su capacidad de diferenciación entre diversos fenotipos celulares, como odontoblastos, que son esenciales para la formación de dentina y regeneración de tejido dental, así como en osteocitos u osteoblastos entre otras, lo que las hace especialmente interesante en el campo de la medicina regenerativa (Nuti et al., 2016).

Por otro lado, se decide seleccionar la línea celular MG-63, estas células se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC® CRL-1427™, Barcelona, España), son células aisladas de osteosarcoma procedentes de adulto. Están consideradas osteoblastos inmaduros debido a que exhiben rasgos típicos de osteoblastos, como la actividad de la fosfata alcalina y la síntesis de osteocalcina. Estas células responden a estímulos externos, como la vitamina D, lo que les hace útiles para estudiar las primeras etapas de la diferenciación de osteoblastos. En cuanto a su capacidad de proliferación, cabe destacar, que el número de células MG63 y su proliferación se ven afectados por la rugosidad y la composición de la superficie del material en el que se cultivan.

Por todo esto, sus características las hacen ideales para evaluar la biocompatibilidad de un material, especialmente en el contexto de implantes ortopédicos y dentales, ya que la capacidad de las células osteoblásticas para adherirse, proliferar y diferenciarse adecuadamente en la superficie de un implante es un indicativo clave de que el material puede integrarse bien con el hueso circundante y, por lo tanto, ser exitoso a largo plazo (Lincks et al., 1998).

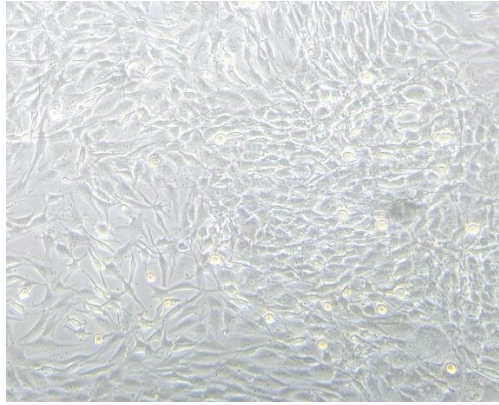


Figura 12: Células MG-63 microscopio óptico

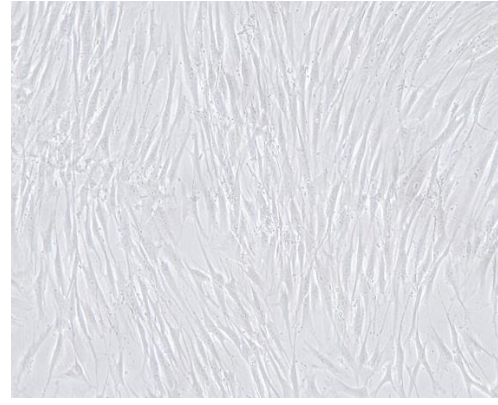


Figura 13: Células hDPSC microscopio óptico

4.3.2. Preparación de células en el material

En primer lugar, es necesario saber cuál es la concentración de células que se van a sembrar en cada una de las probetas, para ello se van a realizar varias pruebas de concentraciones basadas en anteriores estudios realizados en el laboratorio y otras investigaciones como la realizada por Rossi et al. (2022).

Sabiendo la medida promedio de las muestras, por los anteriores ensayos realizados, se calcula el área de las muestras, tanto las circulares como las cuadradas, correspondientes a las de Ti6Al4V y Ti6Al7Nb y aleaciones fabricadas respectivamente. Para ajustar los parámetros, se van a realizar pruebas con distintas concentraciones de células hDPSC. En el primer cultivo se siembra; una primera concentración de 1800 células por cm^2 , una concentración intermedia de 3333 células por cm^2 y otra de 5000 células por cm^2 . Mediante la ecuación 20, se calcula la cantidad de células necesarias según la muestra que se vaya a sembrar.

$$n^{\circ}\text{Células} = \frac{\text{area de la muestra}}{\text{Células} \times \text{cm}^2} \quad (20)$$

Finalmente, tras realizar los pasos que se explicarán en los siguientes apartados y realizar diversas pruebas de concentraciones, se van a ajustar los parámetros de concentración de las células a 6000 células por cm^2 , por lo que el número de células con el que se realizarán los ensayos serán los recogidos en la tabla 12.

Material	Área	Nº de células
TNZT, TNZTS Y TNZHTS	0,6 cm^2	6780
Ti6Al7Nb y Ti6Al4V	1,13 cm^2	3600
Control	0,8 cm^2	4800

Tabla 12: Número de células necesarias para los ensayos de proliferación y adhesión según el material.

Cabe destacar que, aunque las muestras hayan sido esterilizadas por autoclave, antes de sembrarlas se esterilizarán de nuevo en un dispositivo de luz ultravioleta depositándolas en placas Petri durante 4 horas aproximadamente.

4.3.3. Tripsinización y conteo de células DPSC y MG63

Una vez clara la concentración de células a emplear, se preparan los materiales necesarios para realizar los cultivos. Los experimentos que requieran una manipulación de los cultivos celulares serán realizados en una campana de flujo laminar Mars Safety Class 2 (ScanLaf, Lynge, Dinamarca).

Se dispone de frascos de cultivo de las líneas celulares deseadas, dichas células han sido descongeladas previamente y sembradas en frascos como el representado en la figura 14. Introducimos los materiales necesarios (tabla 13) en la campana de flujo laminar. Cabe destacar, que todo el material que se introduzca en la campana debe ser previamente rociado con una mezcla de etanol y agua destilada.

<i>Materiales</i>	<i>Cantidad</i>
Pipeta automática	1
Micropipeta manual de 0,5 μ l -10 μ l	1
Puntas de micropipeta de 10 μ l	1 (caja)
Puntas de pipeta automática de 10ml y 5ml	2
Pipetas Pasteur de 3ml	1
Frascos de cultivo hDPSC y MG-63	2
Tripsina	2ml
Medios de cultivo hDPSC y MG-63	10ml x2
PBS	8ml
Filtro StemCell	2

Tabla 13: Materiales necesarios para la tripsinización de los frascos de cultivo.

Una vez introducidos los materiales necesarios, se procede a tripsinizar o levantar las células del frasco de cultivo. Para ello, en primer lugar, se va a retirar el medio de las células, en el caso de células madre de pulpa dental humanas (hDPSCs) el medio de proliferación se compone de medio mínimo esencial alfa (α MEM; Gibco, EEUU) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco), 1% de L-glutamina 100X 200 mM (EuroClone, Italia), 1% de penicilina-estreptomicina 100X y 1% de anfotericina B 100X (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Por otro lado, el medio de proliferación de las células MG63 se compone de Minimum Essential Media (MEM; Thermo Fisher Scientific, Reino Unido) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Gibco, EEUU), 1% de L-glutamina 100X 200 mM (EuroClone, Italia), 1% de penicilina-estreptomicina 100X, 1% de anfotericina B 100X (Thermo Fisher Scientific, EEUU), 1% de aminoácidos no esenciales (MEM Non-Essential Amino Acids Solution, NEAA; Thermo Fisher Scientific) y 1% de Piruvato sódico al 100nM (Thermo Fisher Scientific).

Tras haber retirado el medio de los frascos, se realiza un lavado con PBS, debido a que uno de los componentes del medio es suero fetal bovino (FBS) que inactiva la tripsina. A continuación, se añaden 2 ml de tripsina con una pipeta Pasteur, se cierra el frasco y se introduce en incubador CelCulture CO_2 incubator durante 3 minutos a 37°C, debido a que esta es la temperatura a la que la tripsina está activa. Pasado el tiempo, se golpea el frasco con la mano para acabar de despegar las células y se introduce de nuevo en la campana.

Una vez las células están en suspensión, se añade de medio 4 veces más que de tripsina, es decir, en este caso 8 ml del medio correspondiente (de MG-63 o hDPSC) mediante el cual se inactiva la tripsina gracias al FBS, y se resuspende bien para evitar aglomeraciones de células. Además de resuspender con la pipeta, se va a utilizar un filtro Stemcell al introducirlo al frasco para evitar estos agregados celulares y conseguir una mezcla más homogénea (figura 14). Obteniendo así una suspensión celular de 10ml, compuesta por los 2ml de tripsina y 8ml de medio.

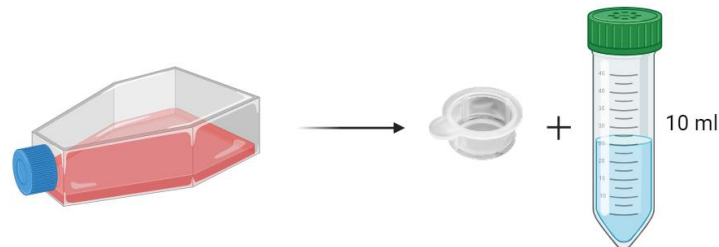


Figura 14: Proceso tripsinización, del frasco de cultivo a bote evitando aglomeraciones celulares mediante el filtro StemCell

El segundo paso es el conteo de las células. Para poder determinar la cantidad de mezcla que se deposita en las muestras, es necesario saber que concentración de células hay en los 10ml de suspensión celular. Para ello, se extraen 10 μl de la suspensión y se depositan en un Eppendorf junto con 10 μl de tripán azul y se resuspende bien. A continuación, se deposita la mezcla en un portaobjetos específico y se introduce en un contador automático de células EVE automatic cell counter (figura 15) que proporcionará la cantidad de células que hay en 1000 μl , así como el porcentaje de estas que son viables.



Figura 15: Contador de células EVE automatic cell counter

Seguidamente, se realizan los cálculos necesarios para saber los microlitros de suspensión que hay que depositar en cada muestra para realizar los cultivos. Habiendo obtenido el número de células en 1000 μl ($Cel_{1000\mu\text{l}}$) y el número de células necesarias para tener una concentración de 6000 células/ cm^2 (Cel_{mat}) (Tabla 12), se calcula mediante la ecuación 21, la cantidad de microlitros necesarios en cada una de las muestras.

$$Suspensión (\mu\text{l}) = \frac{Cel_{mat} \cdot 1000\mu\text{l}}{Cel_{1000\mu\text{l}}} \quad (21)$$

4.3.4. Siembra para evaluación de adhesión, proliferación, expresión génica y HRFSEM

Una vez definidas las cantidades necesarias para cada uno de los tipos de implante, se preparan los materiales necesarios (tabla 14) dentro de la campana de alto flujo para realizar los cultivos sobre los implantes.

<i>Materiales</i>	<i>Cantidad</i>
Micropipeta manual de 0,5 μ l – 10 μ l	1
Micropipeta manual 10 μ l – 100 μ l	1
Puntas de micropipetas	1 (caja)
Pipetas Pasteur de 3ml	2
Bote con suspensión de hDPSC y MG-63	2
Medios de cultivo hDPSC y MG-63	10ml x2

Tabla 14: Materiales necesarios para realizar el cultivo celular sobre las muestras

El objetivo de este estudio es analizar la viabilidad celular y por ende la biocompatibilidad de los materiales por lo que, como anteriormente se ha comentado, se van a realizar ensayos sobre las muestras fabricadas de adhesión, proliferación y expresión génica.

I. ADEHSIÓN

La capacidad de integración tisular de los biomateriales es un factor fundamental para determinar la osteointegración y biocompatibilidad de este. Estos factores dependen directamente del comportamiento y adhesión de las células a su entrono (Gómez et al., 2007).

Este ensayo indica la cantidad de células que se adhieren a la superficie del material en las primeras 5h, lo que es un indicativo directo de la compatibilidad del material con el crecimiento celular. Analizar como varía la adhesión celular según el material permite entender la dinámica de la interacción célula-material. Un buen material permitirá una adhesión rápida y sostenida.

Una vez se han introducido en la campana los materiales necesarios y se han realizado los cálculos de las cantidades necesarias, se procede a la siembra de los materiales. Se deben sembrar tres muestras de cada condición en placas de 24 pocillos para cada ensayo, así como sus correspondientes controles.

Para el ensayo de adhesión, se colocan las muestras previamente esterilizadas en el ultravioleta en una placa de 24 pocillos, a continuación, se procede a depositar los microlitros de suspensión celular adecuados sobre las muestras mediante la micropipeta.

Como se ha comentado anteriormente, al realizar dos tipos de ciclos de sinterizados distintos (figura 5) se van a dividir las condiciones en 2, es decir, de las 3 aleaciones fabricadas (TNZT, TNZTS Y TNZHTS) se obtendrán 6 condiciones. Por otro lado, en cada tipo de condición se sembrarán dos muestras con células hDPSC y una con MG-63, incluyendo las aleaciones Ti6Al7V y Ti7Al7Nb (figura 17). Además de las muestras, se sembrará un control de adhesión como el representado en la figura 16.

Una vez se siembran todas las muestras, la placa se deposita en la incubador de CO₂ y tras 1h se añade el medio correspondiente a la línea celular y se introducen de nuevo en el incubador durante 4h más.

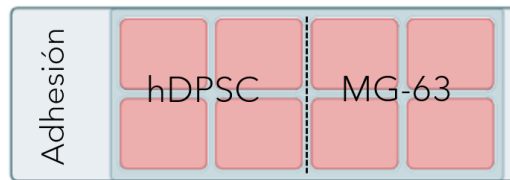


Figura 16: Control de adhesión.

II. PROLIFERACIÓN

El ensayo de proliferación indica si las células son capaces de sobrevivir en el medio y multiplicarse al estar en contacto con el material de estudio, por lo que se considera un indicativo de que el material no es tóxico y que su superficie es propicia para la actividad biológica, lo cual es esencial para aplicaciones a largo plazo.

Las condiciones utilizadas en este ensayo son idénticas a las de adhesión, se utilizarán la misma cantidad de células por muestra con la única diferencia del tiempo que se deja al cultivo proliferar. En este caso las células estarán en el incubador durante 72h y también se añadirá aproximadamente 1ml de medio 1h después de sembrarlas. Esto permitirá a las células tanto adherirse al material como multiplicarse. Además de los cultivos en la placa de 24 pocillos (figura 17), se siembra un control de proliferación de hDPSC y MG-63 como el representado en la figura 16.

III. EXPRESIÓN GÉNICA

En el ensayo de expresión génica se varía la concentración de células que se deposita sobre las muestras, en este caso el ensayo se dejará en proliferación durante 2 semanas, por lo que se tiene que reducir la concentración de estas. Por ello, en este caso se empleará una concentración de 2000 células/cm².

Como se varía la concentración celular, se ha de calcular de nuevo la cantidad de células que se deben depositar en las muestras según el área de estas, para ello se empleará la ecuación 20 dando como resultado la tabla 15.

Material	Área	Nº de células
TNZT, TNZTS Y TNZHTS	0,6cm ²	2260
Ti6Al7Nb y Ti6Al4V	1,13cm ²	1200
Control	0,8cm ²	1600

Tabla 15: Número de células necesarias para el ensayo de expresión génica según el material.

Al variar la cantidad de células, mediante la ecuación 21 se realiza de nuevo el cálculo de los microlitros de suspensión celular necesarios para obtener 2000 células/cm² en cada una de las probetas.

Durante el tiempo de proliferación, como se ha comentado anteriormente, se ha de añadir medio alrededor de 1h después de haber sembrado las células en las muestras. Debido a que las muestras en este caso se dejarán en proliferación durante 2 semanas, es importante cambiar el medio de proliferación cada 2 o 3 días aproximadamente, retirando el existente y añadiendo 1ml aproximadamente.

Cabe destacar que la disposición de las probetas en las placas de 24 pocillos donde se van a realizar los cultivos celulares es la misma que en adhesión y proliferación, representada en la figura 17 y además de esta, también se siembra un control de expresión génica de hDPSC (D) y MG-63 (M) con la concentración correspondiente al ensayo (figura 16).

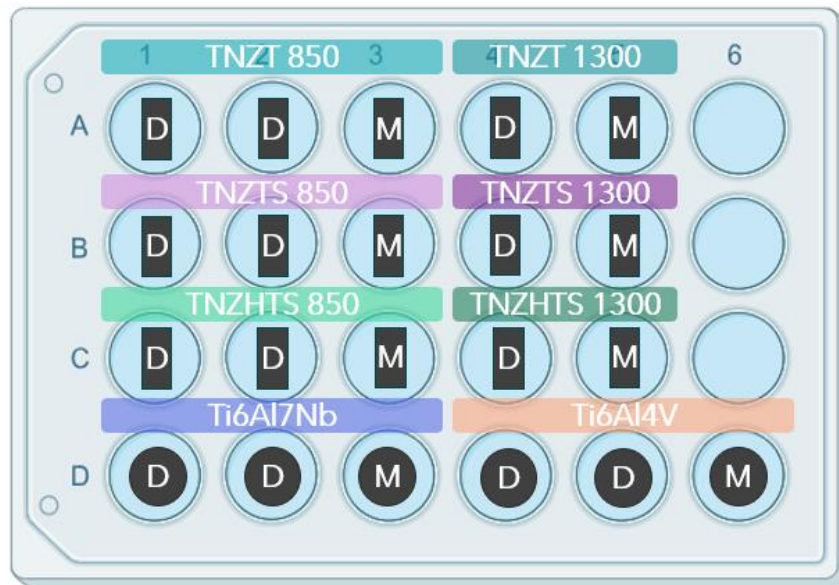


Figura 17: Disposición de las muestras para el ensayo de adhesión, proliferación y expresión génica.

Una vez finalizadas las 2 semanas de proliferación, se retira el medio de los pocillos para guardarlo en microtubos Eppendorf individuales y congelarlos a -80°C , es imprescindible cambiar la punta de la pipeta por cada pocillo para evitar posibles contaminaciones. A continuación, a los pocillos sin medio se le añade $500\mu\text{l}$ de trizol y se resuspende mecánicamente. La solución resultante de cada uno de ellos se guarda en Eppendorfs individuales que también se pueden congelar a -80°C .

IV. HRFSEM

La única diferencia en cuanto al cultivo de las células que se llevarán al microscopio de barrido de campo de alta resolución es el método que se empleará para fijarlas. Tanto la concentración de células, la disposición de las muestras y el tiempo que se deje proliferar el cultivo, será como en el ensayo de proliferación.

4.3.5. Fijación de las células de adhesión, proliferación y HRFSEM

Una vez completados los tiempos de cada uno de los ensayos, recogidos en la tabla 16, se han de fijar las muestras. Para ello, se utilizarán dos tipos distintos de fijación según se vayan a destinar a realizar un marcaje con fluorescencia o al HRFSEM.

Ensayo	Tiempo de proliferación
Adhesión	5 horas
Proliferación	3 días
Expresión génica	2 semanas

Tabla 16: Tiempo de los cultivos en implantes en proliferación según el tipo de ensayo.

