



UNIVERSIDAD DE PANAMA
VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO
FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA Y CLÍNICA

TÍTULO

DESARROLLO DE SUPERFICIES NANOESTRUCTURADAS DE
ALEACIÓN DE TITANIO COMO VEHÍCULO PARA PROMOVER LA
MADURACIÓN OSTEOBLÁSTICA DE CÉLULAS OSTEOGÉNICAS.

Presentado por
VENETTIA R. LESLIE C.

TESIS DOCTORAL PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
Y CLÍNICA - MD, PhD

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ
2025

TUTOR PRINCIPAL Y DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Rolando Gittens, PhD

Director Adjunto de Investigación e Innovación (I+i)

Instituto Técnico Superior Especializado (ITSE)

Director Ejecutivo Encargado - CiiECYT-AIP

Ingeniero de investigación /INDICASAT-AIP

TUTORES ADSCRITOS DE VIRGINIA COMMONWEALTH UNIVERSITY:

Dra. Barbara Boyan

Director del Laboratorio de Investigación e Innovación Musculoesquelética

(LMRI)/Instituto de Ingeniería y Medicina de VCU

Dr. Zvi Schwartz DMD,PhD

Profesor del Departamento de Ingeniería Biomédica,

Escuela de Ingeniería de VCU

Dr. David Joshua Cohen, MD

Profesor adjunto VCU College of Engineering

Departamento de Ingeniería Biomédica

Dedico esta tesis a mi esposo, por su confianza incondicional, palabras de aliento y por ser aparte de DIOS, la otra roca que me sostuvo en momentos difíciles. Gracias por su amor, por creer en mis sueños, la complicidad y el empuje para sacarlos adelante con dignidad y verdad.

AGRADECIMIENTOS:

“Estoy profundamente agradecida con DIOS por esta oportunidad y por darme las fuerzas para que con resiliencia y mucha fe pudiera resistir hasta el final”

Cuando en nuestro camino van uniéndose todos los sabios para compartir su conocimiento, uno no puede más que sentirse afortunado y muy agradecido. Es por ello que deseo dar gracias a profesores, mentores y todas aquellas personas que compartieron conmigo las ideas, conceptos y criterios acerca del mundo de la investigación.

Deseo agradecer a mi mentor y director de tesis, el Dr. Rolando Gittens por invitarme a ser parte de su equipo e introducirme en el fascinante mundo de los biomateriales. Sus enseñanzas en cuanto a la nanoestructuración de las superficies de aleación de titanio, la caracterización de éstas utilizando microscopia electrónica de barrido y luego, la realización de cultivos celulares para ser utilizadas sobre dichas superficies, me hicieron comprender que salirnos de nuestra zona de confort y áreas de conocimiento nos permite explorar otros mundos en la ciencia y la investigación y que la gran mayoría de las veces ni imaginamos que existen o que son la fase inicial de un gran descubrimiento.

Debo expresar mi profundo agradecimiento a la Dra. Barbara Boyan por brindarme la oportunidad de realizar parte de la fase experimental de mi PhD en su prestigioso laboratorio en Estados Unidos. Desde el primer día de mi llegada a la Ciudad de Richmond, Virginia hizo los arreglos de bienvenida para

compartir una deliciosa velada con ella, el Dr. Schwartz y el Dr. Cohen como parte del equipo de mentores con los cuales estaría yo aprendiendo y haciendo experimentación en el Laboratorio de Investigación e Innovación Musculoesquelética (LMRI)/Instituto de Ingeniería y Medicina de Virginia Commonwealth University. Su pasión por la investigación y capacidad de hilar muy fino en el análisis de los hallazgos que arroja un estudio me han ayudado a ver con más claridad cual es la línea de pensamiento que se debe tener y lo inquisitivo que debe ser un investigador. Su calidez y buena anfitriona que mostró ser durante reuniones de fin de año en su hogar y luego mi despedida, me hicieron sentir como si estuviera en familia.

El Dr. Schwartz, el cual considero “Mentor Control de Calidad”, representó una persona clave en el proceso de aprendizaje, en optimización de pruebas y análisis de data. Sus conocimientos e instinto como investigador son admirables. Lo acertado en cuanto a la orientación que debe seguir una investigación y la búsqueda incansable de buena data tras cada ensayo o experimentación, hicieron posible que yo obtuviera el material adecuado para sustentar mi tesis.

Un especial agradecimiento al Dr. Joshua Cohen cuyos consejos y guía para mantenerme enfocada y tener claridad durante tiempos difíciles fueron cruciales para el proceso de adaptación en esa fase de mi proyecto de investigación. Su apoyo para lograr resultados y el análisis de estos fueron invaluable. “ **The Mediator**”, como afectuosamente le llamaba, era el adjetivo que mejor lo calificaba en el manejo de las complejas situaciones que se pudieran dar con respecto a los estudiantes a su cargo como tutor de planta.

VI

Su papel de director de la orquesta en cuanto al funcionamiento de las cosas en el laboratorio y su guía personalizada en los procesos, marcaron la pauta para cumplir con los objetivos y cronogramas de la fase experimental establecidos para hacer en su laboratorio.

La alianza y el trabajo conjunto con el Laboratorio de Investigación e Innovación Musculoesquelética (LMRI) / Instituto de Ingeniería y Medicina de la VCU, liderado por la Dra. Barbara Boyan y en colaboración con el Centro de Nanoestructuración de Materiales y sus investigadores, estudiantes de doctorado, representaron un elemento indispensable en la alineación de los procesos de experimentación, análisis de las superficies nanoestructuradas, pruebas especiales y cultivos celulares.

El equipo técnico y de investigadores del INDICASAT-AIP formó parte crucial en el desarrollo del proyecto, brindando su ayuda tanto en orientación, guía, espacio físico, préstamo e intercambio de insumos y uso de equipos, en momentos en que era requerido. En este sentido deseo dar reconocimiento a la Lic. Geraldin Martínez, con quien tuve mi proceso de orientación inicial y guía de procedimientos en el laboratorio de Química y manejo del horno de síntesis microondas MARS6.

Deseo dar gracias al Dr. Edgardo Castro, el cual formó parte de mi tribunal evaluador de sustentación de tesis y fue un facilitador de algunas aplicaciones de análisis de data. Agradezco el haberse convertido en un oído amigo, consejero y alguien con el cual simplemente se podía conversar e intercambiar anécdotas personales, académicas y experiencias de doctorados en general.

VII

Un especial reconocimiento y agradecimiento por la colaboración del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, al conceder los permisos y espacios necesarios para el aprendizaje del manejo de cultivos de células madre mesenquimales, guiado y liderado por la Doctora Mairim Solís y en colaboración estrecha con la Licenciada Yanelys Jaén.

A mis familiares y amigos que mostraron su respaldo y palabras de aliento para seguir adelante con este nuevo emprendimiento académico a pesar del *Reloj Vida*. Esto se hizo claramente evidente cuando sobrinas políticas Aixa y Graciela no dudaron en poner su firma de respaldo y aval como codeudoras de mi beca de estudios.

Finalmente, con un corazón rebosante de agradecimiento, amor y respeto, quiero dedicarle palabras de profunda gratitud a mi esposo Frank, quien sin duda representó el eje central en este proceso de principio a fin. Su respaldo fue vital en todos los aspectos, procurando siempre mi bienestar y estabilidad integral, particularmente durante ese difícil periodo de pandemia en el cual el Programa del Doctorado quedó sumergido en la virtualidad, agravando el ya desafiante proceso de embarcarme en estudios a nivel doctoral a estas alturas de la vida.

Mi motivación en su momento como Coordinadora Académica de la especialidad médica de Radiología siempre fue mejorar el proceso de enseñanza a los médicos generales y especialistas en formación, aumentando las destrezas académicas y conocimientos requeridos para una investigación científica, dejando así un legado sólido para fortalecer su malla curricular y desempeño clínico.

*“Los que sembraron con lágrimas con
regocijo segarán; Irá andando y
llorando quien lleva la preciosa
semilla, más volverá con regocijo
trayendo su gavilla”*

Salmo 126

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS:	IV
TABLA DE CONTENIDOS	IX
INDICE DE TABLAS:	XIII
PALABRAS CLAVE:	XVII
ABREVIATURAS:	XVII
SECCIÓN I	1
RESUMEN: -----	1
ABSTRACT: -----	2
SECCIÓN II	3
1. OBJETIVO PRINCIPAL :	3
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	5
2.1. OBJETIVO ESPECÍFICO 1	5
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO 2	6
2.3. OBJETIVO ESPECÍFICO 3..	6
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO: -----	7
SECCIÓN III	8
1. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN Y UTILIZACIÓN DE LOS .	8
2. LOS PRODUCTOS Y RESULTADOS PREVISTOS DE ESTE	
PROYECTO SON LOS SIGUIENTES:	11

3. BENEFICIOS Y PRINCIPALES BENEFICIARIOS:	11
4. DESCRIPCIÓN GLOBAL DEL DISEÑO Y LA	13
SECCIÓN IV	14
1. INTRODUCCIÓN	14
2. CONCEPTOS DE INTERÉS Y CLAVES DE LAS CARACTERÍSTICAS SUPERFICIALES, MODIFICACIÓN Y RESPUESTA CELULAR A LA MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE BIOMATERIALES:	18
2.1. Ingeniería de superficies:	18
2.2. Osteointegración y más allá:	22
2.3. Cultivo celular y efectos biológicos sobre la superficie del biomaterial:	24
2.4. Determinación de la expresión génica con niveles específicos de proteínas:	25
3. PROPOSITO DE LA EXPERIMENTACIÓN:	26
SECCIÓN V	28
1. MATERIALES Y MÉTODOS:	28
1.1 BIOMATERIALES:	28
1.2 LÍNEAS CELULARES:	28
1.3 FABRICACIÓN E INGENIERÍA DE SUPERFICIES:	29
1.3.1. Nanomodificación de la superficie de la placa de aleación Ti6Al4V-	29
1.3.2. Caracterización de la superficie de las placas Ti6Al4V-SLA:	31
1.3.2. (a) SEM (Microscopía electrónica de barrido)	31

1.3.2.(c) Análisis XPS: -----	32
1.3.2.(d) Ángulo de contacto: -----	33
1.3.2.(e) Microscopía confocal Láser: -----	33
1.4. CULTIVOS CELULARES:	34
1.5. ENSAYOS BIOMOLECULARES: ADN, Macro-Micro/BCA, ALP, OCN, OPN, OPG, VEGF	37
1.6 ESTADÍSTICAS	39
SECCIÓN VI -----	40
MANUFACTURA Y NANOMODIFICACIÓN SOBRE OTRAS -----	40
SPERFICIES DE Ti6AL4V -----	40
1.MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
1.1 BIOMATERIALES:	40
1.2 LÍNEAS CELULARES:.....	41
1.3 NANOMODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE	41
MICROTRANSPORTADORES Ti6AL4V	41
1.3.1. Caracterización de la superficie de los microtransportadores: -----	43
1.3.1.(a) SEM (microscopía electrónica de barrido):-----	43
1.3.1.(b) SEM-EDX (Rayos X de dispersión de electrones):	44
1.3.1.(c) Análisis XPS: -----	45
1.3.1.(d) Mediciones del ángulo de contacto: -----	45
1.3.1(e) Microscopía Confocal Láser-----	46
1.4 CULTIVO CELULAR SOBRE MICROTRANSPORTADORES:	47
1.4.1. Ensayos con células VERO: -----	48
1.4.2. Cultivos de células MG-63: -----	49

1.4.3. Células madre mesenquimales derivadas de células madre	51
SECCIÓN VII.....	53
1.RESULTADOS GENERALES	53
1.1 RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE LAS PLACAS DE Ti6Al4V:	53
1.2. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE MICROPORTADORES DE Ti6Al4V:	66
3. DISCUSION:	79
4. CONCLUSIÓN.....	83
5. REFERENCIAS:	86
ANEXOS	92

INDICE DE TABLAS:

TABLA I. Ensayos de nanomodificación de la superficie de placas de aleación de Titanio Ti6AL4V utilizando parámetros variables.

Tabla II. Química de la superficie por SEM-EDX en muestras de placas SLA vs. NanoWave-SLA.

Tabla III. Valores de Ángulos de Contacto en placas de aleación de Ti sin protocolo de limpieza CP-2.

Tabla IV. Valores de Ángulos de Contacto en placas de aleación de Ti con limpieza con protocolo CP-2 .

Tabla V. Nanomodificación de la superficie de microtransportadores de aleación de Ti (Ti6Al4V).

Tabla VI. Análisis de la química de superficie de los Microtransportadores μ Ti Nativos y μ Ti NanoWave hecho por EDX-SEM .

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Imágenes SEM a baja y alta magnificación de la modificación de superficie realizada en placas SLA de aleación de Titanio .

Fig. 2 Imágenes SEM a baja y alta magnificación de la nanomodificación de superficie hecha a las placas de aleación de Ti6Al4V que fueron limpiadas usando el protocolo del laboratorio VCU (CP2/VCU).

Fig. 3 Química de la superficie por XPS. La composición química superficial por espectroscopia de fotoelectrones de rayos X de las placas de aleación de Ti tratadas con SLA y NanoWave-SLA muestra el panel de elementos predominantes.

Fig. 4 Ángulo de contacto de placas de aleación de Ti sin limpieza con CP-2.

Fig. 5 Medición del ángulo de contacto en placas limpiadas con protocolo de limpieza CP-2.

Fig. 6 Caracterización de la rugosidad media (RSa) y medición de pico a valle (RSz) de la superficie de las placas de aleación de Ti utilizando microscopía confocal.

Fig. 7 Producción de marcadores osteogénicos.

Fig. 8 SEM de los ensayos iniciales de fabricación de microtransportadores de aleación Ti6Al4V con baja y alta magnificación.

Fig. 9 SEM de microtransportadores de aleación Ti6Al4V ensayos iniciales de fabricación a baja y alta magnificación.

Fig. 10 Imágenes SEM de microtransportadores de Ti6Al4V Nativos y tratados con diferentes parámetros de modificación hidrotermal.

Fig. 11 Imágenes SEM de la superficie de microtransportadores de aleación Ti6Al4V. (a, b, c) μ Ti Nativas; (d,e,f) μ Ti NanoWave, con aspecto trabecular de hueso.

Fig. 12 SEM-EDX. Química de superficie de (a), Microtransportadores μ Ti Nativos y mTi NanoWave analizados por EDX-SEM con un detector EDX.

Fig. 13 Mediciones estáticas del ángulo de contacto. (a) Partículas mTi Nativas y mTi NanoWave.

Fig. 14 Mediciones del ángulo de contacto con ESEM (microscopia Electronica de Barrido-modo Ambiental por sus siglas en inglés)

Fig.15 Microscopia Confocal. Caracterización de microtransportadores de aleación de Ti mediante microscopía confocal.

Fig. 16 ESEM. Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental de baja y alta magnificación del cultivo de células VERO sobre μ Ti Nativas (a,b) y μ Ti-NanoWave

Fig. #17. ESEM. Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental con imágenes de baja y alta magnificación del cultivo de células MG-63 sobre NanoWave μ Ti .

Figura Complementaria 1. Resumen gráfico: Imágenes del polvo de mTi-nativo u original que posteriormente es nanoestructurado en horno de síntesis *MARS 6*, con resultado final de poros que imitan la estructura jerárquica del hueso.

Fig. Complementaria 2. Imagen de Microscopía Confocal 3D de la superficie de platos de aleación de Titanio (Ti6Al4V). (a) SLA, (b) NanoWave-SLA

Fig. Complementaria 3. Imagen de microscopía confocal 3D de la superficie del microtransportador μ Ti NanoWave.

Fig. Complementaria 4. (a, b) Imágenes de cultivo de células VERO. Microscopía de luz invertida y (c, d) con Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental sobre μ Ti-Nativa y μ Ti-NanoWave respectivamente.

Fig. Complementaria 5. ESEM. (a, b). Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental de baja y alta magnificación del crecimiento y adhesión de iPMSCs sobre el microtransportador μ Ti NanoWave.

PALABRAS CLAVE:

Aleación de titanio, nanomodificación, nanoestructuras, desmineralización, osteointegración, microtransportadores, microrrugosidad, nanotrabecular, microtransportador.

ABREVIATURAS:

ADN=Acido Desoxiribonucleico

ADNasa= Enzima que degrada e hidroliza el ADN

ALP = Fosfatasa Alcalina (de siglas en inglés)

BCA = Acido Bicincroninico (de siglas en inglés)

CP2= Protocolo de limpieza #2 (de siglas en ingles)

⁰C = Grados Centígrados

EDS = Espectroscopía de Rayos X de Dispersión de Energía

iPSC = Células madre pluripotenciales inducidas

μTi = micro-Titanio

μm = micrómetro

MG-63 = Línea celular de osteosarcoma humano

MSCs = Células Madre Mesenquimales

MWHT = Tratamiento hidrotermal por microondas

NW = Tratamiento NanoWave

OCN= Osteocalcina

OPG= Osteoprotegerina

OPN= Osteopontina

Pa= Pascales

Ra = rugosidad media aritmética

Rz = Altura máxima media del pico al valle

SEM = Microscopía electrónica de barrido

SLA= Grillado de arena y grabadas con ácido (de siglas en Ingles)

Ti6Al4V = Aleación de 90%Titanio 6%Aluminio 4%Vanadio

VEGF = Factor de crecimiento endotelial vascular (de siglas en ingles)

XPS = Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X

SECCIÓN I

RESUMEN:

El tratamiento MWHT en polvo de Ti6Al4V mejora sus propiedades superficiales mediante oxidación rápida a baja temperatura, en un entorno acuoso de alta presión, formando una capa de óxido controlada que acelera reacciones químicas y optimiza el material. (Lukaszewska-Kuska et. Al. (2018)) Se han creado estructuras en la superficie de materiales, como las aleaciones de titanio, mediante la manipulación de la temperatura, el uso de disolventes, la manipulación de la electricidad o la combinación de ambos, lo que ha dado lugar a diversas nanoestructuras y características de las que ya se ha informado en la bibliografía. Al utilizar ondas electromagnéticas para calentar directamente la mezcla de reacción, la irradiación por microondas puede reducir significativamente los tiempos de reacción y mejorar la calidad del producto.(Souza et. Al. (2019))

El titanio y sus aleaciones han sido ampliamente utilizados en implantes odontológicos y ortopédicos debido a su biocompatibilidad, resistencia a la corrosión, propiedades fisicoquímicas favorables y capacidad de osteointegración, lo que garantiza su estabilidad y éxito clínico en el cuerpo humano. El orquestador de este proceso es una osteointegración óptima que permite que las células óseas interactúen directamente con el biomaterial o implante, sin tejido fibroso intermedio, (Lukaszewska-Kuska et. Al. (2018; Souza et. Al. (2019)) estableciendo una conexión estructural y funcional directa. En las terapias de regeneración ósea, sobre todo con aleaciones de Ti nanoestructuradas para emular las características del hueso, la osteointegración es clave para el éxito, siendo también importante un reciente enfoque la reacción del tejido blando y la estética del implante para mejorar resultados clínicos.(Souza et. Al. (2019)) (Raucci et. Al. (2020)) El concepto de Miniaturizar cualitativamente estructuras óseas en microtransportadores de aleación de titanio es innovador y potencialmente efectivo, replicando efectos biológicos similares en cultivos celulares.(Souza et. Al. (2019)) Este enfoque usa nanotecnología para mejorar las características superficiales de las aleaciones de Ti, haciéndolas más propicias para la fijación y el crecimiento de las células óseas.

ABSTRACT:

Adapting the surface properties of Ti alloy powder (Ti6Al4V) through microwave-assisted hydrothermal oxidation (MWHT) treatment is a fast and effective method for accelerating chemical reactions. It involves subjecting the material to low temperatures in a high-pressure aqueous environment, thereby forming a surface layer of oxide with a controlled concentration of solvent. (Lukaszewska-Kuska et. Al. (2018))

Structures have been created on the surface of materials, such as titanium alloys, by manipulating temperature, using solvents, electricity, or a combination of both methods, resulting in numerous nanostructures and features that have already been reported in the literature. By using electromagnetic waves to directly heat the reaction mixture, microwave irradiation can significantly reduce reaction times and improve product quality. (Souza et. Al. (2019)) For various reasons, titanium and its alloys have been widely used as biomaterials for dental and orthopedic implants. Their biocompatibility, excellent corrosion resistance, and favorable physicochemical properties make them stable and suitable for use in the human body. Most importantly, they possess osseointegration capabilities, a crucial factor for their successful use in clinical settings. The entire process is orchestrated by optimal osseointegration in which the bone cells interact directly with the biomaterial or implant without the intervention of any fibrous tissue, (Lukaszewska-Kuska et. Al. (2018; Souza et. Al. (2019)) establishing a direct structural and functional connection. Osseointegration is crucial for implant success in bone regeneration therapies, particularly with Titanium alloys that mimic bone. Recent approaches also focus on soft tissue response and aesthetic aspects of the implant. (Souza et. Al. (2019)) (Raucci et. Al. (2020)) The idea of qualitatively miniaturizing bone-like structures and transferring them to our Ti alloy microcarriers is innovative, and more so if they can have the same biological effects on cell cultures. (Souza et. Al. (2019)) This approach leverages nanotechnology to enhance the surface properties of Ti alloys, thereby making them more conducive to the attachment and growth of bone cells.

SECCIÓN II

1. OBJETIVO PRINCIPAL :

Desarrollar técnicas innovadoras de nanomodificación en superficies de aleaciones de titanio para replicar la estructura ósea a nivel nanoscópico y así promover la diferenciación osteoblástica y la regeneración ósea localizada, con especial atención a las aplicaciones en medicina regenerativa traslacional.

Basamos nuestro estudio en la creación de nanoestructuras estables y reproducibles sobre superficies de aleaciones de titanio que emulan el aspecto morfológico del hueso, aprovechando los conocimientos que tenemos sobre la biocompatibilidad de este biomaterial y su buena capacidad de osteointegración.

Las enfermedades musculoesqueléticas están entre las que más afectan a los sistemas públicos de salud de los países desarrollados, cuestan millones de dólares e impactan negativamente en el "Año de Vida Ajustado vs. Calidad" y el "Año de Vida Ajustado vs. Discapacidad", que son una medida de los años vividos en perfecta salud ganados y los años en perfecta salud perdidos. respectivamente. Por eso ha sido necesario crear terapias y utilizar prótesis que garanticen el restablecimiento de la funcionalidad orgánica.

Varias enfermedades musculoesqueléticas crónicas y degenerativas, como la artrosis, la osteoporosis y las lesiones osteolíticas metastásicas, carecen en la actualidad de buenas terapias regenerativas y aún pueden observarse aflojamientos de implantes con fracaso e inestabilidad. Por eso es necesario recrear cada vez más las características jerárquicas que emulan las del hueso en la superficie de los biomateriales utilizados, para garantizar un buen anclaje del implante, una osteointegración exitosa y la generación de tejido óseo sano a su alrededor.

En estudios previos se ha patentado una técnica de estructuración de la superficie de placas de Titanio mediante un método de modificación hidrotermal asistido por un horno microondas sintético, por lo que hemos planteado la experimentación utilizando este sistema, aplicándolo tanto a superficies sólidas como a polvo de aleación de Titanio (Ti6Al4V), con lo que proponemos una hipótesis de trabajo. en la que argumentamos que las superficies nanoestructuradas de aleación de titanio (Ti6Al4V) diseñadas para imitar la estructura ósea permiten la adhesión celular y promueven la producción de biomoléculas asociadas a la formación de hueso, sirviendo como vehículo para la regeneración ósea.

Como parte de nuestra pregunta de investigación nos planteamos si era posible miniaturizar las características del hueso esponjoso sobre superficies de titanio para desarrollar un concepto de biomaterial que pueda promover la generación de marcadores osteogénicos y una posible regeneración ósea.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Estos objetivos específicos se han diseñado para cubrir los aspectos técnicos, biológicos y químicos de esta investigación.

