



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

**MODIFICACIÓN SUPERFICIAL DE ÓXIDO DE TITANIO EN ACERO INOXIDABLE PARA
MEJORAR SU BIOFUNCIONALIDAD**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

VICTOR IRAHUEN GARCÍA PÉREZ

TUTORA:

**DRA. ARGELIA ALMAGER FLORES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, DEPeI, UNAM**

COMITÉ TUTOR:

**DRA. SANDRA RODIL POSADA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES, UNAM.**

**DR. HIGINIO ARZATE,
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, DEPeI, UNAM**

Ciudad de México, Mayo de 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

RESUMEN	5
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
Antecedentes.....	8
Infecciones asociadas a dispositivos biomédicos.....	10
Respuesta celular a biomateriales (interacción superficie-célula).....	11
Películas delgadas y óxido de titanio.....	13
Planteamiento del problema y justificación.....	19
Hipótesis.....	20
OBJETIVOS	21
Objetivo general.....	21
Objetivos específicos.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Preparación de las muestras experimentales.....	22
Modificación superficial de la topografía de los sustratos.....	22
Depósito de las películas de óxido de titanio.....	23
Optimización de la adhesión película-sustrato.....	23
Caracterización de las muestras experimentales.....	25
Análisis de la rugosidad media (Ra) y topografía.....	25
Análisis de mojabilidad.....	25
Análisis de cristalinidad.....	26
Análisis de la composición química superficial.....	26
Evaluaciones microbiológicas.....	27
Ensayos de adhesión bacteriana.....	28
Ensayos de formación de biopelículas.....	29
Viabilidad bacteriana.....	29
Hibridaciones DNA-DNA.....	30
Microscopía confocal.....	33
Ensayos biológicos con células mesenquimales humanas (hBM-MSC's)	34

Ensayos de adhesión y proliferación celular.....	34
Inmunoensayos de función y diferenciación celular.....	35
Análisis de la producción proteica en el microambiente generado por las hMSC's.....	36
Expresión génica de integrinas y marcadores de diferenciación osteoblástica en hBM-MSCs.....	38
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS.....	40
RESULTADOS.....	41
Muestras experimentales.....	41
Modificación superficial de la topografía de los sustratos.....	41
Depósito de las películas de óxido de titanio.....	42
Optimización y análisis de adhesión película-sustrato.....	43
Caracterización de las muestras experimentales.....	47
Análisis de la rugosidad media (Ra) y topografía	47
Análisis de la mojabilidad.....	50
Análisis de cristalinidad.....	51
Análisis de la composición química superficial.....	51
Evaluaciones microbiológicas.....	54
Ensayos de adhesión bacteriana.....	54
Ensayos de formación de biopelículas.....	56
Hibridaciones DNA-DNA.....	63
Microscopía confocal.....	69
Ensayos biológicos con células mesenquimales humanas derivadas de médula ósea (hMSC's)	73
Ensayos de adhesión y proliferación celular.....	73
Inmunoensayos de función y diferenciación celular.....	74
Análisis de la producción proteica en el microambiente generado por las hMSC's.....	76
Expresión génica de integrinas y marcadores de diferenciación osteoblástica en las hMSC's.....	79
DISCUSIÓN.....	85

CONCLUSIONES.....	96
BIBLIOGRAFÍA.....	98

RESUMEN

Los dispositivos implantables enfrentan dos retos para su aplicación clínica: infecciones asociadas a dispositivos y falta de integración tisular. Los dispositivos a base de titanio (Ti) son más usados en comparación con el acero inoxidable (SS) grado médico, principalmente por sus propiedades de superficie que inducen una mejor integración ósea y menor probabilidad de infección. La funcionalización superficial es una estrategia, física y/o química, que permite regular ambas propiedades induciendo una respuesta celular específica.

Objetivo: Funcionalizar superficies de SS con nanorecubrimientos de óxido de titanio amorfo (ss-aTiO). Incrementar la adhesión del nanorecubrimiento a la superficies de SS. Realizar caracterización química, topográfica, cristalina y de rugosidad. Evaluar la diferenciación de células progenitoras mesenquimales a través de marcadores osteoblásticos. Evaluar el crecimiento y formación de la biopelículas bacterianas asociadas a infecciones en dispositivos orales y ortopédicos. Metodología: El diseño micro-estructural de las superficies se realizó mediante un protocolo de arenado a través de macropartículas de dióxido de silicio (SiO₂) y grabado ácido con ácido sulfúrico H₂SO₄. Mientras tanto el nanorecubrimiento de a-TiO₂ se deposito a través de magnetron sputtering. La adhesión del nanorecubrimiento se analizo mediante la prueba de rayado. La proliferación celular se analizó mediante ensayo por fluorescencia de DNA. El marcador osteoblástico RUNX2 expresado por células mesenquimales fueron analizados mediante qPCR. Proteínas asociadas a diferenciación osteoblastica como osteocalcina y fosfatasa alcalina a través de inmunoensayo. Factores de crecimiento y proteínas asociadas a regeneración ósea como proteínas morfogénicas ósea 2 (BMP-2) osteoprotegerina y factor de crecimiento vasculo endotelial (VEGF), asociado a crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, fueron evaluados a través de ELISA. La adhesión bacteriana y formación biopelículas asociado a infecciones en dispositivos ortopédicos fue evaluada utilizando *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. El modelo para evaluar infecciones en dispositivos orales consistió en un co-cultivo de nueve especies

anaerobias, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotipo b, *Actinomyces israelii*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Streptococcus sanguinis*), en ambos casos la adhesión y formación de la biopelículas fue evaluada mediante el ensayo XTT y microscopia confocal. Superficies de Ti y SS fueron empleadas como comparativos. Resultados: Se obtuvieron superficies micro-estructuradas, a través del protocolo de arenado-grabado ácido, con una rugosidad media aproximada de $R_a \approx 2.5 \mu\text{m}$. Las superficies de SS funcionalizadas con el nano-recubrimiento de $\alpha\text{-TiO}_2$ con un espesor aproximado de 75 nm. La adhesión del nanorecubrimiento se logro incrementar hasta 19 newtons. El regulador génico osteoblástico RUNX2 fue altamente expresado en superficies funcionalizadas con $\alpha\text{-TiO}_2$ (ss- αTiO), así como la producción de proteínas osteocalcina y fosfatasa alcalina asociadas a función osteoblastica. Una significativa producción de factores de crecimiento asociados a regeneración ósea, como BMP-2, OPG y VEGF, fueron observados en las superficies funcionalizadas con $\alpha\text{-TiO}_2$ comparado con superficies de SS. La adhesión bacteriana y formación de biopelículas de especies de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* fue menor en comparación con superficies Titanio, mientras en la evaluación con el co-cultivo de nueve especies orales se observó una reducción significativa reducida a la comparación con SS.

Este estudio muestra que superficies micro-estructuradas de SS funcionalizadas con nano-recubrimientos de $\alpha\text{-TiO}_2$ dirigen las células mesenquimales hacia un linaje osteoblástico, además de inducir la producción de factores de crecimiento asociados a regeneración ósea. Aún más la adhesión bacteriana y formación de la biopelícula fue reducida en las superficies funcionalizadas.

ABSTRACT

Introduction: Biomaterial implants and devices faces two challenges with respect to their clinical use; a biomaterial associated infection and a lack of native tissue integration. Titanium (Ti) implant devices are more Applied in clinical settings than stainless steel (SS), mainly by surface properties that induce a better integration and lower rate infection. Meanwhile device surface functionalization, chemical or physical, can modify and induce a specific cell response in implanted biomaterials. Objective: To functionalized SS surfaces with amorphous titanium oxide (ss-aTiO) nanocoatings and evaluate osteoblastic differentiation using Mesenchymal stem cells and the biofilm formation using two bacterial models. Material and methods: SS microstructured surfaces were designed with sandblasting-acid etch protocol. The amorphous TiO₂ nanocoating was applied trough magnetron sputtering in SS substrates (ss-aTiO). Complete surface characterization was made. Nanocoating-surface adhesión was mesaured with scratch test. Mesenchymal stem cells were used and osteoblastic markers were measured trough qPCR. Growth factors and protein production associated with bone regeneration were assessed trogh immunoassay protocl. Bacterial adhesión and biofilm formation was assesed with XTT assay and confocal laser microscopy. Pure Ti and SS were used as comparative. Results: Microstructured stainless steel surfaces (Ra= 2.5 um) biofunctionalized with a-TiO₂ coating (75 nm tickness) were designed. Thin film adhesión reached 19 newtons. Conclusions: Osteoblastic gene regulators were highly expressed and higher production of growth factors associated with bone regeneration were found in ss-aTiO surfaces compared with SS. Bacterial adhesión and biofilm formation of Sthaphylococcus spp., was lower on the functionalized surfaces compared with titanium surfaces, while using oral bacteria, significantly reduced adhesión and biofilm formation was observed in functionalized (ss-aTiO) surfaces and titanium (Ti) surfacaces in comparison with stainless steel (SS) surfaces.

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

Un biomaterial es una sustancia o compuesto que ha sido diseñado para formar, individualmente o como parte de un sistema biológico complejo, y es empleada para dirigir, a través de la interacción con los componentes de los sistemas vivos, el curso terapéutico o diagnóstico en medicina humana o veterinaria (Williams, 2009).

Aunque los tejidos y órganos del cuerpo pueden funcionar durante toda la vida del ser humano, estos pueden sufrir procesos destructivos que incluyen fracturas, infecciones y cáncer, causando además síntomas como dolor y pérdida de la función. Dentro de estas circunstancias es posible remover el tejido dañado y reemplazarlo por un material sintético o biomaterial para sustituir el tejido u órgano dañado, devolviendo en la medida de lo posible la función que cumplía dentro del organismo del paciente. Los dispositivos biomédicos implantables han sido ampliamente utilizados por más de 50 años y de acuerdo al NIH (National Institute of Health) se estima que entre el 8-10% de la población Norteamericana (20-25 millones de personas) portan un dispositivo biomédico (NIH, 2010). Entre los biomateriales más empleados en medicina encontramos tres tipos: cerámicos, polímeros y metales.

De manera tradicional los cerámicos han sido usados en el área dental como materiales restaurativos, como coronas, cementos y dentaduras. Sin embargo, su pobre resistencia a la fractura limita sus aplicaciones en comparación con los metales y polímeros. Otros usos de estos materiales cerámicos incluyen el

recubrimiento de prótesis articulares y sustitutos óseos en ortopedia (Williams et al., 1990).

Por otra parte, las aplicaciones de los polímeros empleados en el área biomédica incluyen un amplio rango de usos que van desde prótesis articulares, faciales, tubos traqueales, componentes cardíacos y gastrointestinales además de adhesivos, selladores, suturas y cementos óseos (Agrawal, 1998).

Los metales son ampliamente usados como implantes para soportar carga, por tanto, una de las aplicaciones más comunes involucra al área ortopédica. Estas aplicaciones van desde simples alambres, tornillos y placas de fijación, hasta prótesis articulares de cadera, rodilla, hombro, etc. Además, también se utilizan en el área de cirugía cardiovascular, cirugía cráneo-facial y oral como materiales de restauración e implantes dentales (Donachie, 1998).

Aunque todos los dispositivos biomédicos benefician de manera importante la calidad de vida de los pacientes, es necesario reconocer que estos aditamentos están sujetos a fallas, por ello, resulta importante el desarrollo continuo de nuevos materiales que mejoren su vida útil, desempeño o funcionamiento.

Específicamente para los dispositivos biomédicos empleados en el área dental, cráneo-facial y ortopédica, se requiere, además de un desempeño mecánico adecuado, una interacción biológica óptima que se puede entender como la integración adecuada de los tejidos circundantes al dispositivo en particular el tejido óseo (oseointegración), así como la disminución en la colonización bacteriana al dispositivo con el fin de prevenir infecciones en los tejidos circundantes (infecciones asociadas a dispositivos).

INFECCIONES ASOCIADAS A DISPOSITIVOS BIOMÉDICOS

Las infecciones bacterianas son una importante secuela en el manejo de heridas tanto traumáticas como quirúrgicas, incrementando por consecuencia, la morbilidad y mortalidad en los pacientes debido a la falta de efectividad total de la técnica aséptica preventiva y la terapéutica antimicrobiana (Ryan, 2007). La búsqueda de biomateriales que puedan prevenir o evitar las infecciones con relación al acto quirúrgico es una necesidad imperiosa, si uno considera que las infecciones asociadas a dispositivos ocurre aproximadamente en 250,000 pacientes anualmente, creando un gasto aproximado de 2 billones de dólares a la industria de salud de los Estados Unidos (Darouiche, 2004). En el desarrollo de biomateriales con características enfocadas a prevenir o tratar infecciones se debe tomar en cuenta que las poblaciones bacterianas no son estáticas y que frecuentemente, las infecciones asociadas a dispositivos biomédicos son consecuencia de la formación de biopelículas sobre su superficie (Costerton et al., 1999).

Una biopelícula es una formación de agregados bacterianos, usualmente existentes como comunidades asociadas, que se adhieren a una variedad de superficies naturales o artificiales embebidas en una matriz de exopolisacáridos, que contiene una concentración suficiente de nutrientes para sostener las necesidades metabólicas de la microbiota que la conforma (Costerton et al., 1994). Debido a esta arquitectura específica y a las interacciones que existen entre las especies que forman la biopelícula, lo cual disminuye la difusión de moléculas al interior de la biopelícula y transferencia de genes de resistencia entre las especies

bacterianas, se ha observado un incremento en la tolerancia a los antimicrobianos y resistencia al sistema inmune del huésped, si se compara con las bacterias libres o en estado planctónico (Costerton, 2005; Patel, 2005; Vincent, 2003)

Entre los principales dispositivos de uso biomédico que pueden ser afectados por infecciones asociadas a las biopelículas se encuentran catéteres intravenosos, válvulas cardíacas, dispositivos de asistencia ventricular, extensores coronarios, ortoprótesis, dispositivos de fijación ósea, implantes de mama, cocleares, intraoculares e implantes dentales y ortopédicos (Darouiche, 2001). Las tasas de infección en estos aditamentos van desde el 20-50% para dispositivos de asistencia ventricular, de un 10-30% para catéteres urinarios, del 5-10% para dispositivos de fijación ósea e implantes dentales, hasta un 3-8% para catéteres venosos centrales y de 1-3% para prótesis articulares. (Darouiche, 2004)

RESPUESTA CELULAR A BIOMATERIALES (INTERACCIÓN SUPERFICIE-CÉLULA)

Se ha descrito que la integración exitosa del implante o dispositivo depende del resultado entre la competencia entre las bacterias y las células tisulares (Gristina, 1987). Si esta competencia es ganada por las células, el biomaterial será cubierto por una capa celular y será menos vulnerable a la biopelícula bacteriana. Por otra parte, si esta competencia es ganada por las bacterias, la superficie será cubierta por la biopelícula bacteriana y las funciones celulares serán afectadas por los factores de virulencia liberados en la biopelícula (Subbiahdoss et al., 2009)

Por tanto en el caso de los implantes endo-óseos, la integración de estos con el tejido óseo circundante, es un proceso crítico para la regeneración ósea en

el área dental y ortopédica. La necesidad de acelerar y mejorar la oseointegración particularmente para aquellos pacientes en los que la salud ósea está comprometida por la edad o enfermedad, ha impulsado el desarrollo e investigación en el área ortopédica, craneofacial y dental.

Trabajos previos han demostrado que las características de superficie de los implantes tienen una influencia directa en la respuesta tisular o biológica afectando la adsorción proteica y modulando así la proliferación y diferenciación celular. Se ha reportado que características superficiales como rugosidad, química y energía libre se han reportado que tienen una influencia significativa en la adhesión y diferenciación celular, así como en la producción de moléculas o factores que promueven el crecimiento óseo y la oseointegración (Buser et al., 2004; Martin et al., 1995; Sul et al., 2005; Zhao et al., 2005).

Las modificaciones superficiales para mejorar la óseo integración en implantes metálicos se ha basado en imitar las características de remodelación del hueso. Durante la remodelación ósea, la resorción por los osteoclastos genera una microestructura con dimensiones micrométricas; alrededor de 100 μm en diámetro y 50 μm en profundidad, mientras que en la periferia de la zona afectada por los osteoclastos se forma una topografía a escala sub-micrométrica y finalmente las fibras de colágeno expuestas en la superficie producen topografías en la escala nano-métrica (Boyan et al., 2003; Chambers et al., 1984; Prodanov et al., 2013; Rho et al., 1998)

Diferentes estudios realizados *in vitro* e *in vivo* han mostrado que las superficies con escala micrométricas y sub-micrométricas ($\sim 2\text{--}4 \mu\text{m}$), comparables a las generadas por el proceso de resorción ósea y dimensión celular, promueven

la diferenciación osteoblástica y la producción de factores locales angiogénicos, mejorando de esta manera la tasa de éxito de oseointegración clínica (Buser et al., 1991; Cochran, 1999; Cochran et al., 2002; Raines et al., 2010)

PELÍCULAS DELGADAS Y ÓXIDO DE TITANIO

Los biomateriales necesitan cumplir con dos características para su potencial uso clínico; por una parte, deben responder a las necesidades mecánicas y funcionales del tejido a sustituir, las cuales están básicamente relacionadas con las propiedades másicas del material y por otra parte, deben presentar una interacción óptima con los sistemas biológicos, la cual es dirigida principalmente por las características de superficie de los materiales.

Tomando esto en cuenta, es difícil encontrar materiales que satisfagan completamente estas dos características: función y biocompatibilidad. Es por esto que la modificación superficial de un material que satisface las necesidades mecánicas y de funcionalidad a través del depósito de un recubrimiento biocompatible que pueda dirigir y mejorar la respuesta biológica, es una vía promisorio para el desarrollo de nuevos materiales biofuncionales.