Adhesión y proliferación

Para fijar ambos ensayos se lleva a cabo el mismo protocolo. En primer lugar, se retiran las muestras del incubador, así como el medio de proliferación que contienen los pocillos. A continuación, se realiza un lavado con PBS para eliminar los posibles restos de medio y se introduce en cada uno de los pocillos alrededor de 600 μ l de formol al 4% a 4°C, y se deja en la nevera durante 20 minutos. Pasado este tiempo, se retira el formol y lava de nuevo con PBS. Una vez realizado el lavado, se puede realizar la tinción para el marcaje con fluorescencia o dejar en PBS el tiempo que se desee.

Para llevar a cabo el marcaje por fluorescencia se va a utilizar, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) de y faloidina conjugada con tetrametilrodamina (TRITC) ambas de Thermo Fisher Scientific, EE. UU. En primer lugar, se ha de realizar la mezcla de DAPI y faloidina, cuya concentración es 1:100 y 1:400 respectivamente. Para calcular la cantidad de PBS, DAPI y faloidina que hay que utilizar, se sigue las ecuaciones descritas a continuación.

Se desea una mezcla de 5ml (*cantidad de mezcla deseada* $_{\mu$ l), para realizar la tinción, por lo que los microlitros de DAPI y faloidina serán:

$$Faloidina_{\mu l} = \frac{cantidad\ de\ mezcla\ deseada_{\mu l}}{100} \quad (22)$$

$$DAPI_{\mu l} = \frac{cantidad\ de\ mezcla\ deseada_{\mu l}}{400} \quad (23)$$

La cantidad de PBS necesario para que la mezcla de DAPI y faloidina cumpla con las concentraciones deseadas será:

$$PBS_{\mu l} = cantidad\ de\ mezcla\ deseada_{\mu l} - DAPI_{\mu l} - Faloidina_{\mu l} \quad (24)$$

A continuación, se elimina el PBS de las muestras y se añade la cantidad necesaria para cubrir uniformemente toda la superficie de la muestra con la mezcla. Este proceso se tiene que realizar en un ambiente al que no le esté dando luz directamente, debido a que ambos reactivos son sensibles a la luz, por lo que podrían fotodegradarse o perder su capacidad de fluorescencia si están expuestos a ella.

Tras la tinción, ya se pueden ver las muestras en el microscopio de fluorescencia Leica DM4000 B, utilizando el paquete de software Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF) para realizar las fotografías, ambos de Leica Microsystems (Alemania).

Una vez realizadas las fotografías, se van a procesar a través del software gratuito ImageJ Fiji (Schindelin et al., 2012). Mediante dicho programa, se puede contabilizar los núcleos de cada una de las imágenes, con el fin de estimar la cantidad de células de cada uno de los ensayos realizados. El proceso para para realizar el conteo es el siguiente: En primer lugar, se importa la imagen únicamente de los núcleos que se desean contar. A continuación, se modifica la imagen a 16 bits y el programa analiza las figuras 3D de la imagen, en este caso los núcleos. Da como resultado 4 fotos como se representan en la figura 18 y en número de núcleos existentes.

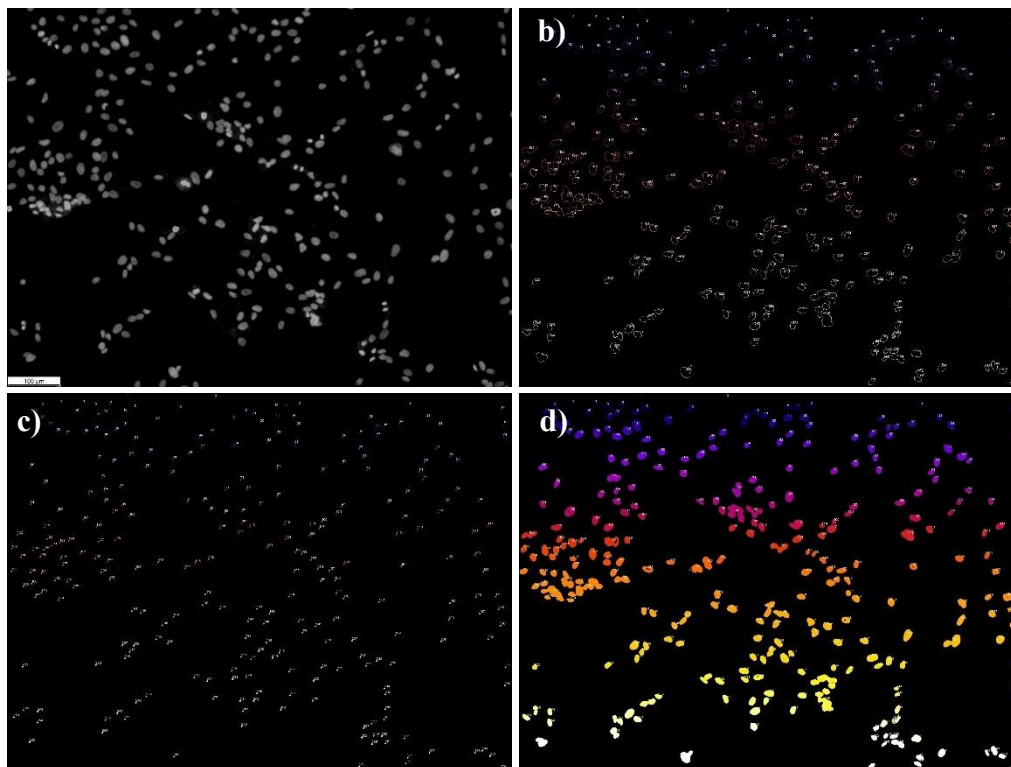


Figura 18: Imágenes extraídas de un control de proliferación de hDPSC, a) cambio de la imagen a binaria para extraer el fondo. b) extracción de la forma de los núcleos. c) centro de cada núcleo. d) máscara sobre los núcleos.

Microscopio de barrido de emisión de campo de alta resolución – HRFSEM

Para los cultivos que se han realizado con el objetivo de llevarlos al microscopio de barrido de emisión de campo de alta resolución (HRFSEM), se va a emplear otro método de fijación, debido a que el objetivo es observar las muestras respetando al máximo posible la integridad de las estructuras celulares. Por lo que en este ensayo se utilizara el glutaraldehído, que es un potente agente fijador que forma enlaces cruzados con las proteínas, preservando las estructuras celulares en un estado muy cercano al natural (Hopwood, 1973).

El método es similar a las fijadas con formol, puesto que, tras realizar el lavado con PBS se añade en las muestras el glutaraldehído al 2,5% y se deja durante 20 minutos. Pasado este tiempo se realiza un lavado con PB y se les añade 1ml aproximadamente de PB hasta que se transporten al HRFSM. Cabe destacar, que es importante colocar las muestras en una solución de PB en lugar de PBS debido a que con PBS se generarían una gran cantidad de cristales, debido a su contenido de cloruro de sodio (NaCl), que impedirían ver las estructuras celulares.

4.3.6. Protocolo para evaluación de citotoxicidad – MTS

Para realizar el ensayo de citotoxicidad o viabilidad celular, se va a emplear el 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2(4-sulfofenil)-2H tetrazolio, conocido comúnmente como MTS. En este ensayo colorimétrico, el MTS va a ser reducido generando un producto soluble denominado formazan, cuya concentración será proporcional a las células vivas. Para llevar a cabo el ensayo se procede de la siguiente manera:

1. Cultivo de células

Para realizar este cultivo, se utiliza una placa de 96 pocillos, debido a que se utilizarán 3 pocillos para cada uno de los 15 electrolitos. La concentración que se llevará a cabo en este ensayo es de 10000 células hDPSC por pocillo.

En primer lugar, se cultivan las células, como se ha explicado en el apartado 4.3.4, y se añaden 300 μ l de medio de proliferación durante las primeras 24 horas. Pasado este tiempo, se añaden 100 μ l del electrolito a evaluar. Además de los pocillos con electrolitos, se incluyen un control negativo y uno positivo; en uno de los pocillos de control se sembrarán células y se agregarán 400 μ l de medio de proliferación, mientras que en otro se añadirán 400 μ l de látex. Por lo tanto, se obtendrá como control negativo medio de cultivo específico hDPSC, como control positivo células en presencia de látex y los cultivos con el electrolito a evaluar. Cabe destacar que cada una de las condiciones se analizará por triplicado como se representa en la (figura 19).

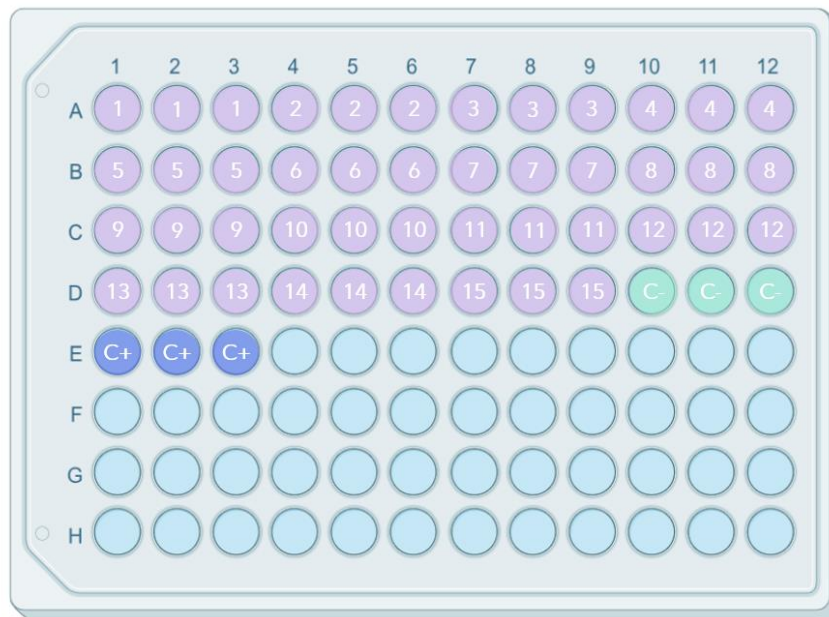


Figura 19: Disposición del cultivo celular para el ensayo de citotoxicidad.

Material	Número del electrolito
TNZT	1, 2 y 3
TNZHTS	4, 5 y 6
TNZTS	7, 8 y 9
Ti6Al7Nb	10, 11 y 12
Ti6Al4V	13, 14 y 15

Tabla 17: Numero de electrolitos de cada aleación

2. Ensayo de citotoxicidad

Una vez pasadas las 48h correspondientes al tiempo de proliferación, se han de añadir 40 μ l de MTS. Para esta parte del ensayo es imprescindible trabajar sin presencia de luz directa. Al añadir el MTS se introduce la placa en la incubadora durante 1 a 4 horas, en este caso se dejarán durante 3 horas en incubación. Finalizado este tiempo, se procede a medir en el espectrofotómetro VICTOR3 Multilabel Plate Reader de PerkinElmer con una longitud de onda de 490 nm.

Una vez obtenidos los datos, se calcula el porcentaje de viabilidad de cada condición (%Viabilidad_C), en función de la media de la absorbancia del control negativo (m_{C-}) y la media de absorbancia de cada condición (m_C). Además, se asume que la media de absorbancia del control negativo corresponde al 100% de viabilidad celular y mediante un factor de conversión, calculamos la viabilidad de nuestras condiciones de estudio según la ecuación 25.

$$\%Viabilidad_C = \frac{100\% \text{ de viabilidad}}{m_{C-}} \cdot m_C \quad (25)$$

4.3.7. Protocolo para evaluación de expresión génica

Un enfoque crítico en la evaluación de la biocompatibilidad, es el análisis de la expresión génica en células expuestas a la aleación. Dicho ensayo permite detectar la expresión de genes específicos que son indicativos de como responden las células ante el material. El análisis de expresión génica incluye técnicas como la PCR en tiempo real (qPCR) y la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa o retrotranscripción (RT-PCR), las cuales permiten cuantificar y comparar la expresión de genes clave en diferentes condiciones, proporcionando una visión detallada de las respuestas celulares.

En la presente investigación, se han seleccionado un conjunto de genes fundamentales para evaluar las aleaciones con células osteogénicas, un aspecto crucial para su aplicación en implantes tanto ortopédicos como odontológicos. Entre los genes analizados se incluyen GAPDH, COL1A1, RYNX2 Y BGLAP. Los pasos para realizar los ensayos son los descritos a continuación.

1. Extracción y cuantificación de RNA

Con los Eppendorfs procedentes de los cultivos de expresión génica, se realiza la extracción de RNA. Para ello, en primer lugar, es necesario sacar del congelador los Eppendorfs correspondientes a las células y dejar que se atemperen por aproximadamente 5 minutos, pasado este tiempo se realiza un spin para que las gotas queden en la parte inferior del eppendorf. A continuación, se añade 100 μ l de cloroformo (200 μ l cloroformo/ 1.000 μ l de trizol), lo que nos permite separar la fase acuosa que contiene el RNA. Seguidamente, se centrifuga durante 15 minutos a 12.000 RCF a 4°C y se pasa a la campana de gases para continuar el proceso.

Una vez las fases están completamente separadas, se coge el máximo volumen posible de la fase acuosa y se pasa a un eppendorf nuevo, al que previamente se le ha añadido 1 μ l de glucógeno, que funciona de *carrier* para el RNA. La fase orgánica, se puede conservar a -80°C para futuras determinaciones como extraer el DNA o proteínas.

Al eppendorf donde se ha añadido la fase acuosa correspondiente al RNA, se le añade 250 μ l de isopropanol (500 μ l isopropanol/ 1.000 μ l de trizol) para precipitar los ácidos nucleicos, y se deja reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se introduce en el

congelador a -80°C durante 15 minutos, para favorecer la precipitación de RNA. A continuación, se centrifuga durante 10 minutos a 12.000 RCF a 4°C y se elimina el sobrenadante si arrastrar el pellet. Se añade $500\ \mu\text{l}$ de etanol 75% y se centrifuga 5 minutos 7.500 RCF a 4°C y se vuelve a desechar el sobrenadante. Se repite de nuevo este lavado con etanol y se deja secar en el termobloque a 65°C para diluir bien el RNA. Finalmente, se resuspende en $30\ \mu\text{l}$ de H_2O libre de RNAsas y DNAsas, y para diluir bien el RNA se incuban en el termobloque 5 minutos a 65°C con la tapa de eppendorf cerrada.

Para determinar la pureza y cuantificar el RNA de todas las muestras, se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop One atendiendo al valor de las ratios A260/280 y A260/320, que indican la presencia de ácidos nucleicos en la muestra y la presencia de sales respectivamente. Las muestras de RNA se conservarán en el congelador a -80°C hasta que se realice la reacción de retrotranscripción.

Antes de continuar el proceso, es necesario realizar los cálculos previos a la retrotranscripción, con la que se pasará de RNA a cDNA.

Debido a que se van a estudiar 4 genes y cada gen se estudia por duplicado, se necesitan un total de 8 pocillos por cada muestra. En la qPCR, para cada pocillo se necesita $1\ \mu\text{l}$ de cDNA, por lo que, para calcular los microlitros de mezcla de cDNA se sigue la ecuación 26.

$$(2\ \mu\text{l} \cdot 4\ \text{genes}) + 2\ \mu\text{l de reserva} = 12\ \mu\text{l de mezcla por muestra} \quad (26)$$

Por otro lado, en la qPCR se necesitan $4\ \text{ng}/\mu\text{l}$ de cDNA para producir una buena reacción, por lo que, al necesitarse $12\ \mu\text{l}$, la concentración de RNA será:

$$4\ \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \cdot 12\ \mu\text{l} = 48\ \text{ng} \quad (27)$$

Se dispone de los resultados proporcionados por el NanoDrop de la concentración de RNA que hay en cada una de las muestras. Por lo general habrá concentraciones de RNA muy elevadas en las que para conseguir 48ng de RNA, se debe de pipetear muy poco volumen, lo cual es inviable a la práctica, por lo que, es necesario realizar diluciones en H_2O .

Una vez realizadas las diluciones, se disponen de las nuevas concentraciones de RNA ($[\text{RNA}_d]$). Con dichos resultados se ha de calcular los microlitros de la dilución y los de H_2O que hay que añadir en un nuevo eppendorf para conseguir exactamente 48ng de RNA de cada una de las muestras. Se necesitan $6\ \mu\text{l}$ en total, debido a que de los $12\ \mu\text{l}$ de cDNA, $6\ \mu\text{l}$ deben ser mastermix (MM) y $6\ \mu\text{l de RNA}$. Siguiendo las ecuaciones 28 y 29 se puede calcular la cantidad de dilución y de agua respectivamente, para conseguir los ng deseados.

$$\mu\text{l de dilucion} = \frac{48\ \text{ng}}{[\text{RNA}_d]} \quad (28)$$

$$\mu\text{l de H}_2\text{O} = 6\ \mu\text{l} - \mu\text{l de dilucion} \quad (29)$$

Una vez se dispone de los cálculos necesarios se procede a realizar la retrotranscripción.

2. Reacción de retrotranscripción – RT PCR

La transcripción reversa o retrotranscripción (RT) es un método molecular que posibilita la generación de ADN complementario (cDNA) a partir de moléculas de ARN mensajero (mRNA) mediante la enzima transcriptasa reversa. Cada reacción ha de contener la mastermix (MM) descrita en la tabla 18.

Compuestos	Cantidad μ l
H2O	1,92
10X RT Buff	1,2
Random primers	1,2
dNTPs	0,48
RNasa Inhibitor	0,6
Rev. transcrip	0,6
TOTAL	6

Tabla 18: Compuestos de la mastermix para una muestra para la retrotranscripción.

Cabe destacar que las cantidades recogidas en la tabla 18, es para una única muestra y 1 gen, por lo que hay que multiplicar esos valores por 60 (57 muestras + 1bRT + 2 de margen), en el caso del bRT se le añadirá además de la MM, 6 μ l de H₂O sin RNA.

Compuestos	Cantidad μ l
H2O	115,2
10X RT Buff	72,0
Random primers	72,0
dNTPs	28,8
RNasa Inhibitor	36,0
Rev. transcrip	36,0
TOTAL	360

Tabla 19: Compuestos y cantidades de la mastermix para la retrotranscripción de 57 muestras

Tras haber calculado las cantidades necesarias para realizar la retrotranscripción de todas las muestras, se procede a realizar las mezclas. En primer lugar, se extraen las muestras RNA del congelador y se dejan descongelar 5 minutos en el termobloque a 37°C, se sacan también el resto de los compuestos (dNTPs y las enzimas) y se dejan descongelando a temperatura ambiente. Una vez todo descongelado en la campana de gases, se posicionan las enzimas y las muestras en hielo y el resto a temperatura ambiente. A continuación, añadimos en orden en otro eppendorf los compuestos para la mastermix. Es importante trabajar en hielo, para ello se utilizan unas placas de hielo para mantener todas las mezclas y reactivos fríos. Ya lista la mastermix y las diluciones, se preparan los eppendorfs rotulados donde se va a realizar la retrotranscripción

En primer lugar, mediante los datos calculados en las ecuaciones 28 y 29, se añaden los microlitros de agua necesarios para las diluciones. Posteriormente, se añade la mastermix en cada uno de los eppendorfs sin necesidad de cambiar la punta de la pipeta y, por último, el RNA en la pared del eppendorf cambiando de punta en cada muestra para evitar contaminaciones obteniendo un total de 12 μ l de mezcla.