2.1. OBJETIVO ESPECÍFICO 1

Establecer un método para nanomodificar superficies de aleación de titanio que imiten las características similares a los huesos. Con ello pretendemos optimizar las condiciones de tratamiento de la superficie mediante un tratamiento hidrotérmico apoyado por un horno de síntesis de microondas para crear nanoestructuras sobre superficies sólidas y micropartículas de Ti6Al4V que emulen las características de la superficie ósea.

Tenemos previsto caracterizar la rugosidad superficial de las superficies modificadas mediante técnicas como la microscopía electrónica de barrido (SEM), la perfilometría o el ángulo de contacto, la microscopía confocal y correlacionar estas propiedades con las características morfológicas del hueso.

Las propiedades químicas de las superficies modificadas se analizarán mediante técnicas como la espectroscopia de rayos X (EDX) y el análisis de composición elemental con XPS, para evaluar la interacción de los

tratamientos con los componentes de la aleación y la formación de fases bioactivas.

La caracterización precisa de la superficie es clave para comprender cómo afectan las modificaciones a la interacción con las células.

2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO 2

Evaluar los efectos de las superficies nanoestructuradas de aleación de titanio en el proceso de diferenciación osteoblástica en células osteogénicas.

Estudiaremos la expresión génica de marcadores osteoblásticos (como ALP, osteocalcina, osteoprotegerina, osteopontina, VEGF) en células osteogénicas cultivadas en las superficies modificadas mediante técnicas ELISA (término en inglés-Enzyme Immunosorbent Assay) o Ensayo de inmunoabsorción enzimática.

Para garantizar que las superficies nanoestructuradas no solo favorecen la adhesión celular, sino que también inducen una diferenciación osteoblástica eficaz, es fundamental evaluar la respuesta osteogénica de las células. La evaluación *in vitro* de estas propiedades permite establecer si las superficies modificadas favorecen una respuesta biológica adecuada. Esto proporcionará pruebas que justifiquen el uso de las superficies modificadas en aplicaciones clínicas.

2.3. OBJETIVO ESPECÍFICO 3

Reproducción de las características de nanomodificación obtenidas en las placas, sobre otras superficies de aleación de Ti.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO:

Las superficies nanoestructuradas de aleación de titanio (Ti6Al4V), diseñadas para imitar la estructura ósea, permiten la adhesión y proliferación celular y fomentan la producción de biomoléculas asociadas a la formación ósea, sirviendo de vehículo para la regeneración ósea.

SECCIÓN III

1. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN Y UTILIZACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Las afectaciones del sistema musculoesquelético, que incluyen cambios degenerativos en la columna vertebral, osteoartritis que incluye pequeñas y grandes articulaciones, osteoporosis y enfermedades infiltrativas, se han posicionado como las afecciones más reportadas en los sistemas de salud de los países desarrollados, lo que representa un costo muy alto para la sociedad en términos de salarios perdidos, gasto en salud (incapacidad y pensiones). Todas estas enfermedades implican alteraciones en la desmineralización ósea. También existen otras con pérdida de densidad ósea como las enfermedades medicamentosas (esteroides), infecciones óseas (osteomielitis), tiroideas, paratiroideas e incluso gastrointestinales.

Desde un punto de vista técnico, el uso de biomateriales para promover la regeneración del tejido óseo se viene desarrollando y aplicando desde hace varios años tanto en el campo ortopédico como en el odontológico. (Raucci et. Al. (2020)) (Tolstunov (2019)). El patrón de oro para la regeneración ósea sigue siendo el injerto óseo autólogo, debido a su capacidad regenerativa y baja probabilidad de rechazo.

Sin embargo, la morbilidad asociada al lugar del procedimiento ha promovido una importante oferta de biomateriales sintéticos o naturales manipulados, generalmente de naturaleza cerámica (por ejemplo, hueso animal desmineralizado, fosfatos cálcicos) que están disponibles en las clínicas. (Ballouze et. Al. (2021)). Aun así, todavía hay espacio para nuevos biomateriales que promuevan una regeneración más rápida y eficaz.

En el caso particular de nuestra investigación, hemos incorporado el uso de microtransportadores nanoestructurados de aleación de titanio con la visión de crear una terapia inyectable y mínimamente invasiva como posible contribución al campo de la regeneración del tejido óseo.

En el contexto nacional, tanto el Plan Estratégico Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (PENCYT) como la Agenda Nacional de Prioridades de Investigación en Salud (ANPIS) enfatizan la necesidad de investigar sobre enfermedades virales, transmisibles, crónicas y oncológicas, entre otras. El desarrollo económico de Panamá en los últimos años ha contribuido a mejorar la calidad y esperanza de vida en un gran porcentaje de la población, lo que también ha aumentado la incidencia de enfermedades crónicas. De esta manera, nuestra propuesta aborda directamente varios puntos del PENCYT 2019-2024 que han sido reflejados en versiones anteriores.

El Estado se enfrenta a grandes retos en este ámbito de la salud, entre los que destacan el coste de los medicamentos y la dificultad de acceso a la medicina personalizada, al tratamiento del cáncer y a las terapias regenerativas, así como a las tecnologías de diagnóstico. Enfrentar estos retos requiere de la generación de conocimientos y cambios como resultado de la

ciencia, la tecnología y la innovación. El área temática de "Bioingeniería", a la que se aplica esta propuesta, forma parte de nuevas áreas interdisciplinarias que realmente proponen soluciones que ayudan a combatir enfermedades complejas y a mejorar la calidad de vida de la población. Específicamente, la propuesta responde al Objetivo Estratégico 1 del Programa de Desarrollo de la Ciencia y las Capacidades Científicas, que busca incrementar el capital humano con altas capacidades, para actividades científico-tecnológicas. Una de las líneas de acción dentro de este objetivo se centra en la inserción de capital humano altamente capacitado en la fuerza laboral panameña, idealmente en temas de investigación y en áreas prioritarias de desarrollo. Este objetivo se puede lograr a través de programas específicos para la inserción de becarios de la SENACYT que se hayan preparado en las mejores universidades del mundo.

El desarrollo de una terapia innovadora y regenerativa que contribuya en el mejor de los casos a revertir el daño sufrido para evitar nuevas lesiones se plantea como una solución atractiva para abordar este reto. El hecho de que los tratamientos disponibles sigan siendo altamente invasivos permite el uso de tecnología y procedimientos con tendencias mínimamente invasivas, lo que a su vez abarataría los costos de salud y permitiría que más pacientes se beneficien de la terapia, al tiempo que contribuiría a atender a un sector desatendido de la población panameña.

2. LOS PRODUCTOS Y RESULTADOS PREVISTOS DE ESTE PROYECTO SON LOS SIGUIENTES:

- 2.1 Informe de caracterización fisicoquímica de la nanomodificación de microtransportadores de titanio: Las micropartículas de titanio se adquirirán comercialmente y se modificarán en el laboratorio para generar microestructuras y nanoestructuras en su superficie.
- 2.2 Cifras de adhesión celular y gráficos de viabilidad de microtransportadores de aleación de titanio y placas nanoestructuradas.
- 2.3 Gráficos de producción de marcadores de diferenciación celular osteoblástica. Las actividades para obtener estos resultados se describen en la sección de metodología y en el cuadro de variables.

3. BENEFICIOS Y PRINCIPALES BENEFICIARIOS:

Esta aplicación representa una nueva línea de investigación en el área de biotecnología, bioingeniería y ciencias de la vida en Panamá, que se alinea con los objetivos del PENCYT. Nuestro proyecto aportará a la comunidad científica de Panamá nuevos conocimientos sobre los procesos moleculares durante la diferenciación de células madre en superficies nanoestructuradas, como así como una metodología para la producción de biomateriales de potencial uso clínico. Otros beneficios asociados a este proyecto de investigación incluyen:

- 3.1 Publicación de artículos científicos en revistas internacionales indexadas

de alto impacto que ayuden al reconocimiento científico de las instituciones asociadas a esta propuesta de tesis, así como a los índices de desempeño científico de Panamá.

3.2 Apoyo a la redacción de propuestas que puedan competir en convocatorias nacionales e internacionales.

3.3 Desarrollo de la propiedad intelectual basada en las innovaciones que surjan de esta investigación.

Entre los distintos grupos que se beneficiarán de los resultados a corto, medio y largo plazo de esta investigación figuran:

- Como estudiante de doctorado directamente asociada a este proyecto (ayudante de investigación), recibí una formación inestimable en técnicas de diseño y fabricación de biomateriales, cultivo celular y biología molecular.
- Al iniciar la implantación con pacientes de osteoporosis, por ejemplo, podrán recibir un tratamiento personalizado generado en nuestro país.
- Los médicos en la práctica clínica dispondrían de herramientas adicionales para el tratamiento de la desmineralización ósea y las osteoporosis producidas localmente y a costos más asequibles para nuestra comunidad.
- La comunidad científica podrá buscar colaboraciones y utilizar equipos y conocimientos asociados a esta investigación.
- La sociedad en general a través del desarrollo económico que pueden producir las nuevas tecnologías y la mejora de los índices nacionales de evaluación internacional.

4. DESCRIPCIÓN GLOBAL DEL DISEÑO Y LA METODOLOGÍA DEL ESTUDIO:

Diseño: Experimental puro con *modelo "in vitro"*

Actividades:

4.1 Nanomodificación de microtransportadores y placas de aleación de titanio (Ti6AL4V):

4.2 Caracterización estructural y fisicoquímica de microtransportadores y placas de aleación de titanio nanoestructuradas:

4.3 Establecimiento de cultivos celulares en microtransportadores de aleación de titanio y placas nanoestructuradas, y evaluación de la adhesión y viabilidad celulares:

4.4 Evaluación de la diferenciación de células osteoblásticas en microtransportadores de aleación de titanio y placas nanoestructuradas mediante el análisis de marcadores de diferenciación temprana y tardía, como la fosfatasa alcalina, la osteocalcina, las proteínas morfogénicas óseas y la producción de proteínas como el VEGF, así como la expresión génica de marcadores de diferenciación ósea (es decir, OCN, OPN).

SECCIÓN IV

1. INTRODUCCIÓN

La recuperación de la funcionalidad de los tejidos mediante la ingeniería tisular y la posterior regeneración ha adquirido una importancia creciente en diversos campos de la medicina. Los recientes avances científicos y tecnológicos en medicina regenerativa lo han convertido en una realidad factible. (Parihar et. Al. (2022; Zivari-Ghader et. Al. (2022))

Una de las mejores descripciones de esta disciplina la define como el punto de encuentro de la física, la ciencia de materiales avanzados y la biología del desarrollo, con aplicaciones potenciales en entornos clínicos. (Esdaille et. Al. (2021)) Este avance abre un abanico de posibilidades para tratar afecciones crónicas y degenerativas con procedimientos mínimamente invasivos, restaurando así la funcionalidad de órganos y sistemas. Comprender los mecanismos de lesión, los factores de inmunidad y las células que modulan la regeneración ayuda a diseñar el modelo que se va a crear. (Seifert et. Al. (2023))

Los biomateriales se utilizan con mayor frecuencia en el cuerpo humano para restaurar la funcionalidad de un órgano o tejido como parte de la medicina traslacional. Por ello, un biomaterial ideal para la medicina traslacional debería reproducir fielmente las características estructurales de la matriz extracelular del tejido original. (Ogueri y Laurencin (2020))

El uso de biomateriales para la restauración dental, así como la estabilización y regeneración de partes del sistema musculoesquelético,, ha sido una aplicación de larga data en el campo, con una amplia literatura científica que apoya sus principios de funcionamiento. (Dec et. Al. (2022; Esdaille et. Al. (2021; Mishra y Chowdhary (2020))

Las enfermedades musculoesqueléticas figuran entre las más prevalentes en los sistemas de salud pública de los países desarrollados. Según la base de datos de Estimaciones Sanitarias Mundiales de la OMS, es la segunda causa mundial de años vividos con discapacidad (AVAD). (Sebbag et. Al. (2019)) Estas enfermedades generan importantes costes económicos (millones de dólares) e influyen negativamente tanto en los AVAC (años de vida ajustados por calidad) como en los AVAD (años de vida ajustados por discapacidad), que miden los años vividos en perfecto estado de salud ganados y perdidos, respectivamente.

Los huesos presentan una estructura estratificada a nivel macroscópico y microscópico, según su papel de soporte de carga y sus funciones metabólicas. El objetivo del diseño de las características del biomaterial es imitar las características macroscópicas o microscópicas para obtener la función final necesaria. (Gittens et. Al. (2011; Gittens et. Al. (2012; Ren et. Al. (2015))

El hueso es susceptible de sufrir infecciones, lesiones por desgaste, fracturas e infiltración neoplásica, y puede requerir procedimientos de intervención y dispositivos especiales para restaurar su funcionalidad. No es de extrañar que se estén dedicando muchos esfuerzos e inversiones a la

fabricación de andamiajes para la ingeniería de tejidos óseos. (Dec et. Al. (2022))

El estudio de los implantes metálicos ha proporcionado información valiosa sobre los aspectos biológicos del proceso y sobre cómo interactúan las células con los materiales artificiales. Esta información se utiliza para diseñar implantes más compatibles con el organismo como promotores de agentes de reparación tisular, teniendo en cuenta el papel preponderante de las propiedades superficiales del implante en el proceso. (Xue et. Al. (2020)) (Davies (2007; Gittens et. Al. Scheideler et. Al. et. Al. (2014))

El proceso de osteointegración implica una compleja cadena de acontecimientos y mecanismos fuertemente influidos por las propiedades de la superficie del implante, como su rugosidad y la química de la superficie. (Xue et. Al. (2020)) (Gittens et. Al. Scheideler et. Al. et. Al. (2014))

Este contacto directo entre el tejido óseo y la superficie del implante define el concepto de osteointegración. Es el objetivo principal de cualquier procedimiento de implante óseo que tenga éxito, tal y como describieron por primera vez el profesor Branemark et al. en la década de 1960. (Branemark (1983; Buser et. Al. (2017)) Una vez introducido el implante en el cuerpo, se desencadenan una serie de eventos de señalización y se forma un revestimiento en su entorno debido a la secreción de enzimas, anticuerpos, proteínas estructurales, moléculas de grasa y diferentes iones presentes en los fluidos corporales. (Lossdorfer et. Al. (2004; Schwartz et. Al. (1999)) Todos ellos son esenciales para los distintos procesos fisiológicos y su presencia en la superficie del implante puede influir en el modo en que el organismo interactúa

con este material extraño. Así que, en esencia, las células responden con mayor intensidad a las características del biomaterial que son relevantes para su entorno físico y químico inmediato. Si la superficie es similar en escala al tamaño de la célula, afectará más significativamente al modo en que la célula se adhiere a esa superficie específica o interactúa con ella. (Wang et. Al. (2015)) (Raines et. Al. (2019))

El titanio y sus aleaciones se utilizan desde hace décadas como biomateriales para implantes dentales y ortopédicos. Los amplios estudios y la literatura sobre su uso tienen como objetivo lograr resultados duraderos y satisfactorios, para lo que se requiere una interacción robusta y directa entre el hueso y su superficie. (Brånemark et. Al. (1977)) (Schwartz y Boyan (1994))

En nuestros ensayos, previamente nanomodificamos la superficie de microtransportadores de aleación Ti6Al4V por primera vez para imitar el aspecto de estructuras similares al hueso y luego, en experimentos posteriores, replicamos estas características en placas de aleación Ti6Al4V y en superficies de implantes dentales, mejorando así su funcionalidad y con ello la biocompatibilidad deseada. (Sharma et. Al. (2022))

La intrincada interacción de características de rugosidad a micro y nanoescala obtenida es una estrategia prometedora para replicar la textura superficial natural del hueso. (Gittens et. Al. (2011)) (Zhao et. Al. (2006)) Este enfoque biomimético proporciona las claves físicas y químicas necesarias para dirigir la diferenciación celular.

Estas estructuras se han creado en la superficie del material de aleación de titanio (Ti6Al4V) mediante una nanomodificación hidrotermal con la

combinación de temperatura , disolventes y manipulación del tiempo , asistida por microondas de síntesis (MARS 6) y dando lugar a diversas nanoestructuras y características. (Cheng et. Al. (2018)) (Mendonca et. Al. (2008)) (Variola et. Al. (2009))

Los conocimientos metabólicos y biomoleculares generados en la experimentación con la superficie de nuestras placas de aleación de Ti6Al4V nanomodificada se aplicarán además a la continuación de los ensayos con las superficies logradas en los microtransportadores de aleación de Ti (Ti6Al4V), utilizando el método de nanomodificación que generó las características superficiales de las estructuras similares al hueso. Con ello pretendemos fusionar décadas de conocimientos generados sobre superficies modificadas de implantes de titanio a granel para desarrollar una nueva terapia basada en microtransportadores de titanio nanoestructurados, como posible tecnología de regeneración tisular inyectable, mínimamente invasiva y localizada. (Gittens et. Al. (2011; Ogueri y Laurencin (2020)) (Zor et. Al. (2019))

2. CONCEPTOS DE INTERÉS Y CLAVES DE LAS CARACTERÍSTICAS SUPERFICIALES, MODIFICACIÓN Y RESPUESTA CELULAR A LA MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE BIOMATERIALES:

2.1. Ingeniería de superficies:

Investigaciones anteriores han demostrado que las características de la superficie favorecen la adhesión, proliferación y diferenciación de las células

osteogénicas, no solo a microescala, sino también a nanoescala. (Gittens et. Al. (2012; Wennerberg y Albrektsson (2009))

Se ha demostrado que las consideraciones críticas sobre las propiedades del biomaterial, como la rugosidad de la superficie, la química, la energía y otros imitadores de la estructura ósea, modifican las características biológicas y la evolución de las células osteogénicas, como se ha comprobado en trabajos y publicaciones anteriores. (Alijani y Vaughan (2024; Schwartz y Boyan (1994))

Como parte de un objetivo largamente perseguido de emular la estructura ósea en implantes (Iwata et. Al. (2017)), diseñamos la primera parte de nuestra experimentación basada en una Modificación de Superficie Hidrotérmica patentada asistida por Microondas de Síntesis en un entorno oxidativo, esta vez con énfasis específico en la concentración y tiempo del sustrato, obteniendo por primera vez una nanomodificación estable y reproducible que emula los aspectos de una superficie similar al hueso.

La idea de miniaturizar estructuras similares a las óseas, transferidas a placas nanoestructuradas de aleación de Ti y a otras superficies de aleación de Ti, es innovadora y más consigue que estas características resulten atractivas para que las células osteogénicas se adhieran, proliferen y diferencien. La obtención de estructuras que van de la micro a la nanoescala significa que el patrón solo puede evaluarse mediante una tecnología especial de obtención de imágenes microscópicas, en lugar de a simple vista. (Gittens et. Al. Olivares-Navarrete et. Al. et. Al. (2014))

Mediante el control de la temperatura, el tiempo y la concentración de disolvente (H_2O_2) en el entorno de reacción, la morfología y la composición de la superficie pueden adaptarse con precisión para conseguir las propiedades deseadas, como una mayor biocompatibilidad y adhesión celular. (Gittens et. Al. (2011))

La resistencia, rugosidad e hidrofilia de la superficie son factores críticos que influyen en el comportamiento de las células osteogénicas sobre las superficies de aleación de Ti (Liu et. Al. (2023; Stoilov et. Al. (2022)) y representan la capacidad de la superficie para resistir la tensión mecánica o la deformación. Esto garantiza la durabilidad y longevidad del implante, proporcionando una base estable para la adhesión y el crecimiento celular. Lo mismo ocurre con la probada rugosidad de la superficie, que mejora las interacciones célula-material al proporcionar más superficie para la adhesión celular e imitar la textura rugosa del hueso natural. (Alijani y Vaughan (2024; Liu et. Al. (2016))

Por otra parte, la capacidad de una superficie para atraer y retener moléculas de agua. La hidrofilia es crucial en la adsorción de proteínas y la adhesión celular, ya que crea un entorno favorable para la adhesión y diferenciación de las células osteogénicas. También puede ayudar a evitar la formación de adsorciones proteicas no específicas, que pueden interferir en la función celular. (Lotz et. Al. (2016))

Estas propiedades interconectadas influyen en la biocompatibilidad de las superficies de aleaciones de Ti para aplicaciones de células osteogénicas. Optimizándolas, es posible crear superficies que promuevan la adhesión,

proliferación y diferenciación celular, lo que en última instancia conduce a una mejor integración del implante y a su éxito a largo plazo, que es el objetivo final (Gittens et. Al. (2012)), teniendo en cuenta los conocimientos generados sobre las superficies de titanio para implantes aportándolos al campo de la ingeniería biomédica y la medicina regenerativa.

Todo el proceso está orquestado por una osteointegración óptima en la que las células óseas forman una interfaz directa con el biomaterial o el implante sin ningún tejido fibroso de por medio (Souza et. Al. (2019; Sul et. Al. (2005)), estableciendo una conexión estructural y funcional directa.

En las terapias de regeneración ósea, en particular con superficies estructuradas de aleación de Ti, la osteointegración es crucial para el éxito de los implantes y los materiales de andamiaje(Mesa-Restrepo et. Al. (2024)) aunque también se está teniendo en cuenta un enfoque más reciente, que es la reacción del tejido blando que rodea al biomaterial y la estética del propio implante. (Alanazi (2024; Urban et. Al. (2024))

La idea de miniaturizar cualitativamente estructuras similares al hueso, trasladada a nuestros microtransportadores de aleación de Ti, es innovadora y más si son capaces de tener los mismos efectos biológicos sobre los cultivos celulares.(Gittens et. Al. (2011)) Este enfoque aprovecha las ventajas de la nanotecnología para mejorar las características superficiales de la aleación de Ti, haciéndolas más propicias para la fijación y el crecimiento de las células óseas. El objetivo es desarrollar una tecnología inyectable mínimamente invasiva que favorezca la regeneración ósea localizada.

2.2. Osteointegración y más allá:

Como sabemos, el uso de biomateriales para la reparación dental y la restauración musculoesquelética es quizás, una de las aplicaciones con más larga historia en el campo, con una extensa literatura científica sobre los principios de funcionamiento (Esdaille et. Al. (2021)) (Mishra y Chowdhary (2020)) y un gran número de productos clínicos en el mercado disponibles para tratar diferentes afecciones. (Ratner (2019))

La fabricación de implantes con biomateriales metálicos se estudia desde hace más de medio siglo con la intención de conseguir resultados duraderos y satisfactorios, para lo que se requiere una interacción fuerte y directa entre el hueso y la superficie del implante. (Alghamdi (2018; Branemark et. Al. (1977; Mishra y Chowdhary (2020; Schwartz y Boyan (1994))

Este contacto directo entre el hueso y la superficie del implante define el concepto de *osteointegración* y es el objetivo actual de todo procedimiento de implante óseo que se precie. (Tolstunov (2019))

Al diseñar un modelo *in vitro*, el objetivo es trasladar estos conocimientos al plan del experimento y reproducir la dinámica de lo que ocurre a nivel molecular y celular.

Esto significa que esperamos generar datos medibles de la respuesta celular que ayuden a comprender el proceso de adhesión celular, proliferación y producción de biomarcadores. (Bisio et. Al. (2021; Chen et. Al. (2012))

Este proceso de osteointegración implica una compleja cadena de acontecimientos que van desde la absorción de proteínas y la coagulación de

la sangre en la superficie del implante hasta la infiltración en el lugar y el reconocimiento biológico de la superficie por parte de las células madre mesenquimales (MSC) y los osteoblastos. Por último, estas células dirigen la formación de hueso nuevo en la interfaz, creando así un vínculo íntimo entre el hueso y el implante. (Davies (2007; Puleo y Nanci (1999))

Para que la osteointegración tenga éxito, las células osteogénicas diferenciadoras eligen entre un proceso de proliferación continuado durante varios ciclos más o, por otro lado, algunas pasan a formar parte de un proceso de regulación a la baja en el que detienen la proliferación activa e inician diferentes procesos de señalización y deposición de proteínas en el lugar del implante para comenzar el proceso de diferenciación osteoblástica y mineralización.(Davies (1998; Davies y Baldan (1997; Saruwatari et. Al. (2005))(Gittens RA; Doctoral Thesis. Georgia, USA: Georgia Institute of Technology; 2012.) Esto se conoce como osteogénesis de contacto y el implante debe ser capaz de permitir el proceso. El ciclo de remodelación ósea incluye una compleja serie de procesos de señalización y es un proceso continuo de resorción del tejido óseo viejo por parte de los osteoclastos con el fin de preparar la superficie para el hueso nuevo. (Davies (2007)) (Mulari et. Al. (2004; Teitelbaum y Ross (2003)) Este proceso genera brechas o lagunas estructuralmente complejas cuyo diámetro oscila entre 30 y 100 μm . Esta nueva superficie da lugar a una también nueva que tiene las características y la información bioquímica para que los osteoblastos trabajen en la construcción de hueso nuevo (57, 58). Esta matriz ósea depositada acaba mineralizándose y rellenando los espacios donde se reabsorbió el hueso.