Los metales son empleados generalmente para estabilizar las fracturas, reemplazar articulaciones y órganos dentarios así como extensores (stents) coronarios en patologías cardiovasculares. Generalmente la biocompatibilidad en los materiales metálicos es principalmente determinada por la resistencia a la corrosión, tomando en cuenta que se ha observado que la liberación de iones

metálicos puede causar inflamación severa y algunas reacciones alérgicas en bajas concentraciones (Homsy, 1970; Thomas et al., 2011; Zitter and Plenk, 1987)

Se ha observado que dentro del grupo de los metales utilizados como biomateriales en implantes dentales y ortopédicos, el titanio (Ti) es el que exhibe una mejor biocompatibilidad en comparación con las aleaciones de acero inoxidable y de cromo (Williams, 2001). Respecto a los experimentos *in vitro*, diferentes tipos celulares han mostrado una adecuada biocompatibilidad, adhesión celular y proliferación en las superficies de Ti generalmente dada por su capa de óxido pasiva formada por el contacto con el ambiente. El titanio es un metal relativamente inerte y resistente a la corrosión debido a que en contacto con el medio ambiente forma de manera inmediata una capa pasiva de óxido de titanio (de aprox. 5 nm de espesor). En el titanio, se ha observado que la película pasiva es en gran parte responsable de la adecuada respuesta biológica de los implantes basados en este material (Giavaresi et al., 2003; Karpagavalli et al., 2007; Rossi et al., 2008).

Por otra parte, se ha reportado que la corrosión del titanio es similar al acero inoxidable 316 en soluciones no proteicas, sin embargo, el acero inoxidable siempre exhibe una mayor reactividad química en cultivos celulares y en sistemas *in vivo* (Steinemann, 1998). Esto puede ser debido a que las soluciones proteicas aceleran la velocidad de corrosión del acero inoxidable en comparación a las soluciones salinas (Clark and Williams, 1982). Por otra parte, el titanio no se observa esta corrosión acelerada en soluciones o medios biológicos (Hanawa, 2004).

Dentro de las modificaciones superficiales a las que han sido sujetos los metales, principalmente el titanio, para su aplicación en el área biomédica, se encuentran las que alteran la topografía y las modificaciones químicas.

Se ha estudiado el efecto en la respuesta biológica de las modificaciones superficiales topográficas en los materiales. El efecto en la escala milimétrica sólo tiene una influencia mecánica en la oseointegración, mientras que en la escala micrométrica se ha determinado por numerosos estudios que la rugosidad media en el rango de $\sim 2-4 \mu\text{m}$ tiene un efecto favorable en la respuesta biológica *in vitro* así como en la oseointegración *in vivo* (Bachle and Kohal, 2004), más aun se ha observado que la topografía a nano escala en metales también puede tener efecto en la respuesta biológica (Gittens et al., 2011) (Prodanov et al., 2013)

Las modificaciones químicas reportadas para el titanio, se han centrado principalmente en la modificación del titanio con cerámicas y vidrios bioactivos para lograr una unión íntima entre el hueso y el implante (Cooke, 1992; Meffert, 1999; Narayanan et al., 2008). Este tipo de recubrimientos generalmente producen una integración ósea adecuada, sin embargo estos recubrimientos normalmente fallan por la adhesión al metal y su resistencia a la fractura *per se*.

Otro tipo de recubrimientos que se ha planteado para mejorar la funcionalidad de los implantes basados en metal se encuentran los de óxido de niobio, estaño y zirconio con propiedades biocompatibles (Acevedo-Morantes et al., 2012; Andreiotelli et al., 2009; Eisenbarth et al., 2006; Lappalainen and Santavirta, 2005) y unos recubrimientos con especial interés en el área ortopédica son los de carbono-similar a diamante (Antunes et al., 2013; Hinuber et al., 2010; Roy and Lee, 2007).

Por otra parte, en el área biomédica las modificaciones superficiales en metales con películas delgadas de óxido de titanio a través del método de *sputtering* ha sido poco estudiada en comparación a otros métodos. Este método, tiene un potencial en área biomédica por ser un proceso escalable, rápido y reproducible. La tabla 1 muestra los estudios en los que ha sido evaluada sistemáticamente la biofuncionalidad o multifuncionalidad (respuesta biológica dirigida de células tisulares y biopelícula bacterianas) y el desempeño mecánico del nano recubrimiento (adhesión película-sustrato), como es de observarse, estos estudios, aún son escasos.

Las propiedades de la película o recubrimiento son diferentes a las del material en bulto o sustrato, generalmente se asume que un recubrimiento es una película con un grosor de al menos 1 μm , por otra parte los recubrimientos con espesores debajo del rango de la escala micrométrica ($< 1 \mu\text{m}$) son conocidos como películas delgadas o nano-recubrimientos. De igual manera se ha observado que las películas delgadas no modifican las propiedades topográficas y mecánicas del material en bulto (Choi et al., 2013; Venables, 2000)

En cualquiera de estas propuestas un punto crítico para su aplicación es lograr una adhesión adecuada entre el sustrato y el recubrimiento, donde por adecuado se entiende la habilidad del recubrimiento para mantenerse unido sobre el sustrato en condiciones de la inserción quirúrgica, de funcionamiento y sin degradación en el tiempo del dispositivo biomédico. En el área biomédica las películas de óxido de titanio son empleadas generalmente a espesores nanométricos, al estar expuestas en ambientes adversos la resistencia al desgaste o rayado es necesario para su estabilidad mecánica y durabilidad. Dentro de los

diferentes procesos para el depósito de películas de óxido de titanio la técnica de *sputtering* es empleada principalmente por producir un recubrimiento adherente y uniforme en áreas extensas con un mejor control estequiométrico.

Haciendo un análisis de la literatura en donde se ha utilizado el método de *sputtering* para depositar películas de óxido de titanio (Tabla 1), se puede observar que la mayoría de estos estudios se han enfocado en el análisis de ciertas características biológicas, bioactivas, ópticas, mecánicas y estructurales de estos recubrimientos. Sin embargo, los estudios que se centran en las propiedades de adhesión, desgaste o resistencia al rayado de las películas de óxido de titanio son muy escasos y hasta donde sabemos sólo se ha reportado la adhesión de las películas de TiO generadas por otros métodos diferentes al método de *sputtering* (Chen, 2006; Chung, 2009; Hasan, 2010; Jaworski, 2008; Kuo, 2002; Lackner, 2004).

Por lo antes mencionado una de las estrategias para incrementar la biofuncionalidad de los implantes a base de acero inoxidable son las modificaciones superficiales a través del texturizado a escala micrométrica y nano recubrimientos de óxido de titanio, lo cual es el propósito principal de este estudio.

Tabla 1.- Resumen de estudios experimentales en el área biomédica de las modificaciones superficiales de óxido de titanio a través del método de sputtering.

Autor y Año	Recubrimiento	Sustrato	Método de Depósito	Características Biológicas y Estructurales Analizadas
Ong et al., 1995)	HA & a-TiO	Ti	Ion beam sputtering (IBS)	Adhesión celular y adhesión de proteínas <i>in vitro</i>
Pan et al., 1997)	TiO ₂	SS & Ti	Ion beam sputtering	Resistencia a la corrosión <i>in vitro</i>
Huang et al., 2003)	TiO ₂	Silicio & cp-Ti	Plasma inmersión & sputtering	Hemocompatibilidad <i>in vitro</i> e implantación en caninos
Zhou et al., 2007)	Titania	Silicio	Magnetron sputtering (MS)	Bioactividad (crecimiento HA)
He et al., 2008)	TiO (amorfo-rutilo-anatasa)	Silicio	DC-Reactive MS	Adhesión, migración, proliferación y diferenciación en osteoblastos
Lindgren et al., 2009)	c-TiO	Ti	Magnetron sputtering	Bioactividad
Ge et al., 2009)	TiO-Laminina	No especifica	MS-(NaOH-aminosilano)	Adhesión, migración y proliferación (HUVEC's)
Zhang et al., 2009)	TiO dopado La(2)O(3)	Silicio	Reactive-MS	Adhesión plaquetaria
Shah et al., 2011)	TiO (foto)	SS (brackets)	Magnetron sputtering	Efecto antibacterial (<i>L. acidophilus</i>)
Lilja et al., 2011)	c-TiO (anatasa & rutilo)	SS 316L & cp-Ti	Sputtering	Bioactividad
Kuwabara et al., 2012)	TiO-HA	cp-Ti	Dual Sputtering deposition	Adhesión y migración (BMDC's de ratón) e integración <i>in vivo</i>
Hrkac et al., 2013)	Ti-Ag	Polioximetileno	Co-Magnetron sputtering	Citotoxicidad y efecto antibacterial
Cao et al., 2013)	TiO(N)	SS-Brackets	Magnetron sputtering	Efecto antibacterial en especies selectas
Szymanowski, H et. al., 2005)	TiO	Vidrio & algodón	RF-PECVD	Efecto antibacterial en <i>E. coli</i> (luz UV-C)
Siva, RMD et. al., 2005)	O & N en α -Ti y TiO (rutilo)	SS 316L	MS (Ti) and Thermal oxidation (TiO)	Tribológicas, adhesión película-sustrato y corrosión
Zhou, W et. al., 2005)	TiO (amorfo)	Vidrio	DC - Reactive MS	Adhesión, migración y proliferación de células epiteliales
Jeyachandran, YL et. al., 2006)	Ti & TiN & HA	No especifica	MS and Sol-Gel	Adhesión bacteriana (<i>P. gingivalis</i>)
Shao, H et. al., 2010)	TiO	CG/NG Titanio	Reactive MS	Microestructura, adhesión de interface y hemocompatibilidad
Song, DH et. al., 2011)	Ag-TiO nanocomposite	cp-Ti	DC- Magnetron Sputtering	Propiedades mecánicas y antibacteriales (<i>S. aureus</i>)
Sedire, S et. al., 2014)	c-TiN	cp-Ti	DC- Magnetron Sputtering	Resistencia a la corrosión

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Actualmente el acero inoxidable es poco utilizado como material para implantes en el área médica y odontológica. Esto se debe en gran parte a estudios que han reportado que existe una mejor interacción superficial del titanio y sus aleaciones con los sistemas biológicos.

México no cuenta con una industria que produzca implantes dentales u ortopédicos de Ti, todos los implantes que son colocados en nuestro país son de fabricación extranjera (Gambogi, 2012), lo que genera un costo adicional para los pacientes que requieren el uso de alguno de estos aditamentos. Por otra parte, México se encuentra ubicado como el décimo tercer país con mayor producción de acero a nivel mundial (WSA, 2012). Considerando esta situación, en este trabajo proponemos realizar una modificación superficial en sustratos de acero inoxidable de grado médico mediante el depósito de películas de óxido de titanio utilizando la técnica de *magnetron sputtering*, con la finalidad de mejorar la respuesta biológica del acero inoxidable, siendo nuestra meta mejorar o por lo menos igualar la respuesta biológica del titanio y sus aleaciones.

Este proyecto contempla el depósito, la caracterización y la optimización de la adhesión película-sustrato de un nano-recubrimiento de óxido de titanio amorfoso sobre sustratos de acero inoxidable de grado médico, así como la evaluación de la respuesta biológica de estas películas mediante ensayos empleando células mesenquimales humanas y especies bacterianas asociadas a infecciones de dispositivos biomédicos.

Esta propuesta podría brindar una alternativa en materia de salud pública para el país, ya que se podría incrementar el uso de implantes dentales y ortopédicos basados en acero inoxidable con propiedades biológicas y funcionales similares a las del Titanio, así como cualquier otro dispositivo micro estructurado.

HIPÓTESIS

El depósito de una película de óxido de titanio amorfo sobre acero inoxidable mejora su biofuncionalidad para su uso en implantes médicos y odontológicos

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la biofuncionalidad de recubrimientos de óxido de titanio amorfo depositados sobre sustratos de acero inoxidable de grado médico, con el fin de incrementar la vida útil de implantes ortopédicos basados en acero inoxidable.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obtener sustratos de acero inoxidable (SS) con rugosidad aproximada de 3 μm .
- b) Establecer las condiciones de depósito óptimas de películas de óxido de titanio (TiO_2) sobre el acero utilizando un sistema de depósito por evaporación física (magnetron sputtering).
- c) Optimizar las propiedades de adhesión película-sustrato.
- d) Depositar películas de TiO_2 sobre los sustratos de acero con rugosidad y adhesión optimizadas.
- e) Caracterizar las muestras experimentales (ss-aTiO) en su componente físico (topografía) y químico.
- f) Evaluar la adhesión bacteriana y formación de biopelículas sobre las muestras experimentales, empleando bacterias aeróbicas y anaeróbicas involucradas en infecciones asociadas a dispositivos ortopédicos y dentales, respectivamente.
- g) Evaluar los procesos de adhesión, proliferación y diferenciación celular sobre las superficies experimentales empleando células humanas mesenquimales derivadas de médula ósea (hBM-MSCs).

MATERIALES Y MÉTODOS

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS EXPERIMENTALES

MODIFICACIÓN SUPERFICIAL TOPOGRÁFICA

Para lograr el diseño topográfico de rugosidad media en las muestras experimentales, se utilizaron dos métodos:

- Arenado. Este método se basa principalmente en realizar patrones superficiales a través del empleo de energía mecánica. Este suministro de energía es dado por partículas abrasivas impulsadas por aire presurizado que impactan contra las superficies blanco, desprendiendo de esta manera material de nuestro material substrato y generando así una rugosidad principalmente en la escala micrométrica.

- Grabado ácido. Este método se utiliza para lograr una rugosidad sub-micrométrica en la superficie tratada. El grabado ácido es un método sustractivo para texturizar metales como el titanio y el acero inoxidable. El proceso de grabado ácido genera corrosión en los dispositivos metálicos, en relación al tiempo y al tipo de ácido, creando principalmente rugosidad en la escala sub-micrométrica. Una de las ventajas de usar el grabado ácido posterior al arenado es la remoción de partículas adheridas a la superficie generadas por este. Los ácidos más comunes para grabado de metales son el clorhídrico, sulfúrico y cítrico.

En este estudio empleamos la técnica de arenado hasta lograr un patrón homogéneo visualmente en toda la superficie empleando óxido de aluminio y dióxido de silicio con diferentes tamaños de partícula $\sim 30\mu\text{m}$, $\sim 110\mu\text{m}$ y $\sim 500\mu\text{m}$, respectivamente. Para el caso de la modificación sub-micrométrica, ésta se logró a

través de la técnica de grabado ácido con ácido sulfúrico durante tres periodos de tiempo; 30, 60 y 90 segundos.

DEPÓSITO DE LAS PELÍCULAS DE ÓXIDO DE TITANIO

El sistema de evaporación catódica (magnetron sputtering) se emplea para generar películas delgadas. Este se basa en un ambiente al alto vacío o reducido, una diferencia de potencial y un flujo de átomos (ionizados) a través de este. En este ambiente se generan partículas de alta energía (Ar^+) que colisionan y desprenden átomos de un material blanco que viajan desde el material blanco hacia el sustrato a recubrir, dependiendo en parte el crecimiento de la película por sitios energéticamente favorables en el sustrato.

Las películas delgadas de óxido de titanio (TiO_2) fueron depositadas sobre los sustratos de SS mediante el sistema de evaporación catódica (magnetron sputtering) de forma reactiva, utilizando un blanco de titanio de alta pureza (99.99%) y trabajando en atmósfera de argón y oxígeno (Ar/O 8:2) empleando una potencia de 200 W y con un total de 1800 segundos de tiempo de depósito a temperatura ambiente.

OPTIMIZACIÓN DE LA ADHESIÓN PELÍCULA-SUSTRATO

Con el objetivo de incrementar la adhesión película-sustrato se emplearon dos estrategias durante el depósito. La primera estrategia consistió en depositar una película buffer de titanio puro previo al depósito de óxido de titanio. Esta estrategia se utilizó para obtener una película de titanio próxima al sustrato de acero inoxidable que podría favorecer la adhesión entre los metales titanio y acero,

ya que la película al estar basada de óxido de titanio es de naturaleza más afín al metal de titanio generado en la capa buffer y basada en un metal como el acero.

La segunda estrategia estuvo basada en el hecho de que la difusión es un proceso activado térmicamente, por tanto al modificar la temperatura del sustrato durante el depósito, este es un factor que define el crecimiento de la película delgada o nanorecubrimiento. Basados en esto, en el estudio modificamos la temperatura del sustrato durante el depósito: temperatura ambiente (TA), y una temperatura de 100° C y una temperatura de 250° C para favorecer la adhesión del nanorecubrimiento de óxido de titanio al sustrato.

Después de que de las películas delgadas de óxido de titanio fueron depositadas sobre el acero inoxidable 316L, con sus respectivas variantes para optimizar la adhesión película-sustrato, fueron evaluadas por la técnica de rayado o prueba de scratch. Este método es empleado para medir la adhesión/película sustrato, el cual en su configuración normal una punta de acero es desplazada a través de la superficie con el recubrimiento bajo una carga progresiva hasta que ocurre una falla en el mismo debido a una carga específica o carga crítica (CL). Las diferentes fallas que pueden ocurrir incluyen desprendimiento de la película, fallas a través de la película, deformación plástica y fallas en el sustrato o películas. El análisis posterior de las siguientes fallas se puede realizar por microscopía óptica, electrónica de barrido o por emisión acústica.

CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS EXPERIMENTALES

Análisis de la rugosidad media (Ra)

Este método se basa en el movimiento vertical una punta (diamante) en contacto con una muestra o superficies la cual se desplaza lateralmente a una distancia y fuerza específica. Por perfilometría se pueden obtener mediciones de patrones verticales en el rango de 10 nm hasta 1 mm. En este estudio, la rugosidad media (Ra) de la superficies se determinó a través del Perfilómetro (Dektak II A) en el modo de contacto, se analizó en cada una de las superficies un área de 500 por 500 μm y cada una de estas mediciones se realizó por triplicado.