Una vez preparadas todas las reacciones, se ponen en el termociclador con los siguientes ciclos de temperaturas: Comienza con una incubación a 25 °C durante 10 minutos, seguida de un ciclo a 48 °C durante 30 minutos en los que la enzima lleva a cabo la retrotranscripción y finalmente una incubación a 95 °C durante 5 minutos donde se inactiva la transcriptasa reversa. Termina con un ciclo de 4°C hasta que el cDNA se guarda en el congelador a -20°C hasta que se realice el siguiente ensayo.

3. Real Time PCR – qPCR

Le ensayo de *Real Time PCR* o qPCR, permite cuantificar los productos de la PCR durante cada ciclo de reacción, produciendo una media cuantitativa de los productos de PCR acumulados. Para ello, se utilizan sondas de hidrólisis cuyo extremo 5' lleva conjugado un fluoruro que actúa como *reporter* o donador de fluorescencia y en su extremo 3' una molécula aceptadora que se conoce como *quencher*. La energía que es emitida por el *reporter* es absorbida por el *quencher*, lo que resulta en una señal de fluorescencia muy baja. Dicha supresión de fluorescencia ocurre hasta que se da la hibridación de la sonda, que supone la liberación del *quencher*, y por tanto la señal de *reporter* es captada por el detector midiendo así un aumento de la fluorescencia. Finalmente, se obtiene el ciclo *threshold* (CT) que es el número de ciclos que tarda una reacción en llegar a una cierta cantidad de fluorescencia, dicho valor CT de cada una de las reacciones, se puede usar para cuantificar un nivel de expresión relativa (VanGuilder et al., 2008).

Durante esta investigación se realiza la reacción Real Time PCR para las muestras de cDNA obtenidas a partir de la reacción de transcripción reversa explicada anteriormente, de los ensayos con células hDPSC y MG63.

Para este ensayo, todas las muestras se analizan por duplicado y la media del valor CT se usará posteriormente para el análisis de los 4 genes seleccionados: GAPDH, COL1A1, RYNX2 Y BGLAP, seleccionados por potencial para evaluar la interacción de los materiales con células osteogénicas.

GEN	Características
<i>GAPDH</i>	El <i>housekeeping gene</i> GAPDH (Hs99999905_m1) se utiliza como control endógeno, debido a que se trata de un gen con expresión constante y por ello, se empleara para normalizar los datos en el posterior análisis.
<i>COL1A1</i>	El gen COL1A1 (Hs00164004_m1) codifica para la cadena alfa-1 del colágeno tipo I, el principal componente de la matriz extracelular en el tejido óseo. Su expresión se emplea como un marcador de la formación de matriz ósea y se puede utilizar para evaluar la capacidad del material de promover la síntesis de colágeno en las células.
<i>RYNX2</i>	El gen RUNX2 (Hs00231692_m1) es un factor de transcripción clave en la diferenciación osteogénica. Se utilizada para evaluar la capacidad del material de inducir la diferenciación de osteoblastos.
<i>BGLAP</i>	El gen BGLAP (Hs01587814_g1), que codifica la proteína osteocalcina, es un marcador tardío de la maduración de osteoblastos. Su expresión se analizará para observar el grado de mineralización y maduración de las células óseas en respuesta a la aleación.

Tabla 20: Características de los genes que se analizan en la qPCR

Cara a la realización del ensayo, se va a utilizar una placa de 385 pocillos, con un volumen final de 10µl por pocillo: 1 µl de cDNA, 0,5 µl de sonda, 5 µl de Master Mix TaqMan™ Gene Expression 2X y 3,5 µl de agua libre de DNAsas y RNAsas (tabla 22).

En primer lugar, se preparan los 4 eppendorfs para depositar la mezcla correspondiente a cada gen. Se disponen de 21 muestras, codificadas de la L21 a la L40, además se incluyen controles de DPSC y MG63, así como controles negativos para cada uno de los genes en los que únicamente se incluye agua. La disposición que se utilizará en la placa para realizar el ensayo es la representada en la tabla 21, en la que cada muestra es analizada por duplicado con cada uno de los genes, obteniendo finalmente para cada gen 60 pocillos con un volumen de 10µl por pocillo, como se ha comentado anteriormente.

Como para cada gen se van a utilizar 60 pocillos + 2 de margen, se ha de preparar la mezcla con: 32 µl de sonda correspondiente al gen, 320 µl de Master Mix TaqMan™ Gene Expression 2X y 224 µl de agua libre de DNAsas y RNAsas. Con esto obtendremos 4 eppendorfs de 576 µl correspondientes a cada uno de los genes.

Una vez tenemos la mezcla, se coje la placa de 384 pocillos y se marcan las filas para añadir el cDNA y el mix en la misma posición que el representado en la tabla 21. Se va pocillo por pocillo añadiendo 9 µl del mix del gen que corresponda. Una vez los pocillos tienen el mix, se añade 1µl del cDNA menos en los controles negativos, en los que se debe añadir 1µl de agua.

	GAPDH		RUNX2		COL1A 1		BGLAP		GAPDH		RUNX2		COL1A 1		BGLAP		GAPDH		RUNX2		COL1A 1		BGLAP	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	L21								L31								L41							
	L2 1	L2 1	L2 1	L2 1	L2 1	L2 1	L2 1	L2 1	L3 1	L3 1	L3 1	L3 1	L3 1	L3 1	L3 1	L3 1	L4 1	L4 1	L4 1	L4 1	L4 1	L4 1	L4 1	L4 1
B	L22								L32								C13							
	L2 2	L2 2	L2 2	L2 2	L2 2	L2 2	L2 2	L2 2	L3 2	L3 2	L3 2	L3 2	L3 2	L3 2	L3 2	L3 2	C1 3	C1 3	C1 3	C1 3	C1 3	C1 3	C1 3	C1 3
C	L23								L33								C14							
	L2 3	L2 3	L2 3	L2 3	L2 3	L2 3	L2 3	L2 3	L3 3	L3 3	L3 3	L3 3	L3 3	L3 3	L3 3	L3 3	C1 4	C1 4	C1 4	C1 4	C1 4	C1 4	C1 4	C1 4
D	L24								L34								C15							
	L2 4	L2 4	L2 4	L2 4	L2 4	L2 4	L2 4	L2 4	L3 4	L3 4	L3 4	L3 4	L3 4	L3 4	L3 4	L3 4	C1 5	C1 5	C1 5	C1 5	C1 5	C1 5	C1 5	C1 5
E	L25								L35								C16							
	L2 5	L2 5	L2 5	L2 5	L2 5	L2 5	L2 5	L2 5	L3 5	L3 5	L3 5	L3 5	L3 5	L3 5	L3 5	L3 5	C1 6	C1 6	C1 6	C1 6	C1 6	C1 6	C1 6	C1 6
F	L26								L36								C17							
	L2 6	L2 6	L2 6	L2 6	L2 6	L2 6	L2 6	L2 6	L3 6	L3 6	L3 6	L3 6	L3 6	L3 6	L3 6	L3 6	C1 7	C1 7	C1 7	C1 7	C1 7	C1 7	C1 7	C1 7
G	L27								L37								C18							
	L2 7	L2 7	L2 7	L2 7	L2 7	L2 7	L2 7	L2 7	L3 7	L3 7	L3 7	L3 7	L3 7	L3 7	L3 7	L3 7	C1 8	C1 8	C1 8	C1 8	C1 8	C1 8	C1 8	C1 8
H	L28								L38								C19							
	L2 8	L2 8	L2 8	L2 8	L2 8	L2 8	L2 8	L2 8	L3 8	L3 8	L3 8	L3 8	L3 8	L3 8	L3 8	L3 8	C1 9	C1 9	C1 9	C1 9	C1 9	C1 9	C1 9	C1 9
I	L29								L39								C20							
	L2 9	L2 9	L2 9	L2 9	L2 9	L2 9	L2 9	L2 9	L3 9	L3 9	L3 9	L3 9	L3 9	L3 9	L3 9	L3 9	C2 0	C2 0	C2 0	C2 0	C2 0	C2 0	C2 0	C2 0
J	L30								L40								C-							
	L3 0	L3 0	L3 0	L3 0	L3 0	L3 0	L3 0	L3 0	L4 0	L4 0	L4 0	L4 0	L4 0	L4 0	L4 0	L4 0	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-

Tabla 21: Distribución de la placa de 285 pocillos empleada para la qPCR.

Obteniendo finalmente en cada pocillo:

Compuestos	Cantidad μl
cDNA	1
Gene Expression	5
Sonda	0,5
H₂O	3,5
TOTAL	10

Tabla 22: Contenido de cada pocillo de la qPCR.

Una vez finalizado el proceso, la placa se debe sellar con un adhesivo y se pasa al termociclador QuantStudio 5 Real-Time PCR, que permite detectar y medir la fluorescencia a tiempo real. Dicho termociclador sigue las siguientes condiciones: en primer lugar, tiene una etapa previa a una temperatura de 50°C durante 2 minutos donde se activa la acción de la enzima a Amperasa Uracil N-Glicosilasa (UNG), que evita la reamplificación de productos de PCR que resultarían en falsos positivos. A continuación, se establecen 40 ciclos a 95 °C durante 10 segundos para desnaturalizar el DNA seguidos de una etapa de 1 minuto a 60 °C de anillamiento de los primers y amplificación.

5. RESULTADOS

Una vez se han finalizado todos los ensayos, se procede a analizar los resultados de estos. Para ello se ha utilizado tanto equipos y colaboración del Instituto de Tecnología de Materiales (ITM) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV), junto con el Servicio de Microscopía Electrónica, así como, de la Universidad de Valencia (UV), en el Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina.

5.1. Fabricación de los materiales

5.1.1. Caracterización tras la compactación

Se pesan los polvos que se van a emplear antes de hacer la compactación y después de realizarla se toman las medidas de las probetas resultantes recogidas en la tabla 23. Cabe destacar que las 5 primeras muestras de cada aleación se hicieron con meses de diferencia de las 2 últimas, por lo que la variación en las dimensiones tras la compactación puede explicarse por el cambio en cualquier factor del proceso. Incluido el factor humano.

	Masa después compactación (g)	Dimensiones después compactación		
		Largo (mm)	Ancho (mm)	Espesor (mm)
<i>Ti-35Nb-7Zr-5Ta</i>	10,430	30,38	12,35	5,46
	10,409	30,21	12,34	5,56
	10,443	30,19	12,35	5,63
	10,430	30,16	12,3	5,64
	10,225	30,16	12,37	5,55
	10,308	29,07	11,72	5,58
	10,429	29,09	11,73	5,63
<i>Ti-35Nb-7Zr-5Ta-4Sn</i>	10,607	30,09	12,29	5,45
	10,644	30,11	12,27	5,49
	10,639	30,16	12,42	5,44
	10,639	30,23	12,3	5,48
	10,626	30,21	12,33	5,43
	10,612	29,31	11,8	5,59
	10,640	29,35	11,79	5,60
<i>Ti-35Nb-4Zr-3Hf-5Ta-4Sn</i>	11,117	30,22	12,24	5,69
	11,138	30,36	12,24	5,43
	11,170	30,4	12,53	5,58
	11,118	30,41	12,36	5,61
	10,987	30,32	12,36	5,54
	11,162	29,24	11,82	5,80
	11,175	29,23	11,73	5,85

Tabla 23: Masa antes y después de la compactación y las dimensiones de las probetas

Se calcula volumen en verde (Vol_{verde}) en cm^3 mediante la ecuación 4, la densidad en verde (ρ_{verde} g/cm³) mediante la ecuación 5, y a continuación la porosidad en verde (%) utilizando de la ecuación 6 (tabla 24).

	Vol_{verde} (cm ³)	ρ_{verde} (g/cm ³)	Porosidad en verde (%)	Porosidad en verde (%) promedio	ρ_{verde} (g/cm ³) promedio
Ti-35Nb-7Zr-5Ta	2,049	5,091	12,32	11,65	5,012
	2,073	5,040	13,20		
	2,099	4,983	14,12		
	2,092	4,995	13,98		
	2,071	4,949	14,78		
	1,901	5,424	6,60	6,55	5,427
	1,921	5,430	6,50		
Ti-35Nb-7Zr-5Ta-4Sn	2,015	5,290	10,73	11,33	5,255
	2,028	5,258	11,28		
	2,038	5,233	11,70		
	2,038	5,232	11,72		
	2,023	5,262	11,21		
	1,933	5,492	7,33	7,32	5,492
	1,938	5,493	7,30		
Ti-35Nb-4Zr-3Hf-5Ta-4Sn	2,105	5,312	14,50	13,98	5,345
	2,018	5,539	10,85		
	2,125	5,261	15,32		
	2,109	5,298	14,72		
	2,076	5,313	14,49		
	2,005	5,570	10,36	10,33	5,571
	2,006	5,573	10,30		

Tabla 24: Volumen, densidad y porosidad en verde tras la compactación.

5.1.2. Caracterización tras la sinterización

Tras el sinterizado, se vuelven a realizar todas las mediciones de las muestras con el objetivo de evaluar la contracción que ha podido sufrir el material. Como se ha comentado anteriormente, las últimas dos probetas de las aleaciones se han sinterizado con un ciclo distinto.

	Dimensiones después sinterizado			Volumen después sinterizado (cm ³)
	Largo mm	Ancho mm	Espesor mm	
<i>Ti-35Nb-7Zr-5Ta</i> 850°C-1300°C	29,55	11,89	5,42	1,904
	29,46	11,93	5,45	1,915
	29,50	11,93	5,50	1,936
	29,49	11,92	5,50	1,933
	29,47	11,92	5,44	1,911
1300°C	29,07	11,72	5,58	1,901
	29,09	11,73	5,63	1,921
<i>Ti-35Nb-7Zr-5Ta-4Sn</i> 850°C-1300°C	29,58	11,93	5,42	1,913
	29,54	11,97	5,45	1,927
	29,59	11,94	5,37	1,897
	29,63	11,93	5,4	1,909
	29,64	11,94	5,38	1,904
1300°C	29,31	11,8	5,59	1,933
	29,35	11,79	5,6	1,938
<i>Ti-35Nb-4Zr-3Hf-5Ta-4Sn</i> 850°C-1300°C	29,72	12,00	5,58	1,990
	29,66	12,22	5,41	1,961
	29,71	12,06	5,57	1,996
	29,70	12,06	5,55	1,988
	29,67	12,03	5,49	1,960
1300°C	29,24	11,82	5,80	2,005
	29,23	11,73	5,85	2,006

Tabla 25: Dimensiones de las muestras tras el sinterizado

Utilizando las ecuaciones 7, 8, 9 y 10 se obtiene la variación del ancho, largo y espesor de las muestras.

	Δ largo Promedio	Δ ancho Promedio	Δ espesor Promedio	Δ volumen Promedio
<i>Ti-35Nb-7Zr-5Ta</i> 850°C-1300°C	2,40	3,52	1,90	7,54
1300°C	3,84	4,09	3,45	10,95
<i>Ti-35Nb-7Zr-5Ta-4Sn</i> 850°C-1300°C	1,87	3,08	0,99	5,83
1300°C	2,96	3,52	2,78	8,98
<i>Ti-35Nb-4Zr-3Hf-5Ta-4Sn</i> 850°C-1300°C	2,14	2,19	0,89	5,14
1300°C	3,39	4,00	2,51	9,58

Tabla 26: Contracción de las muestras tras el sinterizado

Se puede observar en la tabla 26, como las muestras que se han sinterizado en un solo ciclo de 1300°C, sufren una contracción significativa frente a las que se han sinterizado en dos ciclos, el primero de 850°C y el segundo de 1300°C. Esto puede deberse a la combinación de factores como la rapidez de la densificación, la eliminación de poros y la reorganización de la microestructura, debido a que un ciclo más controlado permite una reorganización más controlada de las partículas y una eliminación gradual de los poros, lo que reduce la contracción de la probeta.

Método Arquímedes

Tras realizar el método Arquímedes se registran los pesos de la muestra en seco (P_D), sumergida (P_S) y mojada (P_M).

	P_D (g)	P_S (g)	P_M (g)
Ti-35Nb-7Zr-5Ta	10,4790	8,6122	10,4958
	10,4480	8,5750	10,4562
	10,4822	8,5989	10,4910
	10,2651	8,4169	10,2747
	10,484	8,5980	10,4890
	10,3080	8,4322	10,3136
	10,4330	8,5328	10,4357
Ti-35Nb-7Zr-5Ta-4Sn	10,6448	8,7809	10,6589
	10,6865	8,8236	10,7025
	10,6854	8,8153	10,6987
	10,6737	8,8090	10,6962
	10,686	8,8161	10,6991
	10,6149	8,5330	10,6230
	10,6461	8,7400	10,6510
Ti-35Nb-4Zr-3Hf-5Ta-4Sn	11,1651	9,2263	11,1838
	11,1886	9,2729	11,1936
	11,2174	9,2765	11,2271
	11,1788	9,2372	11,1906
	11,0706	9,1498	11,0814
	11,1703	9,1950	11,1760
	11,1788	9,2090	11,1900

Tabla 27: Valores del método Arquímedes: Peso en seco (D), Peso sumergido (S) y peso mojado (M)

Utilizando las ecuaciones 15, 16, 17 y 18 se calcula el porcentaje de poros abiertos y cerrados y la densidad experimental y relativa de las muestras respectivamente. Además, es posible calcular la porosidad total de la muestra sumando la porosidad cerrada y abierta obtenida en el ensayo (tabla 28).

	$\%P_a$	$\%P_c$	$\rho_{exp}(\text{g/cm}^3)$	$\%P_t$
Ti-35Nb-7Zr-5Ta	0,89	3,31	5,563	4,20
	0,44	3,92	5,554	4,36
	0,47	4,13	5,540	4,60
	0,26	4,26	5,544	4,53
	0,52	4,33	5,525	4,85
	0,32	5,33	5,479	5,65
	0,15	5,43	5,483	5,59
Ti-35Nb-7Zr-5Ta-4Sn	0,75	3,60	5,668	4,35
	0,85	3,17	5,688	4,02
	0,71	3,56	5,673	4,26
	0,70	3,54	5,675	4,24
	1,19	3,37	5,656	4,56
	0,40	13,91	5,078	14,32
	0,25	5,73	5,572	5,97
Ti-35Nb-4Zr-3Hf-5Ta-4Sn	0,96	7,24	5,704	8,20
	0,26	5,98	5,825	6,24
	0,50	6,94	5,751	7,44
	0,60	7,29	5,723	7,89
	0,56	7,19	5,731	7,75
	0,31	8,94	5,638	9,25
	0,58	8,62	5,641	9,20

Tabla 28: Resultados del método Arquímedes, poro abierto ($\%P_a$), poro cerrado ($\%P_c$), densidad experimental (ρ_{exp}) y porosidad total ($\%P_t = \%P_a + \%P_c$)

La diferencia del porcentaje total de poros ($\%P_t$) que se puede observar en la tabla 28, confirma que con la sinterización con un solo ciclo de 1300°C, el material experimenta una contracción rápida y considerable, debido a que la elevada temperatura favorece la densificación y eliminación de poros demasiado rápido, lo que podría ocasionar que mayor cantidad de poros queden atrapados en el interior de la muestra.