El concepto de imitar la estructura jerárquica del hueso en las superficies de los implantes mediante la inclusión de nanoestructuras en los dispositivos disponibles en el mercado tiene su origen en esta observación. (Gittens et. Al. (2011))

Nuestro estudio se centra en el titanio y su aleación Ti6Al4V, uno de los biomateriales más estudiados y utilizados en la industria de los implantes. El desarrollo de una fina capa de óxido en la superficie del titanio forma parte de sus atributos y se cree que es un factor clave en el rendimiento biológico de este metal, ya que se asemeja a los atributos de la hidroxiapatita ósea; sin embargo, las características topográficas de la superficie a escala micro y nanométrica también son un colaborador sinérgico fundamental que requiere una atención especial para lograr una osteointegración. (Sul et. Al. (2005))

2.3. Cultivo celular y efectos biológicos sobre la superficie del biomaterial:

La elección de la línea celular para una experimentación está directamente relacionada con la finalidad y el uso de los resultados esperados.

El diseño de un plan de experimentación *in vitro* gira en torno al hecho de probar la capacidad de la superficie creada para promover la adhesión y diferenciación celular, por lo que, en nuestro caso, los cultivos celulares utilizados deben ser de origen osteogénico. Estas células proporcionan un entorno controlado para estudiar la formación ósea y los resultados de estos ensayos aportan valiosos conocimientos sobre los mecanismos de diferenciación osteoblástica. (Oryan et. Al. (2017; Safarova et. Al. (2020))

Las células que se suelen utilizar son las células madre mesenquimales (MSC), y su inducción de la diferenciación puede verse influida por varias condiciones, que incluyen la alimentación con medios enriquecidos, la adición de factores de crecimiento o proteínas morfogénicas e imitadores bioquímicos o de superficie. (Safarova et. Al. (2020))

Las CMM poseen un notable potencial para diferenciarse en distintos tipos celulares, entre los que se incluyen los osteoblastos, y depende en gran medida de la biosfera en la que residen. (Bruder et. Al. (1994; Olivares-Navarrete et. Al. (2010))

2.4. Determinación de la expresión génica con niveles específicos de proteínas:

La diferenciación celular se evalúa utilizando dos marcadores principales de diferenciación osteoblástica; la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), como marcador de diferenciación temprana; y contenido de osteocalcina en el medio condicionado, como marcador de diferenciación tardía. (Schwartz et. Al. (1999; Siller y Whyte (2018))

La expresión de ALP aumenta durante las primeras etapas de la formación ósea y es abundante en el tejido mineralizado. (Vimalraj (2020)) Se utiliza con frecuencia cuando se escenifica el proceso de mineralización y diferenciación osteogénica.

Cuando las células progenitoras comienzan a diferenciarse en osteoblastos maduros o células formadoras de hueso, la actividad de esta enzima aumenta como un indicador crucial de su compromiso con la línea osteogénica. Ayuda

a descomponer los grupos fosfato, esenciales para la formación de minerales, como la hidroxiapatita. (Hoemann et. Al. (2009))

En nuestras pruebas, La actividad de la fosfatasa alcalina se analiza a partir de la liberación de p-nitrofenol a partir de *p*-nitrofenilfosfato a pH 10,2. A continuación, los valores de actividad se normalizan con respecto al contenido de proteínas.

Los niveles de **osteocalcina (OCN)**, se cuantifican como marcador de diferenciación tardía y mineralización.

La osteoprotegerina (OPG), una citoquina que funciona como receptor señuelo activador del ligando del factor nuclear B κ " (RANKL) para inhibir la osteoclastogénesis,

Osteopontina (OPN) es una proteína que promueve la diferenciación de los osteoblastos hacia tejido óseo y también facilita la resorción de hueso como parte de la remodelación ósea.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), es un potente factor de crecimiento que interviene en la vasculogénesis y la angiogénesis.

3. PROPOSITO DE LA EXPERIMENTACIÓN:

Lograr una modificación a nanoescala de superficies de aleación de titanio (Ti6Al4V) con una rugosidad y estructura consistentes, realizada en un entorno oxidativo hidrotermal mediante síntesis asistida por microondas y adquirida modificando la temperatura, el tiempo y la concentración de disolvente (H₂O₂). El resultado inmediato esperado es una superficie estable y reproducible atractiva para que las células progenitoras promuevan su adhesión,

proliferación y diferenciación osteogénica, evaluada además mediante los respectivos análisis de marcadores metabólicos.

SECCIÓN V

1. MATERIALES Y MÉTODOS:

1.1 BIOMATERIALES:

Placas pretratadas no estériles de aleación de Ti6Al4V-SLA (placas de aleación de titanio con grabado en arena y ácido), 10,5 mm de largo x 5,2 mm de ancho x 1,1 mm de espesor (AB Dental, Tel Aviv, Israel).

Dos (2) placas SLA de aleación de Ti y dos (2) placas SLA nanoestructuradas de aleación de Ti (denominadas en los experimentos NanoWave-SLA), se colocaron en cada pocillo del ensayo, lo que supuso un total de 12 placas por grupo.

Los experimentos se diseñaron con un n=6 por grupo de muestras en al menos 3 ensayos repetidos independientes.

1.2 LÍNEAS CELULARES:

Células hMSCs-RUO, solo para uso en investigación (Ossium Health , Indianapolis, EE.UU.), fueron utilizadas en las placas de aleación de Ti para evaluar proliferación y para los ensayos de diferenciación osteoblástica biomolecular.

1.3 FABRICACIÓN E INGENIERÍA DE SUPERFICIES:

1.3.1. Nanomodificación de la superficie de la placa de aleación Ti6Al4V-SLA:

Basándonos en experiencias y publicaciones anteriores sobre la modificación de la superficie de discos de aleación de Ti, decidimos diseñar ensayos en nuestras placas de aleación de Ti6Al4V pretratadas con SLA (grillado de arena y grabadas con ácido), con el objetivo de reproducir estructuras con las características jerárquicas cualitativas del hueso.

Para estos ensayos se utilizaron placas pretratadas no estériles SLA-Ti6Al4V de 10,5 mm de longitud x 5,2 mm de anchura x 1,1 mm de grosor (AB Dental, Tel Aviv, Israel). Estas muestras de placas rectangulares se esterilizaron con UV y se les aplicó el tratamiento MWHT posterior para conseguir nuestras nanoestructuras de forma trabecular.

Experimentamos con diferentes parámetros comenzando con ligeros cambios en la concentración de disolvente (H_2O_2), combinados con modificaciones de temperatura y tiempo. Estos ensayos se describen en la **Tabla 1**.

El primer ensayo se realizó utilizando únicamente el disolvente: H_2O_2 9,78 M sin dilución (tal como fue adquirido de los proveedores,) y otro con una dilución de 5M, ambos sin tratamiento con MWHT, pero dejados en 25 mL de solución durante un tiempo máximo de dos horas (2), como los que se utilizarán para el grupo de tratamiento con MWHT.

Los siguientes ensayos se practicaron bajo el tratamiento MWHT, utilizando diferentes parámetros de concentración de solvente, tiempo y temperatura. El ensayo con la concentración máxima de H_2O_2 , 9,78 M, no se realizó basándonos en nuestra experiencia con microtransportadores, en el que el ensayo se abortó debido a un aumento excesivo de la presión de microondas relacionado con la alta concentración de solvente.

Dos placas diferentes cada vez se sumergieron dentro de un recipiente de teflón Easy Prep-Plus (CEM, Charlotte, NC, EE. UU.) y luego fue colocado en el microondas de síntesis para un proceso de nanomodificación hidrotermal (NanoWave) por microondas de síntesis Mars 6 (CEM Corporation, Matthews, NC, USA) con diferentes parámetros a bajas temperaturas (125-150°C) en un ambiente oxidativo controlado (H_2O_2 5M) durante 90 min hasta un máximo de 2 horas, de acuerdo con los métodos anteriormente descritos.

Finalmente, luego de obtener los resultados deseados (evaluados por microscopía electrónica de barrido), decidimos conservar los mismos parámetros utilizados de ensayos llevados a cabo en paralelo con los microtransportadores como parte del proceso de estandarización en el tratamiento y preservación de la integridad de las superficies y con los cuales obtuvimos las estructuras deseadas.

Tras el tratamiento hidrotermal asistido por microondas (MWHT), los recipientes que contenían las superficies se llevaron a una cabina de bioseguridad para manipular el contenido en condiciones asépticas. La solución de H_2O_2 5M utilizada para este tratamiento se decantó en un vaso de precipitados de 250 ml (VWR International) y se desechó. Las placas

rectangulares se transfirieron a un nuevo recipiente, con agua estéril Tipe I libre de ADNasa y se dejaron sumergidas hasta que se necesitaron para los ensayos con el objetivo de mantener su carácter hidrofílico.

Cada corrida de nanomodificación se compuso de 4 placas, y una placa NanoWave-SLA se guardó para la obtención de imágenes de la superficie después de cada corrida como parte del proceso de control de calidad y se guardó una placa NanoWave-SLA para obtener imágenes de la superficie por microscopia después de cada ejecución de nanomodificación como parte del proceso de control de calidad.

1.3.2. Caracterización de la superficie de las placas Ti6Al4V-SLA:

La morfología superficial y la química de las placas T16Al4V-SLA nanoestructuradas se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido (Quattro S ,Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), así como espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDX), ,Microscopía confocal y un software de análisis de imágenes (ImageJ, Bethesda, EE.UU.).

1.3.2. (a) SEM (Microscopía electrónica de barrido)

Las placas de aleación Ti6Al4V que se almacenaron en agua estéril tipo y se guardaron para la caracterización de la superficie, se secaron con gas nitrógeno seco en una campana. A continuación, cada tipo de muestra se colocó en un talón dentro de la cámara del microscopio y se cerró y selló en condiciones de alto vacío, analizándose después individualmente en diferentes momentos. Las imágenes se adquirieron con aumentos bajos y altos, desde

5.000x hasta 100.000 x, con una tensión de aceleración de 5Kv-10Kv y una corriente de 2-4kV. La descripción del resultado en las placas también se describe en la **Tabla # 1**.

1.3.2.(b) SEM-EDX (Rayos X de dispersión de electrones):

Las muestras se escanearon utilizando un detector EDX con una tensión de aceleración de 30 kV y un aumento de 5 k. Las tablas de resultados de este último escaneado sugieren que el tratamiento MWHT se produce a través de un proceso de oxidación en la superficie.

Las nanoestructuras obtenidas imitan las características deseadas de las estructuras óseas, con una arquitectura formada por múltiples poros fusionados por finas paredes.

ImageJ Se realizaron y presentaron histogramas del diámetro medio de los poros y del grosor de las paredes.

1.3.2.(c) Análisis XPS:

La composición química de las placas de aleación de Ti tratadas con SLA y NanoWave-SLA se analizó con espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS). Se obtuvo un panel de elementos superficiales predominantes en superficies no limpiadas y en superficies limpiadas con el protocolo de limpieza del laboratorio. Esto se hizo debido a los contaminantes (principalmente hidrocarburos) detectados en las superficies. El protocolo de limpieza establecido en *Park et al., 2014* se realiza con Solución Limpiadora

Concentrada Micro-90 (#M-9033), Acetona (grado ACS), Isopropanol (grado reactivo), Etanol (grado reactivo) y ddiH_2O .

Se utilizaron tres placas de cada superficie tratada y se analizaron 6 puntos de cada una, explorando puntos en el centro y en los bordes. Los valores se promediaron y se representaron gráficamente.

1.3.2.(d) Ángulo de contacto:

Para la medición del ángulo de contacto, las placas de aleación Ti6Al4V (1 placa SLA y 1 placa NanoWave -SLA) que se habían almacenado en agua estéril de tipo I se secaron con gas nitrógeno. A continuación, se colocaron individualmente en el goniómetro de ángulo de contacto (ramé-hart Instrument co., NJ,) y el sistema transfirió mecánicamente una gota de $3\mu\text{L}$ de agua Tipe 1 a un lugar seleccionado de la placa. Se tomaron adquisiciones en serie cada 5 segundos, comenzando a los 0 segundos y terminando a los 15 segundos para un total de 4 imágenes. Se tomaron 4 imágenes de una gotita con el software de imagen (DROPimage Advanced). Esto se repitió en 5 lugares diferentes de cada placa (en 4 cuadrantes y 1 en el centro) para un total por placa de 20. Los valores se promediaron y se representaron gráficamente. (Figura # 4, 5)

1.3.2.(e) Microscopía confocal Láser:

Las muestras se colocaron en el escáner del microscopio confocal y las mediciones de la rugosidad superficial media (R_{sa}) y de la altura del pico al

valle (RSz) se obtuvieron analizando doce puntos en dos discos diferentes de cada grupo (discos SLA y NanoWave-SLA)

Se realizaron mediciones de la rugosidad media (Rsa) y de los valores de pico a valle (RSz) en la superficie de las placas de aleación Ti6Al4V que se limpiaron con el protocolo de laboratorio de tres alcoholes y también a las placas no limpiadas.

Los grupos NanoWave-SLA representan los tratados mediante nanomodificación superficial hidrotérmica en un entorno oxidativo. (Figura # 6)

1.4. CULTIVOS CELULARES:

El propósito de desarrollar esta fase experimental es realizar una evaluación completa de la diferenciación de hMSCs-RUO adquiridas comercialmente (Ossium Health , Indianápolis, EE.UU.) se cultivaron en superficies de placas SLA de aleación de titanio Ti6Al4V, Nanoestructuradas (NanoWave)-SLA y en placas TCPS (Poliestireno grado cultivo de tejidos) como grupo de control.

Las células hMSC se sembraron a una densidad de 10.000 células/área (5.000 células/cm²) de en placas tratadas de 24 pocillos (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) en condiciones de incubación regulares de 5% CO₂, 37°C y medio completo (Gibco™ MEM α, sin nucleósidos (número de catálogo: 12561056) 10% FBS inactivado por calor 2mM, L-Glutamina 50 u/mL Penicilina-Estceptomicina. Los cálculos de expansión y dilución se realizaron de acuerdo con los proveedores de productos biológicos.

Para los experimentos, las placas de muestras se utilizaron previamente en cultivos celulares. Se lavaron y limpiaron como se indica a continuación antes de utilizarlas para estos cultivos celulares:

Las placas de aleación de titanio Ti6Al4V , se colocaron de forma independiente en un vaso de precipitados de 150 ml y se lavaron con 20 ml de detergente Micro-90 al 2%, 2 veces durante 15 minutos cada una en un baño sonificador CPX5800 (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA),

A continuación, se sonicó dos veces en agua ultrapura (Direct-Q 3, Merck, Burlington, MA, EE.UU.) durante 15 minutos cada vez.

Las superficies se enjuagan brevemente de forma secuencial en acetona e isopropanol de grado reactivo y, por último, en etanol, durante 5 minutos en cada solución.

Las placas tratadas con SLA (dos por pocillo) y los grupos de SLA+ Nanowave (dos por pocillo) se colocaron por grupos en una placa de cultivo de 24 pocillos. Para el grupo TCPS se utiliza una placa de 24 pocillos tratada con cultivo tisular para el grupo de control de cultivo celular comprobado para confluencia y recuento celular. Cada grupo, (G1-G3) tiene $n = 6$

Los medios se cambian a las 24 h de la siembra y después cada 48 h. A las 7 d (80-90 %) de confluencia comprobada en G1, se cambian los medios. Después de otras 24 horas, se cosecharon las células de . Las células G1 se separaron por tripsinización, y el recuento celular se realizó con un contador celular automático (contador celular EVE NanoEntek, IL, EE.UU.).

Los medios acondicionados se recogieron de G2 y G3, se guardaron en tubos de microcentrífuga y se almacenaron a -80 grados hasta que se necesitaron para los ensayos biomoleculares.

Después de recoger el medio condicionado, cada pocillo se lava con 500 ml de PBS 1X. El PBS se retira cuidadosamente y se sustituye por 500 m L de Triton X 0,05% (Thermo Scientific, Mx city, MX). A continuación, las muestras se someten a un procedimiento de congelación y descongelación como se indica a continuación para evitar rayar o dañar la superficie:

- La placa se coloca en un recipiente con hielo seco + etanol durante 30 segundos y luego se transfiere a baños de agua a 37⁰ para descongelarla rápidamente. Este proceso se repite tres veces.
- Una vez finalizado el tercer proceso de congelación-descongelación, las muestras con la solución Triton X se transfieren inmediatamente a un tubo de centrífuga individual de 1,5 ml.

Cuando se necesitó un punto de parada, las células lisadas se sumergieron en tubos de microcentrífuga, con 500 µL de solución Triton X 0,05% y se almacenaron a -80 grados en el congelador hasta que se necesitaron para ensayos individuales de Proteína, ALP y ADN.

Los ensayos ELISA de OCN, OPG, OPN, VEGF de los medios condicionados recogidos se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante y según el plan de trabajo.

1.5. ENSAYOS BIOMOLECULARES: ADN, Macro-Micro/BCA, ALP, OCN, OPN, OPG, VEGF .

Se medirán utilizando un ensayo rápido para la actividad de la fosfatasa alcalina, Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA assay, Invitrogen; Pierce BCA Protein Assay Kit y Enzyme-linked immunosorbent assay kits (ELISA DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN).

1.5.1. Cuantificación del ADN (Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA assay, Invitrogen, CA, USA).

Las muestras congeladas con células +placas de aleación de Ti y sumergidas en solución Tryton X al 0,05 % se descongelaron lentamente en hielo. De acuerdo con el protocolo del fabricante, se diluye una cantidad específica de esta solución hasta un factor de dilución deseado con tampón TE y se procesa contra patrones en una placa de fluorescencia negra de 96 pocillos (07-200-567, Thermo Fisher Scientific) .

Una vez añadida una solución de trabajo con un reactivo colorante y protegida de la luz, la placa se colocó en un lector de placas, a temperatura ambiente y se leyó utilizando fluorescencia a 504 nm de excitación, 531 nm de emisión. La cuantificación obtenida es en ug/pocillo

-Cuantificación de proteínas: Macro-BCA, Micro-BCA (Kit de ensayo de proteínas Pierce BCA)

El Macro-BCA se realizó en las muestras de placas de aleación de Ti y, posteriormente, la cuantificación Micro-BCA se realizó en las superficies de Microcarrier.

Las muestras congeladas con células +placas de aleación de Ti y sumergidas en solución Tryton X al 0,05 % se descongelaron lentamente en hielo tal como se hizo para el ADN. Según el protocolo del fabricante, se coloca una cantidad alícuota dedicada de la solución de la muestra en una placa de 96 pocillos que también tendrá estándares preparados que contienen diluciones del diluyente de la muestra y del estándar de albúmina. Se añade a las muestras, estándares y blancos una solución de trabajo que contiene reactivos de proteína BCA . Tras un periodo de incubación a 37°C , la placa se coloca en un lector de microplacas a 570 nm.

1.5.2. ALP: Fosfatasa alcalina:

Se utilizó un ensayo rápido para la actividad de la fosfatasa alcalina que incluía:

Dos Amino-2-metil-1-propanol (AMP) Sigma A65182;MW-89.14; *p*-Nitrofenil Fosfato (pNPP) Sigma P4744;MW 371.14 ; MgCl₂ Sigma M9272; MW 203,31; NaOH; Diluyente de la muestra; *P*-Nitrofenil Estándar (pNP) Sigma N7660

Las muestras y los estándares se preparan según el protocolo del fabricante y se realizan diluciones seriadas en una placa de 96 pocillos.

Los estándares se leen primero como referencia visual de color en un lector de microplacas a 405 nm. Las muestras, los estándares y los blancos, una vez añadida una solución tampón, se incuba la placa y se comprueba el cambio de color, que puede tardar hasta 3h y depende en gran medida del tipo de célula. El lector de microplacas se ajusta a 405 nm.

Los valores de los uM/mL de ALP están normalizados a µg/µL de Proteína.

1.5.3. Lectura de los biomarcadores Osteocalcina (OCN), Osteoprotegerina (OPG), Osteopontina (OPN), Factor de crecimiento Vascular Endotelial (VEGF)

Los ensayos se realizaron utilizando protocolos estandarizados del kit ELISA (Duo Set de R&D System) específicos para cada uno de estos marcadores. Los valores obtenidos fueron normalizados a DNA. Los valores obtenidos se normalizaron con respecto a los del ADN.

1.6 ESTADÍSTICAS

ANOVA unidireccional

t-Student

t-Student modificado

Se analizaron los valores de Errores Standard de la media

SECCIÓN VI

MANUFACTURA Y NANOMODIFICACIÓN SOBRE OTRAS SUPERFICIES DE Ti6Al4V

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 BIOMATERIALES:

Se utilizaron microtransportadores de aleación Ti6Al4V (Goodfellow® GF12641701-1EA, Merck) con diámetro de 150-200 μm (promedio 175 μm) y una densidad de 4,43 g/cm³, como biomaterial experimental para servir como sustrato para la adherencia y proliferación celular. El número de microtransportadores por pocillo de plato de cultivo se calculó para garantizar una cobertura uniforme de la superficie monocapa en función del área del pocillo: 23,05 mg/pocillo para platos de 24 pocillos (2 cm²/pocillo) y 16,53 mg/pocillo para platos de 96 pocillos (0,32 cm²/pocillo). Todos los valores se redondearon.

También se utilizaron microtransportadores de adherencia mejorada de poliestireno (Ps) de Corning® (CLS3779-10G, Merck) con un tamaño de 125-212 μm (promedio 168,5 μm => radio = 84,25 μm) y una densidad de 1,026 $\pm$ 0,004 g/cm³, que sirvieron como controles negativos. Se usaron cantidades equivalentes de cobertura de superficie para tener una cobertura monocapa

uniforme: 23,05 mg/pocillo (24 pocillos) y 3,69 mg/pocillo (96 pocillos). Los experimentos se diseñaron para utilizar un $n = 6$ por grupo de muestras en al menos 3 ensayos repetidos independientes.

1.2 LÍNEAS CELULARES:

Líneas celulares VERO (ATCC CCL-81), células MG63 (ATCC, Rockville, MD, EE. UU.) y Células Madre derivadas de la pluripotencial inducida - iPSC (ATCC-BYS0112 /ACS-1026)

Estas líneas celulares se utilizaron principalmente para evaluar cualitativamente el patrón de crecimiento morfológico y la adhesión en las superficies de los microtransportadores. Sus características y método de cultivo se detallan a continuación.

1.3 NANOMODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE MICROTRANSPORTADORES Ti6Al4V

Los ensayos de fabricación del biomaterial se realizaron procesando polvo de aleación Ti6Al4V con partículas de 150-200 μm de diámetro (TI016015/1, Goodfellow Cambridge Ltd., Huntingdon, Inglaterra).

Se colocó una cantidad basal de polvo de aleación Ti6Al4V nativa (3 g) en una botella de vidrio de 1 oz y se limpió previamente en un baño sonicador CPX5800 (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, EE.UU.) durante 30 min con 15 mL de detergente Alconox al 10% (Alconox, Inc., Nueva York, NY).

EE.UU.). A continuación, se sonicó dos veces en agua ultrapura (Direct-Q 3, Merck, Burlington, MA, EE.UU.) durante 15 minutos y una tercera vez durante 5 minutos.