Análisis de hidrofiliidad (mojabilidad)

Esta técnica permite determinar de manera indirecta la tensión superficial de sólidos, este fenómeno es debido a los enlaces intermoleculares del líquido y los enlaces insatisfechos en la superficie del material. La técnica proporciona principalmente información de la energía superficial midiendo la interfase líquido-sólido la cual puede ser analizada usando un goniómetro. El ángulo de contacto caracteriza la mojabilidad de una superficie. Ángulos de contacto mayores de 90° generados en la superficie, harán que esta tenga pobre mojabilidad y baja energía superficial libre contrario a lo observado en ángulo menores a 90° con alta mojabilidad y alta energía superficial. La mojabilidad del agua de las superficies experimentales fue analizada en este estudio con el goniómetro Rame-Hart a través del método de gota sésil estática empleando gotas de 5 μL de agua bidestilada. Se midieron tres gotas por superficie y cada grupo de muestras fueron

medidas por triplicado para obtener el ángulo de contacto del agua y finalmente analizadas a través del software DROPimage para obtener la media \pm el error estándar de la media (EEM).

Análisis del ordenamiento atómico (cristalinidad)

El análisis de la estructura cristalina de las películas delgadas de óxido de titanio depositadas sobre el acero 316L, así como de las superficies de titanio comercialmente puro, fue determinado por difracción de rayos X (XRD) empleando un difractómetro Bruker D8 en modo acoplado Bragg-Bretano y monocromático Cu K α . El ordenamiento atómico nanorecubrimiento del óxido de titanio fue caracterizado en las películas depositadas sobre Silicio (Si) empleando el equipo Rigaku Ultima IV XRD System con una fuente de radiación Cu K α operando en la configuración de incidencia rasante de 1 $^{\circ}$ en orden para evitar detectar la difracción de los picos provenientes del sustrato de Silicio.

Análisis de la composición química superficial

Para determinar de la composición química superficial se emplearon dos estrategias Espectroscopia foto-electrónica de rayos X (XPS) y espectroscopia dispersiva de rayos X (EDS). En XPS un haz incidente de rayos X causa la foto emisión de los electrones pudiendo logrando detectar hasta 1000 ppm de los elementos en una profundidad vertical de 1-10 nm, basándose en que la energía de un fotón incidente producirá fotoelectrones con una energía cinética definida que varían de elemento a elemento, nos puede dar así la composición elemental a

través un difractograma. En este estudio la composición química fue determinada por el equipo XPS (ESCALAB 250, Thermo Scientific, Waltham MA) en ultra bajo vacío (10^{-9} Torr o menor) con una fuente monocromática de rayos X AlK α . Una de las ventajas del XPS es que puede encontrar diferencias en los niveles de carbón, por lo cual los discos fueron montados con grapas de acero inoxidable para disminuir la posible lectura de carbón de la cinta adhesiva, igualmente previo al análisis los discos fueron sonicados en acetona para remover componentes orgánicos. Los barridos de inspección fueron completados en cada región, seguidos por escaneos de alta resolución para C1s, Ti2p, O1s. Los barridos fueron alineados a la energía de C1s a 248.8 eV, finalmente el software Thermo Advantage fue empleado para analizar el resultado de los espectros.

EVALUACIONES MICROBIOLÓGICAS

Para las evaluaciones microbiológicas se utilizaron nueve cepas de bacterias bucales de referencia y dos especies aeróbicas fueron utilizadas para los ensayos de adhesión bacteriana y formación *in vitro* de las biopelículas (**Tabla 2**).

Tabla 2. Especies bacterianas empleadas en las evaluaciones microbiológicas.

Especie	ATCC*	Relacionado con infecciones en
<i>Actinomyces israelii</i>	12102	
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> serotipo b	43718	
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624	
<i>Eikenella corrodens</i>	23834	
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i>	25586	Dispositivos
<i>Parvimonas micra</i>	33270	orales
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277	
<i>Prevotella intermedia</i>	25611	
<i>Streptococcus mutans</i>	10556	
<i>Streptococcus sanguinis</i>	25175	
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Dispositivos
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	14990	ortopédicos

* American Type Culture Collection, Rockville, MD.

ENSAYOS DE ADHESIÓN BACTERIANA

Antes de ser utilizadas en los ensayos biológicos, todas las superficies fueron esterilizadas en auto clave durante 20 minutos. Posteriormente se colocaron individualmente en placas de 24 pozos donde se les adicionó una suspensión ajustada (OD=1 a 600 nm) de cada especie bacteriana (10^9). Las superficies con las especies bacterianas fueron incubadas durante 24 horas a 35° C bajo condiciones aeróbicas ó anaeróbicas dependiendo de las especies para los ensayos de adhesión bacteriana. Después de la incubación, las muestras fueron sometidas a sonicación durante 5 períodos de 10 segundos cada uno, con el objetivo de desprender las bacterias adheridas sobre las superficies. Después de la incubación, se realizó el conteo visual de las unidades formadoras de colonias

(UFC's) para determinar solamente la cantidad de bacterias adheridas en cada una de las superficies analizadas.

ENSAYOS DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS

Las superficies experimentales se colocaron individualmente en placas de 24 pozos donde se les adicionó una suspensión de ajustada (OD=1 a 600 nm) de cada especie bacteriana (10^9). Las superficies con las especies bacterianas fueron incubadas durante 3 y 7 días a 35 °C bajo condiciones aeróbicas ó anaeróbicas dependiendo de las especies.

Viabilidad bacteriana

La viabilidad de las células bacterianas adheridas a cada una de las superficies fue analizada *in situ* utilizando el kit XTT (Sigma). Este método se centra en la medición de la viabilidad celular a través de la reducción de la sal de tetrazolio a formazan por parte de las enzimas para la fosforilación oxidativa (respiración celular) presentes en la membranas celulares de células bacterianas viables, la reducción se observa como un cambio colorimétrico en el medio de cultivo. Se agregaron 100 µL de la solución de XTT (10%) en un volumen final de medio de cultivo de 1 mL en cada una de las superficies con las biopelículas y se incubo por 3 horas en un ambiente libre de luz. Subsecuentemente se tomaron 100 µL del sobrenadante y la absorbancia se midió a una longitud de onda de 450 nm utilizando el equipo FilterMax F5. Todos los ensayos de viabilidad bacteriana se llevaron a cabo por triplicado.

Hibridaciones DNA-DNA

Simultáneamente, en los análisis para especies orales, las muestras se procesaron utilizando la técnica de “checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA (Socransky, Smith et al. 1994). El empleo de la técnica de “checkerboard” permite determinar la proporción de cada especie dentro de las biopelículas en cada una de las muestras que serán analizadas. Cada una de las superficies fue transferida a un pozo de una caja de cultivo estéril y se realizaron 3 lavados con PBS. Las superficies fueron transferidas de nuevo a un pozo estéril con 1.5 ml de TE pH 7.5 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) y fueron sonicadas 5 veces en períodos de 10 segundos cada uno. Posteriormente, se tomaron 150 µl del sobrenadante y fueron transferidos a tubos individuales para micro-centrifugación de 1.5 mL que contenían 100 µl de NaOH (0.5 M, Sigma), las muestras fueron dispersadas posteriormente. Los tubos fueron hervidos durante 10 min. y el pH neutralizado con 800 µl de acetato de amonio (5 M, Sigma). El DNA de cada muestra fue colocado en uno de los canales abierto de un minislot-30, concentrado en una membrana de nylon de carga positiva de 15 x 15 cm y fijado a la membrana mediante entrecruzamiento con luz ultravioleta seguido por incubación a 120° C durante 20 min. Dos canales de estándares microbiológicos fueron colocados en cada membrana. Dichos estándares consistieron en mezclas ajustadas a 10⁵ y 10⁶ células de cultivos puros de todas las cepas bacterianas que fueron analizadas.

Para el proceso de obtención de sondas de DNA, todas las cepas fueron adquiridas como cultivos liofilizados del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Las cepas fueron rehidratadas en caldo para *Mycoplasma* y

cultivadas en agar enriquecido a 35° C de 3 a 7 días dentro de una cámara de anaerobiosis con ambiente de 80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂

El crecimiento bacteriano después de 3 a 7 días de cultivo fue recolectado y colocado en tubos para micro-centrifugación de 1.5 ml que contenían 1 ml de amortiguador TE pH 7.6. Las células fueron lavadas dos veces mediante centrifugación en amortiguador TE pH 7.6 a 3,500 rpm durante 10 min. Posteriormente, fueron re suspendidas mediante sonicación durante 15 seg. y lisadas a 37°c durante 1 hora ya sea con 10% SDS y proteinasa K (20 mg/ml) (Sigma) para las especies Gram negativas, ó con una mezcla enzimática que contenía 15 mg/ml de lisozima (Sigma) y 5 mg/ml de achromopeptidasa (Sigma) en buffer TE (pH 8.0) para las especies Gram positivas. El DNA fue aislado y purificado utilizando una técnica estándar. La concentración de DNA fue determinada mediante mediciones espectrofotométricas de la absorbancia a 260 nm. La pureza de las preparaciones fue valorada mediante el cálculo de la relación entre las mediciones de las absorbancias a 260 nm y 280 nm. Las sondas de DNA genómicas fueron preparadas para las 9 especies bacterianas mediante el marcaje con digoxigenina (Roche) de 1µg de DNA purificado utilizando la técnica de primers aleatorios (random primer technique).

Las membranas fueron prehibridizadas a 42 °C durante 1 hora en solución de prehibridación que contenía 50% de formamida, 5x citrato salino estándar (SSC) (1x SSC = 150 mM NaCl, 15 mM citrato de sodio, pH 7.0), 1% caseína, 5x solución Denhardt, 25 mM fosfato de sodio (pH 6.5) y 0.5mg/ml de RNA de levadura (Roche). La membrana con el DNA fijado de las cepas aisladas fue

colocada en un miniblotter-45 (immunetics) con los canales de las muestras rotados 90° en relación a los canales de hibridación. Esto produjo un patrón de tablero de ajedrez (checkerboard) de 30 x 45. Las sondas de DNA fueron diluidas a una concentración de aproximadamente 20 ng/ml en solución de hibridación (45% formamida, 5x SSC, 1x solución Denhardt, 20mM fosfato de sodio (pH 6.5), 0.2mg/ml de RNA de levadura, 10% sulfato de dextrano y 1% caseína), colocadas en canales de hibridación individuales del miniblotter-45 e hibridadas una noche a 42° C con el aparato sellado dentro de una bolsa de plástico para evitar evaporación de las sondas de DNA. La concentración de cada sonda fue ajustada mediante pruebas preliminares de ensayo y error para que todas las sondas detectaran un rango de células entre 10⁴ y 10⁷. Las membranas fueron lavadas dos veces a alta astringencia durante 20 min. Cada vez a 68° C en buffer de fosfato (0.1x SSC y 0.1% SDS) utilizando un baño con circulación.

Las membranas fueron bloqueadas mediante su incubación durante 1 hora en amortiguador bloqueador que contenía 1% de caseína en buffer de maleato (100mM ácido maleico, 150mM NaCl, pH 7.5). Los híbridos fueron detectados incubando las membranas en una dilución de 1:50,000 de anticuerpo contra digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (Roche) utilizando la modificación previamente descrita (Engler-Blum, 1993). Después de ser lavadas, las membranas fueron incubadas en un agente quimioluminiscente de detección (CDP-Star, Roche) a 37° C durante 1 hora y las señales serán detectadas mediante la exposición de las membranas a películas autoradiográficas dentro de cassettes a temperatura ambiente durante 35 min. Después de ser lavadas, las membranas fueron incubadas en un agente quimioluminiscente de detección (cdp-

star, Roche) a 37 °C durante 1 hora y las señales fueron detectadas mediante la exposición de las membranas a películas autoradiográficas dentro de cassettes a temperatura ambiente durante 35 min. Las películas fueron reveladas siguiendo el procedimiento estándar y posteriormente fueron fotografiadas con cámara digital (Kodak Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA.). Con ayuda de un sistema digital de fotodocumentación (Digidoc. Biorad) se enviaron a un programa (Quantity One. Biorad), en el cual se detectaron y analizaron las señales obtenidas en los “checkerboards”.

Microscopía Confocal

La viabilidad de las bacterias dentro de la biopelícula formada sobre las superficies fue analizada por microscopía confocal utilizando el kit LIVE/DEAD® BacLight™ (Invitrogen).

Este método se basa en el empleo del reactivo en una relación 1:1 de yoduro de propidio (el cual penetra solo en células no viables o con membranas dañadas) y SYTO9 (el cual al ser lipofílico puede atravesar las membrana intactas y por tanto teñir células viables). Previo a colocar las muestras en la solución de yoduro de propidio, las muestras fueron lavadas 3 veces con 1mL de agua bidestilada para remover las bacterias ligeramente adheridas a la biopelícula. Subsecuentemente se les adicionó 20 µL de la solución de yoduro de propidio y las muestras fueron incubadas en una cámara fluorescencia por 30 min. Posteriormente, la biopelícula fue observada con un microscopio confocal laser

(Nikon) con una longitud de onda de excitación de 490 nm y una lectura de emisión de 522 nm para SYTO9 y 635 nm para yoduro de propidio. A través del software del equipo se puede determinar semi-cuantitativamente proporción de bacterias viables y muertas, así como la reducción en la viabilidad bacteriana *in situ*.

ENSAYOS BIOLÓGICOS EN CÉLULAS HUMANAS MESENQUIMALES DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA (hBM-MSCs)

Todas las superficies se esterilizaron por autoclave y se colocaron individualmente en placas de 24 pozos y 20,000 células mesenquimales (Lonza) son sembradas por pozo usando medio de cultivo para células troncales mesenquimales (Mesenchymal stem cell growth media, Lonza) e incubadas a 37 °C en una atmósfera de 5% CO₂ y 100% humedad.

Ensayos de adhesión celular y proliferación celular

Se realizaron cultivos celulares sobre las superficies por 24 horas y 7 días. Al final de la incubación las células fueron lavadas 2 veces con PBS para remover las células ligeramente adheridas. Posteriormente, las células fueron desprendidas con ciclos de ultrasonido (2 x 5 segundos) y lisadas con Triton X-100 al 0.05 %. Para analizar la adhesión y proliferación celular, la producción nueva DNA fue analizada a través del kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA protocol kit (Invitrogen,

Paisle, UK) de acuerdo al fabricante y usando una dilución conocida de número de células. Subsecuentemente se añadieron 100 μ L del lisado y 100 μ L de la solución buffer del kit, protegiendo de la exposición luminosa, a cada pozo en una placa de 96 pozos para fluorescencia. Después de 2 minutos de incubación a temperatura ambiente se realizó la lectura a través de un lector de placas para fluorescencia a una longitud de onda de excitación-emisión de 485 nm y 538 nm, respectivamente.

Inmunoensayos de función y diferenciación celular

Se realizaron ensayos para determinar la actividad específica de fosfatasa alcalina. La fosfatasa alcalina es la enzima responsable de incrementar la concentración de fosfatos y facilitar la formación de fosfatos de calcio como la hidroxiapatita. Es conocida como marcador de diferenciación osteoblástica, sin embargo su actividad se incrementa en la primera parte de la diferenciación, por lo que se emplea como un indicador temprano de diferenciación hacia un linaje osteoblástico. Para este ensayo se prepara la solución buffer (AMP, pNPP y $MgCl_2$ en relación 1:1:1). Posteriormente se pipetearon 50 μ L de cada muestra en cada uno de los pozos, se añadieron 50 μ L de solución buffer en todos los pozos con muestras así como en los pozos control. Posteriormente, se incubo por 30 min a 37° C, monitoreando el cambio a color amarillo se añadieron 100 μ L de NaOH en todos los pozos y se leyó la placa a 405 nm.

Análisis de la producción proteica en el microambiente generado por células mesenquimales derivadas de médula ósea (hBM-MSCs)

Con estos ensayos se puede obtener información sobre el efecto de las propiedades del material en la generación del microambiente celular (producción proteica) y su efecto en la regulación del mismo. Estos ensayos se realizaron en cultivos celulares de 7 días. Una vez lisadas el número de células fue analizado a través del protocolo para DNA de doble cadena por fluorescencia previamente descrito. El medio condicionante fue analizado a través de diversos ensayos de ELISA.

Se midieron niveles de la osteocalcina, la cual es la proteína no colagénica más abundante del hueso y es un marcador de diferenciación osteoblástica tardía.

El factor de crecimiento vasculo-endotelial (VEGF) es una proteína producida por las células que ayuda en la señalización para la estimulación de la generación *de novo* vasos sanguíneos (vasculogénesis) durante la etapa embrionaria y formación de vasos sanguíneos de vasculatura pre-existente (angiogénesis) durante la regeneración posterior a daño tisular además de ser un fenómeno imprescindible en la homeostasis ósea. La osteoprotegerina, también conocida como el factor inhibidor de osteoclastos, inhibe la diferenciación de osteoclastos. La proteína morfogenética de hueso 2 (BMP-2), como otras proteínas de la misma familia, tiene un papel importante en el desarrollo del tejido óseo y cartílago.