Son-Elastic (Módulo de Elasticidad)

En el ensayo Son-Elastic se quiere comprobar el módulo de elasticidad de cada una de las aleaciones, como se ha comentado anteriormente, el objetivo es igualar lo máximo posible el módulo elástico del hueso. Los datos recopilados tras el ensayo se recogen en la tabla 29.

	E (Gpa)	Vp(m/s)	ρ (volumen g/cm3)
Ti-35Nb-7Zr-5Ta	70,98	3934	5,50
	68,98	3896	5,45
	67,82	3877	5,42
	67,23	3875	5,37
	62,12	3916	5,42
	59,27	3651	5,33
Ti-35Nb-7Zr-5Ta-4Sn	69,76	3878	5,57
	69,66	3883	5,55
	73,45	3956	5,63
	73,09	3956	5,61
	65,24	3777	5,35
	66,52	3813	5,49
Ti-35Nb-4Zr-3Hf-5Ta-4Sn	70,23	3876	5,61
	76,60	4014	5,71
	71,04	3895	5,62
	71,13	3896	5,62
	73,68	3956	5,65
	64,81	3737	5,57
	64,58	2806	5,57

Tabla 29: Resultados del Son-Elastic: Modulo elástico, Velocidad (m/s) y densidad ρ (volumen g/cm3)

5.2. Caracterización mecánica

5.2.1. Micropunzonado (Small Punch)

En el ensayo de micropunzonado “(Small Punch)” se obtiene la curva de tensión-deformación del material, representada en la figura 20.

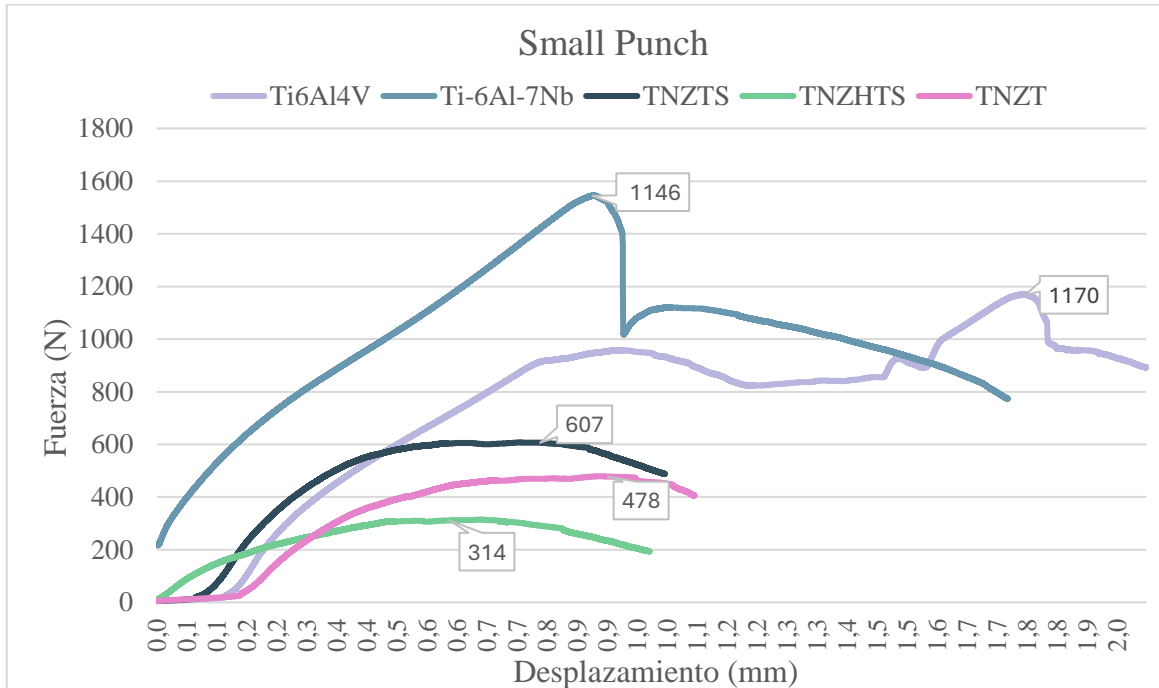


Figura 20: Resultados del Small Punch. Fuerza (N) vs desplazamiento (mm).

De dicho ensayo se extrae el promedio de la fuerza máxima necesaria hasta la fractura, donde se observa, que aunque conste de un espesor menor, el Ti-6Al-4V y Ti-6Al-7Nb tienen una resistencia a la fractura considerablemente mayor a las aleaciones del estudio.

	Espesor (mm)	Fuerza (N)	Espesor Promedio (mm)	Fuerza Promedio (N)
Ti-35Nb-7Zr-5Ta	0,39	500	0,46	520
	0,47	583		
	0,51	478		
Ti-35Nb-7Zr-5Ta-4Sn	0,45	314	0,45	376
	0,47	291		
	0,44	523		
Ti-35Nb-4Zr-3Hf-5Ta-4Sn	0,44	478	0,42	459
	0,34	291		
	0,48	607		
Ti-6Al-4V	0,32	1170	0,32	1256
	0,38	1438		
	0,25	1160		
Ti-6Al-7Nb	0,40	1546	0,37	1462
	0,40	1382		
	0,32	1457		

Tabla 30: Fuerza máxima y espesor de la muestra promedio de cada aleación.

Con el objetivo de normalizar los resultados, se calcula la resistencia a tracción (R_m). Obteniendo los siguientes valores:

	<i>Espesor (mm)</i>	<i>Fuerza (N)</i>	<i>Deflexión (mm)</i>	R_m (MPa)
Ti-35Nb-7Zr-5Ta	0,45	500	0,49	630
	0,47	584	1,236	279
	0,44	479	0,863	351
Promedio				420
Desviación estándar				151
Ti-35Nb-7Zr-5Ta-4Sn	0,44	478	0,719	420
	0,34	291	0,644	369
	0,48	607	0,633	555
Promedio				448
Desviación estándar				78
Ti-35Nb-4Zr-3Hf-5Ta-4Sn	0,39	314	0,635	352
	0,47	503	0,591	503
	0,51	523	0,814	350
Promedio				402
Desviación estándar				72
Ti-6Al-4V	0,32	1170	0,942	1079
	0,39	920	0,665	986
	0,25	1160	1,152	1120
Promedio				1062
Desviación estándar				56
Ti-6Al-7Nb	0,4	1546	0,822	1307
	0,4	1382	0,978	982
	0,32	1458	0,957	1324
Promedio				1204
Desviación estándar				157

Tabla 31: Ensayo de micropunzonado, datos del espesor (mm), fuerza (N), deflexión (mm) y resultado del cálculo de la resistencia a la tracción R_m (MPa).

Dado el estudio Álvarez (2023) en el que se realiza un ensayo de micro tracción y otro de flexión a cuatro puntos, se pueden comparar los datos de dicha investigación con los resultados obtenidos.

	a) R_m (MPa)	b) R_m (MPa)
Ti-35Nb-7Zr-5Ta	420	587,57
Ti-35Nb-7Zr-5Ta-4Sn	448	745,03
Ti-35Nb-4Zr-3Hf-5Ta-4Sn	402	788,46

Tabla 32: Comparación entre la resistencia a tracción del a) ensayo de micropunzonado y b) ensayo de microtracción (Álvarez, 2023)

	a) R_m (MPa)	c) R_m (MPa)
Ti-35Nb-7Zr-5Ta	420	1398,682
Ti-35Nb-7Zr-5Ta-4Sn	448	1177,03
Ti-35Nb-4Zr-3Hf-5Ta-4Sn	402	1137,72

Tabla 33: Comparación entre la resistencia a tracción del a) ensayo de micropunzonado y c) ensayo de flexión a 4 puntos (Álvarez, 2023).

5.3. Análisis biológico

En los ensayos celulares se han obtenido imágenes de fluorescencia mediante el software gratuito ImageJ Fiji (Schindelin et al., 2012). Además, se han llevado muestras fijadas mediante glutaraldehído a Microscopia Electrónica en la Universidad Politécnica de Valencia, para observarlas mediante el microscopio de barrido de campo de alta resolución (HRFSEM).

5.3.1. Adhesión

Para realizar el ensayo, se utilizó hDPSC pase 10 con un 73% de viabilidad, que, tras el conteo, resultó en 210.000 células/1000 μ l. Debido a la poca cantidad, se centrifugaron a la mitad. Por otro lado, de MG63, se utilizó un pase 19 con 79% de viabilidad que resultó en 620.000 células/1000 μ l. Por ello, finalmente se sembraron:

Material	Área	μ l hDPSC	μ l MG63
TNZT, TNZTS Y TNZHTS	0,6cm ²	8,57	5,8
Ti6Al7Nb y Ti6Al4V	1,13cm ²	16,14	10,94
Control	0,8cm ²	11,43	7,74

Tabla 34: Microlitros sembrados para el ensayo de adhesión según la muestra

A continuación, se muestran las imágenes obtenidas de cada una de las aleaciones. Se ha seleccionado una por aleación de cada línea celular. Sin embargo, se obtuvieron un total de 10 imágenes con aumento 10x y 10 imágenes con aumento 20x, con las que se obtendrán los resultados que se mostrarán a continuación:

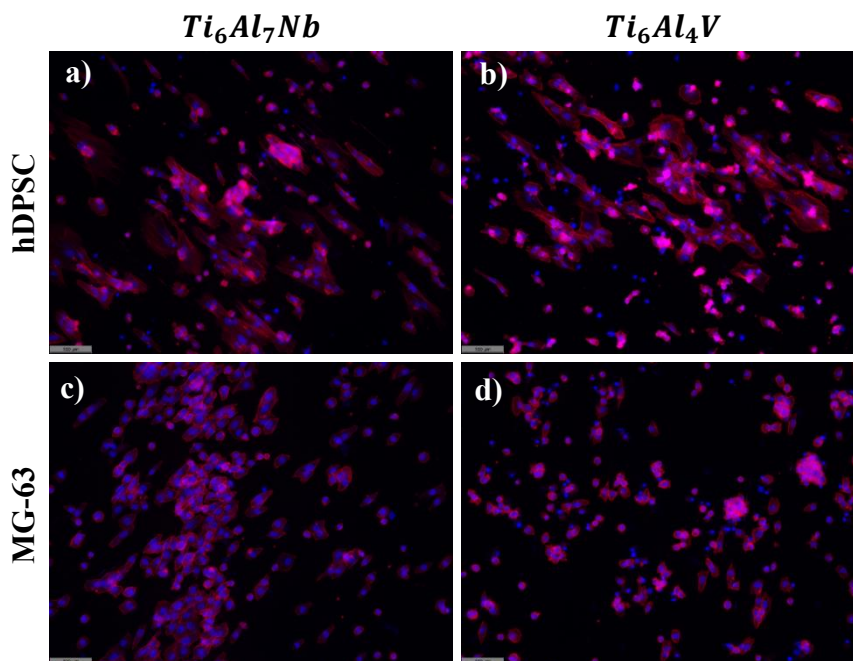


Figura 21: Adhesión a) Muestra de Ti₆Al₇Nb DPSC 182 núcleos, b) Muestra de Ti₆Al₄V DPSC 229 núcleos, c) Muestra de Ti₆Al₄V MG63 209 núcleos, d) Muestra de Ti₆Al₄V MG63 218 núcleos

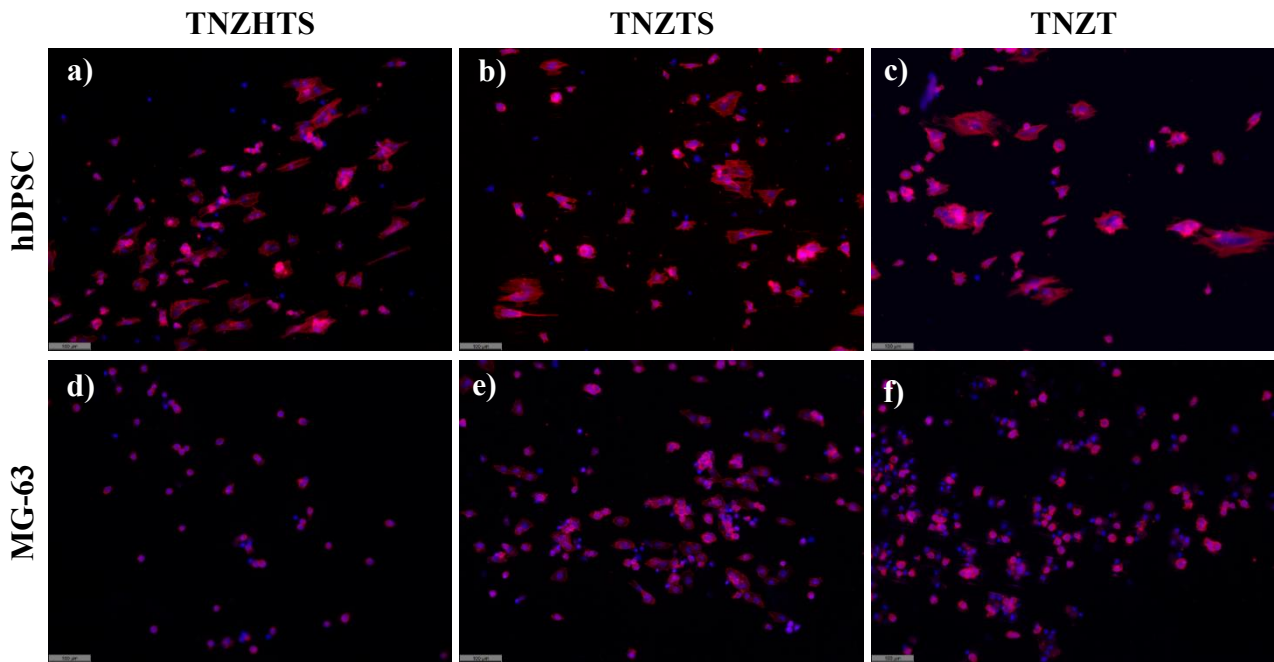


Figura 22: Adhesión a) Muestra de TNZHTS (850°C) DPSC 127 núcleos, b) Muestra de TNZTS (850°C) DPSC 96 núcleos c) Muestra de TNZT (850°C) DPSC 46 núcleos, d) Muestra de TNZHTS (850°C) MG63 50 núcleos, e) Muestra de TNZTS (850°C) MG63 139 núcleos, f) Muestra de TNZT (850°C) MG63 231 núcleos

Tras segmentar y procesar las imágenes 10x obtenidas del ensayo de adhesión, se obtienen los datos recogidos en la tabla 35, cuyos datos corresponden al promedio de 5 imágenes 10x por muestra del ensayo de adhesión.

	<i>Promedio hDPSC</i>	<i>Promedio MG63</i>
<i>TNZT 850</i>	28	195
<i>TNZT 1300</i>	99	-
<i>TNZTS 850</i>	81	108
<i>TNZTS 1300</i>	112	-
<i>TNZHTS 850</i>	99	37
<i>TNZHTS 1300</i>	27	-
<i>Ti6Al4V</i>	152	127
<i>Ti6Al7Nb</i>	152	127
<i>CONTROL</i>	6	29

Tabla 35: Promedio del número de células de cada una de las muestras del ensayo de adhesión

Cabe destacar que, como se observa en la tabla 35, las células MG63 sembradas en las aleaciones sinterizadas en un único ciclo (1300°C) no se han adherido. Se comprobará con el ensayo de citotoxicidad si es debido al propio material o a un factor externo al mismo.

5.3.2. Proliferación

Para realizar el ensayo se utilizaron hDPSC pase 9 con un 73% de viabilidad, que, tras el conteo, se obtuvieron 120.000 células/1000 μ l. Debido a la poca cantidad, se centrifugaron a la mitad. Por otro lado, de MG63, se utilizó un pase 18 con 82% de viabilidad que resultaron en 780.000 células/1000 μ l. Por lo que finalmente se sembraron:

Material	Área	μ l hDPSC	μ l MG63
TNZT, TNZTS Y TNZHTS	0,6cm ²	15	4,61
Ti6Al7Nb y Ti6Al4V	1,13cm ²	28,25	8,69
Control	0,8cm ²	20	6,15

Tabla 36: Microlitros sembrados para el ensayo de adhesión según la muestra

A continuación, se muestran las imágenes obtenidas de cada una de las aleaciones. Se ha seleccionado una por aleación. Sin embargo, se obtuvieron un total de 10 imágenes 10x y 10 imágenes 20x, con los que se obtendrán los resultados recogidos en el presente estudio.