Este proceso de limpieza se hizo en la medida en que se requería una mayor cantidad de biomaterial para los planes del experimento. Los microtransportadores de aleación μTi limpios se secaron en un desecador de vacío (Bel-Art SP Scienceware, NJ, EE.UU.) y se esterilizaron con UV. Un lote se utilizó como " μTi Nativos " microtransportadores sin tratamiento, y otro se separó por grupos de tratamiento. Los parámetros de los ensayos se muestran en **la Tabla nº 2**.

Los ensayos se realizaron inicialmente utilizando una cuarta parte ($\frac{1}{4}$) de la cantidad total calculada para un área de placa de 24 pocillos para optimizar la gestión de los materiales.

El ensayo 1 se realizó con veinticinco miligramos de los microportadores que se colocaron en un recipiente de teflón (EasyPrepPlus PN, Teflon TFM 1700, CEM Corporation, Matthews, NC, EE.UU.), dentro de un termopozo (EasyPrep Plus, Sapphire, CEM Corporation, Matthews, NC, EE.UU.) y se dejaron sumergidos en H_2O_2 2,5M durante el tiempo máximo de 2h, sólo con disolvente. Este tiempo es el máximo que se utilizaría para hacer los grupos de tratamiento hidrotérmico. Después de esto, los microtransportadores se transfirieron a un tubo de microcentrífuga de 1,5 cc, se secaron en un desecador y se almacenaron para la obtención de imágenes SEM con los otros grupos de Native μTi y NanoWave μTi .

La nanomodificación MWHT se realizó con 25mg del grupo microtransportador de aleación μTi designado para el tratamiento. Los

ensayos se realizaron utilizando un tratamiento patentado de nanomodificación hidrotermal por microondas pero empleando diferentes parámetros a bajas temperaturas (100-200°C) en un entorno oxidativo controlado (es decir, 2,5M, 5M de H₂O₂) con un microondas (CEM Corporation, Matthews, NC, EE.UU.) de síntesis *Mars 6* durante 1 hora a un máximo de 2 horas. En este estudio, evaluamos las siguientes condiciones: 200°C durante 2 h, 150°C durante 2 h, y así sucesivamente hasta 100°C durante 1 h. Denominamos a nuestro proceso NanoWave (NW); el resultado es microtransportadores μ Ti nanomodificados o μ TiNanoWave. Tras el tratamiento MWHT, es evidente que se ha producido un cambio químico en la superficie del microtransportador.

1.3.1. Caracterización de la superficie de los microtransportadores:

La morfología de la superficie y la química de los microtransportadores Native μ Ti y NanoWave μ Ti se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido (Quattro S, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), así como espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDX), un software de análisis de imágenes (ImageJ, Bethesda, EE.UU.), ángulo de contacto y microscopía confocal.

1.3.1.(a) SEM (microscopía electrónica de barrido):

Los microtransportadores sumergidos en los tubos de microcentrífuga con agua de tipo I se secaron en el desecador de vacío (Bel-Art SP Scienceware, NJ, EE.UU.) durante al menos 120 min.

Para esta modalidad de obtención de imágenes, se colocaron cuatro (6) mg de microtransportadores de aleación de μ Ti Nativos y otros 6 mg de microtransportadores de aleación de μ Ti NanoWave de sus lotes en una pequeña lámina adhesiva de carbono sobre un talón de forma independiente. Este número de partículas que se ha seleccionado para la caracterización representa aproximadamente 1/4 de la cantidad de todo su tubo de muestra. La cantidad se ha seleccionado para garantizar una distribución uniforme en el campo de visión.

Las imágenes se adquirieron con alto vacío en la cámara, una distancia de trabajo de 10 mm, un voltaje de aceleración de 5kV-10kV y adquisiciones de imágenes con aumentos bajos y altos (de 5.000x a 50.000).

La evaluación por imagen SEM del cultivo celular sobre el biomaterial se realizó tras la preparación de la muestra como se describe más adelante en la metodología.

1.3.1.(b) SEM-EDX (Rayos X de dispersión de electrones):

Los microtransportadores de μ Ti nativos y de μ Ti NanoWave se analizaron por SEM con un detector EDX en tres puntos diferentes de las muestras con un voltaje de aceleración de 30kV, una distancia de trabajo de 10mm y un aumento de la muestra de 5K. Los resultados del informe generado mostraron el porcentaje atómico de los elementos detectados en la superficie de la muestra. Los resultados sugieren que el tratamiento MWHT se produce a

través de un proceso de oxidación en su superficie. Se promediaron los valores y se graficó la media.

1.3.1.(c) Análisis XPS:

La química y el porcentaje atómico de los elementos en la superficie de los microtransportadores Native μT y NanoWave mTi se obtuvieron tras realizar un mapeo con XPS (espectroscopia de fotoelectrones de rayos X). Para adquirir el espectro, los microtransportadores se comprimieron en una lámina de indio sobre un talón para mayor estabilidad y, a continuación, se colocaron en la cámara a una presión de 5×10^{-4} 100 μm , una energía de 280eV y un ángulo de despegue de 45° . Se exploraron seis puntos o partículas y se representó gráficamente el error estándar de la media.

1.3.1.(d) Mediciones del ángulo de contacto:

Para la humectabilidad de la superficie del biomaterial, medimos el ángulo de contacto utilizando dos métodos; Método estático y Método dinámico.

Para el **método estático** se utiliza la cantidad de 17 mg tanto de microtransportadores de μTi Nativos como de μTi nanoestructurados (NanoWave), calculados para el área de un plato de 96 pocillos.

Los microtransportadores se colocaron por separado sobre una superficie adhesiva plana en una plataforma de goniómetro y después se humedecieron con 3 μL de agua destilada para la medición del ángulo de contacto. Se

tomaron adquisiciones seriadas en el punto inicial y luego cada 5 segundos, finalizando a los 15 segundos para un total de 4 imágenes por gota. Se analizaron un total de 3 gotas diferentes en cada grupo de microtransportadores con un software de imágenes emparejado con el goniómetro y luego se promediaron y graficaron los valores.

Para el método dinámico, el ángulo de contacto se midió mediante ESEM (término en inglés para microscopía electrónica de barrido, ambiental), en el cual, utilizando una micropipeta de transferencia, los microtransportadores se colocaron sobre un adhesivo de cobre como conductor térmico y, a continuación, se fijaron en una platina fría a 1 °C. Se variaron la humedad y la presión de la cámara, generando la condensación de las microgotas de agua en las superficies de aleación de Ti. La presión varió gradualmente de 200 Pa a 625 Pa para obtener una humedad relativa del 100% donde se producen las nano gotas. Se localizó una zona en la que la superficie con respecto al haz de electrones formará un ángulo de aproximadamente 70°, que se encuentra en el límite de curvatura de las micropartículas. Para la medición se utilizaron $n = 10$ gotitas.

A continuación, utilizamos un plugin de un software de procesamiento de imágenes que rodea la gota y mide los ángulos interno e inverso promediándolos y dando un valor aproximado del ángulo de contacto.

1.3.1(e) Microscopía Confocal Láser

Para la rugosidad superficial evaluamos las muestras con Microscopía Láser Confocal (Láser ZEISS).

Los valores medios de rugosidad y altura de pico a valle se obtuvieron analizando doce muestras de cada grupo (Native μTi y NanoWave μTi), con láser en 405nm, pinhole 0,29 unidades, gain master 436, offset digital 32 y adquisición de imagen comenzando a 10 aumentos con set final en un objetivo de 20x e intervalos de 1 μm por corte.

1.4 CULTIVO CELULAR SOBRE MICROTRANSPORTADORES:

Para la fase de cultivo celular, el propósito del experimento se centró en establecer un modelo in vitro de cultivo celular en microtransportadores de aleación de titanio nanoestructurados y realizar una evaluación cualitativa por imagen de la morfología celular creciendo en microtransportadores de aleación de titanio nativos y nanoestructurados (Ti6Al4V) utilizando microtransportadores μPs como control.

Tras el tratamiento MWHT en el μTi , los recipientes de microondas se llevaron a una cabina de bioseguridad para manipular el contenido en condiciones asépticas. El solvente se decantó en un vaso de precipitados de 250 ml (VWR International). Las muestras de microtransportadores μTi NanoWave se transfirieron a un nuevo recipiente utilizando una pipeta de transferencia. Las muestras se lavaron una vez con agua estéril libre de ADNasa tipo I, después se sumergieron en más agua estéril de tipo I y se mantuvieron en los tubos de microcentrifuga estériles y sellados hasta que se necesitaron para los cultivos celulares.

Como parte de un proceso de control de calidad, después de cada ejecución de nanomodificación se guardó una pequeña cantidad de microportadores NanoWave (NanoWave- μ Ti) para la obtención de imágenes SEM con el fin de garantizar que las estructuras superficiales se habían reproducido correctamente.

1.4.1. Ensayos con células VERO:

Como aproximación inicial de la respuesta celular, las primeras pruebas piloto se realizaron con microtransportadores y células epiteliales VERO con el fin de evaluar la proliferación y la morfología. Las células epiteliales trabajan junto con los fibroblastos y los macrófagos durante el proceso de regeneración tisular proliferando, migrando y cubriendo la superficie de un implante, ayudando a restaurar la estructura normal de un tejido.

Estas fueron las primeras células disponibles para la experimentación y se sabe que tienen un buen crecimiento en densidad, por lo que representaron un buen candidato inicial para nuestra experimentación.

Tras el proceso de descongelación y expansión, las células VERO se sembraron en una placa de 24 pocillos sin tratar, a un paso siete (P7), y a una densidad de 10.000 células/cm² (o 20.000 células por pocillo) en condiciones de incubación regulares de 5% CO₂ y 37°C utilizando medios completos (DMEM, 10% FBS, 1% P/S, 1% L-Glut) sobre 5mg de Native μ Ti y 5mg de NanoWave μ Ti. Los grupos estaban formados por microtransportadores Native μ Ti y NanoWave μ Ti. Cada grupo tenía n = 3.

Transcurridas 24 horas, se cambió el medio y, a continuación, cada dos días durante un máximo de 7 días. Se evaluó la adhesión y proliferación celular y se realizó un seguimiento mediante microscopía óptica indirecta, tratándose a continuación con una solución fijadora para la obtención de imágenes SEM.

El medio de cultivo es removido y la muestra de células con biomaterial se enjuaga dos veces con PBS 1X caliente (37 °C), se fijan con 500 ml de solución fijadora Karnovsky (ElectronMicroscopySciences-EMS, Cat. n° 15720. Hatfield, PA, EE.UU.), que consta de 2% Paraformaldehído, 2,5 % Glutaraldehído, solución ampón fosfato sódico -0,1M, agua destilada dejándolo sumergida toda la noche a temperatura ambiente, se enjuagan dos veces con agua libre de ADNasa de tipo 1 y se almacenan en más agua libre de ADNasa de tipo 1 a 4 °C hasta que se realicen el microscopio electrónico de barrido (SEM) y otros análisis morfológicos.

1.4.2. Cultivos de células MG-63:

Basándonos en la buena fijación, el crecimiento denso y la adaptación relativamente fácil que la línea celular VERO mostró sobre microtransportadores, decidimos estandarizar la cantidad de microtransportadores utilizados e introducir un segundo grupo de control (μ Ps).

Los cálculos que se hicieron inicialmente se basaban en el área de una esfera individual, el tamaño de las partículas y el área de un pocillo individual en una placa de 24 pocillos, sin embargo los microtransportadores mostraron la formación de gruesos cúmulos que no permitían una evaluación adecuada

de las mono capas de las células sobre ellos, por lo que para los nuevos ensayos se utilizó en su lugar la cantidad de partículas calculada para el área de una placa de 96 pocillos en las placas de 24 pocillos. Esto incluía también la cantidad calculada para los μ Ps.

Los grupos se constituyeron en G1 TCPS para control de la confluencia celular, G2 de μ P (4 mg) como control negativo; G3 μ Ti Nativo (17 mg) y G4 μ Ti NanoWave (17 mg).

Las células MG63 (ATCC, Rockville, MD, EE. UU.) son una línea celular humana de tipo fibroblasto, aisladas del hueso de un paciente varón blanco de 14 años con osteosarcoma y un modelo de estudio de células óseas humanas. Se sembraron a una densidad de 10.000 células/cm² en una placa de 24 pocillos (20.000 células. Cálculos en el Anexo) en condiciones regulares de 5% de CO₂ y medio completo (EMEM, 10% FBS, 100 μ g/mL gentamicina). Para comprobar la confluencia celular, se utiliza una placa estándar de 24 pocillos (TCPS). Para los grupos de microtransportadores Ti6Al4V (n=3), se utilizaron placas de 24 pocillos no tratadas para evitar la adhesión celular inespecífica. Después de 24 h, se cambió el medio de cultivo tras colocar una malla de inserción en el pocillo para evitar la pérdida de microtransportadores durante la alimentación. El proceso se repitió cada 48 h. Al 80-90 % de confluencia, se sustituyó el medio y, tras otras 24 h, se retiró el medio y se cosecharon las células.

Las células + biomateriales se enjuagan dos veces con PBS 1X caliente (37 °C), se fijan con 500 ml de solución de Karnofsky durante 24 h a temperatura

ambiente, después se enjuagan dos veces con agua libre de ADNasa de tipo 1 y se almacenan en más agua libre de ADNasa de tipo 1 a 4 °C hasta que se realice el microscopio electrónico de barrido (SEM) y otros análisis morfológicos. El diseño del ensayo se compone de dos puntos temporales; 24 h y a confluencia.

1.4.3. Células madre mesenquimales derivadas de células madre Pluripotentes inducidas (MSC derivadas de iPSC):

Las células iPSC; BYSO112, ACS 7010 (ATCC, Rockville, MD, EE.UU.) son derivadas humanas masculinas para uso experimental únicamente para diferenciación de linaje de células óseas, para medicina regenerativa, investigación de exosomas, terapia celular, cribado de fármacos e inmunología del cáncer. Se realizaron expansiones y subcultivos y el pase de siembra utilizado fue P5.

Los microtransportadores estériles Native μ Ti, y NanoWave μ Ti (NW μ Ti) se transfieren de sus tubos de microcentrífuga de pesaje a los pocillos de cultivo de una placa de 24 pocillos sin tratar (Corning- Falcon, cat. 351147, NJ, EE.UU.), utilizando 100 μ L de medio completo. Las células se siembran en 400 μ L, a una densidad de 5.000 células por pocillo (10.000 células/área) para evaluar su adhesión y proliferación celular en la superficie del microtransportador de aleación de Ti, hasta alcanzar los 500 μ L finales de medio de cultivo por pocillo.

El cultivo se trata en condiciones de incubación regulares de 5% CO₂ , 37°C y medio completo (Medio Basal MSC, FBS 7%, rhIGF-1 15 ng/mL; rh FGF-b

125pg/mL; L-Alanil-L Glutamina 2.4mM y Pen/Strep) . El kit de crecimiento celular utilizado con el medio basal fue MSC Growth Kit for Bone Marrow Derived MSCs (ATCC-PCS-500-041, Manassas, VA, 20110-2209, USA)

Las células calculadas se sembraron sobre los Microcarriers con un n=3 y el diseño del ensayo es de dos puntos (24 h y confluencia +/- 4d).

En cada grupo correspondiente se retiró todo el medio y las muestras se enjuagaron dos veces con 1X PBS y se fijaron con 500 uL de solución de fijación de Karnovsky durante toda la noche. Tras este periodo de fijación, las muestras se enjuagaron dos veces con agua libre de ADNasa de tipo 1 y se almacenaron en más agua libre de ADNasa de tipo 1 a 4 °C hasta que se realizara el análisis con microscopio electrónico de barrido (SEM).

SECCIÓN VII

1.RESULTADOS GENERALES

1.1 RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE LAS PLACAS DE Ti6Al4V:

Los ensayos se llevaron a cabo en discos de aleación de Ti6Al4V-SLA (material de aleación de Titanio grabado con ácido y pulido con chorro de arena, según siglas en inglés SLA) sometidos a un tratamiento de nanomodificación hidrotermal por microondas con diferentes parámetros a bajas temperaturas en un ambiente oxidativo controlado, asistidos por las microondas de síntesis Mars 6 según la metodología descrita y en los que obtuvimos con éxito y de forma consistente el aspecto de estructuras que emulan estructuras trabeculares similares al hueso. **(Tabla 1)**

El primer ensayo se realizó con el uso del disolvente solo, H₂O₂ 9,78 M (tal como se compra a los proveedores, sin diluciones) y una dilución 5M, ambos sin tratamiento MWHT. No se produjeron cambios en la estructura de la superficie, pero apareció una capa de óxido gruesa y fina respectivamente.

Los siguientes ensayos se practicaron bajo el tratamiento MWHT, utilizando diferentes parámetros de concentración de disolvente, tiempo y temperatura. El ensayo con la concentración máxima de H₂O₂ 9,78 M no se realizó con base en nuestra experiencia previa con microtransportadores en los que el

ensayo fue abortado debido al aumento excesivo de la presión de microondas, relacionado con la alta concentración de disolvente.

Los otros ensayos se realizaron bajo una concentración constante de disolvente de H_2O_2 5M, con tiempo y temperaturas variables, con un resultado desde estructuras mal definidas hasta las nanoestructuras deseadas con aspecto de hueso (**Fig. 1, Fig. 2**), como las obtenidas con parámetros utilizados y estandarizados en nuestros experimentos en paralelo con microtransportadores de aleación Ti6Al4V.

Denominamos "NanoWave" (NW) a nuestro proceso de síntesis y el resultado es la modificación de la superficie de las placas de aleación de Ti con NanoWave-SLA. Los parámetros utilizados para la nanomodificación de la superficie de las placas fueron los mismos que se probaron y estandarizaron paralelamente en nuestros microtransportadores de aleación de μTi .

Tabla I. ENSAYOS DE NANOMODIFICACION DE LA SUPERFICIE DE PLACAS DE ALEACION DE TITANIO Ti6Al4V UTILIZANDO PARAMETROS VARIABLES

Tratamiento a Placas de aleación Ti6Al4V-SLA	Solvente	Temperatura (T °C)	Tiempo (t) min	Estructura de la superficie
Sin tratamiento de MWHT	Sin solvente	T/A	--	Superficie rugosa del pretratamiento SLA tal como se recibe
Sin tratamiento de MWHT	H ₂ O ₂ 9,78 M (solución original, sin diluir)	T/A	--	Cambios no significativos en las estructuras superficiales, pero se observó una gruesa capa de óxido.
Tratamiento sin MWHT	H ₂ O ₂ 5 M	T/A	--	Presencia de una fina capa de óxido sin cambios en la estructura de la superficie
Tratamiento de MWHT	H ₂ O ₂ 9,78 M (solución original, sin diluir)	125 °C	120 min	El ensayo se interrumpió debido a un aumento excesivo de la presión de microondas, relacionado con la elevada concentración de sustrato.
tratamiento de MWHT	H ₂ O ₂ 5 M	125°C	120 min	Modificación de superficies con nanoestructuras mal definidas
Tratamiento de MWHT	H ₂ O ₂ 5 M	150 °C	120 min	Las estructuras superficiales eran poros irregulares con paredes gruesas
Tratamiento de MWHT	H ₂ O ₂ 5 M	150 °C	90 min	- Nanoestructuras con aspecto de hueso. No hubo cambios importantes a pesar del ligero aumento de la temperatura (125 °C)
Tratamiento de MWHT	H ₂ O ₂ 5 M	125°C	90 min	- Nanoestructuras con aspecto trabecular de hueso

* T/A: Temperatura ambiente

Figura 1.

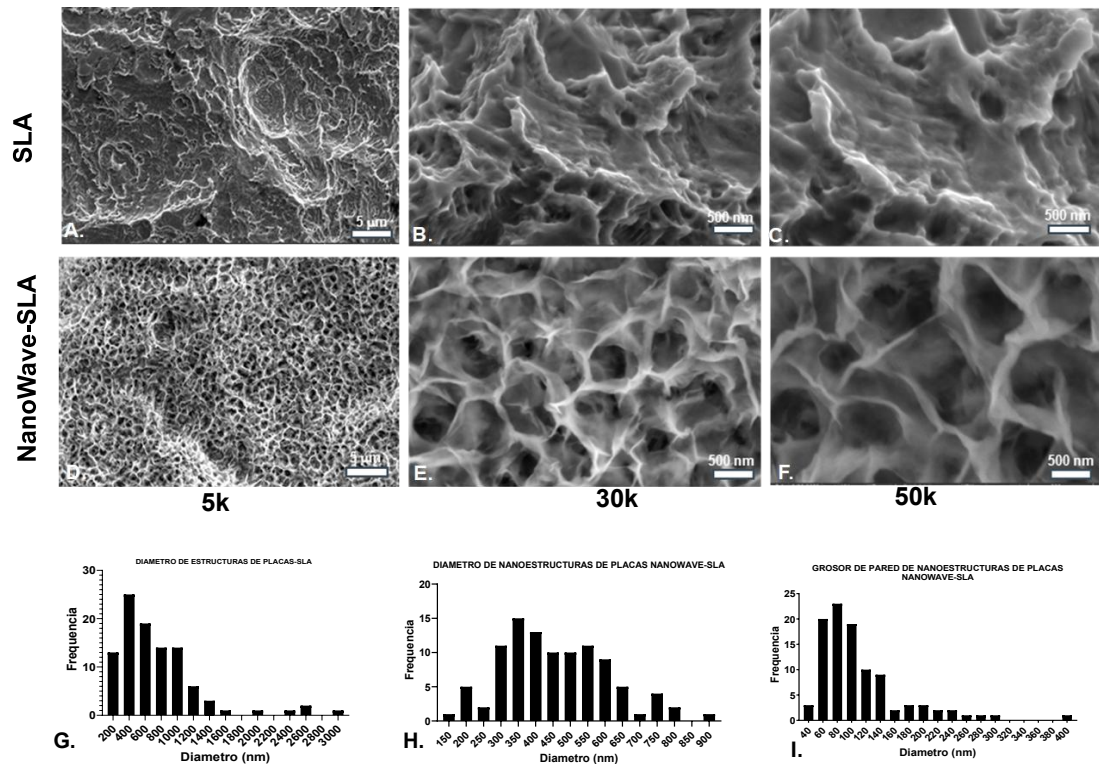
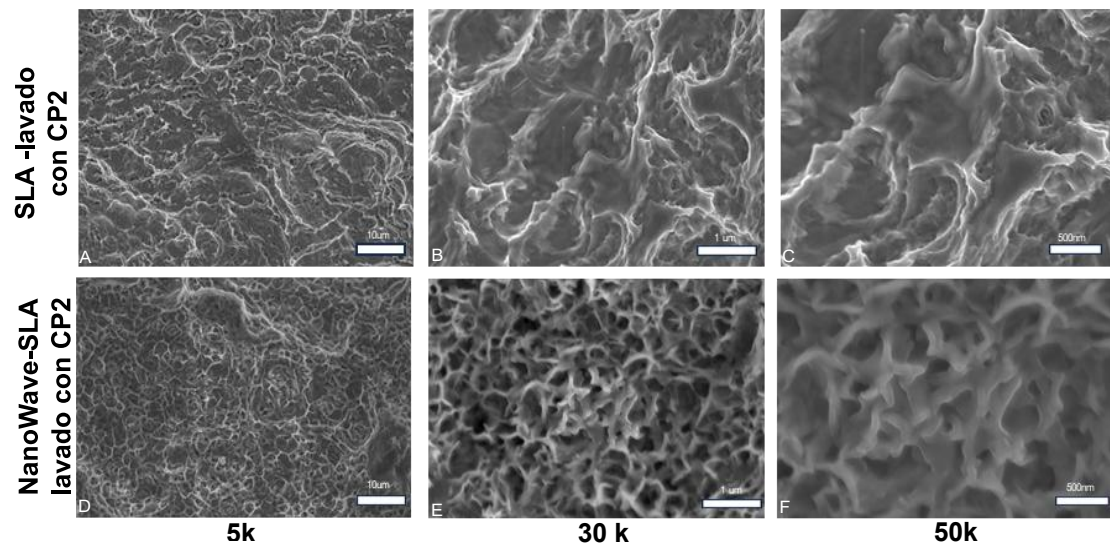


Figura 2.