Todos los marcadores de función ósea y angiogénica, así como marcadores diferenciación de células mesenquimales fueron analizados utilizando

ensayos de ELISA indirectos. Para estos ensayos se emplearon placas de microtitulación de 96 pozos para ensayos de ELISA (Corning Inc.), estas fueron cubiertas con 100 μ L del sobrenadante de cada uno de los pozos con las superficies que serán estudiadas. Las muestras fueron incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, los pozos fueron lavados 5 veces con 0.05% Tween 20 en PBS (200 μ L/pozo) (Sigma-Aldrich Co.). El bloqueo de los pozos se realizó con 0.1% BSA en PBS (200 μ L/pozo), durante 1 hora de incubación, después de la incubación las placas fueron lavadas e incubadas con una dilución de 1:500 de anticuerpo primario diluido en 0.1% BSA en PBS (100 μ L/pozo) por 2 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación con el anticuerpo primario respectivo, las placas fueron lavadas e incubadas con una dilución de 1:2000 de anticuerpo secundario anti-cabra conjugado a HRP (horseradish peroxidase) diluido en 0.1% BSA en PBS (100 μ L/pozo), y de 1:5000 de anticuerpo secundario anti-ratón-HRP diluido en 0.1% BSA en PBS (100 μ L/pozo, por 2 horas a temperatura ambiente. Subsecuentemente, el conjugado de HRP unido a los anticuerpos secundarios fue detectado colorimétricamente usando como sustrato H_2O_2 estabilizado (R & D Systems) (100 μ L/pozo). Posteriormente el desarrollo del color durante 8 minutos y la reacción fue detenida por la adición de 50 μ L/pozo de solución de Stop (2N H_2SO_4) (R & D Systems). Finalmente los valores de la densidad óptica (OD) fueron leídos en un Multilector de placas FilterMax F5 (Molecular Devices) a una longitud de onda de 450 nm.

Expresión génica de integrinas y marcadores de diferenciación osteoblástica en células humanas mesenquimales derivadas de medula ósea (hMSC's)

Células humanas mesenquimales derivadas de medula ósea (Lonza) fueron cultivadas en las superficies de poli-estireno (TCPS), SLA, SS, y ss-aTiO, a una densidad de $10,000$ células/cm² usando los métodos de cultivo previamente descritos. Después a 7 días de incubación, las células confluentes en los pozos de cultivo fueron incubadas nuevamente con medio de cultivo fresco por 12 horas. La recolección fue procesada a través del método de extracción TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA), para RNA siguiendo las recomendaciones del protocolo descritas por el fabricante. Subsecuentemente a través del espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, Waltham, MA) se cuantificó la cantidad de mRNA. Posteriormente, se generaron templates de cDNA a través de la amplificación de RNA (500ng) usando la enzima transcriptasa reversa (High capacity cDNA Reverse Transcription kit, Applied Biosystems, Carlsbad, Ca). Después se realizó la PCR en tiempo real (qPCR) con el cDNA resultante de la transcriptasa reversa con primers génicos específicos empleando el sistema StepOnePlus Real time system and Power Sybr Green Master Mix (Life technologies). Finalmente los valores de fluorescencia fueron cuantificados empleando diluciones de inicio conocidas de células mesenquimales cultivadas en el fondo de poso de cultivo a base de poliestireno (TCPS). La expresión génica fue normalizada con Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH). Diferentes "primers" para marcadores de diferenciación osteoblástica e integrinas fueron

diseñados a través del software Primer-BLAST y sintetizados por Life Technologies (Life Technologies, Carlsbad, CA) los cuales se muestran en la

Tabla 3.

Tabla 3. Secuencia de “primers” empleados para el análisis de expresión por RT-qPCR.

Gen		Secuencia
GAPDH	F	GCTCTCCAGAACATCATCC
	R	TGCTTCACCACCTTCTTG
ITGA1	F	CACTCGTAAATGCCAAGAAAAG
	R	TAGAACCCAACACAAAGATGC
ITGA2	F	ACTGTTCAAGGAGGAGAC
	R	GGTCAAAGGCTTGTTTAGG
ITGA5	F	ATCTGTGTGCCTGACCTG
	R	AAGTCCCTGGGTGTCTG
ITGAV	F	GTTGCTACTGGCTGTTTTGG
	R	CTGCTCCCTTTCTTGTTCTTC
ITGB1	F	ATTACTCAGATCCAACCAC
	R	TCCTCCTCATTTCAATTCATC
RUNX2	F	GTCTCACTGCCTCTCACTTG
	R	CACACATCTCCTCCCTTCTG

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Los resultados de las mediciones de la energía libre superficial, ángulo de contacto, rugosidad media, adhesión bacteriana, viabilidad bacteriana así como proliferación, niveles de proteínas y niveles de expresión génica entre las diferentes superficies experimentales se presentan como la media (ME) \pm el error estándar de la media (EEM). Los análisis para determinar las diferencias en la cantidad de bacterias adheridas entre cada una de las superficies analizadas se llevaron a cabo mediante la prueba de t- de Student y las diferencias significativas se determinaron utilizando la modificación de Bonferroni de la prueba t de Student.

RESULTADOS

MUESTRAS EXPERIMENTALES.

MODIFICACIÓN SUPERFICIAL DE LA TOPOGRAFÍA DE LOS SUSTRATOS

Los valores de rugosidad media obtenidos a través de perfilometría al realizar el proceso de arenado con partículas de dióxido silicio con tamaño de partícula 30 m y 110 μm sobre las superficies de acero inoxidable 316L fueron de $\geq 2.0 \mu\text{m}$ por lo cual estas quedaron descartadas (Fig. 1A). Por otro lado, al realizar el arenado con dióxido de silicio con tamaño de partícula de $\sim 500 \mu\text{m}$ para las mismas superficies de acero 316L, la rugosidad media obtenida fue de $4.26 \mu\text{m}$, (muestras utilizadas) (Fig. 1B). Posterior al arenado, realizamos el grabado ácido obteniendo una disminución en la rugosidad de las superficies de $4.05 \mu\text{m}$ con 30 segundos de grabado, de $3.8 \mu\text{m}$ cuando se utilizaron 60 segundos de grabado y finalmente se observó una rugosidad media de $3.1 \mu\text{m}$ cuando se realizó el grabado durante 90 segundos (Fig. 1C). Con estos resultados se optó por seleccionar el protocolo de arenado con tamaño de partícula de $\sim 500 \mu\text{m}$ y grabado con ácido sulfúrico durante 90 segundos.

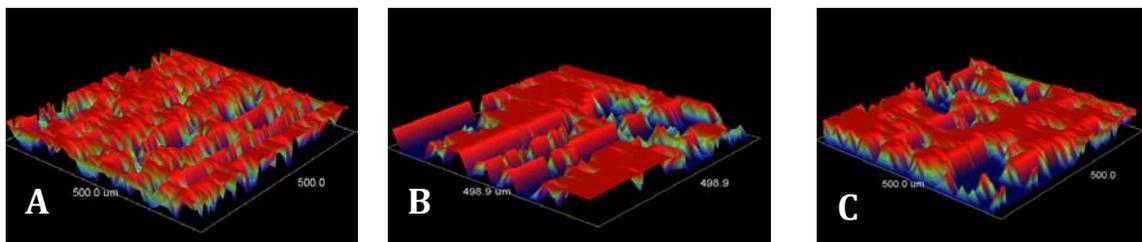


Figura 1. Micrografías cualitativas del análisis de perfilometría en una área de 500 x 500 μm^2 , para sustratos de acero inoxidable grado médico (SS) procesadas a través de arenado con tamaño partícula de SiO_2 de 30 μm (A), de $\sim 500 \mu\text{m}$ (B) y de $\sim 500 \mu\text{m}$ más grabado ácido con H_2SO_4 .

DEPÓSITO DE LAS PELÍCULAS DE ÓXIDO DE TITANIO

El depósito de las películas delgadas de óxido de titanio (TiO_2) se realizó sobre sustratos de acero inoxidable 316L (SS) previamente pulidos con terminado a espejo utilizando pasta de diamante (tamaño de partícula $\sim 5\text{nm}$). Posterior al pulido, las superficies experimentales se descontaminaron a través de un protocolo de lavado ultrasónico con acetona, dos ciclos de 20 min, posteriormente un lavado ultrasónico con isopropanol, dos ciclos de 20 min y finalmente se llevó a cabo el lavado ultrasónico con agua desionizada con el mismo tiempo y ciclos antes mencionados.

Las películas delgadas de óxido de titanio (TiO_2) fueron depositadas sobre los sustratos de SS mediante el sistema de evaporación catódica (*magnetron sputtering*) de forma reactiva, utilizando un blanco de titanio de alta pureza (99.99%) y trabajando en atmósfera de argón y oxígeno (Ar/O 8:2) empleando una potencia de 200 W y con un total de 1800 segundos de tiempo de depósito a temperatura ambiente.

OPTIMIZACIÓN Y ANÁLISIS DE ADHESIÓN PELÍCULA-SUSTRATO

Los resultados obtenidos en el análisis de la adhesión película sustrato en cada uno de los grupos fueron los siguientes. La carga crítica (CL) a la cual se observó desprendimiento total de la película en el grupo donde sólo se modificó la temperatura del sustrato fue de 13.8 ± 0.26 N (Fig. 2A), para el grupo donde se elevó la temperatura a 100° C la carga crítica fue de 14.2 ± 1.9 N (Fig. 2B) y de 15.3 ± 1.4 N (Fig. 2C) cuando se elevó la temperatura a 250° C. En los grupos en el cual se evaluó el depósito previo de la capa buffer de titanio con un espesor de 8 nm los valores observados fueron $12.3 \text{ N} \pm 0.2 \text{ N}$, (Fig. 3A) 18.2 ± 1.2 N (Fig. 3B) y 15.9 ± 1.2 N (Fig. 3C) para las muestras depositadas a temperatura ambiente (TA), 100° C y 250° C, respectivamente. En el grupo en el cual se evaluó el depósito de la capa amortiguadora de titanio de 15 nm aunado a las diferentes variaciones en la temperatura del sustrato, los resultados obtenidos para la TA fueron de $8.4 \text{ N} \pm 0.4 \text{ N}$ (Fig. 4A), para los 100° C de 18.0 ± 0.8 N (Fig. 4B) y para el grupo de 250° C una carga crítica de desprendimiento a los 9.4 ± 1.3 N (Fig. 4C).

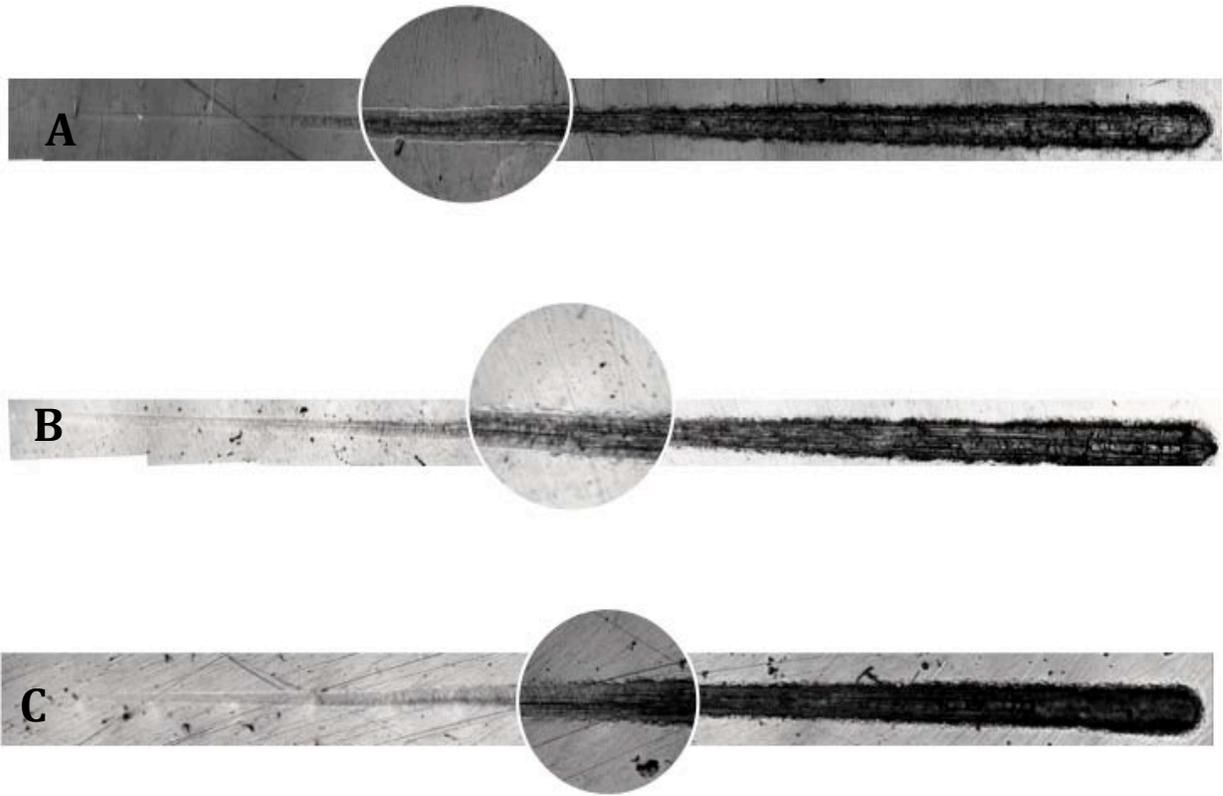


Figura 2. Micrografías cualitativas del análisis de rayado para evaluar la adhesión película-sustrato, para sustratos de acero inoxidable grado médico (SS) donde se mantuvo a temperatura ambiente el sustrato durante el depósito de la película de óxido titanio amorfo (A), el grupo donde la temperatura del sustrato se elevó a 100°C (B), y el grupo en donde se elevó la temperatura del sustrato a 250°C (C).

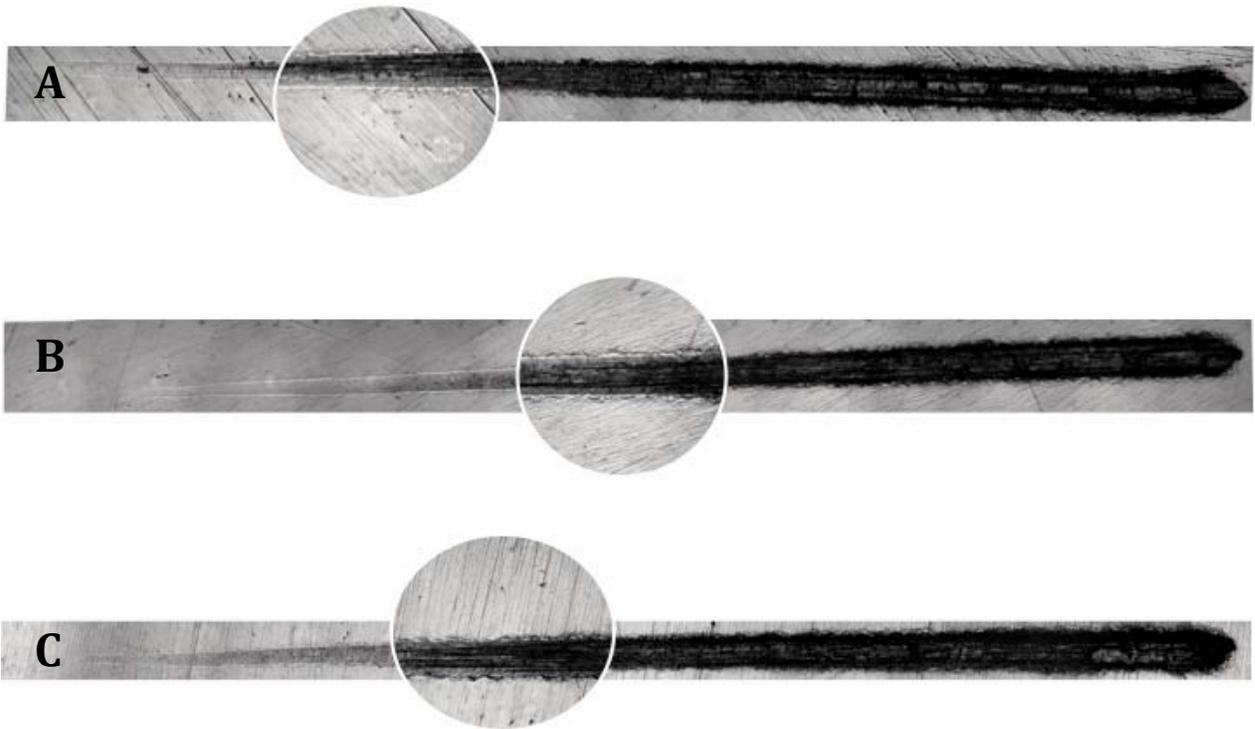


Figura 3. Micrografías cualitativas del análisis de rayado para evaluar la adhesión película-sustrato, para sustratos de acero inoxidable grado médico (SS) empleando una capa buffer de titanio de 8 nm previo al depósito de óxido de titanio amorfo aunado a mantener la temperatura ambiente del sustrato de acero durante el depósito de la película de óxido titanio amorfo (A), el grupo donde la temperatura del sustrato se elevó a 100°C más la capa buffer (B) y el grupo donde la temperatura del sustrato se elevó a 250°C más la capa buffer (C).