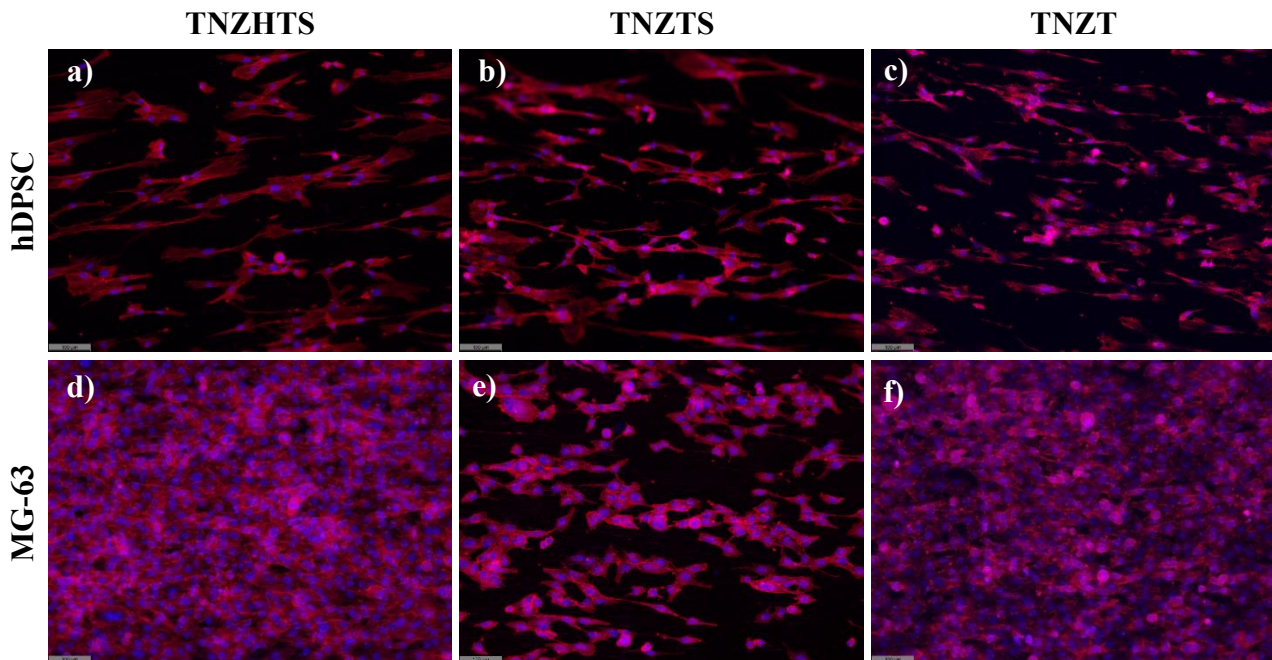


Figura 23: Proliferación a) Muestra de TNZHTS (850°C) DPSC 98 núcleos, b) Muestra de TNZTS (850°C) DPSC 148 núcleos c) Muestra de TNZT (850°C) DPSC 136 núcleos, d) Muestra de TNZHTS (850°C) MG63 589 núcleos, e) Muestra de TNZTS (850°C) MG63 190 núcleos, f) Muestra de TNZT (850°C) MG63 627 núcleos

En el ensayo de proliferación, las muestras van a estar en cultivo durante 72h, por lo que el número de células en comparación con el ensayo de adhesión debe de ser considerablemente mayor. En la figura 23, se puede apreciar cómo, en este caso, la línea celular MG63 tiene una diferencia considerable con los cultivos sembrados con hDPSC, obteniendo mucha más concentración de células en las correspondientes a las de sarcoma humano (MG63).

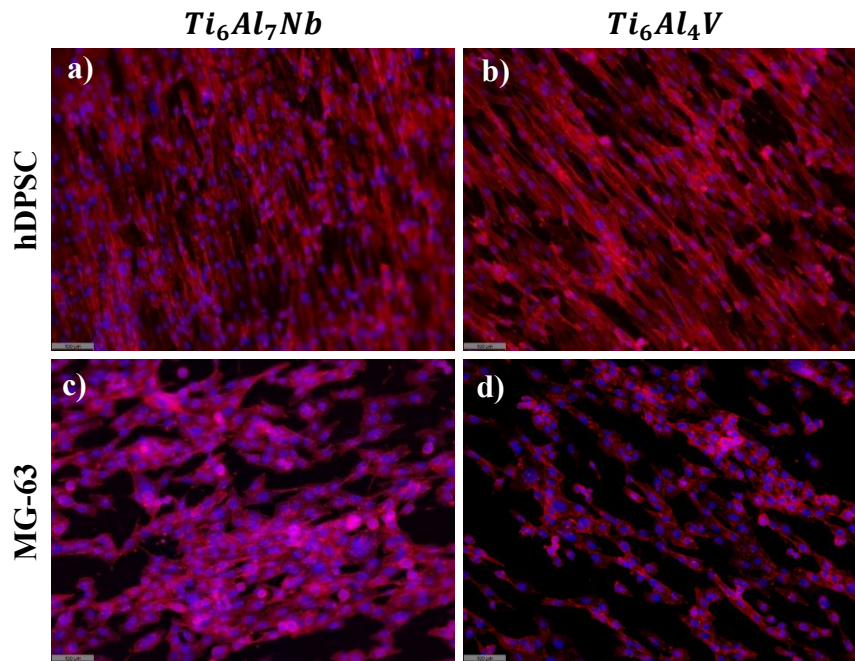


Figura 24: Proliferación a) Muestra de Ti_6Al_7Nb DPSC 472 núcleos, b) Muestra de Ti_6Al_4V DPSC 422 núcleos, c) Muestra de Ti_6Al_4V MG63 262 núcleos, d) Muestra de Ti_6Al_4V MG63 218 núcleos

Tras segmentar y procesar las imágenes 10x obtenidas del ensayo de proliferación, se obtienen los datos recogidos en la tabla 37, cuyos datos corresponden al promedio de 5 imágenes 10x por muestra del ensayo de proliferación.

	<i>Promedio hDPSC</i>	<i>Promedio MG63</i>
<i>TNZT 850</i>	114	530
<i>TNZT 1300</i>	243	307
<i>TNZTS 850</i>	131	131
<i>TNZTS 1300</i>	147	213
<i>TNZHTS 850</i>	80	522
<i>TNZHTS 1300</i>	188	530
<i>Ti6Al4V</i>	263	198
<i>Ti6Al7Nb</i>	335	211
<i>CONTROL</i>	274	187

Tabla 37: Promedio del número de células de cada una de las muestras del ensayo de proliferación.

5.3.3. Citotoxicidad – MTS

En el ensayo de citotoxicidad, se obtienen los valores recogidos en la tabla 38. En dicho ensayo se ha asumido que el 100% de viabilidad corresponde al pocillo al que únicamente se le ha añadido el medio de proliferación de la línea celular correspondiente.

	Absorbancia	% Viabilidad
TNZT (850)	0,548	129,11
	0,385	90,61
	0,351	82,62
TNZHTS (850)	2,183	514,25
	2,365	557,19
	0,371	87,34
TNZTS (850)	0,398	93,80
	2,338	550,69
	2,261	532,68
Ti6Al7Nb	1,061	249,95
	0,797	187,69
	2,216	522,05
Ti6Al4V	0,380	89,64
	2,035	479,42
	2,506	590,37
C- (medio)	0,424	100
C- (LTX)	0,093	21,91

Tabla 38: Ensayo de citotoxicidad, viabilidad celular de cada una de las aleaciones

5.3.4. Expresión génica – Real Time PCR

La Real Time PCR (qPCR) proporciona información de cómo se han ido expresando los genes según avanzaban los ciclos. Según se observa en la figura 25, el GAPDH, es el primero que se ha expresado alrededor del ciclo 20; a continuación, el COL1A1 y por último el RUNX2. En algunos de los ciclos de la qPCR se pueden observar unos cuadrados en rojo, debido a que en la expresión de BGLAP han salido falsos positivos. Por ello, una vez obtenidos los datos, es necesario cuantificarlos.

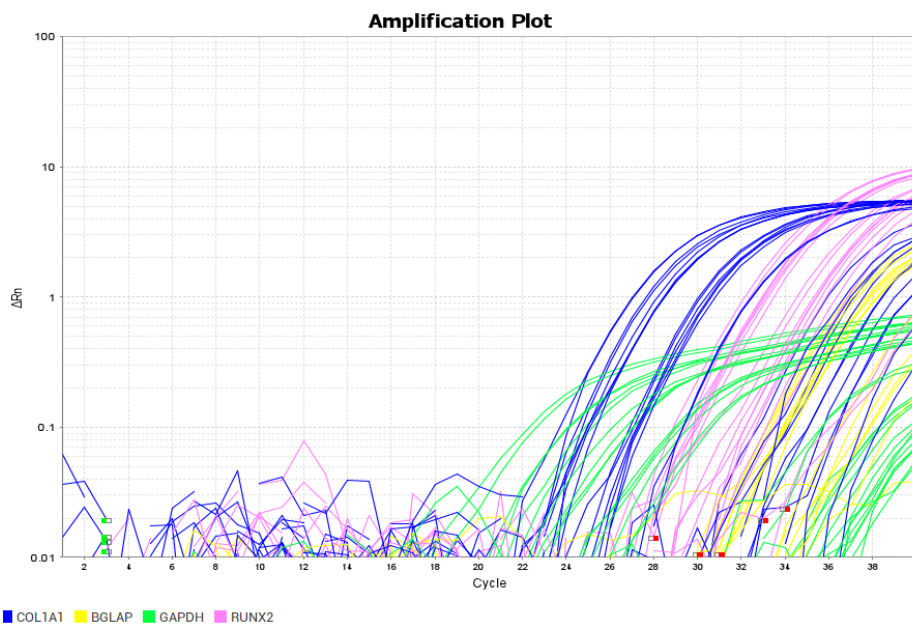


Figura 25: Expresión de los genes en los distintos ciclos (CT) de la PCR

Para cuantificar los resultados de la Real Time PCR, se va a seguir el método delta-delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Este método, según VanGuilder et al. (2008), asume que la reacción ocurre con el 100% de eficacia, por lo que en cada ciclo la cantidad de producto se duplica. El Ct es el número de ciclos que realiza la reacción hasta alcanzar un nivel de fluorescencia determinado. En dicho método, es necesario asumir que uno de los genes se expresa a nivel constante, y, en este caso, es el GAPDH, que es empleado como control endógeno.

Una vez recopilado el valor del Ct para cada reacción, se usa para generar un nivel de expresión relativo. En primer lugar, se promedian los valores de Ct de cada una de las muestras que se han analizado por duplicado.

A continuación, se calcula el ΔCt , para cada una de las muestras.

$$\Delta Ct = Ct(\text{gen de interes}) - Ct(GAPDH) \quad (30)$$

Tras obtener el ΔCt , se ha de seleccionar una muestra de referencia para calcular el $\Delta\Delta Ct$, y en este caso, son los controles. Primero, se calcula el ΔCt promedio de los controles de DPSC y de MG63, y una vez se obtienen, se resta dicho valor al ΔCt de las muestras:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{Muestra}) - \Delta Ct(\text{Promedio de control}) \quad (31)$$

Por último, para calcular la expresión génica, es necesario calcular 2 elevado a la potencia negativa de $\Delta\Delta Ct$, es decir:

$$\text{Expresión génica plegada} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)} \quad (32)$$

Una vez obtenidos estos valores, se realiza el logaritmo de estos para representarlos gráficamente. Con esto obtenemos los valores recogidos en la tabla 39. Todos los valores que se encuentren por encima de 1, se considera que se están sobre expresando; los que tienen un valor < 1 , se están expresando, pero en menor cantidad y los que sale indeterminado en los datos del ensayo (-) es que no se están expresando.

	RUNX2	COL1A1	BGLAP
DPSC TNZT (850)	-	0,826	-
MG63 TNZT (850)	-	-	-
DPSC TNZT (1300)	-	0,944	-
DPSC TNZTS (1300)	-	1,045	-
MG63 TNZTS (1300)	-	-	-
DPSC TNZHTS (850)	-	0,416	-
MG63 TNZHTS (1300)	-	-	-
DPSC Ti6Al7Nb	-	0,647	-
DPSC Ti6Al4V	0,517	0,506	-

Tabla 39: Expresión de los genes RUNX2, COL1A1 y BGLAP

5.3.5. Imágenes en HRFESM

Las células cultivadas específicamente para observarlas en HRFSEM, se fijaron mediante glutaraldehído. Esto es debido a que este ensayo se quiere realizar para poder observar las estructuras celulares, alterándolas lo mínimo posible. Sin embargo, se realizó un primer ensayo en el Servicio de Microscopía Electrónica, concretamente en el microscopio de barrido de emisión de campo de alta resolución, en las que no se pudo observar ninguna célula debido a errores en el proceso de cultivo de estas. Por ello, las imágenes tomadas son de muestras fijadas con formol y que además se les había realizado una tinción de DAPI y Faloidina.

Estas imágenes, como las que se observan en la figura 26, ayudan a comprender las estructuras correspondientes a extensiones del citoesqueleto celular como los filopodios. Estas estructuras son proyecciones de la membrana plasmática que contienen haces de filamentos de actina. Se extienden desde la superficie de la célula y juegan un papel clave en la adhesión y migración celular, debido a que ayudan a la célula a anclarse a un sustrato y a moverse sobre las superficies.

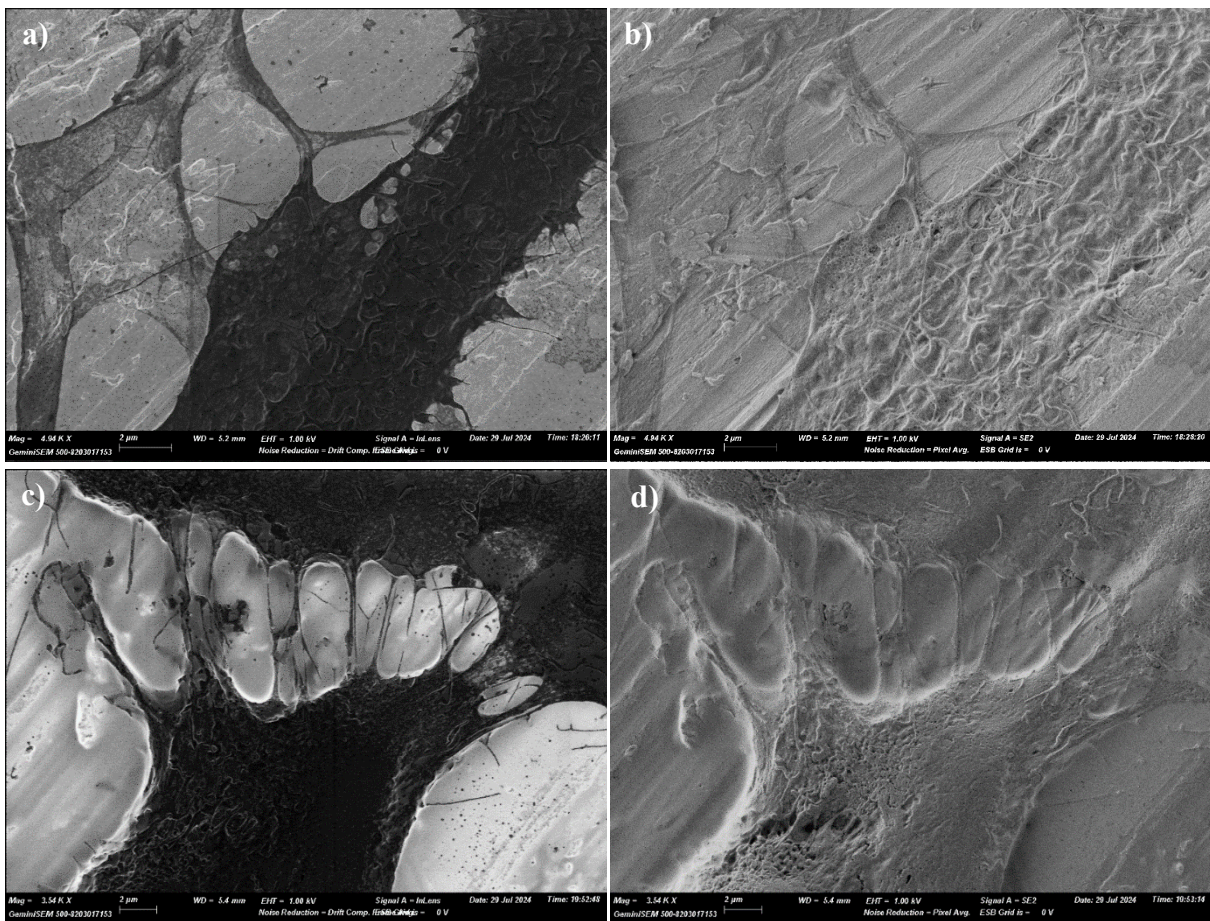


Figura 26: HRFSEM: a) TNZTS MG63, SE. b) TNZTS MG63, InLens c) Ti6Al4V MG63, SE. d) Ti6Al4V MG63, InLens

6. DISCUSIÓN

I. Análisis mecánico

Investigaciones de autores como Niinomi y Nakai, 2011 y Lario et al., 2021, se han centrado en las aleaciones tipo β , como sustitutas a las aleaciones empleadas de Ti6Al4V o Ti6Al7Nb, debido a, entre otros motivos, su elevado módulo elástico en comparación al hueso humano y la toxicidad de los iones liberados por el aluminio y vanadio empleado en dichas aleaciones.

Por un lado, según los resultados obtenidos en el ensayo de micropunzonado, se observa una disminución de la resistencia a tracción con la adición de hafnio y estaño. Por otro lado, se observa un aumento con la adición de estaño únicamente, lo que no coincide con los resultados obtenidos por Álvarez (2023), debido a que, en dicha investigación, con la adición de ambos aleantes, no se modifica la resistencia a tracción y con la adición de estaño sí que disminuye. La tendencia (figura 27) es contradictoria para los ensayos de tracción. Sin embargo, para ambos aumenta dicha resistencia respecto al TNZT al incluir estaño en la aleación.

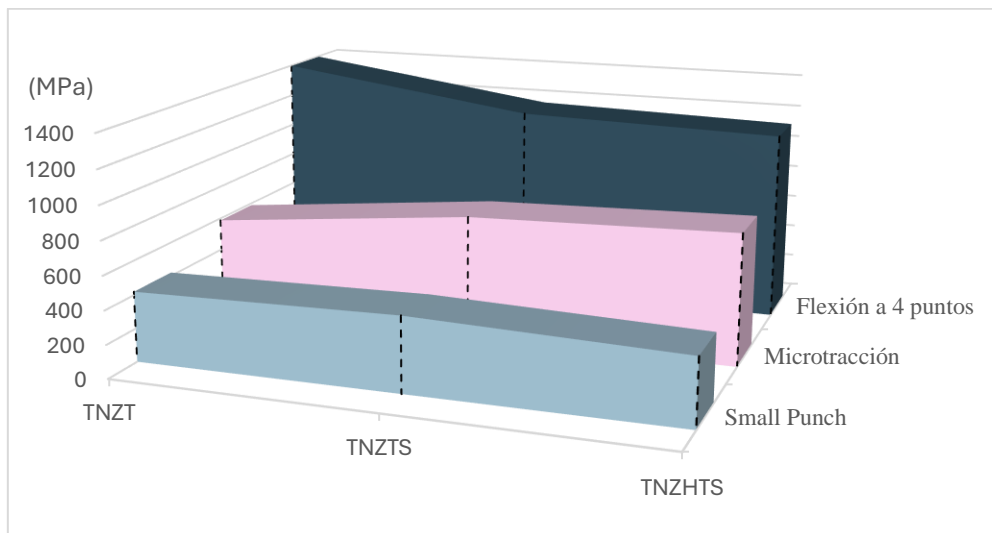


Figura 27: Comparación de la resistencia de la aleación entre el ensayo de micropunzonado realizado en el presente estudio y los ensayos de tracción y flexión de Álvarez (2023).

De los resultados del Son-elastic, se obtienen módulos de elasticidad de cada aleación, representados en la figura 28, donde se observa la comparación entre el promedio del módulo elástico de cada una de las probetas de las distintas aleaciones y el hueso.