Para limpiar la superficie de contaminantes transportados por el aire, principalmente C, las placas SLA y NanoWave-SLA se sometieron al protocolo de limpieza de laboratorio que se modificó a partir del protocolo establecido en *Park et al., 2014* que utiliza Micro-90 solución de limpieza concentrada (#M-9033), Acetona (grado ACS), Isopropanol (grado reactivo), Etanol (grado reactivo) y ddiH₂O. A continuación, se dejaron sumergidas en agua libre de ADNasa Tipe I antes de utilizarlas para los ensayos de cultivo celular.

Tras esta limpieza, pudimos observar un cambio en las nanoestructuras, volviéndose ligeramente más pequeñas y con paredes más gruesas. **(Fig. 2)** A partir de aquí, toda la caracterización de la superficie y la experimentación con células se realizaron sobre las superficies limpiadas.

Tabla II. QUÍMICA DE LA SUPERFICIE POR SEM-EDX EN MUESTRAS DE PLACAS SLA vs NanoWave-SLA

MUESTRA	% ATOMICO DEL ELEMENTO			
	O	Ti	Al	V
SLA	0.0	94.5	1.8	3.0
NanoWave-SLA	52.2	41.3	4.9	1.6

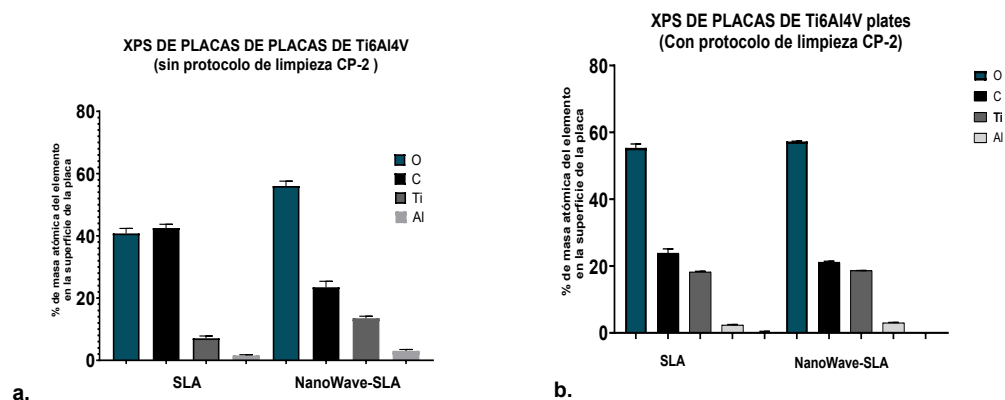


Fig. 3 Química de la superficie por XPS. La composición química superficial por espectroscopia de fotoelectrones de rayos X de las placas de aleación de Ti tratadas con SLA y NanoWave-SLA muestra el panel de elementos predominantes. (a) Representa las placas limpiadas sin CP-2 y (b) las placas limpiadas con protocolo CP-2. Se graficó el error estándar de la media.

Los resultados EDX mostrados sugieren que el tratamiento MWHT se produce a través de un proceso de oxidación de las superficies, al comparar el porcentaje atómico de las placas (A) SLA frente a las tratadas con SLA-NanoWave. Las superficies NanoWave-SLA mostraron un aumento evidente del porcentaje de O. **(Tabla II)**

La composición química superficial por espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS) de las placas de aleación de Ti tratadas con SLA y NanoWave-SLA muestra el panel de elementos predominantes. **(Fig. 3)**

La exploración se realizó en placas limpiadas con el protocolo CP-2 y en placas no limpiadas. Se utilizaron tres placas de cada superficie tratada y se analizaron 5 localizaciones en cada una, explorando manchas en el centro y en los bordes. Se graficó el error estándar de la media.

En las superficies no limpiadas, pudimos observar un porcentaje predominante de oxígeno (O) en la muestra NanoWave-SLA y un valor inferior de carbono (C) en comparación con las placas SLA, sin embargo, en las superficies limpiadas, hubo una reducción significativa en el porcentaje de carbono (C) y un aumento de oxígeno en las placas SLA, pero no hubo cambios importantes en las superficies NanoWave-SLA.

La medición del ángulo de contacto se realizó en las superficies de las placas que se limpiaron con el protocolo de tres alcoholes (CP-2) y también en las que no pasaron por dicho proceso de limpieza.

Las placas de aleación de Ti de cada grupo se colocaron individualmente en la plataforma del goniómetro y el sistema transfirió mecánicamente una gota de agua Tipe 1 de 3 μ l a un lugar seleccionado de la placa para humedecer la

zona. **(Fig. 4a, 4b)** Se tomaron adquisiciones seriadas en el punto inicial y luego cada 5 segundos, finalizando a los 15 segundos para un total de 4 imágenes por gota. Una (1) gota se analizó 4 veces con el software de imagen en 5 lugares diferentes de cada placa (4 cuadrantes y 1 en el centro) y se tomaron imágenes, se promediaron los valores y se graficaron. **(Fig. 4c,4d)**

Los resultados muestran los valores del ángulo de contacto de las placas SLA sin limpieza de CP-2 dentro de los rangos hidrofóbicos (110.5°), mientras que las NanoWave-SLA tienen un valor medio que es hidrofílico (52°).

Por otra parte, hay una reducción evidente en el valor del ángulo de contacto en ambos grupos después de pasar por el CP-2 (protocolo de limpieza con alcohol). Los valores están dentro del rango hidrofílico y no hay diferencias estadísticamente significativas ($15,2^{\circ}$ y $15,9^{\circ}$ respectivamente) entre los grupos. **(Fig. 5)**

El ángulo de contacto dinámico no se incluyó como parte del protocolo de ensayo en las placas debido a la rápida evaporación que sufren las microgotas con posterior desaparición de las gotas en las superficies de estas. La medición estática clásica es un procedimiento ya estandarizado y bien documentado.

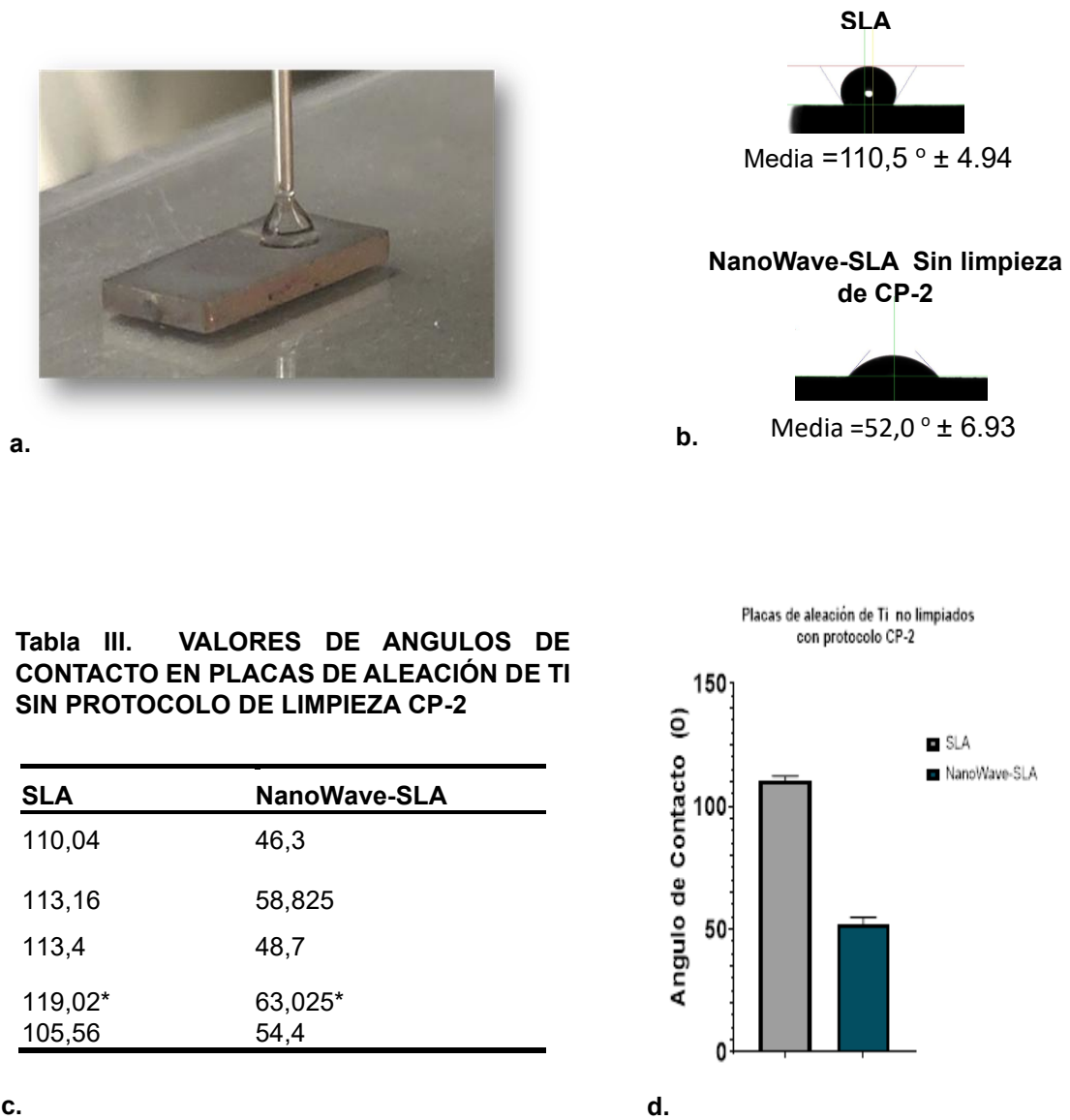
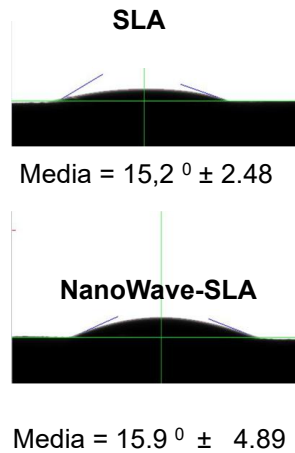


Fig. 4 Angulo de contacto de placas de aleación de Ti sin limpieza con CP-2. (a) Una gota de agua Tipo 1 se transfirió a un punto seleccionado en la superficie de placas individuales SLA y NanoWave-SLA en la plataforma del goniómetro y se tomaron adquisiciones seriadas por un máximo de 15 segundos para un total de 4 imágenes por gota. (b) Una (1) gota se analiza 4 veces con el software de imagen. (c y d) Se encuestaron 5 lugares diferentes de cada placa (los 4 cuadrantes y 1 en el centro), se promediaron y graficaron los valores. *CP-2 : Protocolo de limpieza con tres alcoholes.

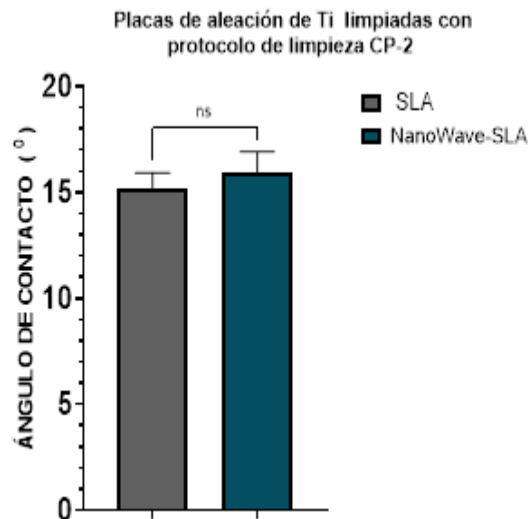


a.

Tabla IV. VALORES DE ANGULOS DE CONTACTO EN PLACAS DE ALEACIÓN DE TI CON LIMPIEZA CON PROTOCOLO CP-2

SLA	NanoWave-SLA
13,3	15,5
10,4*	16,6
16,7	13,4
15,5	26,1*
15,4	18,2

b.



c.

Fig. 5 Medición del ángulo de contacto en placas limpiadas con protocolo de limpieza CP-2. (a) Nuevamente, se colocaron individualmente 1 placa SLA y 1 placa NanoWave-SLA en la plataforma del goniómetro y al humedecer las superficies mecánicamente con una gota de agua Tipe 1 se realizaron adquisiciones seriadas en el punto inicial finalizando a los 15 segundos para un total de 4 imágenes por gota y se midieron sus ángulos de contacto. (b y c) Una gota se analiza 5 veces con el software de imagen en cada placa, se promediaron y graficaron los valores.

La rugosidad promedio (R_{sa}) y la medición de pico a valle (R_{Sz}) de las placas de aleación de Ti se caracterizaron mediante microscopía confocal en

la superficie de las placas de aleación de Ti, tanto en las superficies limpias como en las no limpias con CP-2 de cada grupo. **(Fig. 6)**

Para las superficies no limpiadas, la rugosidad media fue mayor en las placas SLA en un porcentaje estadísticamente mayor que en las muestras NanoWave-SLA, sin embargo, cuando se comparó con las muestras limpiadas, la rugosidad media y las mediciones de Pico a Valle no mostraron cambios importantes con el protocolo CP-2 protocolo de limpieza y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos SLA y Nano-SLA.

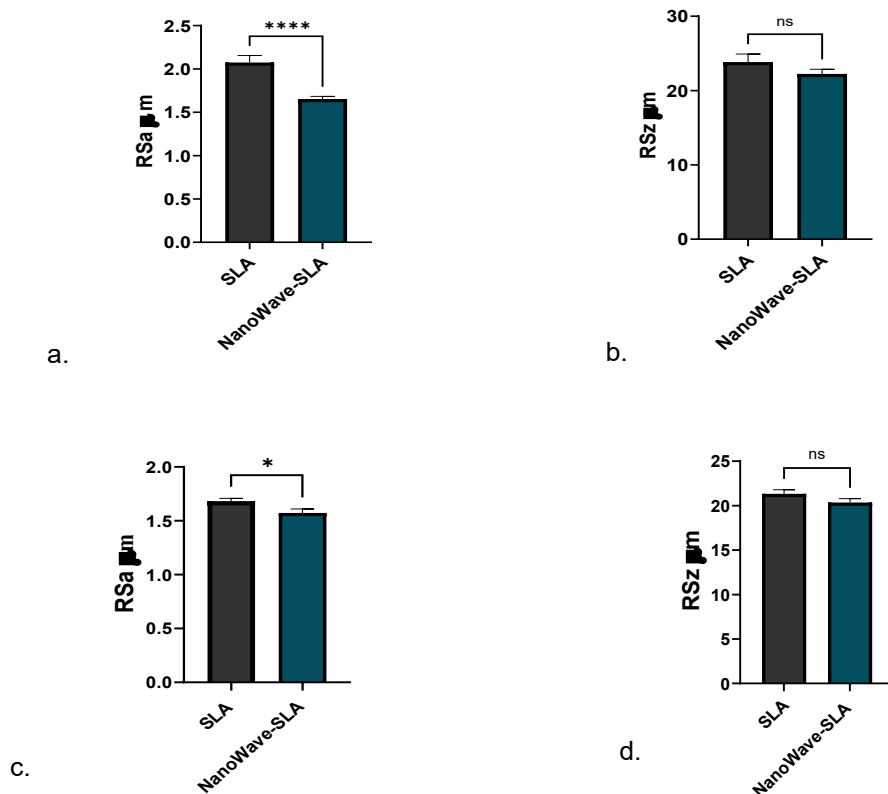


Fig. 6 Caracterización de la rugosidad media (Rsa) y medición de pico a valle (RSz) de la superficie de las placas de aleación de Ti utilizando microscopía confocal. (a) RSa de placas de aleación de Ti no limpiadas con el protocolo CP-2. (b) RSa de placas de aleación de Ti limpiadas con el Protocolo Lab. CP2; (c) RSz de placas de aleación de Ti no limpiadas con el protocolo Lab. CP2. (d) RSz de placas de aleación de Ti limpiadas con el protocolo de Lab. CP-2. Los valores p estadísticamente significativos son $\leq 0,05$ y se representan con uno o más asteriscos (*) y comparan los grupos sometidos al estudio. *ns* representa una diferencia no estadísticamente significativa entre los grupos.

La evaluación de la proliferación celular, diferenciación y expresión génica osteoblástica se realizó a las células hMSCs-RUO cultivadas en las superficies de las placas SLA y NanoWave-SLA y utilizando TCPS como grupo de control como se explica en el segmento de métodos.

La proliferación y la confluencia se evaluaron con un grupo (TCPS) sembrado por separado en una placa tratada de 24 pocillos. Las células se sembraron a una densidad de 10.000 células/área (5.000 células/cm²) y se alcanzó una confluencia del 80-90 % a los 7 días.

Las células en este G1 se separaron por tripsinización y el recuento celular se realizó con un contador celular automático (contador celular EVE NanoEntek, IL, EE.UU.), con números finales que oscilaban entre 2×10^6 - 4×10^6 células/ mL.

La cuantificación de ADN (ug/mL) muestra un valor inferior en el contenido medio de ADN en los pocillos de los grupos de placas SLA y de aleación de titanio nanoestructurada (SLA y NanoWave-SLA) en comparación con el grupo control TCPS negativo que sólo tiene cultivo celular sin biomaterial. De acuerdo con el análisis de lo reportado en la literatura, esto es esperado, ya que en este punto la proliferación celular está disminuyendo debido a que el compromiso gira en torno a la restricción de la proliferación y apoya el inicio del desarrollo de la maduración de la matriz extracelular. En nuestros hallazgos, los valores de ADN entre las superficies estructuradas no mostraron una diferencia estadísticamente significativa.

El análisis de la actividad de la fosfatasa alcalina como marcador temprano en el proceso de diferenciación y enzima importante en la formación ósea activa no mostró una diferencia estadísticamente significativa en los valores al

comparar los grupos TCPS frente a NanoWave-SLA y SLA frente a NanoWave-SLA, pero la diferencia fue estadísticamente significativa entre el grupo TCPS frente a SLA, donde el valor fue inferior para el grupo SLA. Dado que el ensayo se realizó con células en confluencia, este hallazgo sugiere que la reducción de la actividad ALP como marcador temprano está relacionada con una reducción de la proliferación celular y un inicio de la maduración de la matriz y la diferenciación celular. Este hallazgo también concuerda con el aumento de los valores de los demás marcadores, principalmente OCN como marcador de diferenciación tardía, lo que sugiere que la maduración y la mineralización han comenzado. Los valores de OCN son significativamente superiores cuando se comparan los grupos TCPS frente a SLA y TCPS frente a NanoWave-SLA.

(Fig.7)

Al observar los valores de los demás marcadores, que se normalizaron con respecto al ADN, se presume una tendencia a su aumento, aunque el análisis de los gráficos no mostró una diferencia estadísticamente significativa.

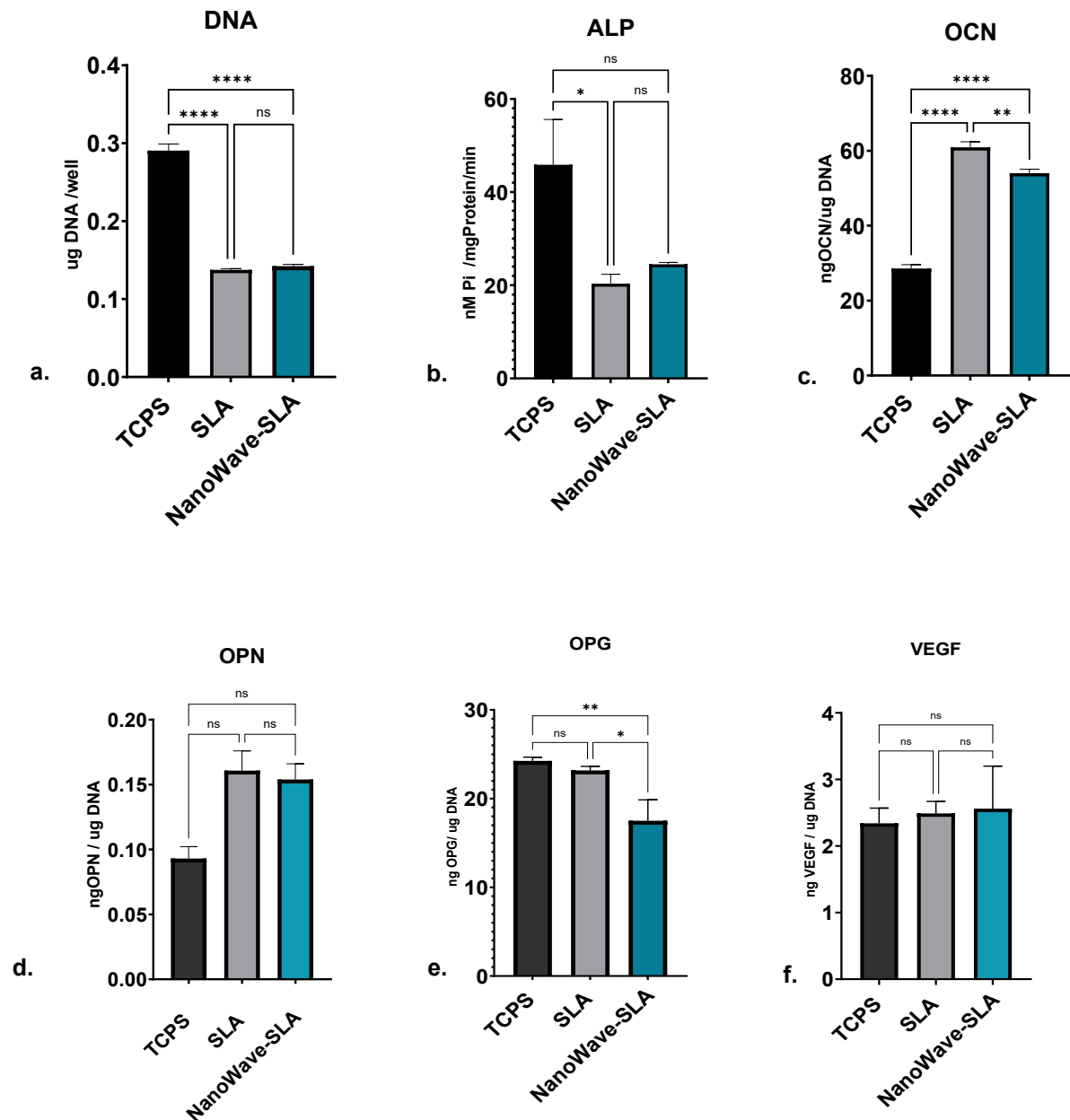


Fig. 7 Producción de marcadores osteogénicos. Se determinó los efectos de las nanoestructuras similares al hueso creadas en la superficie de las placas de aleación de Ti y su producción de marcadores osteogénicos. Se cultivaron células HMSC en placas tratadas con SLA y NanoWave-SLA y se cuantificaron los marcadores en confluencia. (a) Cuantificación de ADN, (b) Actividad ALP, (c) OCN, (d) OPN, (e) OPG, y (f) se midió la producción de VEGF. Los datos presentados son el $\pm$ error estándar de la media de seis muestras independientes. Los valores p estadísticamente significativos son $\leq 0,05$ y se representan con uno o más asteriscos (*) y comparan los grupos sometidos al estudio. *ns* representa una diferencia no estadísticamente significativa entre los grupos.