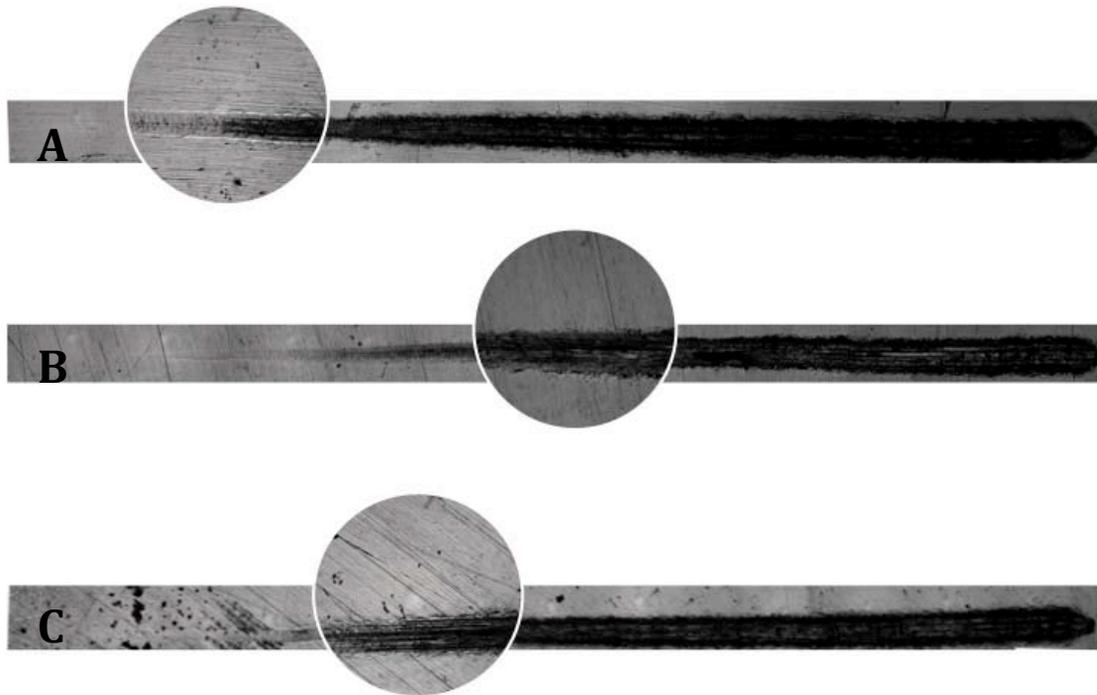


Figura 4. Micrografías cualitativas del análisis de rayado para evaluar la adhesión película-sustrato, para sustratos de acero inoxidable grado médico (SS) empleando una capa buffer de titanio de 15 nm previo al depósito de óxido de titanio amorfo aunado a mantener a temperatura ambiente en el sustrato durante de la película de óxido titanio amorfo (A), llevando el sustrato a una temperatura de 100°C, el grupo donde la temperatura del sustrato se elevó a 100°C más la capa buffer (B) y el grupo donde la temperatura del sustrato se elevó 250°C más la capa buffer (C).

Con los resultados del análisis de rayado observamos que la adhesión película sustrato se vio mejorada notablemente hasta ~20 N a través del uso la capa buffer de titanio y manteniendo la temperatura de depósito a 100° C.

En resumen, se prepararon 200 superficies de SS (modificados topográficamente) con las películas delgadas de óxido de titanio (TiO₂) para los ensayos biológicos mediante el sistema de evaporación catódica (*magnetron sputtering*) de forma reactiva, utilizando un blanco de titanio de alta pureza

(99.99%) y trabajando en atmósfera de argón empleando una potencia de 200W y con 30 segundos de tiempo de depósito a una temperatura de 100° centígrados para el depósito de la capa buffer de titanio. Posteriormente, se realizó el depósito propio de la película de óxido de titanio trabajando en atmósfera de argón y oxígeno (Ar/O 8:2) empleando una potencia de 200W y con 1770 segundos de tiempo de depósito a temperatura ambiente, teniendo de esta manera un tiempo de depósito total de 30 minutos.

CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS EXPERIMENTALES

ANÁLISIS DE LA RUGOSIDAD MEDIA (RA) Y TOPOGRAFÍA

Los resultados obtenidos para el protocolo finalmente seleccionado de modificación superficial topográfica así como posterior al depósito de las películas delgadas de óxido de titanio en el acero inoxidable se muestran en la **tabla 4**. Las superficies experimentales de óxido de titanio amorfo sobre acero (ss-aTiO) tuvieron una rugosidad media (Ra) de 2.9 μm , para el sustrato de acero inoxidable (SS) de 3.1 μm y las superficies de titanio comercialmente puro (SLA) fue de 3.6 μm . Igualmente realizamos las mediciones por microscopía confocal para tener un valor en tercera dimensión de la rugosidad (Sa). Cabe mencionar que estas mediciones se realizaron posterior al proceso de esterilización de auto-clave de las superficies. Por otra parte, la topografía micro-estructurada se preservó en las superficies de acero funcionalizadas, mientras que las superficies SLA presentaron el patrón descrito como panal de abeja, las cuales se pueden observar en la **figura 5**.

Tabla 4. Resultado del análisis de rugosidad de las superficies experimentales a través de perfilometría (Ra) y microscopía confocal (Sa).

Superficie	Ra (μm)	Sa (μm)	Rz (μm)
SLA	3.5 ± 0.09	3.2 ± 0.06	30.10
SS	3.1 ± 0.05	2.6 ± 0.11	31.18
ss-aTiO	2.9 ± 0.06	2.5 ± 0.07	28.67

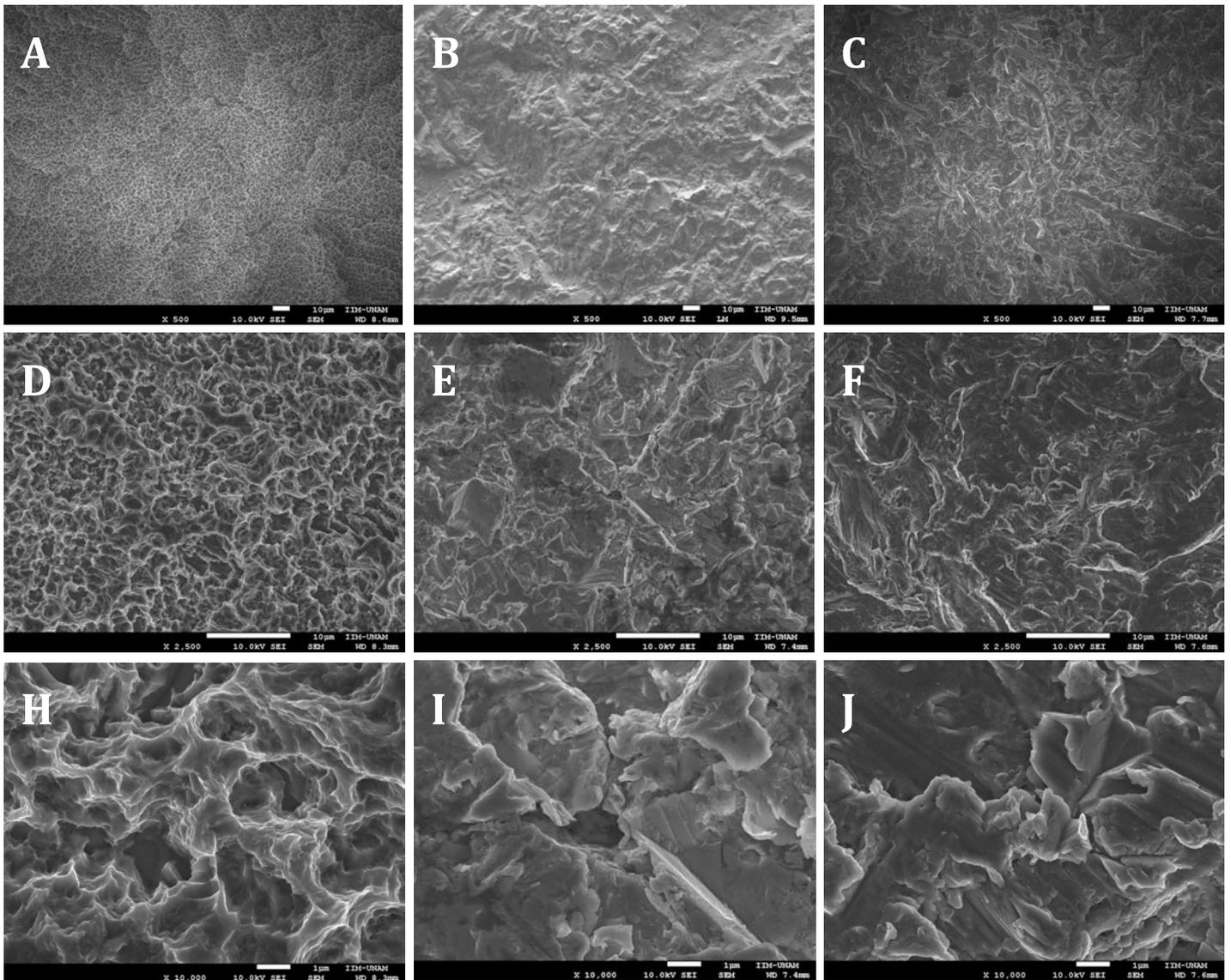


Figura 5. Micrografías por microscopía electrónica de barrido de la topografía superficial a una magnificación 500x para la superficie de titanio SLA (A), acero inoxidable de grado médico SS (B) y superficie SS funcionalizadas con óxido de titanio amorfo (C). Igualmente las micrografías a 2500x para la superficie de titanio SLA (D), acero inoxidable de grado medico SS (E) y superficie SS funcionalizadas con óxido de titanio amorfo ss-aTiO (F). Las micrografías obtenidas a una alta resolución (10K) para la superficie de titanio SLA (G), acero inoxidable de grado medico SS (H) y superficie SS funcionalizadas con óxido de titanio amorfo (I).

ANÁLISIS DE LA MOJABILIDAD

La mojabilidad fue analizada por medio del ángulo de contacto del agua por el método de gota-sésil estática. Los resultados fueron los siguientes, para la superficie de titanio comercialmente puro (SLA) el ángulo de contacto fue de 120.90 ± 0.36 (Fig. 6 A), para la superficies de acero inoxidable micro estructurado de grado médico (SS) fue de 41.40 ± 0.82 (Fig. 6 B), y para la superficies SS funcionalizadas con el nano-recubrimiento de óxido de titanio amorfo (ss-aTiO) fue de 85.92 ± 1.62 (Fig. 6 A).

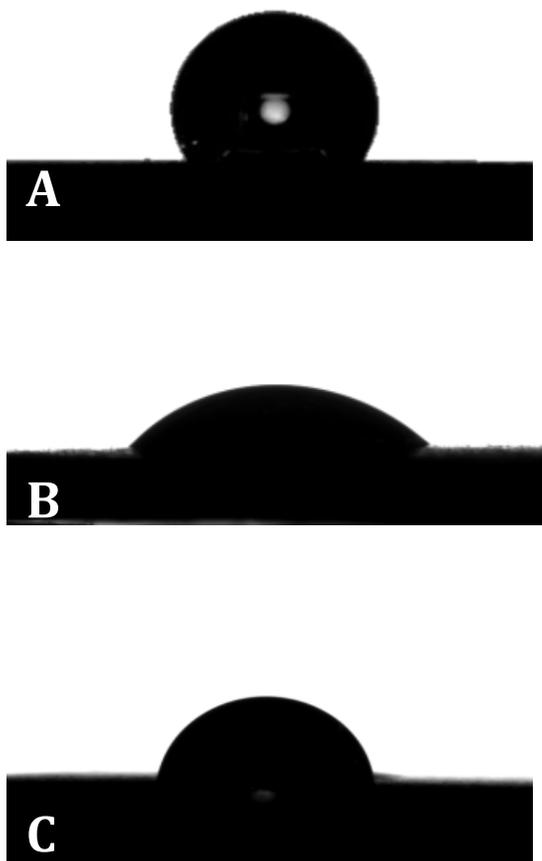


Figura 6. Micrografías cualitativas del análisis de mojabilidad a través del goniómetro con la técnica de gota-sésil estática para la superficie SLA (A), la superficies SS (B) y la superficies ss-aTiO (C).

ANÁLISIS DE CRISTALINIDAD

A través del análisis de difracción de rayos X se determinó que la película delgada depositada en las superficies de acero inoxidable 316L está compuesta por una estructura amorfa de óxido de titanio, como se observa en la **figura 7**.

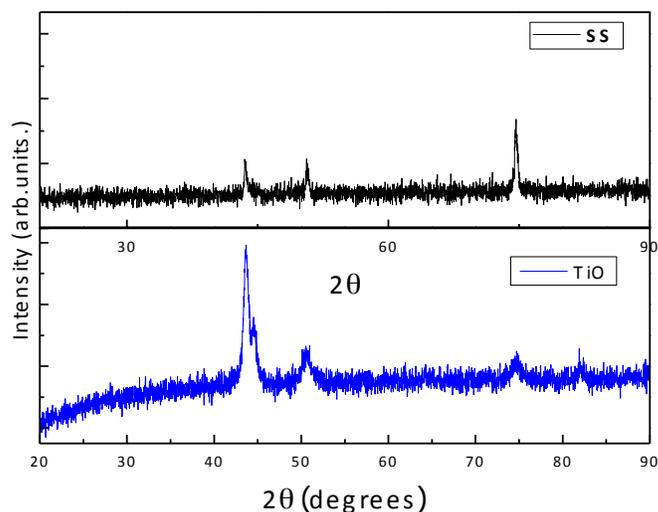


Figura 7. Difracción de rayos X (XRD) de la superficie sustrato de acero inoxidable de grado médico (SS) y la superficie sustrato con la película delgada de óxido de titanio en la cual a través del difractograma se puede observar su estructura amorfa.

ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA SUPERFICIAL

Los resultados obtenidos para cada uno de los elementos; carbono, oxígeno, hierro, titanio, oxígeno, cromo, hierro, silicio y nitrógeno en la superficie de los materiales a través del análisis de espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS), se observa en la **Tabla 5**. Los difractogramas

representativos se muestran en la figura 8, para la superficie SLA (Fig. 8A), la superficie SS (Fig. 8B) y la superficie ss-aTiO (Fig. 8C).

Tabla 5. Composición elemental en porcentaje obtenida a través de XPS.

Elemento	SLA (At%)	SS (At%)	ss-aTiO (At%)
O	46.23	50.87	37.95
Ti	14.88	N/A	8.98
C	38.91	25.08	53.08
Cr		4.58	
Fe		9.38	
Si		8.06	
N		2.03	

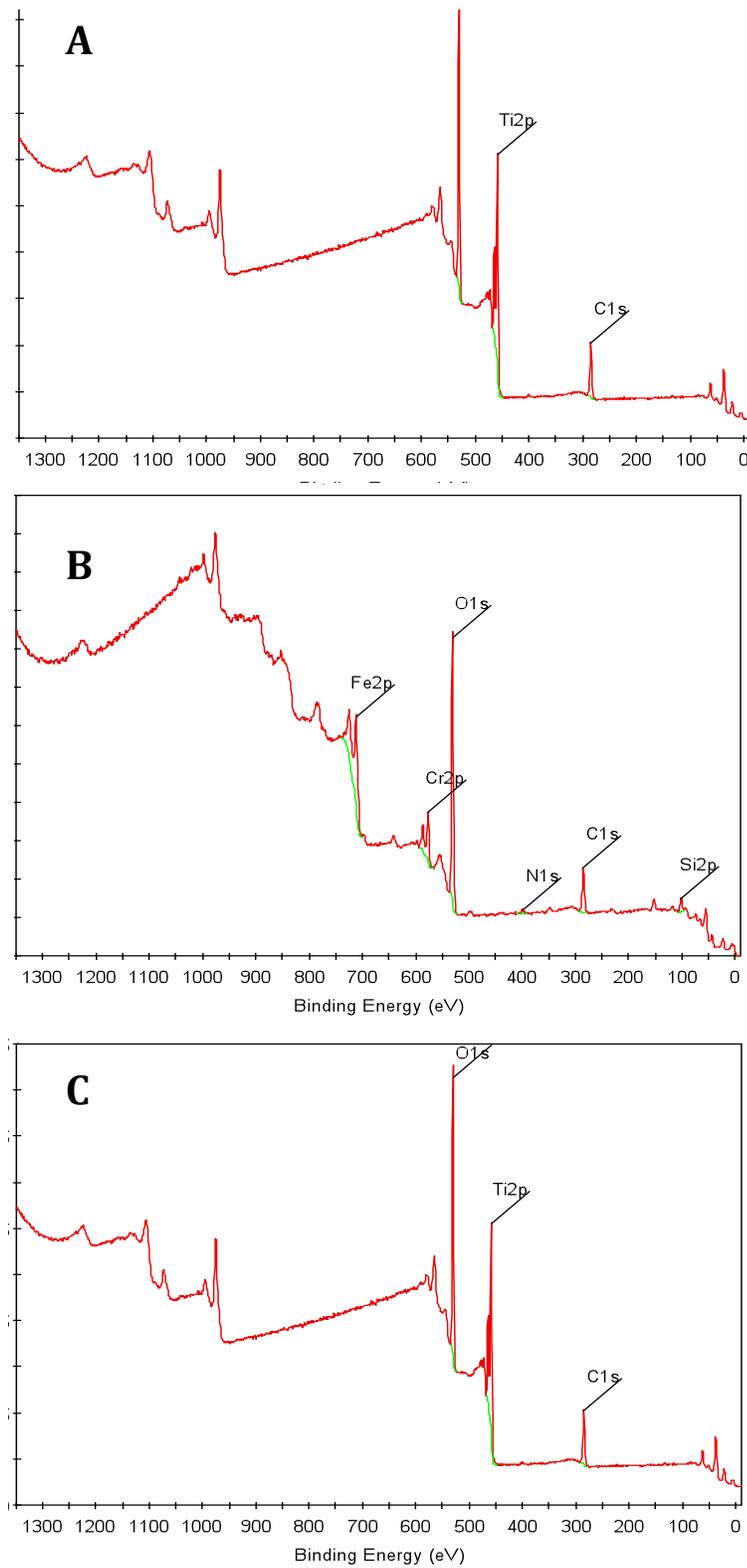


Figura 8. Difractogramas representativos del análisis por XPS de baja resolución para la superficie SLA (A), la superficie SS (B) y la superficie ss-aTiO (C).

EVALUACIONES MICROBIOLÓGICAS

ENSAYOS DE ADHESIÓN BACTERIANA

Los ensayos microbiológicos en las superficies experimentales modificadas con óxido de titanio amorfo, sustratos de SS y superficies SLA se realizaron con especies bacterianas involucradas infecciones asociadas a dispositivos orales (implantes dentales) y ortopédicos.

Conteos de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC's).