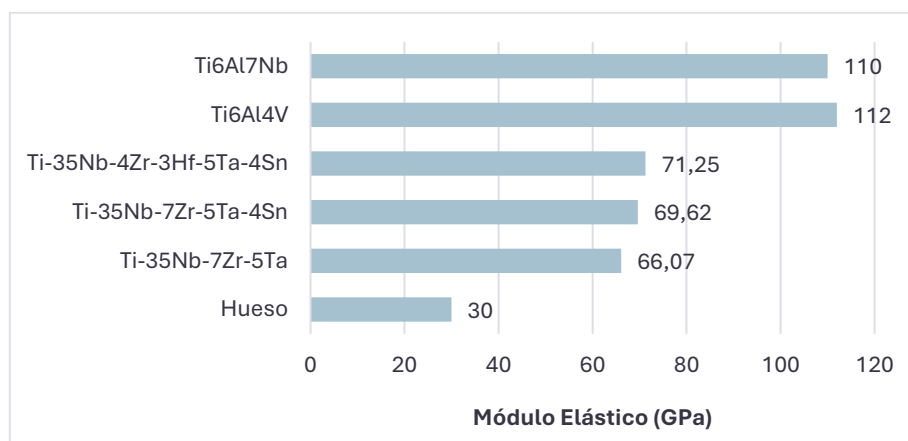


Figura 28: Promedio del módulo elástico de las aleaciones y el hueso.

En la literatura, los autores describen los diferentes valores del módulo elástico en los distintos tipos de dientes, siendo para incisivos 98,3GPa, premolares de 40-80GPa y terceros molares de 75-90GPa (Fong et al., 1999; He et al. 2006). En los resultados obtenidos, se observa que la adición de estaño y hafnio a la aleación base TNZT aumenta el módulo elástico, aunque no de forma significativa. Por otro lado, la resistencia a tracción aumenta con la adición de estaño y, con los datos obtenidos en el micropunzonado, se observa cómo, con la adición tanto de hafnio como de estaño, disminuye dicha resistencia, dato que discrepa con el ensayo de micro tracción obtenido en Álvarez (2023).

Los valores obtenidos en el Son-elastic concuerdan con el estudio de Álvarez (2023), que establece que, con la adición de estaño y/o hafnio, aumenta el módulo elástico. También afirma que, la adición de estos, como se observa en la figura 27, disminuye la resistencia a flexión y la deformación experimentada.

II. Análisis biológico

En el ensayo de adhesión, se busca observar si el material es apto o no para, como su nombre indica, la adhesión de las células. En este ensayo, se observa que, en la aleación diseñada que ha sido sinterizada a 1300°C, no presenta ningún tipo de célula adherida a la superficie. En cambio, como se observa en la figura 29, en las sinterizadas a 850°C hay un elevado número de células adheridas que alcanza hasta 195 células de promedio en el TNZT 850°C. Se debe comprobar si esto es un error en el proceso o efectivamente se liberan iones que resultan tóxicos para la viabilidad celular.

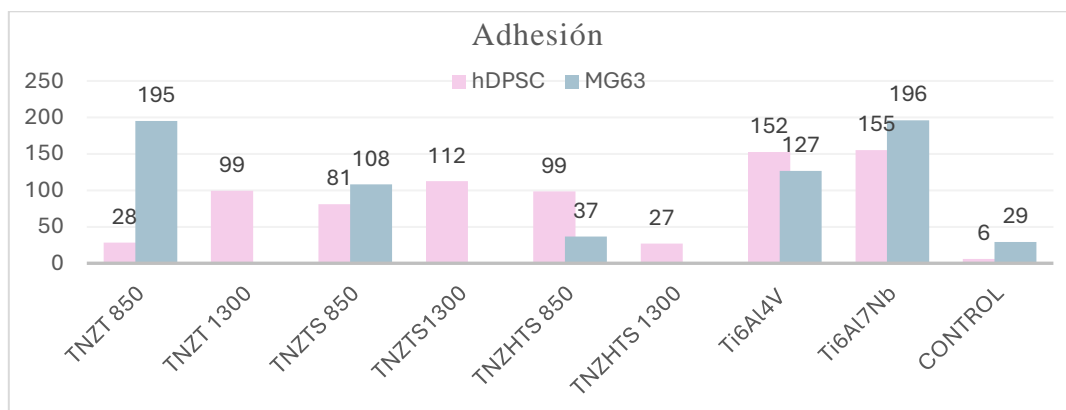


Figura 29: Promedio del conteo de los núcleos tras el análisis de las imágenes de los cultivos de adhesión de DPSC y MG-63

En las imágenes de la figura 30, se puede observar ambos tipos de células en el ensayo de adhesión. Por un lado, está la realizada con la línea células hDPSC, en las que se ve que las células están adheridas al material por su forma alargada y sus terminaciones. Sin embargo, como se observa en la figura 29, hay más cantidad de células MG-63 y, aunque una estructura más redondeada es propia de esta línea celular, se podría estimar una mejor adhesión en las células hDPSC, aunque el número de células existentes sea menor. La tinción de F-Actina (adherencia focal) se ha utilizado con el objetivo de estudiar la morfología de las hDPSC y el citoesqueleto de MG-63 (figura 30), cuyos cultivos han sido tratados con el medio de cultivo convencional. Las hDPSC, sembradas en la superficie plana de las aleaciones diseñadas, muestran un citoesqueleto claro y con adherencias focales largas en forma de “líneas”. En cambio, las células MG-63 en algunas de las condiciones, muestran adherencias focales en forma de “punto” con un citoesqueleto circular.

Comparado con el control, en el que únicamente se encuentran 6 células promedio de hDPSC y 29 de MG63, en este ensayo se puede concluir que la aleación fabricada no presenta ningún tipo de problema para la adhesión celular, debido a que todos los materiales superan con creces al control.

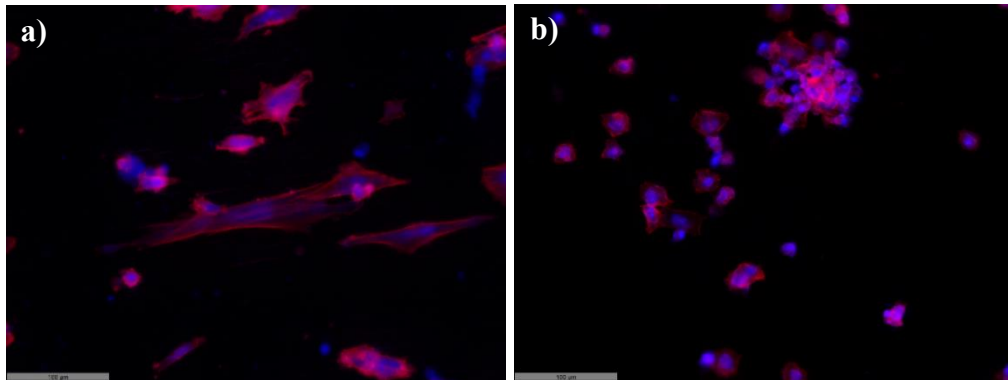


Figura 30: Adhesión en la muestra TNZT (850°C) a) hDPSC, b) MG63

En cuanto al ensayo de proliferación, en la figura 31 se observan imágenes correspondientes a la tinción de F-actina de la aleación TNZHTS 1300°C, en las que en la línea hDPSC se observa una estructura extendida con un citoesqueleto claro, con proyecciones citoplasmáticas correspondientes a filopodios y lamelipodios. En el caso de las MG-63, a diferencia del ensayo de adhesión, la estructura del citoesqueleto se observa más clara y con extensiones en forma de “raya” correspondientes a adhesiones focales y largas.

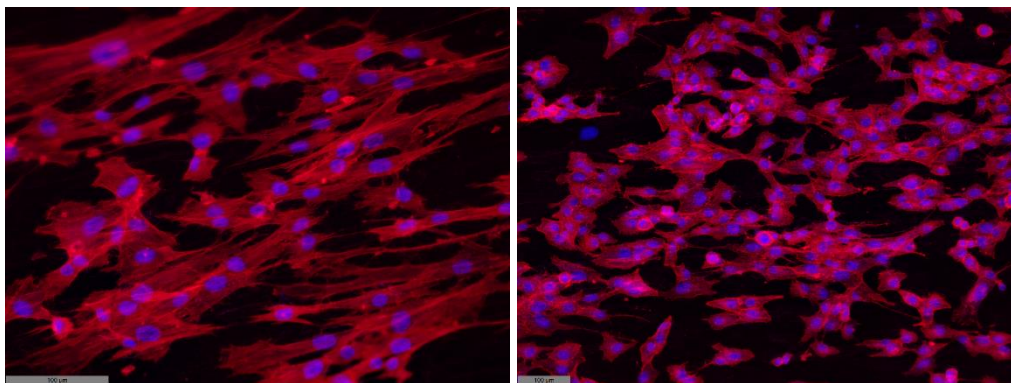


Figura 31: Proliferación a) TNZTS 1300°C DPSC b) TNZTS 1300°C MG-63

En cuanto a la proliferación del cultivo sobre las aleaciones tras pasar 72h horas en medio de cultivo convencionales, se observa (figura 32) que el Ti6Al4V y Ti6Al7Nb, mantienen la misma tendencia que en los ensayos de adhesión, en este caso con un valor más aproximado al de control. Sin embargo, las aleaciones con células MG-63 presentan resultados contradictorios a los que se observan en adhesión, debido a que, la cantidad de células que han proliferado en los mismos es significativamente mayor a los controles, en concreto en TNZT y TNZHTS, tanto 850°C como 1300°C.

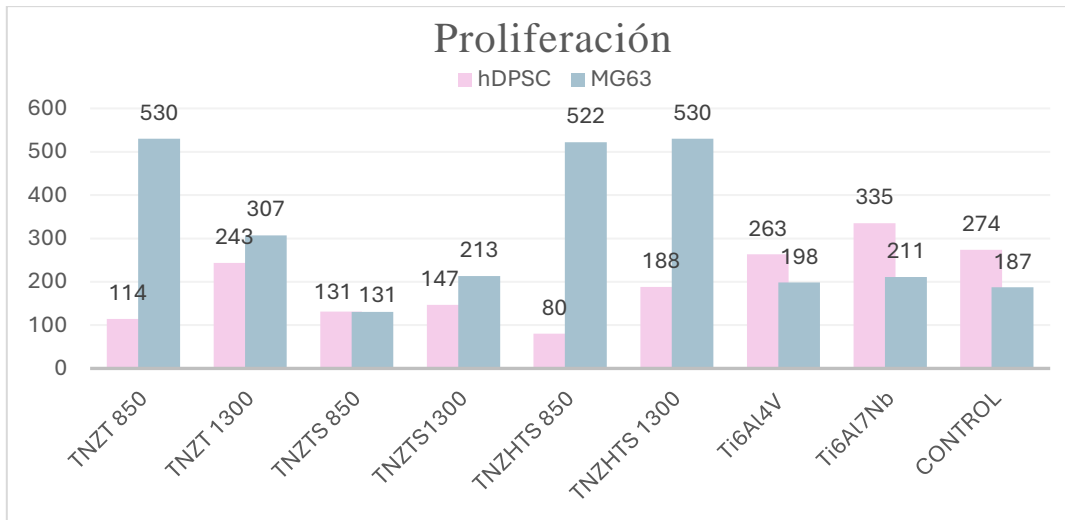


Figura 32: Promedio del conteo de los núcleos tras el análisis de las imágenes de los cultivos de adhesión de DPSC y MG-63

Para comprobar el motivo de esta disparidad en los datos, se recurre al ensayo de citotoxicidad, realizado únicamente para la línea celular hDPSC. Asumiendo que el control sembrado únicamente con medio de proliferación corresponde al 100% de viabilidad, se observa que la adición de estaño y/o hafnio, aumenta la viabilidad celular hasta en un 392% (figura 33) en comparación a la aleación base de TNZT. Sin embargo, también se observa que existe una elevada viabilidad en las muestras correspondientes a la saliva artificial con iones liberados de Ti6Al4V y Ti6Al7Nb.

Por lo que, con este ensayo, y de acuerdo con estudios previos como el de Rossi et al., (2022), se puede decir que no existe evidencia de que los iones liberados por las aleaciones diseñadas, ni los liberados por Ti6Al4V y Ti6Al7Nb, sean citotóxicos para las células madre de pulpa dental humana.

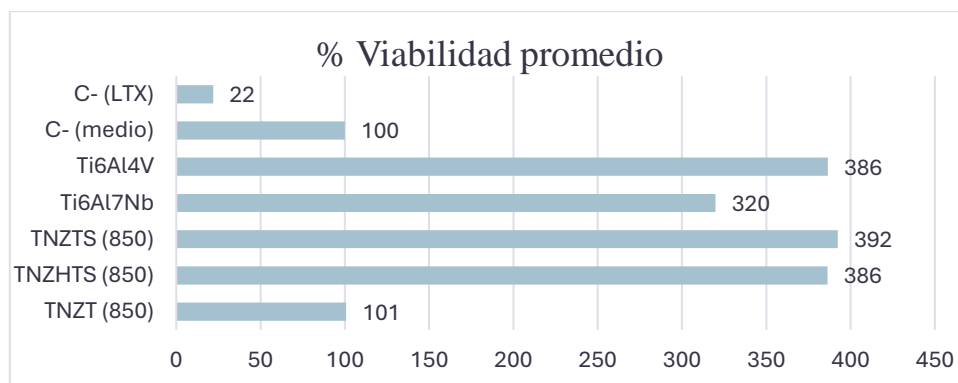


Figura 33: Gráfica correspondiente al promedio de la viabilidad de las células hDPSC del ensayo de citotoxicidad de cada aleación

Y dado que, en investigaciones como la de Rossi et al. (2022), el ensayo de citotoxicidad de TNZT y Ti6Al4V para células madre de pulpa dental humana resultó en valores muy aproximados a la del control, no se puede afirmar con los resultados obtenidos que la adición de estaño y hafnio aumente la viabilidad celular de las hDPSC, debido a que, en el caso del Ti6Al4V y del Ti6Al7Nb, en el presente estudio, también se observa una viabilidad del 382% y del 320% respectivamente, que no corresponde con otras investigaciones ni con los resultados obtenidos de dicha línea celular en la presente investigación.

Sin embargo, Rossi et al. (2022), afirma que la aleación TNZT promueve la proliferación de la línea celular MG63, la cual puede definir el comportamiento de estas aleaciones cuando entran en contacto con células similares a osteoblastos, lo que coincide con los resultados obtenidos en el ensayo de proliferación y pudiendo afirmar que la adición de estaño y hafnio no interfiere en dicho aumento de la proliferación de las MG63.

Para comprender mejor el comportamiento a nivel molecular, se analizan los resultados de la Real Time PCR, obteniendo los niveles de expresión génica normalizados respecto al gen de control GAPDH.

Los materiales representados en la figura 34, son aquellos en los que se han expresado los genes RUNX2 y COL1A1. Los que tienen un valor superior a cero, son los que muestran una regulación positiva en comparación con la muestra de control. La expresión del gen RUNX2, se utiliza para evaluar la capacidad del material de inducir la diferenciación de osteoblastos, y el COL1A1 se emplea como marcador de la matriz ósea y se usa para evaluar la capacidad del material para promover la síntesis de colágeno.

Por un lado, la expresión del gen RUNX2, indica que las células están en una fase temprana de diferenciación osteoblástica. La activación de dicho gen, indica que probablemente el material está promoviendo la diferenciación de células precursoras hacia la línea osteogénica. Asimismo, la activación del COL1A1, indica que las células están produciendo colágeno tipo I, lo cual es un indicativo de posible actividad osteoblástica.

Cabe destacar, que la falta de expresión de BGLAP, se puede considerar normal, ya que éste es utilizado como marcador de la maduración de osteoblastos. Su expresión indicaría que las células están en una fase avanzada de diferenciación osteoblástica, y están activamente involucradas en la mineralización de la matriz ósea. Sin embargo, los cultivos se han realizado con medios de proliferación convencional, es decir, no se ha aplicado ningún medio de diferenciación osteogénica ni el material es inductor de dicha diferenciación.

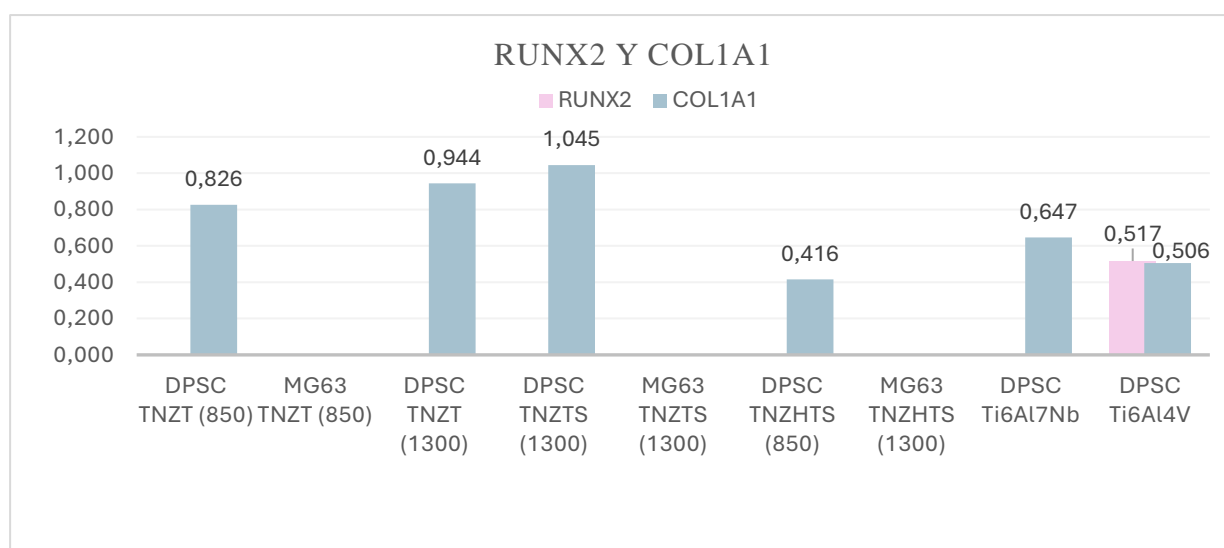


Figura 34: Expresión de los genes RUNX2 y COL1A1 normalizados respecto al GAPDH y el control C₁.

7. PROBLEMÁTICA

Durante la realización de los ensayos, se han encontrado inconvenientes importantes a la hora de obtener resultados biológicos.

En primer lugar, los ensayos de adhesión y proliferación se han realizado un total de 7 veces entre ambos, y 2 veces los de expresión génica. Esto, es debido a la irregularidad obtenida en cada uno de los ensayos. Como se ha explicado en el apartado 4.3.4 *Siembra para evaluación de adhesión y proliferación*, de las mismas aleaciones se hacían duplicados de hDPSC y MG-63 y, tras la tinción, se observaba como la misma línea celular y el mismo material proliferaba de forma completamente distinta. Por ello, los resultados de esta investigación se han estado contrastando con resultados de otras investigaciones, como la de Rossi et al. (2022).