1.2. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE MICROPORTADORES DE Ti6Al4V:

Tabla V. NANOMODIFICACION DE LA SUPERFICIE DE MICROTRANSPORTADORES DE ALEACION TITANIO (Ti6Al4V)

Tratamiento de aleación Ti6Al4V	Solvent	Temperatura (T, °C)	Tiempo (t, min)	Estructura de la superficie
Sin tratamiento	Sin solvente	TA	--	Superficie lisa
Remojo no térmico	H ₂ O ₂ , 2.5M	TA	120	Sin cambios visibles
Tratamiento térmico asistido por microondas (MWHT)	H ₂ O ₂ , 2.5M	200	120	-Capas densas de nanoestructuras -Fragmentación de partículas
MWHT	H ₂ O ₂ , 2.5M	150	120	-Cobertura irregular por las nanoestructuras -Menor fragmentación de partículas
MWHT	H ₂ O ₂ , 2.5M	150	100	-Cobertura más homogénea por las Nanoestructuras -Sinterización de partículas -Menor fragmentación de partículas
MWHT	H ₂ O ₂ , 2.5M	150	90	- Microcorrugado - Digitaciones desorganizadas y Estructuras en forma de pétalos - Sinterización de partículas - Aisladas Partículas fragmentadas
MWHT	H ₂ O ₂ , 2.5M	125	60	Escasa Nanomodificación de la superficie
MWHT	H ₂ O ₂ , 2.5M	100	60	Sin cambios evidentes
MWHT	H ₂ O ₂ , 5.0M	100	90	-Cobertura irregular por Nanoestructuras -Sin sinterización
MWHT	H ₂ O ₂ , 5.0M	125	90	-Cobertura homogénea por nanoestructuras semejantes a Trabéculas de hueso -Sin sinterización

*TA: Temperatura ambiente

Se realizaron ensayos sobre los microtransportadores de aleación de Titanio (Ti6Al4V) modificando los parámetros de concentración de solvente, la temperatura y el tiempo de síntesis (**Tabla 5**). Una vez obtenida una nanoestructura consistente y reproducible, se estandarizó el proceso de fabricación y sus parámetros y se aplicó a todos los microtransportadores μ Ti-NW necesarios para la caracterización de la imagen de superficie y el cultivo celular sobre microtransportador (**Fig. 8- Fig.10**).

Los resultados finales de las nanoestructuras de la superficie de los microtransportadores imitan las estructuras de hueso observadas mediante SEM (**Fig. 11**).

Figura 8

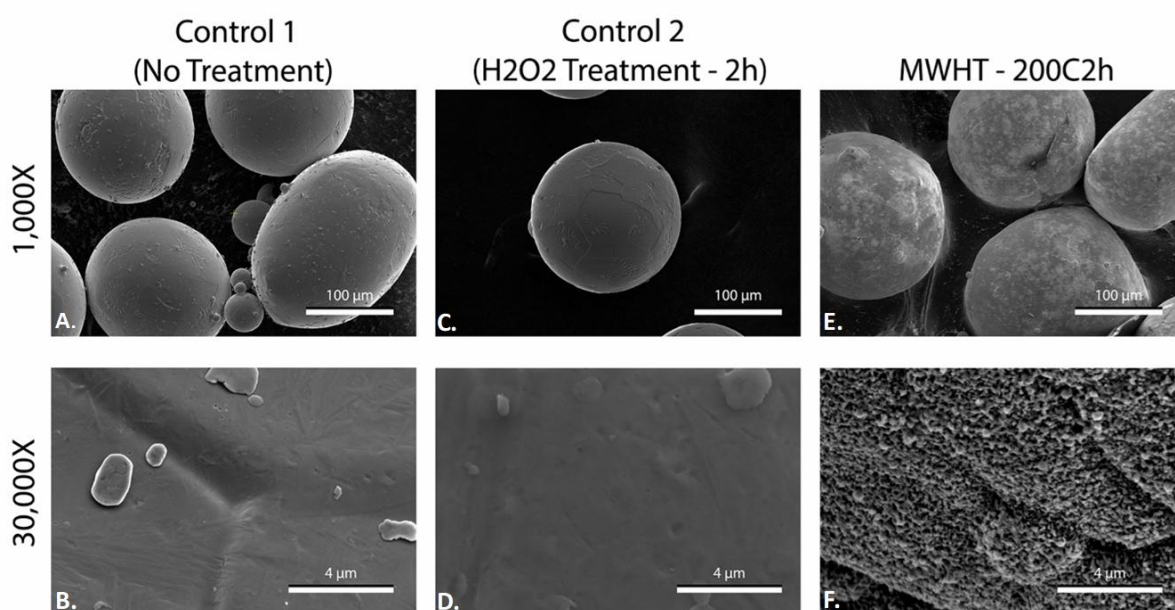


Fig. 8 SEM de los ensayos iniciales de fabricación de microtransportadores de aleación Ti6Al4V con aumentos bajos y altos. Las imágenes SEM de los ensayos iniciales se tomaron de las muestras: (a, b) tal como se recibieron (Control 1), (c,d) tratadas sólo con H₂O₂ 2,5 M, pero sin microondas (Control 2) y (e,f) tratadas con H₂O₂ 2,5M MWHT a 200°C durante 2 h. Se observó una densa capa de nanoestructuras en la superficie de las muestras NanoWave.

Figura 9.

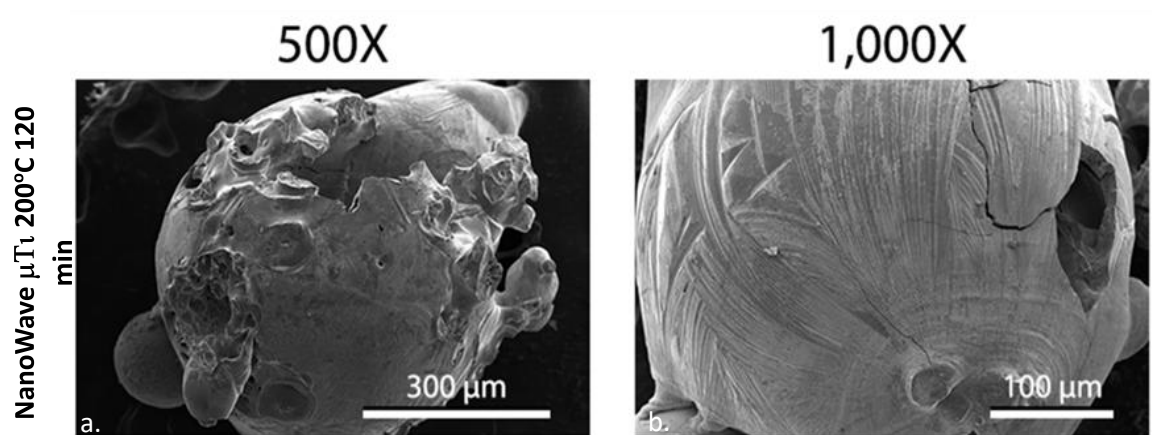


Figura 10.

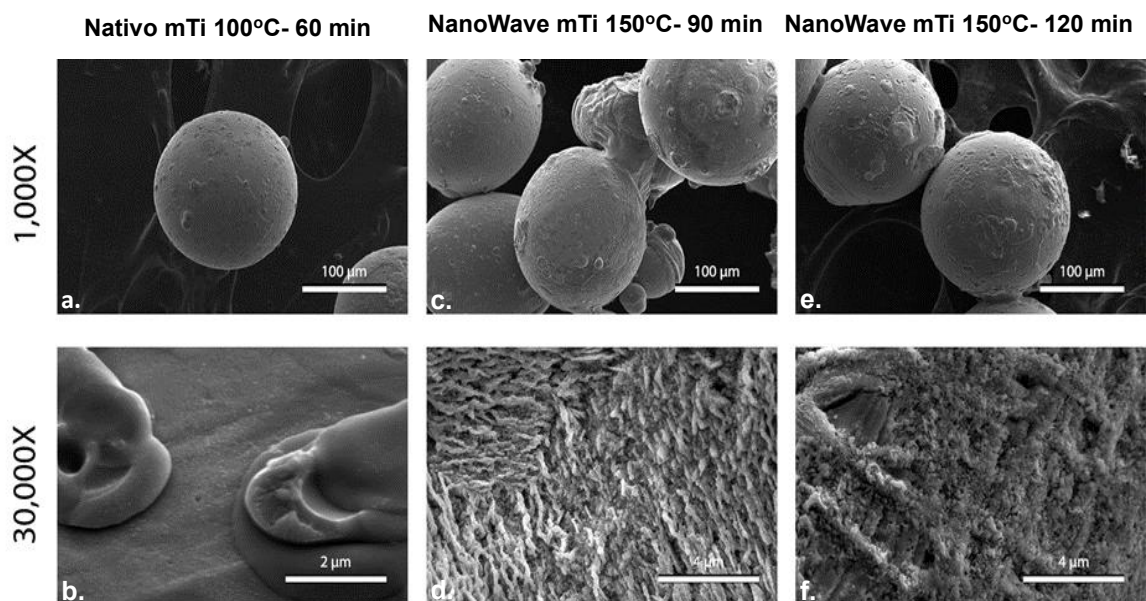


Fig. 9 SEM de microportadores de aleación Ti6Al4V ensayos iniciales de fabricación a baja y alta magnificación. NanoWaved-tratados a 200°C durante 2 h con evidencia de fragmentación del microtransportador. Imágenes presentadas

Fig.10 Imágenes SEM de microtransportadores de Ti6Al4V Nativos y tratados con diferentes Parámetros de modificación hidrotermal. Los microtransportadores de aleación Ti6Al4V nativos fueron tratados con MWHT con los siguientes parámetros: (A, B) 100°C durante 60 min, (C,D) 150°C durante 90 min y (E,F) 150°C durante 120 min. a 150°C durante 1,5 h, se observó la sinterización de las partículas. Las muestras tratadas a 100°C durante 60 min no mostraron cambios visibles. La concentración de disolvente de los ensayos (H2O2) = 2,5 M.

Pudimos comparar microtransportadores de μTi Nativas con μTi NanoWave, mediante imágenes SEM en las que se obtuvo la apariencia superficial de estructuras similares al hueso de forma consistente y reproducible tras varios ensayos consecutivos. Ambos grupos de imágenes se observan a baja y alta magnificación (**Fig. 11d, Fig.11e, Fig.11f**).

Se midió el diámetro mayor y espesor de pared de las nanoestructuras de μTi -NanoWave. Se hicieron histogramas después de medir al menos 150 poros a través de la aplicación de imágenes de ImageJ. Los diámetros mayores se encontraban principalmente en el rango de 100-250 nm con un pico en 150 nm, y el grosor de la pared oscilaba principalmente entre 40-140 nm con un pico de frecuencia en 60 nm (**Fig. 11g, Fig11h**).

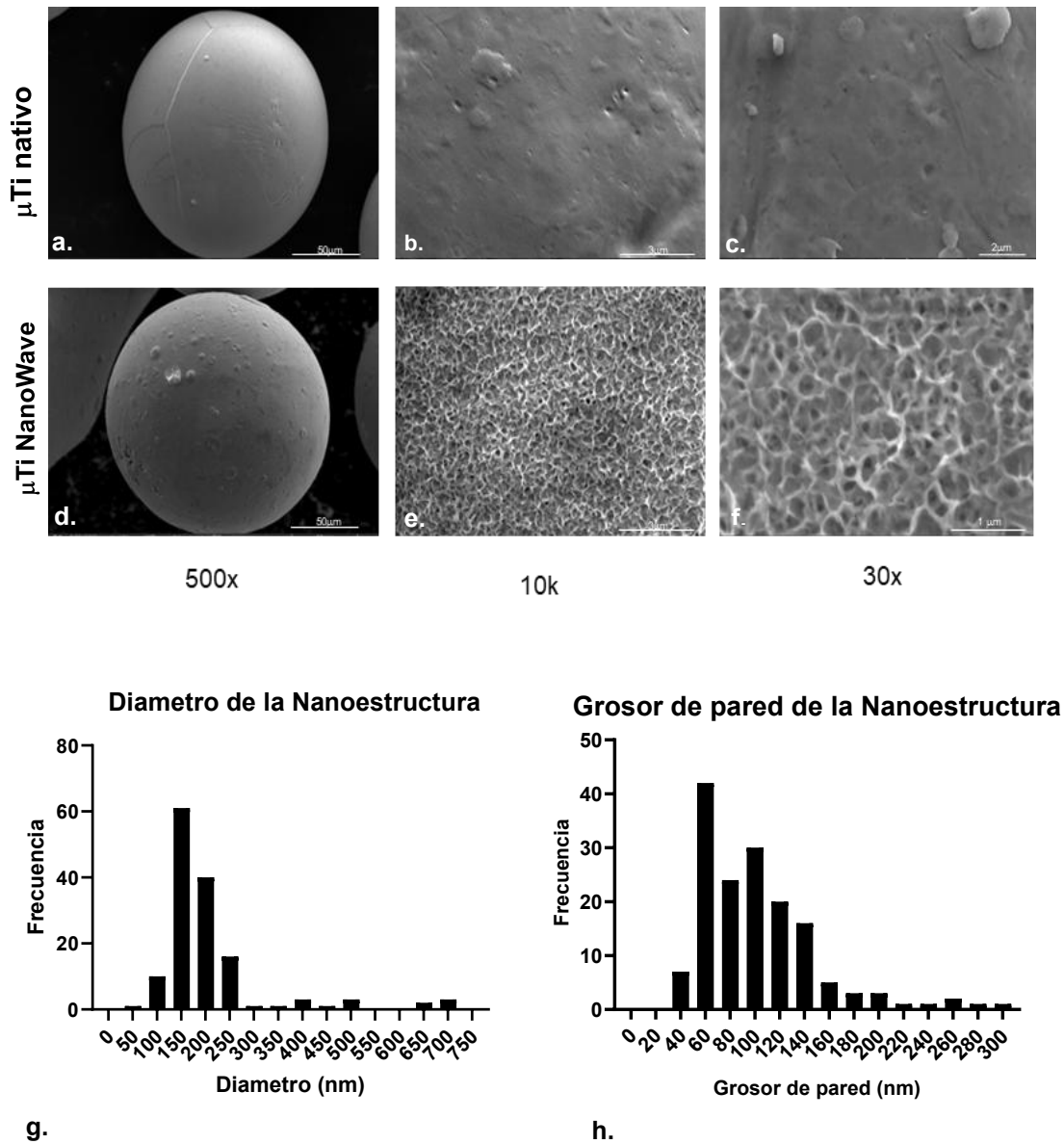


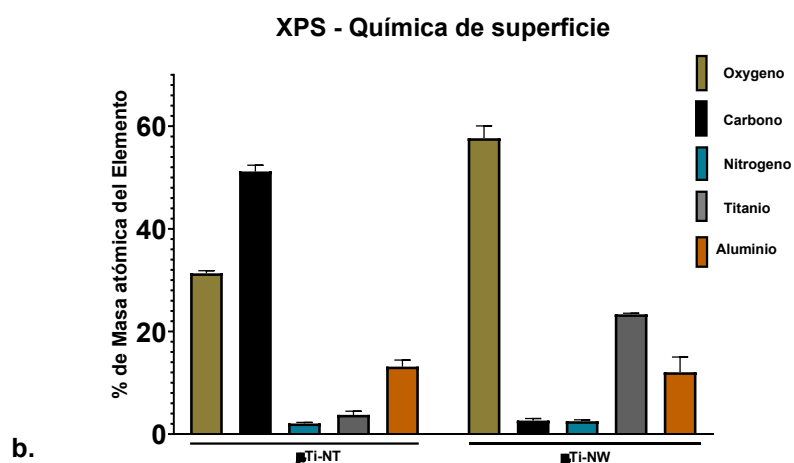
Fig. 11 Imágenes **SEM** de la superficie de microportadores de aleación Ti6Al4V. (a, b,c) μ Ti Nativas; (d,e,f) μ Ti NanoWave, con aspecto trabecular de hueso. Ambos grupos de imágenes se observan a baja y alta magnificación. La concentración de disolvente (H_2O_2) para los microportadores NanoWave = 5,0M. (g,h) Histogramas del diámetro mayor y grosor de pared de la Nanoestructura de los microtransportadores μ Ti NanoWave.

Figura 12

Tabla VI. PORCENTAJE ATÓMICO DE ELEMENTOS EN LA SUPERFICIE DE LOS MICROTRANSPORTADORES

Muestra	% atómico del Elemento			
	O	Ti	Al	V
μTi nativo	0.0	87.1	9.4	3.5
μTi NanoWave	70.1	29.5	0.3	0.1

a.



b.

Fig. 12 SEM-EDX Análisis de química de superficie de (a), Microtransportadores μTi Nativos y μTi NanoWave analizados por EDX-SEM con un detector EDX. Los resultados mostrados en la tabla sugieren que el tratamiento MWHT se produce a través de un proceso de oxidación en la superficie. (b) Química de superficie XPS (espectroscopia de fotoelectrones de rayos X) representada por un panel de elementos. Se exploraron seis puntos o partículas, y se graficó el error estándar de la media como parte de un análisis Anova de dos vías.

Los microtransportadores μTi nativos y μTi -NanoWave fueron analizados por SEM con un detector EDX en tres puntos diferentes de las muestras. Las tablas muestran los elementos más representativos (Oxígeno, Carbono, Nitrógeno, Titanio y Aluminio) y sugieren que el tratamiento MWHT se produce

a través de un proceso de oxidación en la superficie representado por el aumento del porcentaje atómico de O y la disminución de los valores de los otros elementos (**Fig. 12 a**). También fue evidente que con el tratamiento hidrotérmico los niveles de Carbono (C) disminuyeron significativamente, reduciendo los niveles de contaminantes.

La química y el porcentaje atómico de los elementos en la superficie de los microtransportadores μTi Nativos y μTi -NanoWave se obtuvo tras realizar un mapeo con XPS (espectroscopia de fotoelectrones de rayos X) (**Fig. 12b**). Para adquirir el espectro, los microtransportadores se comprimieron en una lámina de indio sobre un talón para mayor estabilidad, y luego se colocaron en la cámara a una presión de 5×10^{-4} , grosor de muestra de $100 \mu\text{m}$, una energía de 280 eV y un ángulo de despegue de 45° . Se exploraron seis puntos o partículas, y se graficó el error estándar de la media.

La humectabilidad de nuestras superficies se exploró con los dos métodos explicados, el segmento de métodos, uno estático y otro dinámico utilizando imágenes ESEM. El primer método estático se realizó sobre una muestra de cada grupo de microtransportadores colocada sobre una superficie plana adhesiva en distintas ocasiones y se tomaron las adquisiciones en serie para un total de 4 imágenes por gota. Se analizaron y promediaron un total de 3 gotas diferentes (**Fig.13**).

El grupo de μTi nativo mostró un ángulo de contacto medio de $59,4^\circ$ en comparación con el grupo de NanoWave μTi con un valor medio de $75,0^\circ$. Ambos grupos de microtransportadores μTi tuvieron valores en el rango considerado hidrofílico, esto es $< 90^\circ$.

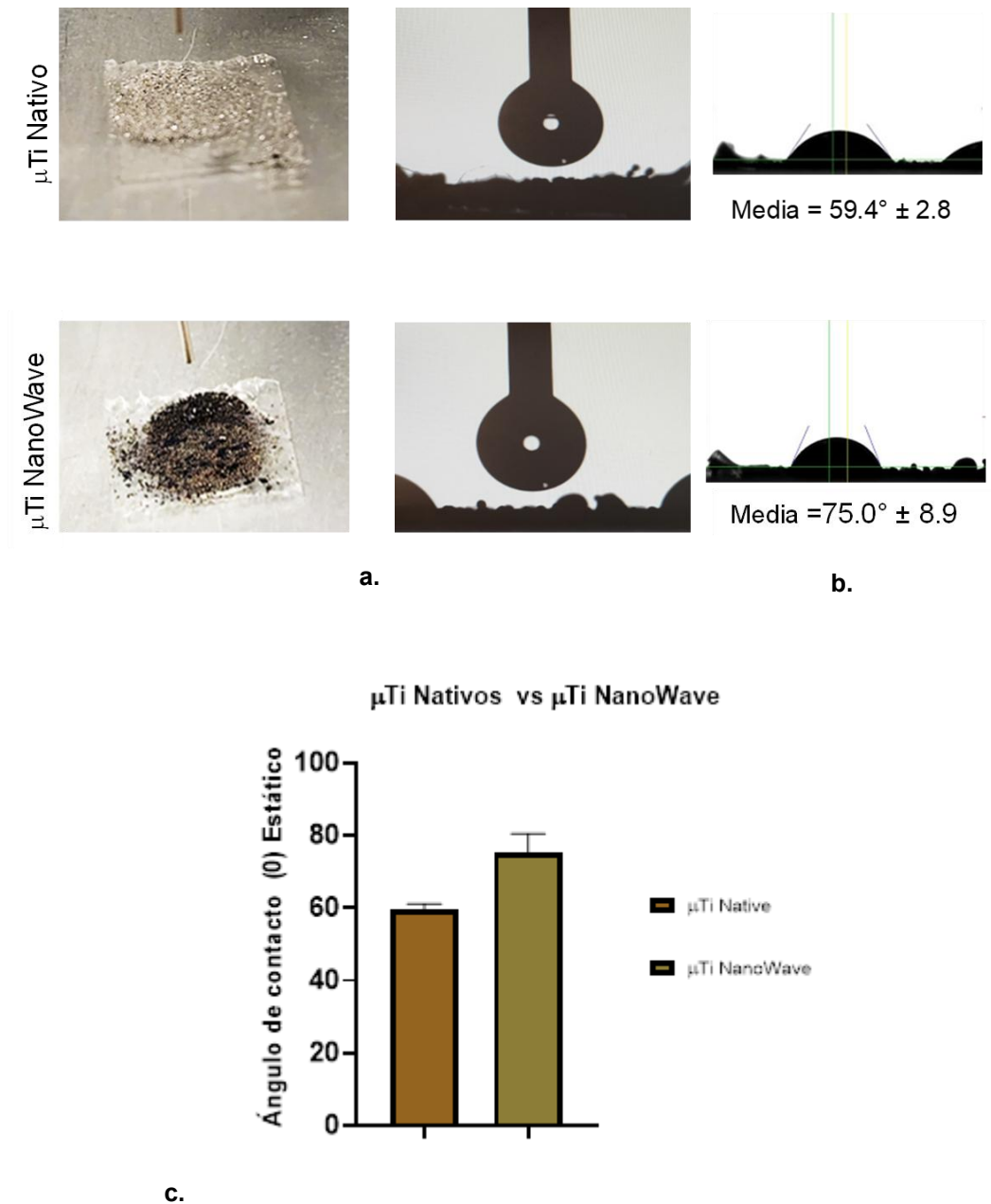
Figura 13

Fig. 13 Mediciones estáticas del ángulo de contacto. (a) Partículas μTi Nativas y μTi NanoWave. (b) Mediciones del ángulo de contacto de grupo de partículas de la aleación μTi nativas y de los microtransportadores de aleación μTi NanoWave. Se tomaron adquisiciones en serie en cada grupo de microtransportadores con un software de imágenes emparejado con un goniómetro, c) se midió el ángulo de contacto, promediaron los valores y se graficaron.

Para el segundo método, los microtransportadores se colocaron sobre un adhesivo de cobre como conductor térmico y, a continuación, se fijaron en una etapa fría a 1°C. Se varió la humedad y la presión de la cámara, generando la condensación de las microgotas de agua en las superficies de aleación de Ti. La presión se varió gradualmente de 200 Pa a 625 Pa para obtener una humedad relativa del 100% donde se producen las nanogotas. Se localizó una zona en la que la superficie con respecto al haz de electrones formará un ángulo de aproximadamente 70°, que se encuentra en el límite de curvatura de las micropartículas. Se utilizó un $n = 10$ de gotas para la medición y se obtuvieron al menos 5 imágenes secuenciales para ver los cambios de forma y anchura de la base de la gota. Sin embargo, independientemente del momento en que se midieron los ángulos en una misma gotita, los valores no variaron significativamente entre sí.

Se utilizó un plugin de un software de tratamiento de imágenes para rodear la gota y medir los ángulos interno e inverso. Se promediaron para obtener un valor aproximado del ángulo de contacto y se representaron gráficamente. Para la aleación μTi Nativas fue igual a 92.3° y 40 ° para los microtransportadores μTi -NanoWave. Estos resultados muestran que la superficie del microtransportador μTi Nativo es altamente hidrófoba y la superficie de μTi -NanoWave altamente hidrofílica. Las diferencias en los valores obtenidos en ambos métodos sugieren que podría obtenerse una medición más individualizada y precisa con la ESEM dinámico, aunque en ambos métodos los microtransportadores de μTi tratados con NanoWave

mostraron características hidrofílicas, que es en definitiva el objetivo para una buena adhesión celular.