A través de los conteos de las UFC's para el ensayo de adhesión bacteriana a las 24 horas para *S. aureus* en las diferentes superficies, observamos la mayor adhesión bacteriana en las superficies control de poliestireno (fondo del pozo de la caja de cultivo) con conteos de $67.3 \pm 1.4 \times 10^8/\text{mL}$ seguido de la superficie SLA $57.5 \pm 12.1 \times 10^8/\text{mL}$, en la superficie experimental modificada de ss-aTiO con conteos de UFC's de $40.2 \pm 5.0 \times 10^8/\text{mL}$ y en la que se observó menor número de UFC's fue la superficie sustrato de acero inoxidable 316L con valores de $29.8 \pm 4.1 \times 10^8/\text{mL}$, no observándose diferencias significativas entre las superficies experimentales ($p > 0.05$), como se muestran en la gráfica de la **figura 9**.

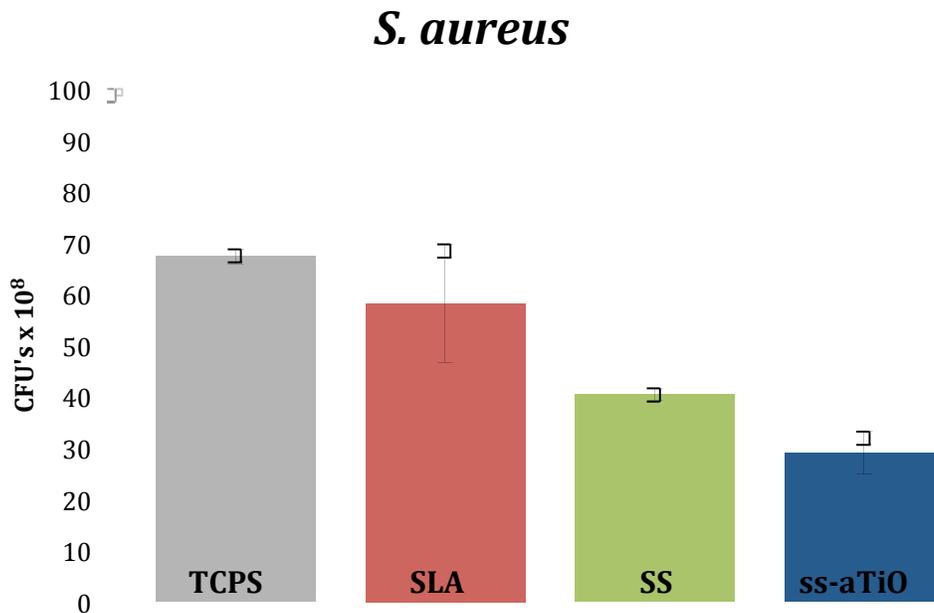


Figura 9. Conteo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC's) de la especie *S. aureus* a 24 horas sembradas en placas de agar, retomadas de las superficies control de poliestireno (TCPS), titanio (SLA), sustrato de acero inoxidable de grado médico (SS) y superficies modificadas con óxido de titanio amorfo (ss-aTiO). $p > 0.05$.

Con respecto a la especie *S. epidermidis* la tendencia observada entre las diferentes superficies fue muy similar, observamos la mayor adhesión bacteriana en las superficies control de Poliestireno con conteos de $140.5 \pm 20.4 \times 10^6/\text{mL}$, seguido de la superficie SLA $116.5 \pm 15.3 \times 10^6/\text{mL}$, seguido por la superficie sustrato de acero inoxidable 316L con conteos de UFC's de $84.6 \pm 12.0 \times 10^6/\text{mL}$ y en la que se observó menor número de UFC's fue la superficie experimental modificada de ss-aTiO con valores de $80.2 \pm 9.1 \times 10^6/\text{mL}$, no observándose diferencias significativas entre las superficies experimentales ($p > 0.05$), como se demuestra gráficamente en la **figura 10**.

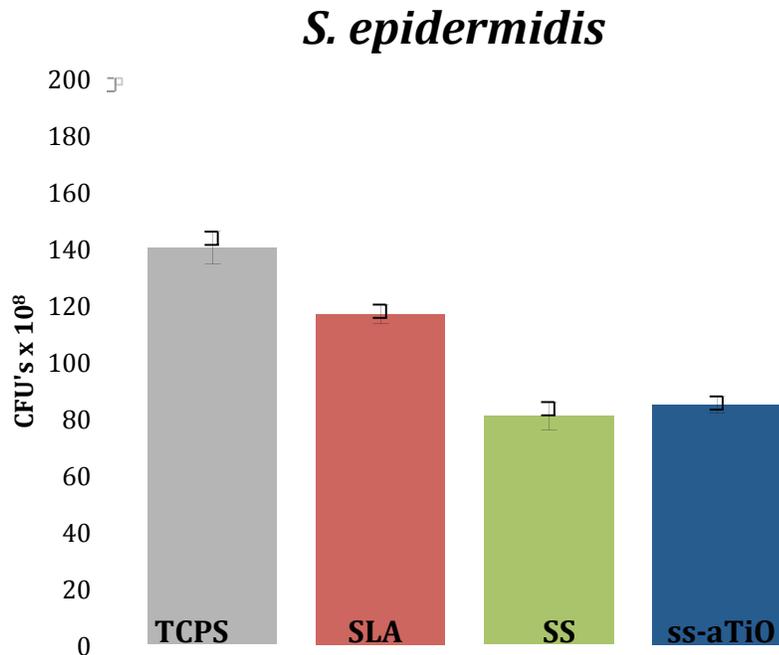


Figura 10. Conteo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC's) de la especie *S. aureus* a 24 horas sembradas en placas de agar, retomadas de las superficies control de poliestireno (TCPS), titanio (SLA), sustrato de acero inoxidable de grado médico (SS) y superficies modificadas con óxido de titanio amorfo (ss-aTiO). $p > 0.05$.

ENSAYOS DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS.

A través de del análisis *in situ* a través de espectrofotometría para el ensayo de formación de biopelículas observamos a las 24 horas para *S. aureus* que la mayor viabilidad celular se registró en la superficie control de poliestireno (TCPS) con conteos de $873.3 \pm 21.0 \times 10^9$ /mL, seguido de la superficie de titanio comercialmente puro (SLA) con $765.33 \pm 96.2 \times 10^9$ /mL, en la superficie experimental modificada con óxido de titanio amorfo (ss-aTiO) con conteos de $602.66 \pm 11.6 \times 10^9$ /mL y en la que se detectó el menor número de células bacterianas fue la superficie sustrato de acero inoxidable 316L con valores de $490.66 \pm 34.1 \times 10^9$ /mL, no observándose diferencias significativa entre la superficies experimentales ($p > 0.05$) como se demuestra en la **figura 11A**.

Mientras que en los análisis de la biopelícula a 7 días para la especie *S. aureus* la superficie control de Poliestireno (TCPS) mostró los conteos superiores de $1073.3 \pm 14.5 \times 10^7$ /mL, seguido de la superficie SLA $365.5 \pm 51.6 \times 10^7$ /mL, en la superficie modificada con óxido de titanio amorfo (ss-aTiO) con conteos de $290.6 \pm 41.8 \times 10^7$ /mL y en la que se observó menor número de UFC's fue la superficie sustrato de acero inoxidable grado médico (SS) con valores de $190.6 \pm 4.8 \times 10^7$ /mL, como se observa en la **figura 11B**.

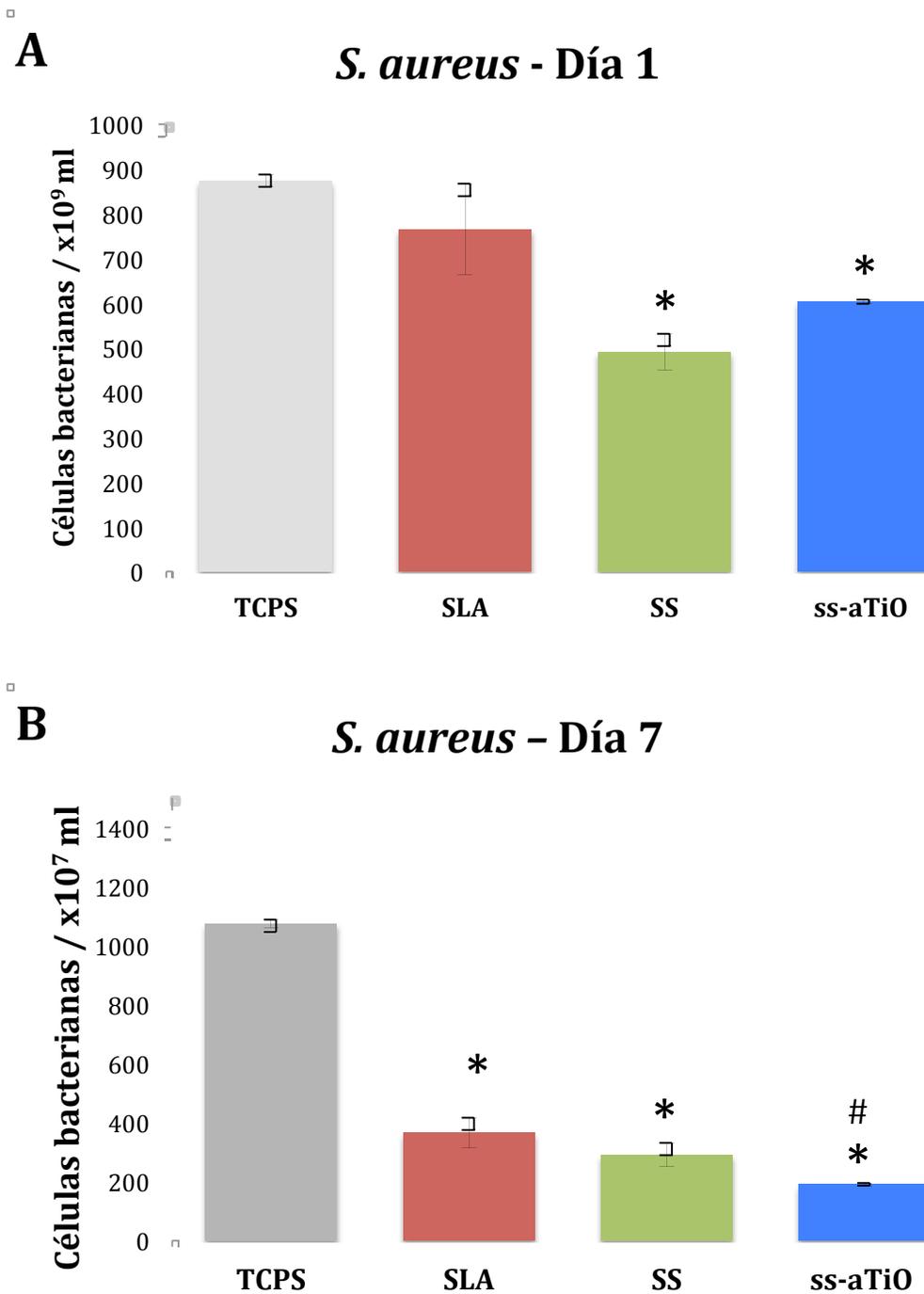


Figura 11. Viabilidad bacteriana (en la formación inicial de la biopelícula al día 1 **(A)** y 7 días **(B)** en la especie *S. aureus* analizada a través de espectrofotometría, retomadas de las superficies control de poliestireno (TCPS), superficies de titanio (SLA), sustratos de acero inoxidable de grado médico (SS) y superficies modificadas con nano-recubrimiento de óxido de titanio amorfo sobre acero inoxidable (ss-aTiO). * $p < 0.05$ vs. TCPS; # $p < 0.05$ vs. SLA; \$ $p < 0.05$ vs. SS.

Para la especie *S. epidermidis* se detectaron conteos mayores por igual en la superficie control de poliestireno (TCPS) con conteos de $63.4 \pm 2.4 \times 10^{10}/\text{mL}$, seguido de la superficie SLA $35.7 \pm 1.8 \times 10^{10}/\text{mL}$, seguido por la superficie experimental modificada con óxido de titanio amorfo (ss-aTiO) con valores $14.9 \pm 0.6 \times 10^{10}/\text{mL}$, y en la que se observó menor número de conteos células de bacterianas fue la superficie de acero inoxidable de grado médico (SS) con conteos de $12.2 \pm 0.5 \times 10^{10}/\text{mL}$, como se observa en la **figura 12 A**.

En los análisis de la biopelícula a 7 días para la especie *S. epidermidis* la superficie control de Poliestireno (TCPS) mostró los conteos superiores de $673.3 \pm 21.7 \times 10^7/\text{mL}$, seguido de la superficie SLA $565.4 \pm 108.6 \times 10^7/\text{mL}$, en la superficie modificada con óxido de titanio amorfo (ss-aTiO) con conteos de $402.6 \pm 11.8 \times 10^7/\text{mL}$ y en la que se observó menor conteo de células bacterianas fue la superficie sustrato de acero inoxidable grado médico (SS) con valores de $290.6 \pm 39.8 \times 10^7/\text{mL}$, como se observa en la **figura 12 B**.

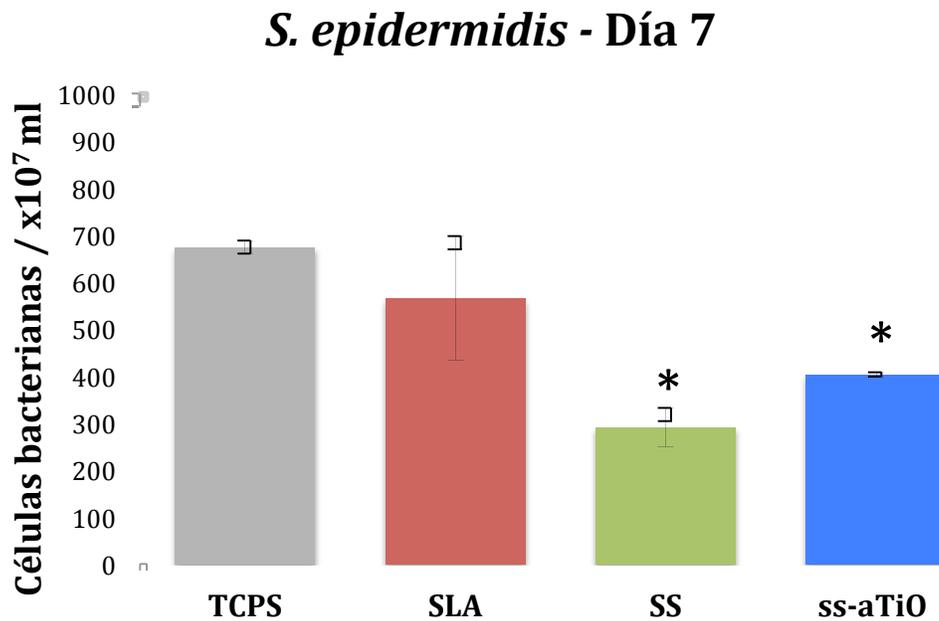
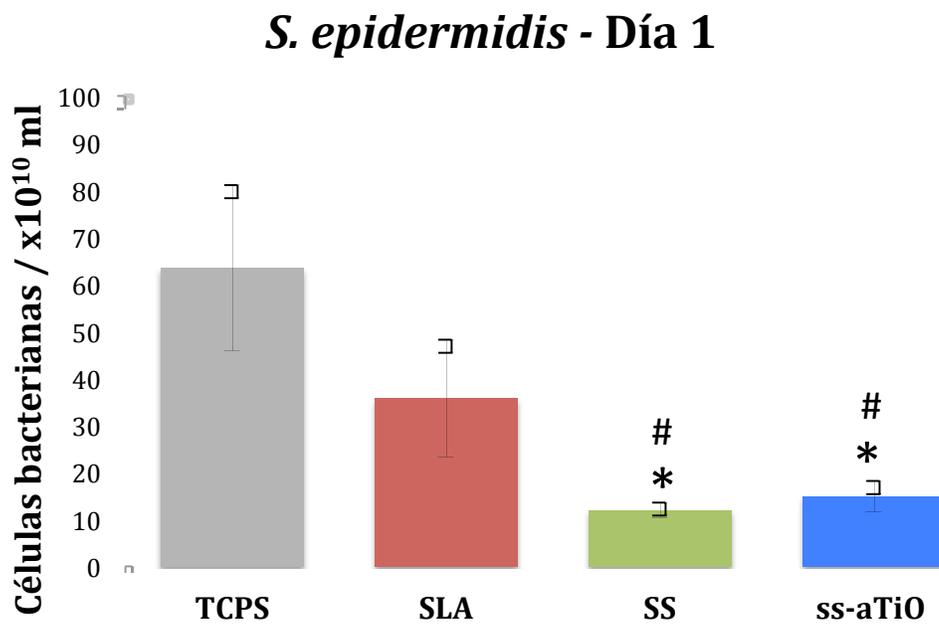


Figura 12 . Viabilidad bacteriana (en la formación inicial de la biopelícula al día 1 **(A)** y 7 días **(B)**) en la especie *S. epidermidis* analizada a través de espectrofotometría, retomadas de las superficies control de poliestireno (TCPS), superficies de titanio (SLA), sustratos de acero inoxidable de grado médico (SS) y superficies modificadas con nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo sobre acero inoxidable (ss-aTiO). * $p < 0.05$ vs. TCPS; # $p < 0.05$ vs. SLA; \$ $p < 0.05$ vs. SS.

En el análisis en la formación inicial de la biopelícula al día 1 para el co-cultivo de nueve especies bacterianas orales las superficies control de Poliestireno (TCPS) y de acero inoxidable grado médico (SS) mostraron valores similares en conteos celulares bacterianos de $85.3 \pm 18.2 \times 10^6/\text{mL}$ y $85.3 \pm 3.7 \times 10^6/\text{mL}$, respectivamente. Mientras que en las superficies de Titanio (SLA) y modificadas con óxido de titanio amorfo (ss-aTiO) se obtuvieron los menores conteos con $55.7 \pm 3.5 \times 10^6/\text{mL}$ y $50.1 \pm 3.6 \times 10^6/\text{mL}$, respectivamente. Los datos son mostrados en la **figura 13A**.