Tras obtener unos resultados más coherentes en los ensayos de proliferación, adhesión y citotoxicidad, se llevaron las muestras a microscopia electrónica, HRFSEM. Allí, se observó que solo algunas de las muestras sembradas en el mismo ensayo tenían colonias de bacterias como las observadas en la figura 34. Por ello, una de las explicaciones a la irregularidad obtenida en los ensayos, es una contaminación durante o posterior a la siembra de las células.

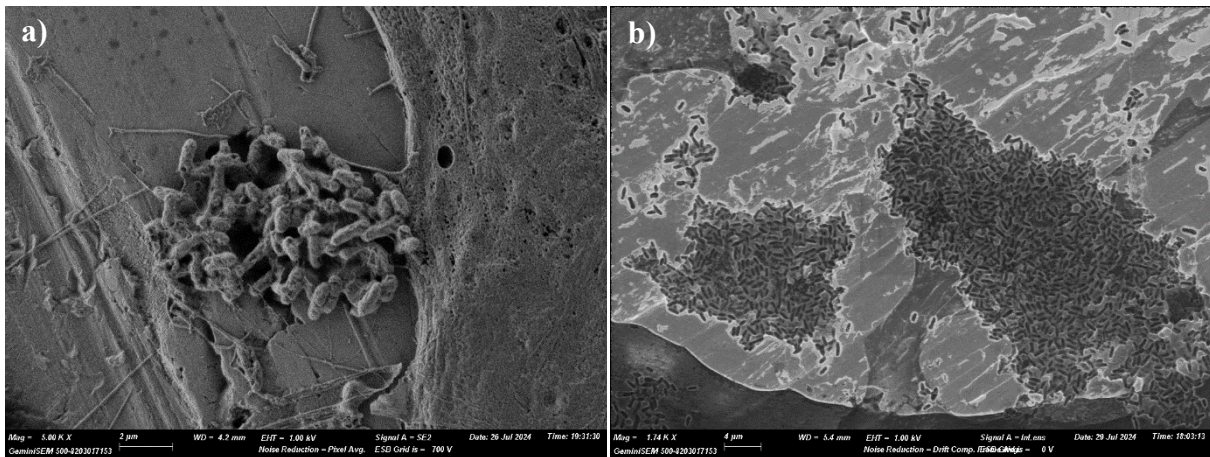


Figura 35: Contaminación bacteriana a) Ti6Al4V DPSC, InLens b) TNZTS DPSC, Secundarios.

Cabe destacar, que un factor que también ha podido influir en dichas irregularidades, es el uso de pases celulares demasiado elevados. Para poder obtener algún resultado, en algunos de los ensayos se tuvieron que descongelar viales nuevos de células.

Por otro lado, las muestras se intentaron llevar al CRIOSEM, con el objetivo de obtener imágenes de las células sin fijarlas, únicamente utilizando nitrógeno líquido. Sin embargo, como era indispensable que las muestras tuvieran PB, al introducirlas en nitrógeno líquido, aunque se retirase la mayor cantidad posible del tampón fosfato, se generaba una capa congelada del líquido impidiendo ver cualquier estructura celular.

En el microscopio de barrido de emisión de campo de alta resolución, el hecho de que las muestras estuvieran en PB también supuso la formación de cristales alrededor de las estructuras celulares figura 35 b). Sin embargo, esto no supuso un problema en la visualización de dichas estructuras.

Finalmente, otra de las limitaciones, se encuentra en la realización de imágenes mediante HRFESM. El objetivo era obtener imágenes de las estructuras celulares con la mínima alteración posible, debido a fijaciones con formol. Sin embargo, tras introducir las muestras en el microscopio y que el equipo hiciera el vacío, se observó que algunas estructuras quedaban dañadas, como las presentes en la figura 36.

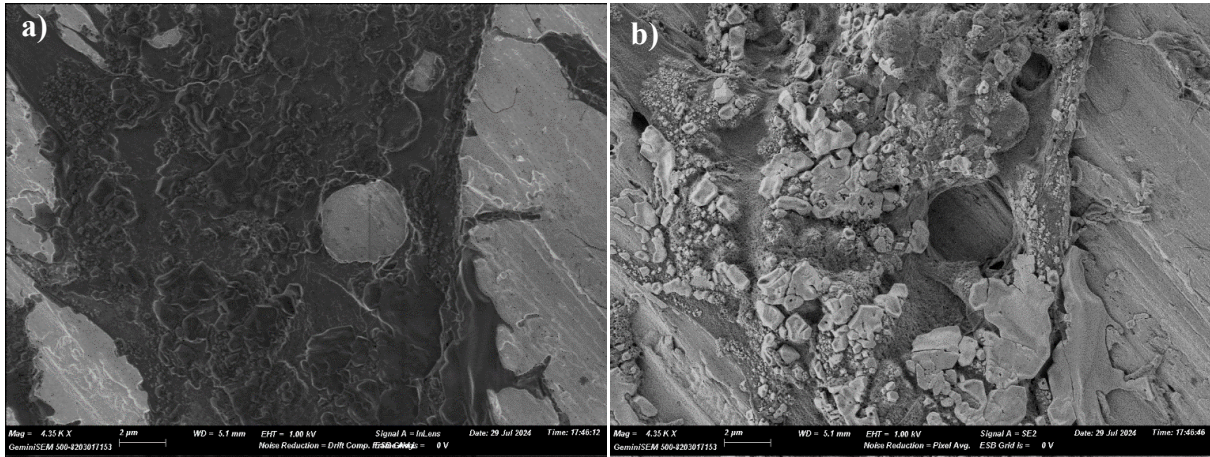


Figura 36: Célula con el núcleo arrancado a) TNZTS DPSC, InLens b) TNZTS DPSC, Secundarios.

8. CONCLUSIONES

En el presente estudio, se ha investigado sobre la viabilidad celular de las aleaciones fabricadas a partir de la aleación base Ti-35Nb-7Zr-5Ta con la adición de estaño y hafnio (Ti-35Nb-7Zr-5Ta-4Sn y Ti-35Nb-4Zr-3Hf-5Ta-4Sn). Asimismo, se han realizado ensayos mecánicos, para comparar los resultados ya existentes sobre estas aleaciones (Álvarez, 2023). De los resultados experimentales, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La sinterización en un único ciclo de 1300°C refleja un aumento considerable en la porosidad, faltando ensayos para ver cómo esto afecta al material de forma microestructural, así como a las propiedades mecánicas.
2. La adición de estaño y hafnio compromete el comportamiento mecánico del material, disminuyendo la resistencia a fractura de este.
3. La aleación base TNZT presenta un módulo de elasticidad más próximo al hueso y la variación composicional refleja un aumento no significativo en el mismo.
4. Los ensayos de adhesión reflejan que no existe ningún impedimento en la interacción célula-material durante las primeras horas. Sin embargo, las irregularidades en los datos hacen que no se pueda afirmar si los materiales favorecen o no la adhesión, sino que simplemente no interfieren en ella.
5. Los ensayos de proliferación confirman que la aleación TNZT promueve la proliferación de la línea celular MG-63, y que la adición de estaño y/o hafnio no interfiere en dicha característica.
6. La citotoxicidad confirma que los iones liberados en suspensión de saliva artificial Ringer-Hartman no son tóxicos y existe una elevada viabilidad celular. Sin embargo, las irregularidades en los datos respecto a la literatura no permiten afirmar que existe un aumento de la viabilidad con las aleaciones diseñadas.
7. La evaluación de los genes expresados en la *Real Time PCR*, afirma que las aleaciones promueven la expresión del gen RUNX2 de forma similar al Ti6Al7Nb y Ti6Al4V.
8. El presente estudio demuestra una adecuada biocompatibilidad de las aleaciones diseñadas. La aleación TNZT y su adición de estaño y/o hafnio poseen cualidades que las convierten en candidatas ideales para investigaciones futuras.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arunkumar, S. (2019). Overview of Small Punch Test. *Metals And Materials International*, 26(6), 719-738. <https://doi.org/10.1007/s12540-019-00454-5>
- Biocompatibility of Clinical Implant Materials.* (s. f.). Google Books. https://books.google.es/books/about/Biocompatibility_of_Clinical_Implant_Mat.html?id=6DdrAAAA_MAAJ&redir_esc=y
- Bruchhausen, M., Holmström, S., Simonovski, I., Austin, T., Lapetite, J., Ripplinger, S., & De Haan, F. (2016). Recent developments in small punch testing: Tensile properties and DBTT. *Theoretical And Applied Fracture Mechanics*, 86, 2-10. <https://doi.org/10.1016/j.tafmec.2016.09.012>
- Cordeiro, J. M., & Barão, V. A. (2017). Is there scientific evidence favoring the substitution of commercially pure titanium with titanium alloys for the manufacture of dental implants? *Materials Science And Engineering C*, 71, 1201-1215. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.025>
- Datta, S., Mahfouf, M., Zhang, Q., Chattopadhyay, P., & Sultana, N. (2016). Imprecise knowledge based design and development of titanium alloys for prosthetic applications. *Journal Of The Mechanical Behavior Of Biomedical Materials/Journal Of Mechanical Behavior Of Biomedical Materials*, 53, 350-365. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.08.039>
- Feldman, D. S. (2019). Biomaterial Enhanced Regeneration Design Research for Skin and Load Bearing Applications. *Journal Of Functional Biomaterials*, 10(1), 10. <https://doi.org/10.3390/jfb10010010>
- Fong, H., Sarikaya, M., White, S. N., & Snead, M. L. (1999). Nano-mechanical properties profiles across dentin–enamel junction of human incisor teeth. *Materials Science And Engineering C*, 7(2), 119-128. [https://doi.org/10.1016/s0928-4931\(99\)00133-2](https://doi.org/10.1016/s0928-4931(99)00133-2)
- García, G. B. (2006). El vanadio, un elemento ambiguo. *Acta toxicológica argentina*, 14, 1851-3743. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1851-37432006000200002&script=sci_arttext&tlng=pt
- German, R. M. (1996). *Sintering theory and practice*. <http://cds.cern.ch/record/1092461>
- Gómez, J. C. M., Hernández-Andara, A., Quevedo-Piña, M., Ortega-Pertuz, A. I., & Chong, M. L. (2022). Periimplantitis: conceptos actuales sobre su etiología, características clínicas e imagenológicas. Una revisión. *Revista Científica Odontológica*, 10(4), e134. <https://doi.org/10.21142/2523-2754-1004-2022-134>
- Gómez, R. J. E., Gómez, L. E. F., Rivero, P. E., & Valdivieso, Q. W. (2007). ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD y ADHESIÓN DE CÉLULAS HUMANAS DE OSTEOSARCOMA EN TI6AL4V SUPERFICIALMENTE MODIFICADO. *Scientia Et Technica*, 1(36), 85-89. <https://doi.org/10.22517/23447214.4933>
- González, M. M., Gil, F. J., Manero, J. M., & Peña, J. L. (2011). Characterization of Two Ti-Nb-Hf-Zr Alloys Under Different Cold Rolling Conditions. *Journal of Materials Engineering and Performance*, 20(4-5), 653-657. <https://doi.org/10.1007/s11665-011-9917-0>
- González, M. M., Peña, J. L., Gil, F. J., & Manero, J. M. (2014). Low modulus Ti–Nb–Hf alloy for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*, 42, 691-695. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.06.010>
- Gu, S., Zhou, Z., & Min, N. (2022). Effects of Element (Al, Mo, Sn and Fe) Doping on Phase Structure and Mechanical Properties of the Ti-Nb-Based Alloys. *Metals*, 12(8), 1249. <https://doi.org/10.3390/met12081249>
- Hao, Y., Li, S., Sun, S. S., & Yang, R. (2006). Effect of Zr and Sn on Young's modulus and superelasticity of Ti–Nb-based alloys. *Materials Science and Engineering: A*, 441(1-2), 112-118. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2006.09.051>

- He, L. H., Fujisawa, N., & Swain, M. V. (2006). Elastic modulus and stress–strain response of human enamel by nano-indentation. *Biomaterials*, 27(24), 4388-4398. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.03.045>
- Herranz-Diez, C., Gil, F. J., Guillem-Marti, J., & Manero, J. M. (2015). Mechanical and physicochemical characterization along with biological interactions of a new Ti25Nb21Hf alloy for bone tissue engineering. *Journal of Biomaterials Applications*, 30(2), 171-181. <https://doi.org/10.1177/0885328215577524>
- Hopwood, D. (1973). *Theoretical and practical aspects of glutaraldehyde fixation*. En Springer eBooks (pp. 47-83). https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3260-0_2
- Kandaswamy, E., Harsha, M., & Joshi, V. M. (2024). Titanium corrosion products from dental implants and their effect on cells and cytokine release: a review. *Journal Of Trace Elements In Medicine And Biology*, 127464. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2024.127464>
- Kuroda, D., Niinomi, M., Morinaga, M., Kato, Y., & Yashiro, T. (1998). Design and mechanical properties of new β type titanium alloys for implant materials. *Materials Science and Engineering A-structural Materials Properties Microstructure and Processing*, 243(1-2), 244-249. [https://doi.org/10.1016/s0921-5093\(97\)00808-3](https://doi.org/10.1016/s0921-5093(97)00808-3)
- Lario, J., Vicente, Á. M., & Amigó, V. (2021). Evolution of the Microstructure and Mechanical Properties of a Ti35Nb2Sn Alloy Post-Processed by Hot Isostatic Pressing for Biomedical Applications. *Metals*, 11(7), 1027. <https://doi.org/10.3390/met11071027>
- Lincks, J., Boyan, B. D., Blanchard, C. R., Lohmann, C. H., Liu, Y., Cochran, D. L., Dean, D. D., & Schwartz, Z. (1998). Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials*, 19(23), 2219-2232. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(98\)00144-6](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(98)00144-6)
- Lola Álvarez Morera, *Estudio del efecto de la adición de estaño y hafnio en las propiedades mecánicas y químicas de las aleaciones Ti Nb-Zr-Ta*, trabajo fin de grado en Ingeniería Biomédica, universitat Politècnica de València, 2023, 66.
- Luo, H., Wu, Y., Diao, X., Shi, W., Feng, F., Qian, F., Umeda, J., Kondoh, K., Xin, H., & Shen, J. (2020). Mechanical properties and biocompatibility of titanium with a high oxygen concentration for dental implants. *Materials Science And Engineering C*, 117, 111306. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111306>
- Mata, M., Peydró, S., De Llano, J. J. M., Sancho-Tello, M., & Carda, C. (2022). Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate into Cementoid-Like-Secreting Cells on Decellularized Teeth Scaffolds. *International Journal Of Molecular Sciences*, 23(24), 15588. <https://doi.org/10.3390/ijms232415588>
- Mjöberg, B., Hellquist, E., Mallmin, H., & Lindh, U. (1997). Aluminum, Alzheimer's disease and bone fragility. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 68(6), 511-514. <https://doi.org/10.3109/17453679708999016>
- Mohammed, M. T., Fan, P., Geetha, M., & Siddiquee, A. N. (2015). Microstructure, mechanical properties and electrochemical behavior of a novel biomedical titanium alloy subjected to thermo-mechanical processing including aging. *Journal of Alloys and Compounds*, 634, 272-280. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2015.02.095>
- Niinomi, M. (2010). Trend and present state of titanium alloys with body centered structure for biomedical applications. *Tetsu-To-Hagane/Journal of the Iron and Steel Institute of Japan*, 96(11), 661-670.
- Niinomi, M., & Nakai, M. (2011). Titanium-Based Biomaterials for Preventing Stress Shielding between Implant Devices and Bone. *International Journal of Biomaterials*, 2011, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2011/836587>
- Nuti, N., Corallo, C., Chan, B. M. F., Ferrari, M., & Gerami-Naini, B. (2016). Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. *Stem Cell Reviews And Reports*, 12(5), 511-523. <https://doi.org/10.1007/s12015-016-9661-9>

- Okazaki, Y., Rao, S., Asao, S., Tateishi, T., Katsuda, S., & Furuki, Y. (1998). *Effects of Ti, Al and V Concentrations on Cell Viability*. *Materials Transactions JIM*, 39(10), 1053-1062. <https://doi.org/10.2320/matertrans1989.39.1053>
- Pesode, P., & Barve, S. (2023). *A review—metastable β titanium alloy for biomedical applications*. *Journal Of Engineering And Applied Science*, 70(1). <https://doi.org/10.1186/s44147-023-00196-7>
- Radaic, A., & Kapila, Y. L. (2021). *The oralome and its dysbiosis: New insights into oral microbiome-host interactions*. *Computational And Structural Biotechnology Journal*, 19, 1335-1360. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.02.010>
- Rossi, M. C., Ventura, B. N., Milián, L., Escuder, A. V., & Borrás, V. A. (2022). *Study of Electrochemical and Biological Characteristics of As-Cast Ti-Nb-Zr-Ta System Based on Its Microstructure*. *Metals*, 12(3), 476. <https://doi.org/10.3390/met12030476>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. *Nature Methods*, 9(7), 676-682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schnitman, P. A. (1990). *Dental Implants: State of the Art, State of the Science*. *International Journal Of Technology Assessment In Health Care*, 6(4), 528-544. <https://doi.org/10.1017/s0266462300004190>
- Silva, R. C. S., Agrelli, A., Andrade, A. N., Mendes-Marques, C. L., Arruda, I. R. S., Santos, L. R. L., Vasconcelos, N. F., & Machado, G. (2022). *Titanium Dental Implants: An Overview of Applied Nanobiotechnology to Improve Biocompatibility and Prevent Infections*. *Materials*, 15(9), 3150. <https://doi.org/10.3390/ma15093150>
- Standard Test Method for Water Absorption, Bulk Density, Apparent Porosity, and Apparent Specific Gravity of Fired Whiteware Products, Ceramic Tiles, and Glass Tiles. (s. f.)*. <https://www.astm.org/c0373-14.html>
- UNE-EN ISO 10993-1:2021 Evaluación biológica de productos sani. . . (s. f.)*. <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma?c=norma-une-en-iso-10993-1-2021-n0067302>
- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M. (2008). *Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis*. *BioTechniques*, 44(5), 619-626. <https://doi.org/10.2144/000112776>
- Wang, Y., Zhang, Y., & Miron, R. J. (2015). *Health, Maintenance, and Recovery of Soft Tissues around Implants*. *Clinical Implant Dentistry And Related Research*, 18(3), 618-634. <https://doi.org/10.1111/cid.12343>
- Yang, R., Rahman, K. S., Rakhymberdiyev, A., Dye, D., & Vorontsov, V. (2019). *Mechanical behaviour of Ti-Nb-Hf alloys*. *Materials Science and Engineering A-structural Materials Properties Microstructure and Processing*, 740-741, 398-409. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2018.10.019>
- Zareidoost, A., & Yousefpour, M. (2020). *A study on the mechanical properties and corrosion behavior of the new as-cast TZNT alloys for biomedical applications*. *Materials Science And Engineering C*, 110, 110725. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110725>
- Zhang, L., & Chen, L. (2019). *A Review on Biomedical Titanium Alloys: Recent Progress and Prospect*. *Advanced Engineering Materials*, 21(4), 1801215. <https://doi.org/10.1002/adem.201801215>
- Zhang, Y., Hu, J., Zhang, W., Yu, S., Yu, Z., Zhao, Y., & Zhang, L. (2019). *Discontinuous core-shell structured Ti-25Nb-3Mo-3Zr-2Sn alloy with high strength and good plasticity*. *Materials Characterization*, 147, 127-130. <https://doi.org/10.1016/j.matchar.2018.10.021>

DOCUMENTO 2
– PRESUPUESTO –

1. CUADRO DE PRECIOS UNITARIOS

El presupuesto se va a dividir en dos secciones principales, cuadros de precios unitarios y cuadros de precios descompuestos. En primer lugar, se recopilan los cuadros de precios unitarios de mano de obra, materiales, maquinaria y equipos y software.