Figura 14

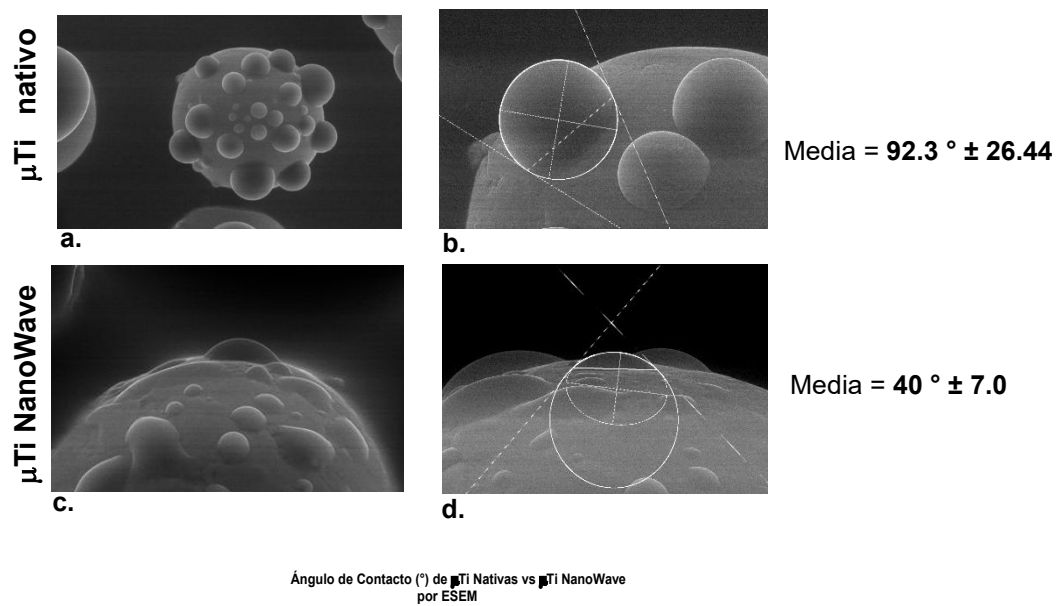


Fig. 14 Mediciones del ángulo de contacto con ESEM (microscopia Electronica de Barrido-modo Ambiental por sus siglas en inglés): Los microtransportadores μTi -Native y μTi NanoWave se colocaron en soportes separados y las muestras se escanearon individualmente en una plataforma de refrigeración dentro del microscopio. Imágenes secuenciales ESEM de condensación de gotas en las superficies de los microtransportadores μTi Native (a,b) y NanoWave μTi (c,d), con humedad y presión de cámara variables. Se representó gráficamente la media de diez (10) gotitas independientes.

Las mediciones de la rugosidad superficial media (Rsa) y de la altura del pico al valle (RSz) se obtuvieron analizando doce muestras de cada grupo (Native μ Ti y NanoWave μ Ti), con un láser en 405nm, pinhole 0,29 unidades, ganancia maestra de 436, desplazamiento digital de 32 y adquisición de imagen a partir de un aumento de 10x con ajuste final a un objetivo de 20x e intervalos de 1mm por corte.

En ambos casos, los valores medios de Rsa y Rsz fueron superiores para las muestras NanoWave, lo que significa que la superficie de los microtransportadores μ Ti NanoWaved era más rugosa que la de las partículas μ Ti Nativas, con un Rsa= 1,35 frente a 0,873 mm y un RSZ = 22,65 vs 14,74 mm (Fig. 15).

Figura 15

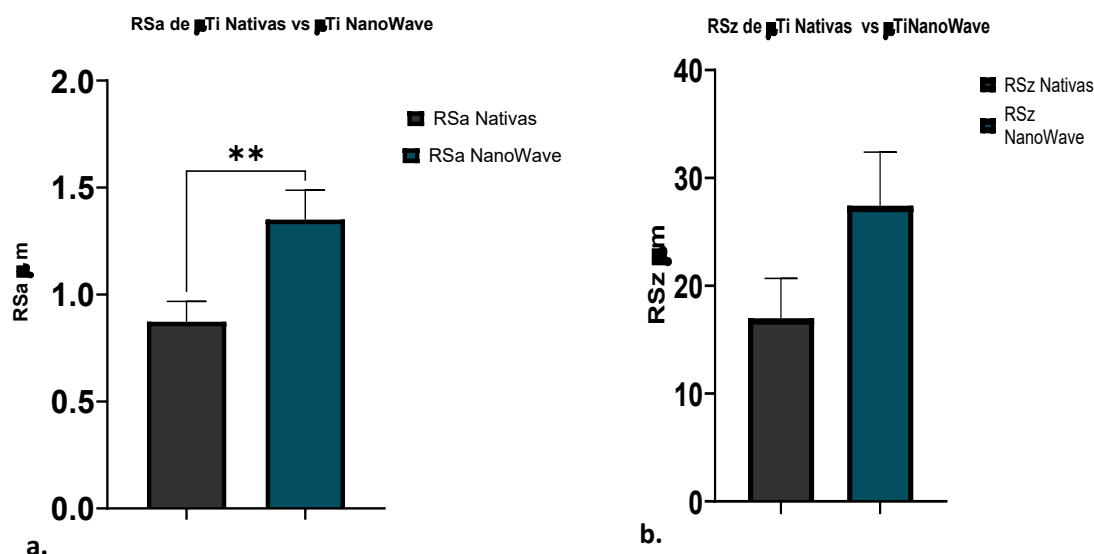


Fig.15 Microscopia Confocal. Caracterización de microtransportadores de aleación de Ti mediante microscopía confocal (a) Rugosidad media (Rsa) y (b) Medidas de altura de pico a valle (RSz), comparación entre μ Ti Nativos y μ Ti NanoWave. Los valores p estadísticamente significativos son $\leq 0,05$ y se representan con uno o varios asteriscos (*) y comparan los grupos sometidos al estudio. ns representa una diferencia que no es estadísticamente significativa entre los grupos.

Las imágenes del modelo in vitro de cultivo celular que se llevó a cabo sobre los microtransportadores tanto nativos como nanoestructurados, mostraron una adhesión y proliferación celular exitosas.

Inicialmente se probaron con células epiteliales VERO en donde se logró apreciar una buena adherencia y proliferación celular sobre los microtransportadores μ Ti NanoWave, con formación de múltiples capas de células bien adheridas en la superficie, a diferencia de lo que se vio en las superficies lisas no tratadas de los microtransportadores μ Ti Nativas en donde hubo pobre adherencia de una monocapa celular con fácil desprendimiento de las mismas.

Otros ensayos incluyeron cultivos de células osteogénicas específicas como células MG-63, las cuales también mostraron buena adherencia y proliferación sobre superficies nanoestructuradas, con formación de filopodios y varias capas de células que se extienden sobre las superficies, sin embargo, la valoración del crecimiento celular sobre la superficie de las μ Ti Nativas no se logró ver células adheridas ni bien definidas.

Basado en el resultado de lo descrito en estos cultivos celulares sobre los microtransportadores, sugiere que las superficies nanoestructuradas generadas por MWHT pueden promover la diferenciación celular.

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica no permitieron en esta ocasión una evaluación clara de la adherencia y proliferación de las MSC derivadas de iPMSC a las superficies del biomaterial. (Imágenes adjuntas en ANEXO como Imagen Complementaria)

Figura 16.

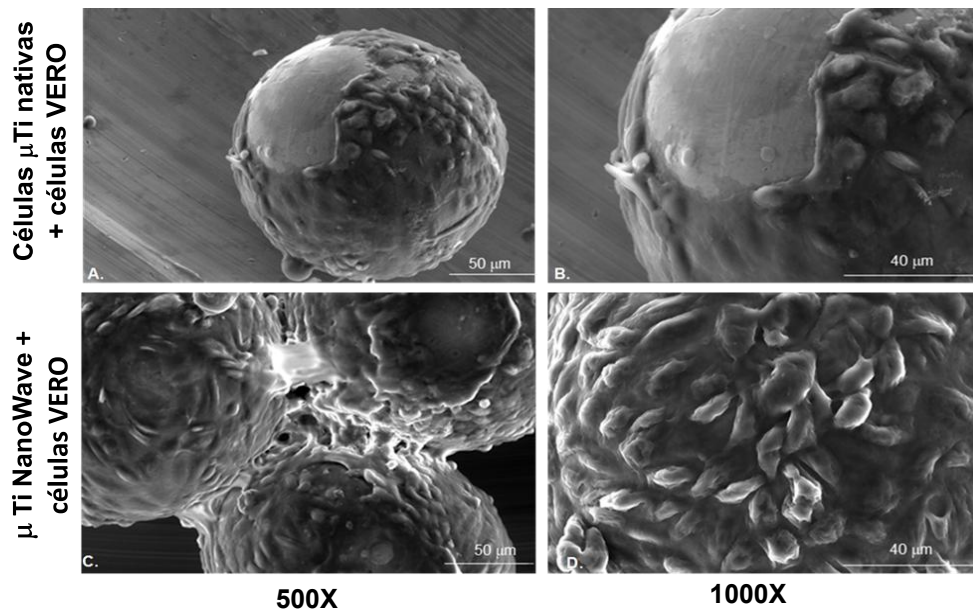


Figura 17.

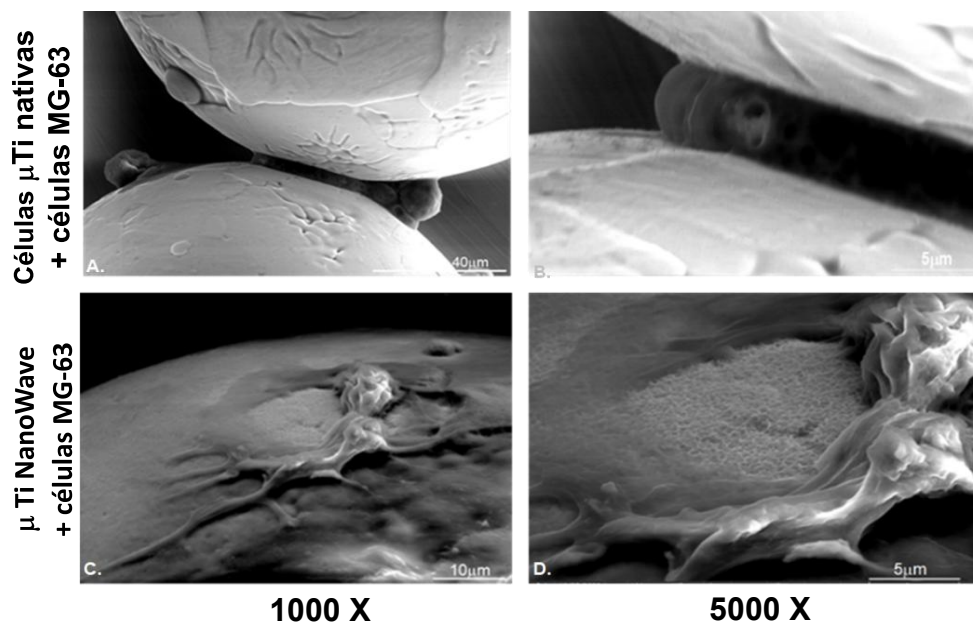


Fig. 16 ESEM. Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental de baja y alta magnificación del cultivo de células VERO sobre μ Ti Nativas (a,b) y μ Ti-NanoWave (c,d). La monocapa de células muestra una pobre adherencia en las superficies lisas nativas no tratadas frente a una buena adherencia y proliferación celular en los microtransportadores μ Ti NanoWaved.

Fig. 17. ESEM. Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental con imágenes de baja y alta magnificación del cultivo de células MG-63 sobre NanoWave μ Ti (a, b). La proliferación celular sobre las superficies de los microportadores era evidente, mostrando una buena adherencia.

3. DISCUSION:

Aunque los implantes metálicos no entran estrictamente en la definición actual de los conceptos de regeneración o ingeniería tisulares, su estudio nos ha permitido conocer mejor los procesos biológicos que tienen lugar en la interfaz célula-biomaterial y los mecanismos disponibles para manipular el comportamiento celular a través de las propiedades superficiales del material (Davies (2007; Xue et. Al. (2020))

En nuestra experimentación utilizamos la metodología de nanomodificación hidrotérmica por microondas de superficies sólidas de Ti6Al4V a granel (Cheng et. Al. (2018)), y la aplicamos no sólo a pequeñas placas rectangulares de esta aleación, sino también al polvo de aleación de Ti6Al4V, esto último por primera vez. Pudimos reproducir cualitativamente la aparición de estructuras similares a huesos en la superficie de las partículas, que denominamos microtransportadores.

Este estudio pone de relieve el papel fundamental de la temperatura (T) y el tiempo de exposición (t) durante el tratamiento MWHT en la definición de la nanoestructura superficial y la integridad de los microtransportadores Ti6Al4V y cómo hemos sido capaces de reproducir estas características nanoestructuradas en otras superficies sólidas de aleaciones de Ti . Mediante la identificación de un "punto dulce" en el que la concentración de sustrato (H_2O_2) desempeña un papel protagonista, pudimos lograr una nanomodificación óptima que emula la de las características similares a los huesos, con un impacto mínimo en la integridad de las partículas. Este hallazgo

subraya la importancia de un control preciso de los parámetros de tratamiento para garantizar los resultados deseados en los procesos de modificación de superficies y evitar el deterioro de la estructura superficial y de los atributos del implante subyacente(Cheng et. Al. (2018; Kasemo y Lausmaa (1988)) .

Las superficies de alta energía son propensas a una rápida contaminación por iones transportados por el aire y moléculas orgánicas, como los hidrocarburos (Kasemo y Lausmaa (1988; Zhao et. Al. (2005)) , lo que altera su composición química y reduce su capacidad para conservar la hidrofiliidad.

El proceso de oxidación controlada, conseguido mediante el tratamiento MWHT, fue crucial para aumentar el contenido de oxígeno elemental en las superficies tratadas. Esto se confirmó mediante análisis químicos con SEM-EDX y XPS , que mostraron un aumento significativo de los niveles de oxígeno, pero también una disminución de los iones contaminantes como el carbono.

La fabricación de superficies altamente hidrófilas es clave para promover la traducción celular y la absorción de proteínas para una respuesta adecuada de las células osteogénicas. (Cheng et. Al. (2018)) (Zhao et. Al. (2005)) (Wei et. Al. (2009))

Esta oxidación controlada no sólo mejora las propiedades del material, sino que también garantiza la coherencia y reproducibilidad del proceso de modificación. Esta técnica ofrece un método más controlado y eficaz para conseguir las características superficiales deseadas. (Huang et. Al. (2021))

Los presentes resultados demostraron el éxito de la adhesión y proliferación celular en las superficies nanoestructuradas de los microtransportadores

Ti6Al4V, ensayadas inicialmente con células epiteliales VERO y después con células osteogénicas específicas como las células MG-63 y las MSC derivadas de iPMSC, cuya adhesión y proliferación se siguieron desde las 24 horas hasta la confluencia. Esto indica que las superficies de microtransportadores y placas de aleación de Ti nanoestructuradas creadas por MWHT pueden soportar la diferenciación celular, esencial para la integración y posible regeneración tisular.

Decidimos realizar los ensayos para determinar la proliferación y la expresión génica de la diferenciación celular únicamente en nuestra placa de aleación de titanio y no ampliar el experimento a las superficies de microportadores, principalmente debido a la falta de bibliografía significativa e investigaciones previas sobre superficies tan pequeñas.

Las superficies de titanio a granel se han estudiado ampliamente y han proporcionado una base sólida para la comparación y la reproducibilidad. Sin embargo, cuando se consideran superficies más pequeñas, la investigación existente es limitada y se centra en su comportamiento en condiciones experimentales similares. Esta laguna en la bibliografía dificulta la predicción y la interpretación de los posibles resultados, ya que la superficie más pequeña podría tener propiedades físicas o químicas diferentes en comparación con las placas de titanio, que están bien documentadas.

Tratar con superficies más pequeñas puede plantear retos como una mayor sensibilidad a los factores ambientales, una mayor relación superficie-volumen o diferencias en las propiedades de los materiales que no se han explorado a

fondo en el contexto de estudios similares. Por tanto, en este experimento resultó poco práctico proceder con superficies más pequeñas.

El siguiente paso es diseñar ensayos para la estandarización y procedimientos metodológicos para la evaluación del proceso de maduración y diferenciación celular en nuestros microtransportadores.

Por otra parte, en nuestra experimentación con placas de aleación de Ti pudimos reproducir características similares al hueso en su superficie utilizando los mismos parámetros que con los microtransportadores.

Nuestro modelo celular mostró una buena adhesión y proliferación en la superficie creada. Por otro lado, el análisis biomolecular mostró el comportamiento celular esperado donde hubo una clara expresión génica de los biomarcadores en la fase temprana y tardía de la diferenciación osteoblástica.

4. CONCLUSIÓN

El tratamiento de nanomodificación de superficies que hemos utilizado ha demostrado ser muy eficaz y reproducible en varias superficies de la misma aleación, lo que demuestra su versatilidad y coherencia a la hora de mejorar las propiedades del material. Induce cambios significativos en las características de la superficie sin comprometer la integridad del material.

Presentamos nuestra metodología modificada para la nanomodificación superficial hidrotérmica por microondas de polvo de aleación Ti6Al4V, placas y también probada en un implante dental, conseguida manipulando bajas temperaturas, tiempo y diferentes concentraciones de sustrato (H_2O_2).

La temperatura (T) y el tiempo de exposición (t) durante el tratamiento MWHT jugaron un papel crítico en la definición de la nanoestructura superficial y la integridad de las muestras a una presión constante, encontrando un punto dulce para la generación de nanomodificaciones con el menor impacto en la fragmentación de partículas o microtransportadores y a la uniformidad de la superficie de la placa de aleación de Ti, obteniendo características con rasgos altamente reproducibles.

La concentración de la solución de H_2O_2 también desempeñó un papel esencial en este proceso de oxidación controlada, mostrando un aumento considerable del contenido de oxígeno elemental en las superficies tratadas. La estabilidad y reproducibilidad de las características superficiales han sido cruciales para la adhesión y diferenciación celular.

Las estructuras obtenidas tienen aspecto óseo, es decir, imitan las características microscópicas del hueso. Estas características coinciden con las de nuestro biomaterial deseado, que puede promover la proliferación de células progenitoras, la adhesión y la diferenciación osteoblástica. Las estructuras se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido, SEM-EDX, XPS, microscopía confocal y análisis ImageJ.

El hecho de poder emular características similares a las del hueso en todas nuestras superficies abre un compás de posibilidades y las aplicaciones clínicas potenciales de estos hallazgos son vastas, sobre todo en el contexto de la regeneración ósea y el desarrollo de dispositivos implantables. (Li et. Al. (2018))

Como se ha señalado en estudios anteriores, la combinación jerárquica de rugosidad a escala micro y nanométrica puede proporcionar las propiedades superficiales estructurales necesarias para la diferenciación osteoblástica que conduce a la reparación del crecimiento óseo sano.

Por otra parte, la literatura de investigación (Gittens, R: 2012) sobre el impacto de las modificaciones superficiales en el comportamiento celular muestra que el destino de las células de linaje osteoblástico puede verse influido por la alteración de las propiedades superficiales, como la nanotopografía y la humectabilidad, sin necesidad de factores solubles externos.

La respuesta celular también depende de su estadio de diferenciación. Estos resultados sugieren que el éxito de la osteointegración de un implante

depende de la contribución de las células del linaje de los osteoblastos en las distintas fases de su proceso de diferenciación

La adhesión y proliferación celular se logró con éxito en la confluencia celular en nuestro diseño de ensayo confirmando que la superficie nanoestructurada de nuestro biomaterial podría potencialmente lograr la diferenciación celular en su superficie

Pudimos comprobar la adhesión y proliferación de las hMSC mediante la cuantificación del ADN, y la diferenciación celular midiendo la actividad ALP y la producción de OCN, OPG, OPN y VEGF como marcadores de diferenciación osteogénica en diferentes estadios.

Para trasladar estos resultados experimentales a la práctica clínica, son necesarios nuevos estudios in vivo que evalúen la estabilidad a largo plazo y la biocompatibilidad de las superficies nanomodificadas. Además, hay que tener en cuenta los aspectos normativos para garantizar la seguridad y eficacia de los nuevos microtransportadores nanoestructurados. Estos esfuerzos ayudarán a salvar la distancia entre la investigación de laboratorio y las aplicaciones médicas prácticas.

El objetivo primordial es aplicar los conocimientos generados sobre las superficies modificadas de los implantes de titanio a granel al desarrollo de nuevas terapias regenerativas, por ejemplo, para la pérdida ósea o el tejido dañado por tumores, basadas en microtransportadores nanoestructurados que ofrezcan las ventajas de una tecnología inyectable, mínimamente invasiva y localizada.

5. REFERENCIAS:

- ALANAZI, S. (2024). Aesthetic problems related to dental implants in the aesthetic zone: A systematic review. *Saudi Dent J*, 36(9), 1179-1183. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2024.06.010>
- ALGHAMDI, H.S. (2018). Methods to Improve Osseointegration of Dental Implants in Low Quality (Type-IV) Bone: An Overview. *J Funct Biomater*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/jfb9010007>
- ALIJANI, H.: VAUGHAN, T.J. (2024). Exploring the hierarchical structure of lamellar bone and its impact on fracture behaviour: A computational study using a phase field damage model. *J Mech Behav Biomed Mater*, 153, 106471. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2024.106471>
- BALLOUZE, R.: MARAHAT, M.H.: MOHAMAD, S.: SAIDIN, N.A.: KASIM, S.R.: y OOI, J.P. (2021). Biocompatible magnesium-doped biphasic calcium phosphate for bone regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 109(10), 1426-1435. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34802>
- BISIO, V.: ESPELI, M.: BALABANIAN, K.: y ANGINOT, A. (2021). Culture, Expansion and Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells. *Methods Mol Biol*, 2308, 3-20. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1425-9_1
- BRANEMARK, P.I. (1983). Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent*, 50(3), 399-410. [https://doi.org/10.1016/s0022-3913\(83\)80101-2](https://doi.org/10.1016/s0022-3913(83)80101-2)
- BRANEMARK, P.I.: HANSSON, B.O.: ADELL, R.: BREINE, U.: LINDSTROM, J.: HALLEN, O.: y OHMAN, A. (1977). Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*, 16, 1-132. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/356184>
- BRÅNEMARK, P.I.: HANSSON, B.O.: ADELL, R.: BREINE, U.: LINDSTRÖM, J.: HALLÉN, O.: y OHMAN, A. (1977). Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*, 16, 1-132.
- BRUDER, S.P.: FINK, D.J.: y CAPLAN, A.I. (1994). Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem*, 56(3), 283-294. <https://doi.org/10.1002/jcb.240560303>
- BUSER, D.: SENNERBY, L.: y DE BRUYN, H. (2017). Modern implant dentistry based on osseointegration: 50 years of progress, current trends and open questions. *Periodontol 2000*, 73(1), 7-21. <https://doi.org/10.1111/prd.12185>
- CHEN, B.Y.: WANG, X.: CHEN, L.W.: y LUO, Z.J. (2012). Molecular targeting regulation of proliferation and differentiation of the bone marrow-derived mesenchymal stem cells or mesenchymal stromal cells. *Curr Drug Targets*, 13(4), 561-571. <https://doi.org/10.2174/138945012799499749>
- CHENG, A.: GOODWIN, W.B.: DEGLEE, B.M.: GITTENS, R.A.: VERNON, J.P.: HYZY, S.L.: SCHWARTZ, Z.: SANDHAGE, K.H.: y BOYAN, B.D. (2018). Surface modification of bulk titanium substrates for biomedical applications via low-temperature microwave hydrothermal oxidation. *J*

- Biomed Mater Res A*, 106(3), 782-796.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.36280>
- DAVIES, J.E. (1998). Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont*, 11(5), 391-401.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9922731>
- DAVIES, J.E. (2007). Bone bonding at natural and biomaterial surfaces. *Biomaterials*, 28(34), 5058-5067.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.049>
- DAVIES, J.E.; BALDAN, N. (1997). Scanning electron microscopy of the bone-bioactive implant interface. *J Biomed Mater Res*, 36(4), 429-440.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(19970915\)36:4<429::aid-jbm1>3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(19970915)36:4<429::aid-jbm1>3.0.co;2-g)
- DEC, P.; MODRZEJEWSKI, A.; y PAWLIK, A. (2022). Existing and Novel Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Int J Mol Sci*, 24(1).
<https://doi.org/10.3390/ijms24010529>
- ESDAILLE, C.J.; WASHINGTON, K.S.; y LAURENCIN, C.T. (2021). Regenerative engineering: a review of recent advances and future directions. *Regen Med*, 16(5), 495-512. <https://doi.org/10.2217/rme-2021-0016>
- GITTENS, R.A.; OLIVARES-NAVARRETE, R.; SCHWARTZ, Z.; y BOYAN, B.D. (2014). Implant osseointegration and the role of microroughness and nanostructures: lessons for spine implants. *Acta Biomater*, 10(8), 3363-3371. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.03.037>
- GITTENS, R.A.; SCHEIDELER, L.; RUPP, F.; HYZY, S.L.; GEIS-GERSTORFER, J.; SCHWARTZ, Z.; y BOYAN, B.D. (2014). A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects. *Acta Biomater*, 10(7), 2907-2918.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.03.032>
- GITTENS, R.A.; MCLACHLAN, T.; OLIVARES-NAVARRETE, R.; CAI, Y.; BERNER, S.; TANNENBAUM, R.; SCHWARTZ, Z.; SANDHAGE, K.H.; y BOYAN, B.D. (2011). The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. *Biomaterials*, 32(13), 3395-3403.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.029>
- GITTENS, R.A.; OLIVARES-NAVARRETE, R.; MCLACHLAN, T.; CAI, Y.; HYZY, S.L.; SCHNEIDER, J.M.; SCHWARTZ, Z.; SANDHAGE, K.H.; y BOYAN, B.D. (2012). Differential responses of osteoblast lineage cells to nanotopographically-modified, microroughened titanium-aluminum-vanadium alloy surfaces. *Biomaterials*, 33(35), 8986-8994.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.08.059>
- HOEMANN, C.D.; EL-GABALAWY, H.; y MCKEE, M.D. (2009). In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol (Paris)*, 57(4), 318-323. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.06.004>
- HUANG, L.; CAI, B.; HUANG, Y.; WANG, J.; ZHU, C.; SHI, K.; SONG, Y.; FENG, G.; LIU, L.; y ZHANG, L. (2021). Comparative Study on 3D Printed Ti6Al4V Scaffolds with Surface Modifications Using Hydrothermal Treatment and Microarc Oxidation to Enhance Osteogenic Activity.