En el análisis en la formación de biopelícula a 7 días para el co-cultivo de nueve especies bacterianas orales la superficie de acero inoxidable grado médico (SS) y la superficie control de Poliestireno (TCPS) mostraron los valores mayores con conteos celulares bacterianos de $110.3 \pm 3.4 \times 10^6/\text{mL}$ y $100.3 \pm 19.6 \times 10^6/\text{mL}$, respectivamente. Mientras que en las superficies modificadas con óxido de titanio amorfo (ss-aTiO) y superficies Titanio (SLA) los conteos fueron de $80.7 \pm 3.6 \times 10^6/\text{mL}$ y $70.1 \pm 7.1 \times 10^7/\text{mL}$, respectivamente, como se observa en la **figura 13B**.

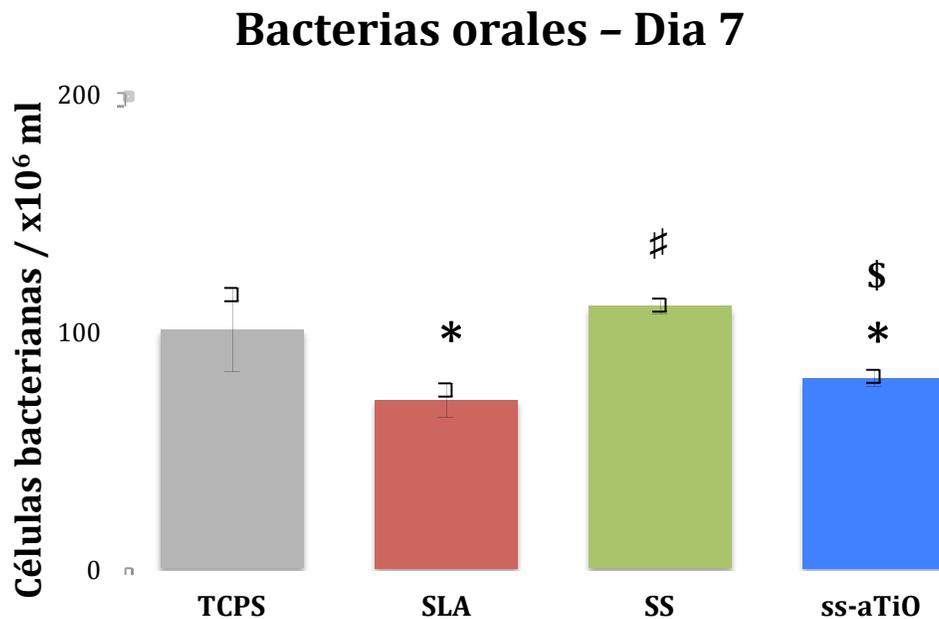
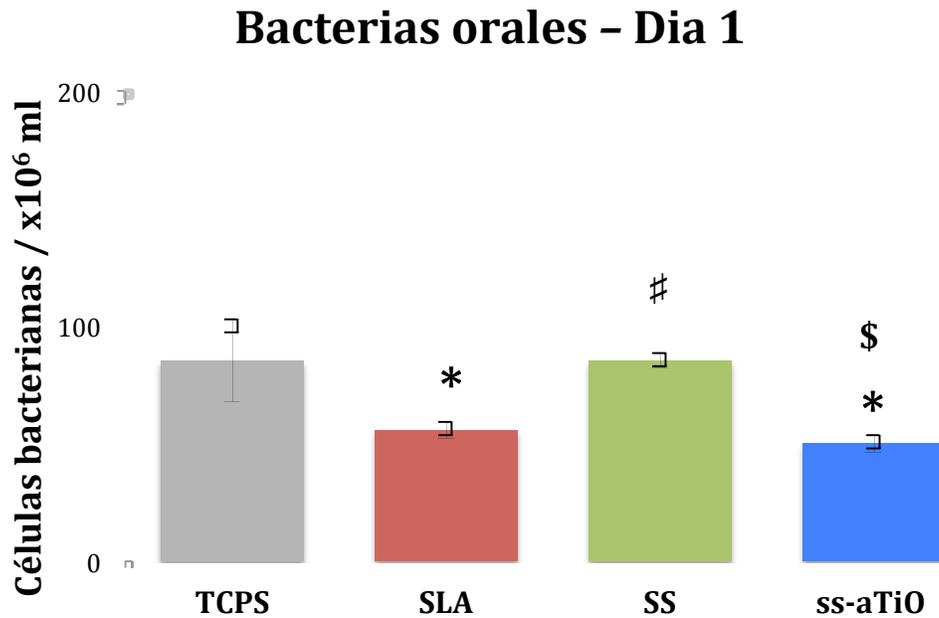


Figura 13. Viabilidad bacteriana en la formación la biopelícula al día 1 (A) y día 7 (B) en nueve especies bacterianas orales en co-cultivo analizada a través de espectrofotometría, retomadas de las superficies control de poliestireno (TCPS), superficies de titanio (SLA), sustratos de acero inoxidable de grado médico (SS) y superficies modificadas con óxido de titanio amorfo sobre acero inoxidable (ss-aTiO). *p < 0.05, vs. TCPS; #p < 0.05, vs. SLA; \$p < 0.05, vs. SS.

Hibridaciones DNA-DNA

En el análisis en la formación de la biopelícula a 1 día para el co-cultivo de nueve especies bacterianas orales por hibridaciones DNA-DNA a través de sondas marcadas para determinar los niveles individuales de cada una de las especie observamos los siguientes resultados; para la especie *A. israelii* los niveles más altos se detectaron en las superficie de ss-aTiO $17.17 \pm 2.21 \times 10^5$, seguido por superficie de acero inoxidable grado médico (SS) con $12.82 \pm 1.98 \times 10^5$, la superficie control de Poliestireno (TCPS) se detectaron cuentas de $6.52 \pm 0.18 \times 10^5$ y para la superficie de SLA no se detectaron cuentas bacterianas. Con respecto a la especie *A. actinomycetemcomitans* los niveles en cuentas más elevado se detectaron en las superficie de SS con $12.82 \pm 1.92 \times 10^5$, seguido por la superficie de ss-aTiO $11.22 \pm 0.86 \times 10^5$, en la superficie TCPS se detectaron cuentas de $9.59 \pm 0.24 \times 10^5$, mientras que para la superficie SLA los niveles fueron de $6.97 \pm 3.49 \times 10^5$, no observándose diferencias entre las superficies experimentales y control. En relación a la especie *C. rectus* los niveles en cuentas más elevado se detectaron de nuevo para la superficie de SS con $3.74 \pm 0.67 \times 10^5$, seguido por la superficie de ss-aTiO $2.24 \pm 0.48 \times 10^5$, en la superficie TCPS se detectaron cuentas de $1.55 \pm 0.36 \times 10^5$, mientras que para la superficie SLA los niveles fueron de $0.78 \pm 0.24 \times 10^5$, sin diferencias significativas entre las superficies experimentales y control. Para la especie *E. corrodens* las cuentas más altas se detectaron en la superficie TCPS con valores de $11.47 \pm 0.11 \times 10^5$, seguido de la superficie de SS con $10.41 \pm 0.21 \times 10^5$, la superficies de ss-aTiO con cuentas $7.28 \pm 0.68 \times 10^5$, mientras los niveles menores en cuentas bacterianas se detectaron en la superficie SLA con $0.40 \pm 0.39 \times 10^5$. Con

respecto a la especie *P. micra* en la superficie que se detectaron valores más altos fue para la superficie control TCPS con valores de $3.49 \pm 0.51 \times 10^5$, seguido de la superficie SS con valores de $0.66 \pm 0.06 \times 10^5$, mientras que para la superficie SLA y ss-aTiO no se detectaron cuentas bacterianas para esta especie. Para la especie *P. gingivalis* la única superficie donde se detectaron cuentas bacterianas fue la superficie control TCPS con $3.70 \pm 0.56 \times 10^5$. Muy similarmente *P. intermedia* fue detectada solamente en la superficies SLA y TCPS, con cuentas de $0.76 \pm 0.7 \times 10^5$ y $0.15 \pm 0.1 \times 10^5$, respectivamente. Para *S. sanguinis* las superficies con valores más altos fueron TCPS y SS con cuentas de $12.74 \pm 1.44 \times 10^5$ y $10.95 \pm 0.16 \times 10^5$, respectivamente. Mientras que las cuentas menores se detectaron en ss-aTiO y SLA con valores de $3.64 \pm 0.52 \times 10^5$ y $1.13 \pm 1.10 \times 10^5$, respectivamente. Respecto a *F. nucleatum* esta especie no se detectó en ningún ensayo. Los datos graficados y análisis estadísticos se muestran en la **figura 15**.

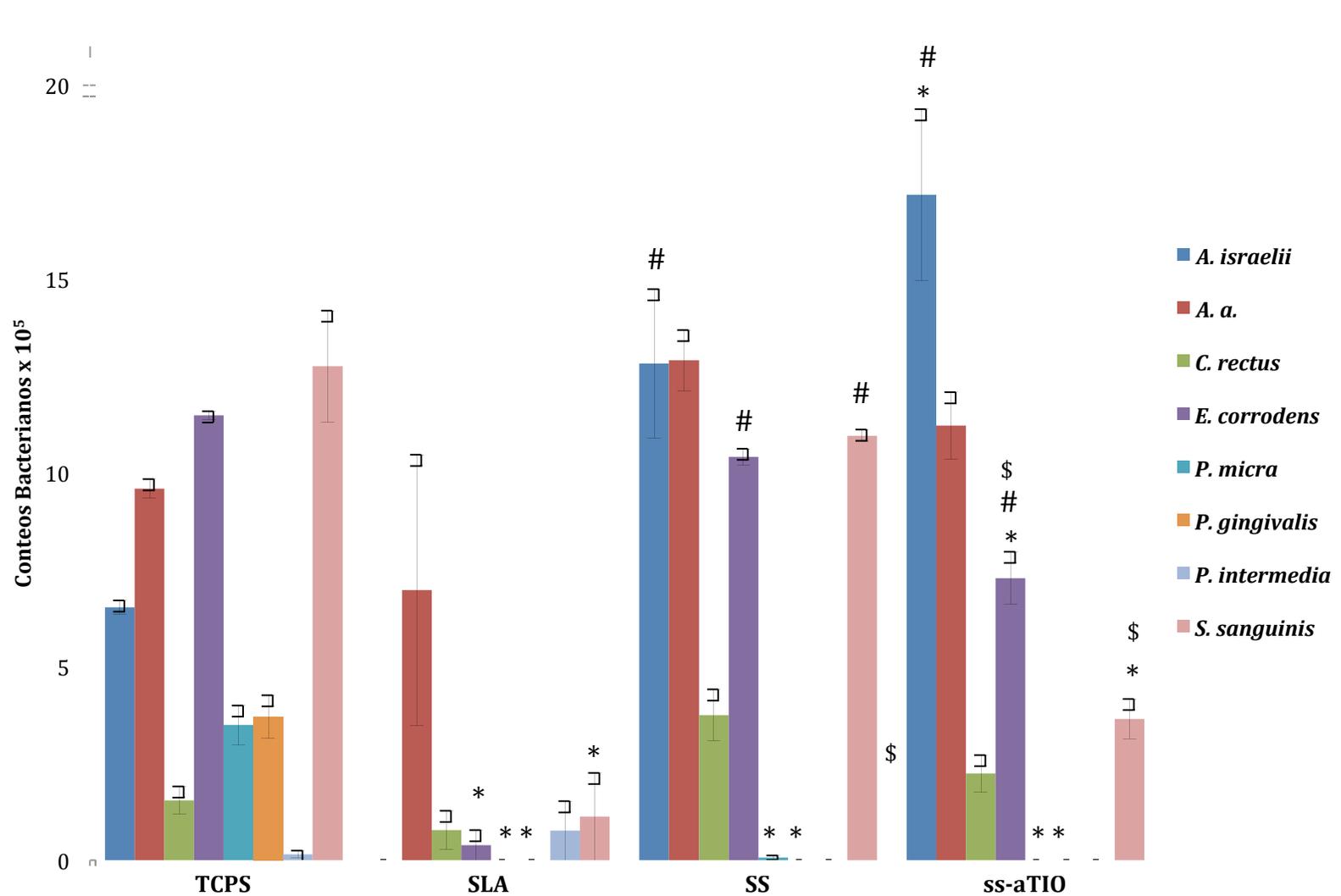


Figura 15. Cuentas bacterianas X 10⁵ en la formación la biopelícula al día 1 para nueve especies bacterianas orales en co-cultivo analizada a través hibridaciones DNA-DNA, retomadas de las superficies control de poliestireno (TCPS), superficies de titanio (SLA), sustratos de acero inoxidable de grado médico (SS) y superficies modificadas con el nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo sobre acero inoxidable (ss-aTiO). *p < 0.05, vs. TCPS; #p < 0.05, vs. SLA; \$p < 0.05, vs. SS.

Respecto al análisis en la formación de la biopelícula al día 7 para el co-cultivo de nueve especies bacterianas orales por hibridaciones DNA-DNA a través de sondas marcadas para determinar los niveles individual de cada una de las especie observamos los siguientes resultados; para la especie *A. israelii* los niveles más altos se detectaron en las superficie SS con $8.05 \pm 0.53 \times 10^5$, seguido por superficie ss-aTiO con $4.24 \pm 2.33 \times 10^5$, en la superficie control de Poliestireno (TCPS) se detectaron cuentas de $3.62 \pm 0.73 \times 10^5$ y para la superficie de SLA se detectaron las cuentas bacterianas más bajas con $0.81 \pm 0.18 \times 10^5$. Con respecto a la especie *A. actinomycetemcomitans* los niveles en cuentas más elevado se detectaron en las superficie SLA con $8.46 \pm 1.92 \times 10^5$, seguido por la superficie TCPS con $7.67 \pm 0.76 \times 10^5$, en la superficie SS se detectaron cuentas de $7.51 \pm 0.27 \times 10^5$, mientras que para la superficie modificada ss-aTiO los niveles fueron de $5.83 \pm 2.98 \times 10^5$, sin diferencias significativas entre las superficies. En relación a la especie *C. rectus* los niveles en cuentas más elevado se detectaron de nuevo para la superficie de SS con $2.57 \pm 0.5 \times 10^5$, mientras que las superficie TCPS y ss-aTiO mostraron cuentas similares 1.88 ± 0.97 y $1.88 \pm 0.71 \times 10^5$, respectivamente, mientras que no se detectaron cuentas bacterianas en la superficie SLA de titanio. Para la especie *E. corrodens* las cuentas más altas se detectaron igualmente en la superficies SS con valores de $7.53 \pm 0.41 \times 10^5$, seguido de la superficie de TCPS con $7.25 \pm 0.68 \times 10^5$, los niveles más bajos detectados para esta especie fueron en las superficies de ss-aTiO con cuentas de $3.91 \pm 1.99 \times 10^5$, para la superficie SLA de titanio por igual no se detectaron cuentas bacterias para esta especie. Con respecto a la especie *P. micra* en la superficie que se detectaron valores más altos fue para la superficie

SS con cuentas de $7.79 \pm 0.32 \times 10^5$, seguido de la superficie TCPS con valores $6.32 \pm 0.72 \times 10^5$, para la superficie ss-aTiO se detectaron las cuentas bacterianas de $4.02 \pm 2.12 \times 10^5$ y la superficie SLA de titanio presento los valores más bajos con cuentas de $2.85 \pm 0.16 \times 10^5$. Específicamente para las especies bacterianas *P. gingivalis* y *P. intermedia* no se detectaron cuentas bacterianas para ninguna de las superficies en el análisis a 7 días. Para *S. sanguinis* las superficies con valores más altos fueron TCPS y SS con cuentas de 9.58 ± 1.44 y $4.95 \pm 1.73 \times 10^5$, respectivamente, mientras que no se detectaron cuentas bacterianas para la superficie SLA de titanio. Respecto a *F. nucleatum* esta especie no se detectó en ningún ensayo al día 7. Los datos graficados y análisis estadísticos se muestran en la **figura 16**.