CUADRO DE PRECIOS DE MANO DE OBRA

Código	Descripción	Unidad	Precio Unitario (€/ud)
MO01	Director del proyecto	h	55,5
MO02	Ingeniero junior	h	16,5
MO03	Técnico de laboratorio	h	24,99

Tabla 40. Cuadro de precios unitarios de mano de obra

CUADRO DE PRECIOS DE MATERIALES UNITARIOS

Código	Descripción	Unidad	Precio Unitario (€/ud)
MAT01	Titanio en polvo	kg	80,00
MAT02	Niobio en polvo	kg	778,00
MAT03	Circonio en polvo	kg	400,00
MAT04	Tántalo en polvo	kg	800,00
MAT05	Estaño en polvo	kg	79,78
MAT06	Hafnio en polvo	kg	1860,00
MAT07	Recipientes plásticos	ud.	0,42
MAT08	Bolas de acero	kg	11,00
MAT09	Parafilm	ud.	46,46
MAT10	Estearato de zinc	kg	58,23
MAT11	Agua destilada	l	0,60
MAT12	Etanol	l	17,96
MAT13	Disco de diamante	ud.	320,29
MAT14	Pegatinas de referencia	ud.	0,10
MAT15	Papel de lija 220 mallas	ud.	3,00
MAT16	Caja de guates látex	ud.	4,40
MAT17	Saliva artificial Ringer-Hartmann modificada	l	6,00
MAT18	Alfa MEM	ml	0,19
MAT19	MEM	ml	0,09
MAT20	Antibióticos: Penicilina-Estreptomicina (P/S)	ml	0,13
MAT21	L-Glutamina	ml	0,17
MAT22	Fungizona	ml	1,08
MAT23	Aminoácidos esenciales	ml	0,15
MAT24	Piruvato	ml	0,13
MAT25	Suero fetal bovino	ml	0,31
MAT26	Tampón PBS	ml	0,02
MAT27	Tripsina	ml	0,17
MAT28	Frasco de cultivo T25 de DELTALAB	ud.	1,26
MAT29	Trypan blue stain 0,4 %	ml	0,32
MAT30	Línea celular MG-63	vial	319,50
MAT31	Línea celular hDPSC	vial	800,00
MAT32	Placa de 24 pocillos	ud.	0,88
MAT33	Placa de 384 pocillos	ud.	7,36

Código	Descripción	Unidad	Precio Unitario (€/ud)
MAT34	Tubos de centrifuga Eppendorf	ud.	0,16
MAT35	Pipetas Pasteur de 3mL	ud.	0,09
MAT36	Micropipeta de 10microlitros	h	0,01
MAT37	Micropipeta de 100microlitros	h	0,01
MAT38	Micropipeta de 1000microlitros	h	0,01
MAT39	Puntas de micropipeta de 10microlitros	ud.	0,30
MAT40	Puntas de micropipeta de 100microlitros	ud.	0,30
MAT41	Puntas de micropipeta de 1000microlitros	ud.	0,30
MAT42	Cámara de cultivo Millicell de 8 pocillos	ud.	44,00
MAT43	DAPI	ml	7,91
MAT44	Rodamina-Faloidina de ThermoFisher	ml	656
MAT45	MTS de Promega	ensayo	4,62
MAT46	STEMCELL Technologies 70 µm	ud.	6,37
MAT47	Bolsas Autoadhesivas para esterilización	ud.	0,08

Tabla 41. Cuadro de precios unitarios de materiales

Para realizar el cálculo de la amortización de la maquinaria, equipos y software empleados en el proyecto, se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{Factor de amortización (€/horas)} = \frac{\text{Precio de compra (€/ud)}}{\text{Horas de uso al año (h/años)} \cdot \text{Años de vida útil}}$$

CUADRO DE PRECIOS UNITARIOS DE MAQUINARIA

Código	Descripción	Unidad	(€/ud)	Vida útil (años)	h/año	€/horas
MAQ01	Caja de guantes GP[Campus] Jacomex	ud.	15422,00	8	1600	1,20
MAQ02	Báscula de precisión Kern	ud.	1410,00	5	1800	0,16
MAQ03	Túrbula Inversina Bioengineering	ud.	6900,00	8	1800	0,48
MAQ04	Prensa hidráulica WPP50 de Metallkraft	ud.	8840,00	5	1600	1,11
MAQ05	Matriz flotante 30x12	ud.	2400,00	3	1800	0,44
MAQ06	Pie de rey	ud.	65,00	3	1500	0,01
MAQ07	Horno tubular dealto vacío Carbolite HVT	ud.	689000,00	5	1200	114,83
MAQ08	Ustillaje de small punch	ud.	485,00	3	1600	0,10

Código	Descripción	Unidad	(€/ud)	Vida útil (años)	h/año	€/horas
MAQ09	Máquina de ensayos Shimadzu Autograph	ud.	52000,00	5	1600	6,50
MAQ10	Taladradora-fresadora OPTIMUM	ud.	5440,00	5	1200	0,91
MAQ11	CortadoraAccutom-10	ud.	23500,00	5	1800	2,61
MAQ12	Ultrasonidos	ud.	2100,00	3	1600	0,44
MAQ13	pHmetro	ud.	328,14	5	1500	0,04
MAQ14	Estufa modelo Selecta 2000207 (lib iones)	ud.	3200	5	4000	0,16
MAQ15	DesbastadoraLaboPol-25	ud.	18900,00	5	1600	2,36
MAQ16	Autoclave	ud.	1852	3	1600	0,39
MAQ17	Microscopio electrónico HRFESEM	ud.	<i>Tarifa microscopía</i>			30,00
MAQ18	Incubadora Forma Scientific	ud.	21218,00	6	8760	0,40
MAQ19	Microscopio de fluorescencia Leica DM4000B	ud.	2021,44	8	90	2,81
MAQ20	Automatic Cell Counter EVE	ud.	3500	4	90	9,72
MAQ21	Espectrofotómetro SpectraMax Plus	ud.	3297,4	5	1600	0,41
MAQ22	Campana de flujo laminar Scanaf	ud.	16927,9	5	1200	2,82
MAQ23	Ordenador ASUS VivoBook	ud.	550	5	1200	0,09

Tabla 42: Cuadro de precios unitarios de maquinaria.

CUADRO DE PRECIOS UNITARIOS EQUIPO Y SOFTWARE

Código	Descripción	Unidad	(€/ud)	Vida útil (años)	h/año	€/horas
EQ01	Equipo Arquímedes	ud.	680	3	1800	0,13
EQ02	Equipo Sonelastic	ud.	7860	3	1800	1,46
EQ03	Ordenador ASUS VivoBook	ud.	550	3	1200	0,15
SW01	Windows 11	ud.	29,99	3	1200	0,01
SW02	Aztec de Oxford Instruments Ltda	ud.	12000	4	1600	1,88
SW03	Leica Application Suite Advance Fluorescence	ud.	Software libre	0	0	0,00
SW04	ImageJ Fiji	ud.	Software libre	0	0	0,00

Tabla 43: Cuadro de precios unitarios de equipo y software.

2. CUADRO DE PRECIOS DESCOMPUESTOS

Para la elaboración de los precios descompuestos, se contempla los costos de los materiales, los equipos necesarios para la ejecución, y las técnicas empleadas, incluyendo la mano de obra, reuniendo por capítulos el trabajo realizado durante la investigación.

Capítulo 01. Fabricación de los materiales

Selección de los polvos

Código	Descripción	Unidad	(€/ud)	Cantidad	Precio (€)
MO01	Director del proyecto	h	55,50	2,00	111,00
MO02	Ingeniero junior	h	16,50	2,00	33,00
Precio por ud.					144,00

Mezcla y compactación de los polvos

Código	Descripción	Unidad	(€/ud)	Cantidad	Precio (€)
MO01	Director del proyecto	h	55,50	6,00	333,00
MO02	Ingeniero junior	h	16,50	8,00	132,00
MO03	Técnico de laboratorio	h	24,99	6,00	149,94
MAT01	Titanio en polvo	kg	80,00	0,20	16,00
MAT02	Niobio en polvo	kg	778,00	0,09	70,02
MAT03	Circonio en polvo	kg	400,00	0,02	8,00
MAT04	Tántalo en polvo	kg	800,00	0,01	8,00
MAT05	Estaño en polvo	kg	79,78	0,02	1,60
MAT06	Hafnio en polvo	kg	1860,00	0,01	18,60
MAT07	Recipientes plásticos	ud.	0,42	6,00	2,52
MAT08	Bolas de acero	kg	11,00	0,06	0,66
MAT09	Parafilm	ud.	46,46	1,00	46,46
MAT10	Estearato de zinc	kg	58,23	0,50	29,12
MAT16	Caja de guates latex	ud.	4,40	0,50	2,20
MAQ01	Caja de guantes GP[Campus] Jacomex	h	1,20	6,00	7,23
MAQ02	Báscula de precisión Kern	h	0,16	3,00	0,47
MAQ03	Túrbula Inversina Bioengineering	h	0,48	1,30	0,62
MAQ04	Prensa hidráulica WPP50 de Metallkraft	h	1,11	10,00	11,05
MAQ05	Matriz flotante 30x12	h	0,44	10,00	4,44
MAQ06	Pie de rey	h	0,01	5,00	0,07
Precio por ud.					842,00

<i>Sinterización</i>					
Código	Descripción	Unidad	(€/ud)	Cantidad	Precio (€)
MO01	Director del proyecto	h	55,50	3,00	166,50
MO02	Ingeniero junior	h	16,50	6,00	99,00
MAQ07	Horno tubular de alto vacío Carbolite HVT	h	114,83	48,00	5512,00
EQ01	Equipo Arquímedes	h	0,13	3,00	0,38
EQ02	Equipo Sonelastic	h	1,46	3,00	4,37
MAT11	Agua destilada	l	0,60	0,25	0,15
Precio por ud.					5782,39

COSTE TOTAL CAPITULO 01 6768,3937

Tabla 44. Cuadro de precios descompuestos capítulo 01

Capítulo 02. Caracterización mecánica

Micropunzonado y Son-Elastic

Código	Descripción	Unidad	(€/ud)	Cantidad	Precio (€)
MO01	Director del proyecto	h	55,5	6,00	333,00
MO03	Técnico de laboratorio	h	24,99	14,00	349,86
MO02	Ingeniero junior	h	16,5	14,00	231,00
MAQ08	Utillaje de small punch	h	0,10	14,00	1,41
MAQ09	Máquina de ensayos Shimadzu Autograph	h	6,5	14,00	91,00

COSTE TOTAL CAPITULO 02 1006,27

Tabla 45. Cuadro de precios descompuestos capítulo 02

Capítulo 03. Preparación de las muestras

Corte de las probetas

Código	Descripción	Unidad	(€/ud)	Cantidad	Precio (€)
MO01	Director del proyecto	h	55,50	4,00	222,00
MO03	Técnico de laboratorio	h	24,99	14,00	349,86
MO02	Ingeniero junior	h	16,50	20,00	330,00
MAT12	Etanol	l	17,96	0,50	8,98
MAT13	Disco de diamante	ud.	320,29	1,00	320,29
MAT14	Pegatinas de referencia	ud.	0,10	26,00	2,60
MAT15	Papel de lija 220 mallas	ud.	3,00	1,00	3,00
MAT16	Caja de guates latex	ud.	4,40	0,20	0,88
MAQ11	Cortadora Accutom-10	h	2,61	25,00	65,28
Precio por ud.					1302,89

<i>Electrolitos</i>					
Código	Descripción	Unidad	(€/ud)	Cantidad	Precio (€)
MO01	Director del proyecto	h	55,50	2,00	111,00
MO02	Ingeniero junior	h	16,50	5,00	82,50
MAT17	Saliva artificial Ringer-Hartmann modificada	l	6,00	0,60	3,60
MAQ10	Taladradora-fresadora OPTIMUM	h	0,91	0,50	0,45
MAQ12	Ultrasonidos	h	0,44	5,00	2,19
MAQ13	pHmetro	h	0,04	0,16	0,01
MAQ14	Estufa modelo Selecta 2000207 (lib iones)	h	0,16	811,23	129,80
MAQ15	Desbastadora LaboPol-25	h	2,36	2,00	4,73
MAT15	Papel de lija 220 mallas	ud.	3,00	3,00	9,00
Precio por ud.					343,27
<i>Esterilización</i>					
MO01	Director del proyecto	h	55,50	1,00	55,50
MO02	Ingeniero junior	h	16,50	5,00	82,50
MAQ16	Autoclave	h	0,39	1,00	0,39
MAT49	Bolsas Autoadhesivas para esterilización	ud.	0,08	26,00	2,08
Precio por ud.					140,47
COSTE TOTAL CAPITULO 03					1786,62

Tabla 46. Cuadro de precios descompuestos capítulo 03

Capítulo 04. Análisis biológico

Adhesión, proliferación, expresión génica y citotoxicidad

Código	Descripción	Unidad	(€/ud)	Cantidad	Precio (€)
MO03	Técnico de laboratorio	h	24,99	80,00	1999,20
MO02	Ingeniero junior	h	16,50	150,00	2475,00
MAT16	Caja de guates latex	ud.	4,40	2,00	8,80
MAT18	Alfa MEM	ml	0,19	500,00	95,00
MAT19	MEM	ml	0,09	500,00	45,00
MAT20	Antibióticos: Penicilina- Estreptomicina (P/S)	ml	0,13	20,00	2,60
MAT21	L-Glutamina	ml	0,17	15,00	2,55
MAT22	Fungizona	ml	1,08	15,00	16,20
MAT23	Aminoácidos esenciales	ml	0,15	23,00	3,45
MAT24	Piruvato	ml	0,13	16,00	2,08
MAT25	Suero fetal bovino	ml	0,31	500,00	155,00
MAT26	Tampón PBS	ml	0,02	5000,00	100,00
MAT27	Tripsina	ml	0,17	16,00	2,72
MAT28	Frasco de cultivo T25 de DELTALAB	ud.	1,26	2,00	2,52
MAT29	Trypan blue stain 0,4 %	ml	0,32	10,00	3,20
MAT30	Línea celular MG-63	vial	319,50	1,00	319,50
MAT31	Línea celular hDPSC	vial	800,00	1,00	800,00
MAT32	Placa de 24 pocillos	ud.	0,88	8,00	7,04
MAT33	Placa de 384 pocillos	ud.	7,36	1,00	7,36
MAT34	Tubos de centrifuga Eppendorf	ud.	0,16	171,00	27,36
MAT35	Pipetas Pasteur de 3mL	ud.	0,09	8,00	0,72
MAT36	Micropipeta de 10microlitros	h	0,01	10,00	0,10
MAT37	Micropipeta de 100microlitros	h	0,01	8,00	0,08
MAT38	Micropipeta de 1000microlitros	h	0,01	5,00	0,05
MAT39	Puntas de micropipeta de 10microlitros	ud.	0,30	2,00	0,60

Código	Descripción	Unidad	(€/ud)	Cantidad	Precio (€)
MAT40	Puntas de micropipeta de 100microlitros	ud.	0,30	1,00	0,30
MAT41	Puntas de micropipeta de 1000microlitros	ud.	0,30	0,50	0,15
MAT42	Cámara de cultivo Millicell de 8 pocillos	ud.	44,00	4,00	176,00
MAT43	DAPI	ml	7,91	0,35	2,77
MAT44	Rodamina-Faloidina de ThermoFisher	ml	656,00	0,09	57,40
MAT45	MTS de Promega	ensayo	4,62	1,00	4,62
MAT46	STEMCELL Technologies 70 µm	ud.	6,37	16,00	101,92
MAQ17	Microscopio electrónico HRFSEM	h	30,00	12,00	360,00
MAQ18	Incubadora Forma Scientific	h	0,40	1008,00	406,92
MAQ19	Microscopio de fluorescencia Leica DM4000B	h	2,81	25,00	70,19
MAQ20	Automatic Cell Counter EVE	h	9,72	5,00	48,61
MAQ21	Espectrofotómetro SpectraMax Plus	h	0,41	2,00	0,82
MAQ22	Campana de flujo laminar Scanaf	h	2,82	15,00	42,32
COSTE TOTAL CAPITULO 04					7348,15

Tabla 47. Cuadro de precios descompuestos capítulo 04

Capítulo 05. Análisis de datos y redacción

Código	Descripción	Unidad	(€/ud)	Cantidad	Precio (€)
MO01	Director del proyecto	h	55,50	5	277,50
MO02	Ingeniero junior: Revisión bibliográfica	h	16,50	50	825,00
MO02	Ingeniero junior: Procesado de las imágenes	h	16,50	15	247,50
SW01	Windows 11	h	0,01	155	1,55
MO02	Ingeniero junior: Redacción de la memoria	h	16,50	90	1485,00
MAQ23	Ordenador ASUS VivoBook	h	0,15	155	23,25
COSTE TOTAL CAPITULO 05					2859,80

Tabla 48: Cuadro de precios descompuestos capítulo 05

3. PRESUPUESTO TOTAL

CAPÍTULO	IMPORTE
Capítulo 01. Fabricación de los materiales	6.768,39 €
Capítulo 02. Caracterización mecánica	1.006,27 €
Capítulo 03. Preparación de las muestras	1.302,89 €
Capítulo 04. Análisis biológico	7.348,15 €
Capítulo 05. Análisis de datos y redacción	2.859,80 €
Ejecución material	19.285,51 €
Gastos generales (13%)	2.507,12 €
Beneficio Industrial (6%)	1.157,13 €
Total	22.949,76 €
IVA (21%)	4.819,45 €
Presupuesto de ejecución por contrata	27.769,20 €