- ACS Omega, 6(2), 1465-1476.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05191>
- IWATA, N.:NOZAKI, K.:HORIUCHI, N.:YAMASHITA, K.:TSUTSUMI, Y.:MIURA, H.: y NAGAI, A. (2017). Effects of controlled micro-/nanosurfaces on osteoblast proliferation. *J Biomed Mater Res A*, 105(9), 2589-2596. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36118>
- KASEMO, B.: LAUSMAA, J. (1988). Biomaterial and implant surfaces: on the role of cleanliness, contamination, and preparation procedures. *J Biomed Mater Res*, 22(A2 Suppl), 145-158.
<https://doi.org/10.1002/jbm.820221307>
- LI, J.:LI, Z.:LI, R.:SHI, Y.:WANG, H.:WANG, Y.: y JIN, G. (2018). In vitro and in vivo evaluations of mechanical properties, biocompatibility and osteogenic ability of sintered porous titanium alloy implant. *RSC Adv*, 8(64), 36512-36520. <https://doi.org/10.1039/c8ra07518b>
- LIU, C.:ZHANG, J.:ZHAO, X.:XU, M.:LIU, H.: y ZHOU, H. (2023). Stability, biomechanics and biocompatibility analysis following different preparation strategies of hierarchical zeolite coatings on titanium alloy surfaces. *Front Bioeng Biotechnol*, 11, 1337709.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1337709>
- LIU, Y.:LUO, D.: y WANG, T. (2016). Hierarchical Structures of Bone and Bioinspired Bone Tissue Engineering. *Small*, 12(34), 4611-4632.
<https://doi.org/10.1002/smll.201600626>
- LOSSDORFER, S.:SCHWARTZ, Z.:WANG, L.:LOHMANN, C.H.:TURNER, J.D.:WIELAND, M.:COCHRAN, D.L.: y BOYAN, B.D. (2004). Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. *J Biomed Mater Res A*, 70(3), 361-369. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30025>
- LOTZ, E.M.:OLIVARES-NAVARRETE, R.:BERNER, S.:BOYAN, B.D.: y SCHWARTZ, Z. (2016). Osteogenic response of human MSCs and osteoblasts to hydrophilic and hydrophobic nanostructured titanium implant surfaces. *J Biomed Mater Res A*, 104(12), 3137-3148.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.35852>
- LUKASZEWSKA-KUSKA, M.:WIRSTLEIN, P.:MAJCHROWSKI, R.: y DOROCKA-BOBKOWSKA, B. (2018). Osteoblastic cell behaviour on modified titanium surfaces. *Micron*, 105, 55-63.
<https://doi.org/10.1016/j.micron.2017.11.010>
- MENDONCA, G.:MENDONCA, D.B.:ARAGAO, F.J.: y COOPER, L.F. (2008). Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. *Biomaterials*, 29(28), 3822-3835.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.05.012>
- MESA-RESTREPO, A.:BYERS, E.:BROWN, J.L.:RAMIREZ, J.:ALLAIN, J.P.: y POSADA, V.M. (2024). Osteointegration of Ti Bone Implants: A Study on How Surface Parameters Control the Foreign Body Response. *ACS Biomater Sci Eng*, 10(8), 4662-4681.
<https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.4c00114>
- MISHRA, S.K.: CHOWDHARY, R. (2020). Evolution of dental implants through the work of per-ingvar branemark: A systematic review. *Indian J Dent Res*, 31(6), 930-956. https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR_587_18

- MULARI, M.T.:QU, Q.:HARKONEN, P.L.: y VAANANEN, H.K. (2004). Osteoblast-like cells complete osteoclastic bone resorption and form new mineralized bone matrix in vitro. *Calcif Tissue Int*, 75(3), 253-261. <https://doi.org/10.1007/s00223-004-0172-3>
- OGUERI, K.S.: LAURENCIN, C.T. (2020). Nanofiber Technology for Regenerative Engineering. *ACS Nano*, 14(8), 9347-9363. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c03981>
- OLIVARES-NAVARRETE, R.:HYZY, S.L.:HUTTON, D.L.:ERDMAN, C.P.:WIELAND, M.:BOYAN, B.D.: y SCHWARTZ, Z. (2010). Direct and indirect effects of microstructured titanium substrates on the induction of mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblast lineage. *Biomaterials*, 31(10), 2728-2735. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.12.029>
- ORYAN, A.:KAMALI, A.:MOSHIRI, A.: y BAGHABAN ESLAMINEJAD, M. (2017). Role of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regenerative Medicine: What Is the Evidence? *Cells Tissues Organs*, 204(2), 59-83. <https://doi.org/10.1159/000469704>
- PARIHAR, A.:PANDITA, V.:KUMAR, A.:PARIHAR, D.S.:PURANIK, N.:BAJPAL, T.: y KHAN, R. (2022). 3D Printing: Advancement in Biogenerative Engineering to Combat Shortage of Organs and Bioapplicable Materials. *Regen Eng Transl Med*, 8(2), 173-199. <https://doi.org/10.1007/s40883-021-00219-w>
- PULEO, D.A.: NANJI, A. (1999). Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials*, 20(23-24), 2311-2321. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(99\)00160-x](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(99)00160-x)
- RAINES, A.L.:BERGER, M.B.:SCHWARTZ, Z.: y BOYAN, B.D. (2019). Osteoblasts grown on microroughened titanium surfaces regulate angiogenic growth factor production through specific integrin receptors. *Acta Biomater*, 97, 578-586. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.07.036>
- RATNER, B.D. (2019). Biomaterials: Been There, Done That, and Evolving into the Future. *Annu Rev Biomed Eng*, 21, 171-191. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-062117-120940>
- RAUCCI, M.G.:D'AMORA, U.:RONCA, A.: y AMBROSIO, L. (2020). Injectable Functional Biomaterials for Minimally Invasive Surgery. *Adv Healthc Mater*, 9(13), e2000349. <https://doi.org/10.1002/adhm.202000349>
- REN, L.:YANG, P.:WANG, Z.:ZHANG, J.:DING, C.: y SHANG, P. (2015). Biomechanical and biophysical environment of bone from the macroscopic to the pericellular and molecular level. *J Mech Behav Biomed Mater*, 50, 104-122. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.04.021>
- SAFAROVA, Y.:UMBAYEV, B.:HORTELANO, G.: y ASKAROVA, S. (2020). Mesenchymal stem cells modifications for enhanced bone targeting and bone regeneration. *Regen Med*, 15(4), 1579-1594. <https://doi.org/10.2217/rme-2019-0081>
- SARUWATARI, L.:AITA, H.:BUTZ, F.:NAKAMURA, H.K.:OUYANG, J.:YANG, Y.:CHIOU, W.A.: y OGAWA, T. (2005). Osteoblasts generate harder, stiffer, and more delamination-resistant mineralized tissue on titanium than on polystyrene, associated with distinct tissue micro- and

- ultrastructure. *J Bone Miner Res*, 20(11), 2002-2016.
<https://doi.org/10.1359/JBMR.050703>
- SCHWARTZ, Z.: BOYAN, B.D. (1994). Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *J Cell Biochem*, 56(3), 340-347.
<https://doi.org/10.1002/jcb.240560310>
- SCHWARTZ, Z.:LOHMANN, C.H.:OEFINGER, J.:BONEWALD, L.F.:DEAN, D.D.: y BOYAN, B.D. (1999). Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage. *Adv Dent Res*, 13, 38-48. <https://doi.org/10.1177/08959374990130011301>
- SEBBAG, E.:FELTEN, R.:SAGEZ, F.:SIBILIA, J.:DEVILLIERS, H.: y ARNAUD, L. (2019). The world-wide burden of musculoskeletal diseases: a systematic analysis of the World Health Organization Burden of Diseases Database. *Ann Rheum Dis*, 78(6), 844-848.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215142>
- SEIFERT, A.W.:DUNCAN, E.M.: y ZAYAS, R.M. (2023). Enduring questions in regenerative biology and the search for answers. *Commun Biol*, 6(1), 1139. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05505-7>
- SHARMA, R.:KUMAR, S.:BHAWNA:GUPTA, A.:DHEER, N.:JAIN, P.:SINGH, P.: y KUMAR, V. (2022). An Insight of Nanomaterials in Tissue Engineering from Fabrication to Applications. *Tissue Eng Regen Med*, 19(5), 927-960. <https://doi.org/10.1007/s13770-022-00459-z>
- SILLER, A.F.: WHYTE, M.P. (2018). Alkaline Phosphatase: Discovery and Naming of Our Favorite Enzyme. *J Bone Miner Res*, 33(2), 362-364.
<https://doi.org/10.1002/jbmr.3225>
- SOUZA, J.C.M.:SORDI, M.B.:KANAZAWA, M.:RAVINDRAN, S.:HENRIQUES, B.:SILVA, F.S.:APARICIO, C.: y COOPER, L.F. (2019). Nano-scale modification of titanium implant surfaces to enhance osseointegration. *Acta Biomater*, 94, 112-131.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.045>
- STOILLOV, M.:STOILLOV, L.:ENKLING, N.:STARK, H.:WINTER, J.:MARDER, M.: y KRAUS, D. (2022). Effects of Different Titanium Surface Treatments on Adhesion, Proliferation and Differentiation of Bone Cells: An In Vitro Study. *J Funct Biomater*, 13(3).
<https://doi.org/10.3390/jfb13030143>
- SUL, Y.T.:JOHANSSON, C.:WENNERBERG, A.:CHO, L.R.:CHANG, B.S.: y ALBREKTSSON, T. (2005). Optimum surface properties of oxidized implants for reinforcement of osseointegration: surface chemistry, oxide thickness, porosity, roughness, and crystal structure. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 20(3), 349-359.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15973946>
- TEITELBAUM, S.L.: ROSS, F.P. (2003). Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet*, 4(8), 638-649.
<https://doi.org/10.1038/nrg1122>
- TOLSTUNOV, L. (2019). Surgical Algorithm for Alveolar Bone Augmentation in Implant Dentistry. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, 31(2), 155-161.
<https://doi.org/10.1016/j.coms.2019.01.001>
- URBAN, I.A.:DI MARTINO, M.:RANGEL, R.:LATIMER, J.:FORSTER, A.: y TAVELLI, L. (2024). Inter-implant Papilla Reconstruction using the Iceberg and 'Garage' Connective Tissue Graft Technique. A Case

- Report and Technique Illustration. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 0(0), 1-15. <https://doi.org/10.11607/prd.7179>
- VARIOLA, F.:VETRONE, F.:RICHERT, L.:JEDRZEJOWSKI, P.:YI, J.H.:ZALZAL, S.:CLAIR, S.:SARKISSIAN, A.:PEREPICHKA, D.F.:WUEST, J.D.:ROSEI, F.: y NANJI, A. (2009). Improving biocompatibility of implantable metals by nanoscale modification of surfaces: an overview of strategies, fabrication methods, and challenges. *Small*, 5(9), 996-1006. <https://doi.org/10.1002/sml.200801186>
- VIMALRAJ, S. (2020). Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*, 754, 144855. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144855>
- WANG, X.:SCHWARTZ, Z.:GITTENS, R.A.:CHENG, A.:OLIVARES-NAVARRETE, R.:CHEN, H.: y BOYAN, B.D. (2015). Role of integrin alpha2 beta1 in mediating osteoblastic differentiation on three-dimensional titanium scaffolds with submicron-scale texture. *J Biomed Mater Res A*, 103(6), 1907-1918. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35323>
- WEI, J.:IGARASHI, T.:OKUMORI, N.:IGARASHI, T.:MAETANI, T.:LIU, B.: y YOSHINARI, M. (2009). Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts. *Biomed Mater*, 4(4), 045002. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/4/4/045002>
- WENNERBERG, A.: ALBREKTSSON, T. (2009). Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*, 20 Suppl 4, 172-184. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01775.x>
- XUE, T.:ATTARILAR, S.:LIU, S.:LIU, J.:SONG, X.:LI, L.:ZHAO, B.: y TANG, Y. (2020). Surface Modification Techniques of Titanium and its Alloys to Functionally Optimize Their Biomedical Properties: Thematic Review. *Front Bioeng Biotechnol*, 8, 603072. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.603072>
- ZHAO, G.:ZINGER, O.:SCHWARTZ, Z.:WIELAND, M.:LANDOLT, D.: y BOYAN, B.D. (2006). Osteoblast-like cells are sensitive to submicron-scale surface structure. *Clin Oral Implants Res*, 17(3), 258-264. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01195.x>
- ZHAO, G.:SCHWARTZ, Z.:WIELAND, M.:RUPP, F.:GEIS-GERSTORFER, J.:COCHRAN, D.L.: y BOYAN, B.D. (2005). High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A*, 74(1), 49-58. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30320>
- ZIVARI-GHADER, T.:DOLATI, S.:MEHDIZADEH, A.:DAVARAN, S.:RASHIDI, M.R.: y YOUSEFI, M. (2022). Recent scaffold-based tissue engineering approaches in premature ovarian failure treatment. *J Tissue Eng Regen Med*, 16(7), 605-620. <https://doi.org/10.1002/term.3306>
- ZOR, F.:SELEK, F.N.:ORLANDO, G.: y WILLIAMS, D.F. (2019). Biocompatibility in regenerative nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)*, 14(20), 2763-2775. <https://doi.org/10.2217/nnm-2019-0140>

ANEXOS

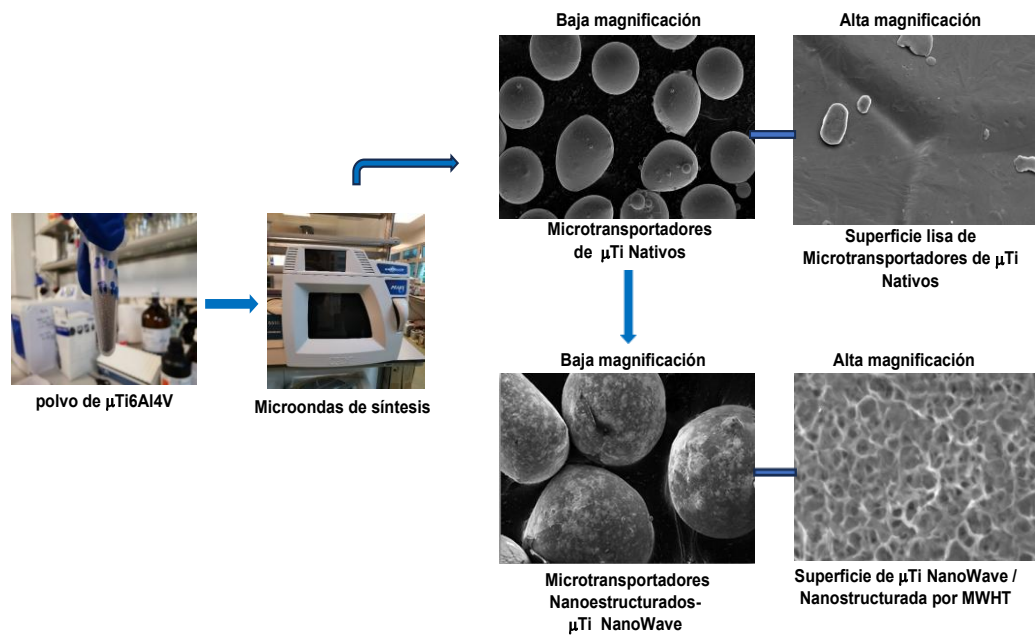


Fig. Complementaria 1. Resumen gráfico: Imágenes del polvo de μTi - nativo. original que posteriormente es nanoestructurado en horno de síntesis *MARS 6*, con resultado final de poros que imitan la estructura jerárquica del hueso.

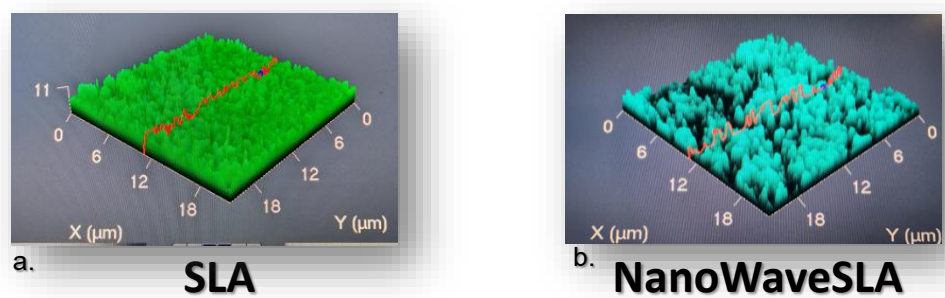
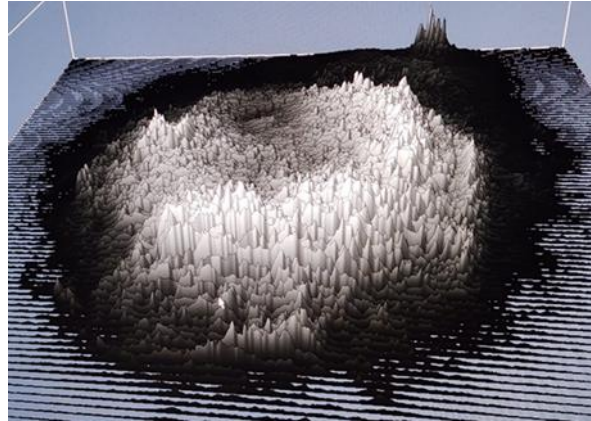


Fig. Complementaria 2. Imagen de Microscopía Confocal 3D de la superficie de platos de aleación de Titanio (Ti6Al4V). (a) SLA, (b) NanoWave-SLA



Complementaria 3. Imagen de microscopía confocal 3D de la superficie nanoestructurada del microtransportador μTi NanoWave.

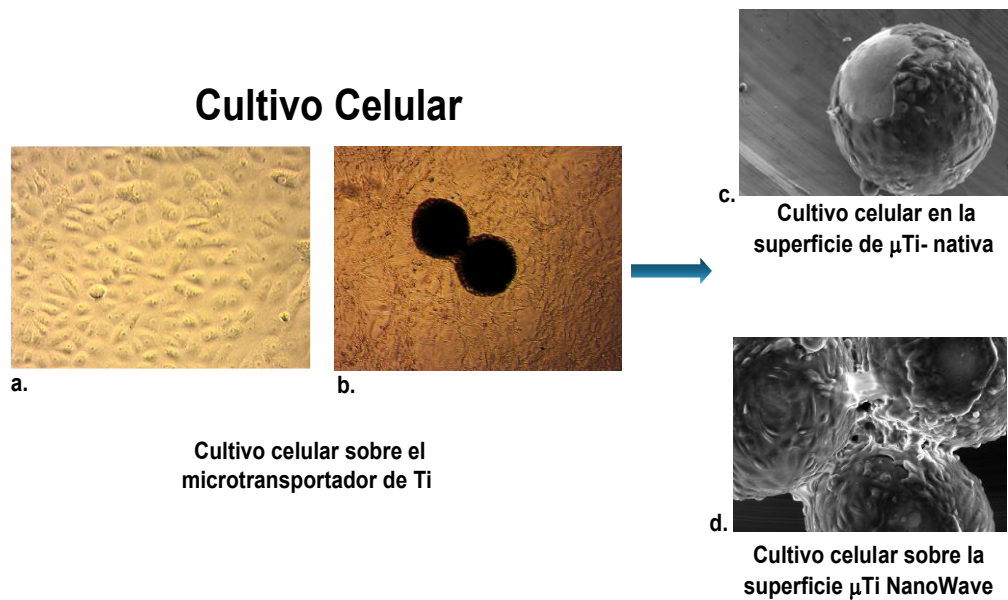


Fig. Complementaria 4. (a, b) Imágenes de cultivo de células VERO. Microscopía de luz invertida y (c,d) con Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental sobre μTi -Nativa y μTi -NanoWave respectivamente.

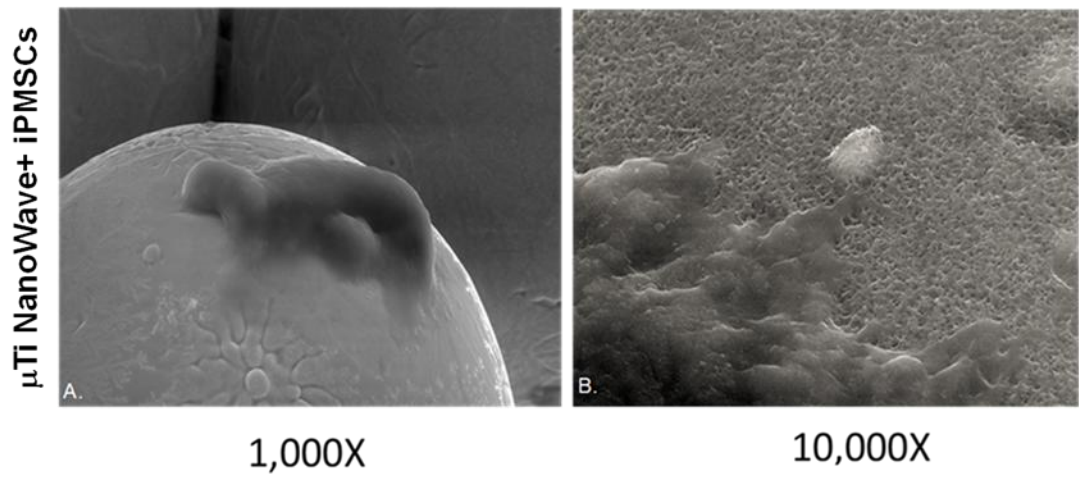


Fig. Complementaria 5. ESEM. (a, b). Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental de baja y alta magnificación del crecimiento y adhesión de iPMSCs sobre el microtransportador μ Ti NanoWave .