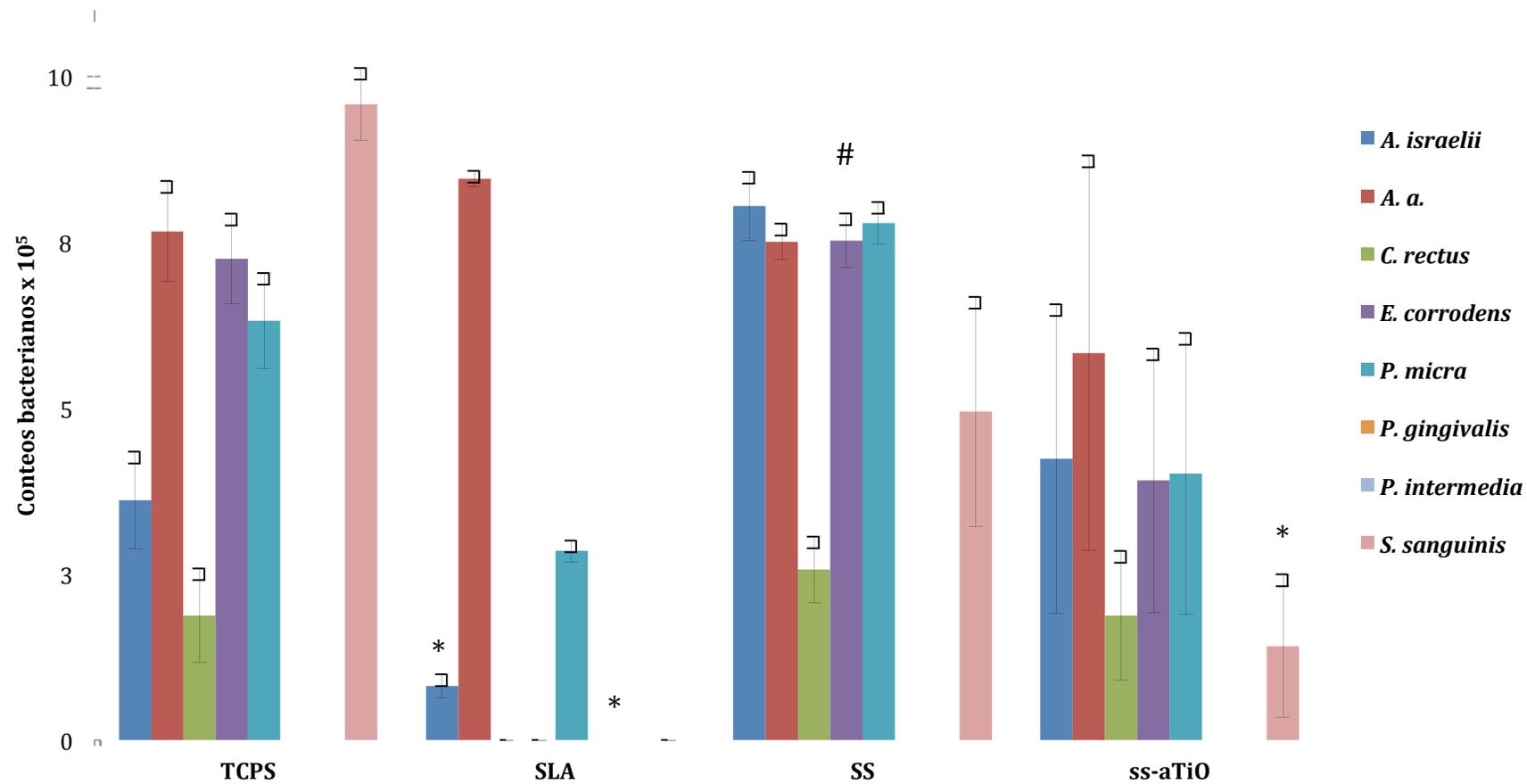


Figura 16. Cuentas bacterianas X 10⁵ en la formación la biopelícula al día 7 para nueve especies bacterianas orales en co-cultivo analizada a través hibridaciones DNA-DNA, retomadas de las superficies control de poliestireno (TCPS), superficies de titanio (SLA), sustratos de acero inoxidable de grado médico (SS) y superficies modificadas con el nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo sobre acero inoxidable (ss-aTiO). *p < 0.05. vs. TCPS: #p < 0.05. vs. SLA: \$p < 0.05. vs. SS.

Análisis de la biopelícula con microscopía confocal

El análisis por microscopía confocal se realizó a través del software integrado al microscopio en el cual se obtenían las unidades de intensidad arbitrarias (U.I.) para cada uno de los canales de emisión. Los análisis se hicieron por triplicado en cada una de las superficies experimentales.

Los resultados obtenidos del canal de fluorescencia en la especie *S. aureus* en los diferentes días evaluados para la superficie de titanio comercialmente puro (Ti) se muestran en la **figura 17 A-F**. A las 24 horas (Fig. 17A) se detectaron valores de 18.1 ± 8.1 U.I. mientras que los valores en la superficie de acero inoxidable de grado médico (SS) fueron de 23.3 ± 6.1 U.I. (Fig. 17B), con respecto a la superficie modificada superficialmente con el nanorecubrimiento de óxido de titanio (ss-aTiO) detectamos valores de 24.3 ± 4.3 U.I. (Fig. 17C). En el análisis a los 7 días para SLA se detectaron valores de 14.2 ± 6.2 U.I. (Fig. 17D), en relación con los valores para SS fueron de 8.0 ± 0.8 U.I. (Fig. 17E) y para la superficie ss-aTiO fueron de 4.8 ± 2.5 U.I. (Fig. 17F).

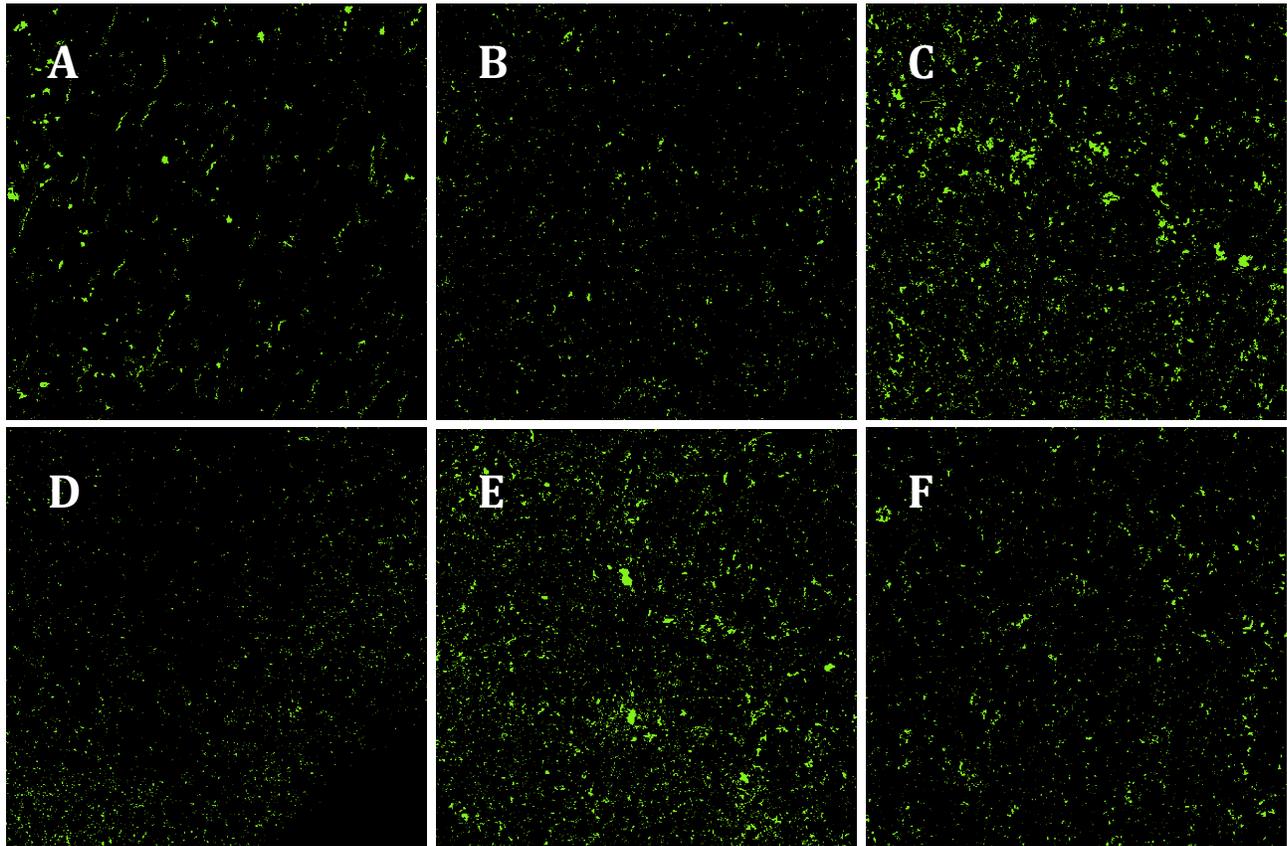


Figura 17 A-F. Micrografías cualitativas por microscopía confocal láser de barrido a 10X a los días uno y siete en la formación de la biopelícula para la especie *S. aureus* en las superficies de Titanio comercialmente puro (**A,D**), superficies de acero inoxidable de grado medico (**D,E**) y superficies modificadas con el nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo (**C,F**).

Los resultados obtenidos del canal de viabilidad en la especie *S. epidermidis* en los diferentes días evaluados para la superficie titanio comercialmente puro (SLA) de titanio se muestran en la **figura 18**. A las 24 horas (Fig. 18A) se detectaron valores de 19.9 ± 4.1 U.I mientras que los valores en la superficie de acero inoxidable de grado medico (SS) fueron de 21.3 ± 3.2 U.I (Fig. 18B), con respecto a la superficie modificada superficialmente con el nanorecubrimiento oxido de titanio (ss-aTiO) detectamos valores de 24.3 ± 4.3 U.I (Fig. 18C). En el análisis al día 7 para SLA se detectaron valores de 29.2 ± 5.2 U.I. (Fig. 18D), en relación a los valores para SS fueron de 35.7 ± 2.8 U.I. (Fig. 18E) y para la superficie ss-aTiO fueron de 31.8 ± 4.5 U.I. (Fig. 18F).

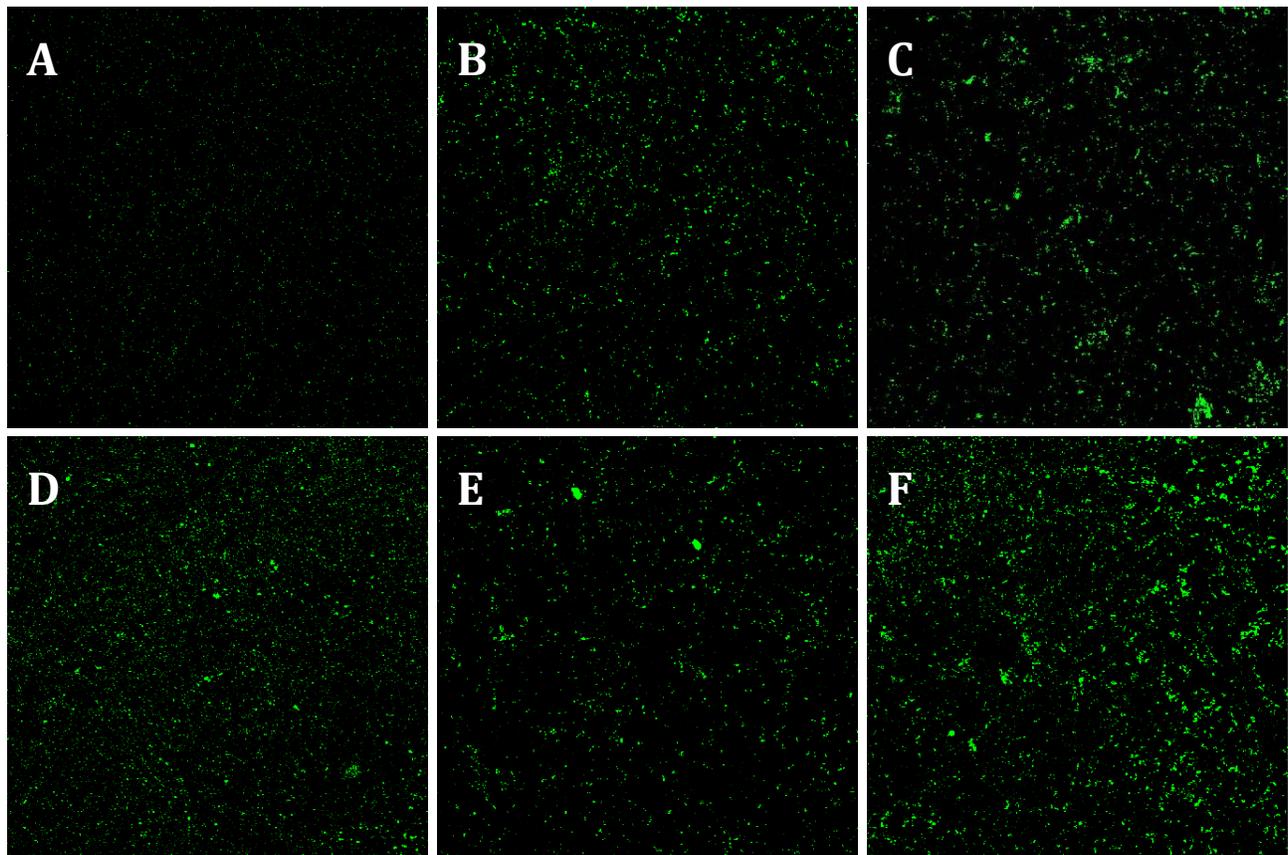


Figura 18. Micrografías cualitativas por microscopía confocal láser de barrido a 10X a los días uno y siete en la formación de la biopelícula para la especie *S. epidermidis* en las superficies de Titanio comercialmente puro (A,D), superficies de acero inoxidable de grado medico (B,E) y superficies modificadas con el nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo (C,F).

Los resultados obtenidos del canal de viabilidad, en el modelo empleando 9 especies orales en mix, en los diferentes días evaluados para la superficie titanio comercialmente puro (SLA) de titanio se muestran en la **figura 19**. A las 24 horas (Fig. 19A) se detectaron valores de 17.7 ± 2.1 U.I mientras que los valores en la superficie de acero inoxidable de grado medico (SS) fueron de 15.9 ± 3.2 U.I (Fig. 19B), con respecto a la superficie modificada superficialmente con el nanorecubrimiento oxido de titanio (ss-aTiO) detectamos valores de 16.3 ± 0.3 U.I

(Fig. 19C). En el análisis al día 7 para SLA se detectaron valores de 9.2 ± 1.2 U.I. (Fig. 19D), en relación a los valores para SS fueron de 6.7 ± 0.8 U.I. (Fig. 19E) y para la superficie ss-aTiO fueron de 5.8 ± 0.5 U.I. (Fig. 19F).

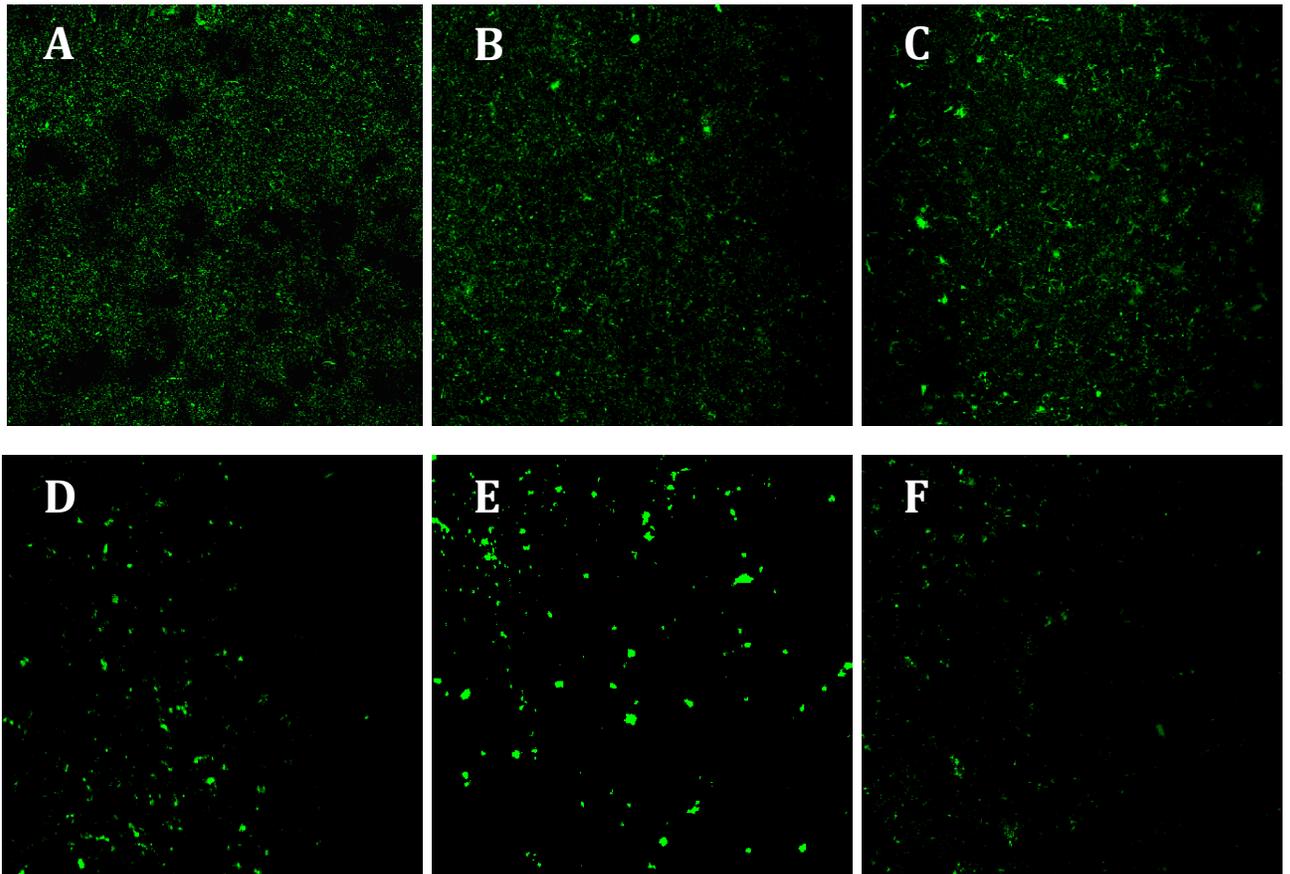


Figura 19 A-F. Micrografías cualitativas por microscopía confocal laser de barrido a 10X a los días uno y siete en la formación de la biopelícula de nueve especies orales en cultivo en las superficies de Titanio comercialmente puro (A,D), superficies de acero inoxidable de grado medico (B,E) y superficies modificadas con el nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo (C,F).

ENSAYOS BIOLÓGICOS CON CÉLULAS MESENQUIMALES HUMANAS DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA (hMSC's)

ENSAYOS DE ADHESIÓN Y PROLIFERACIÓN CELULAR

Los ensayos de proliferación celular fueron evaluados específicamente al observar confluencia en la superficie TCPS, esto al día 7, en la cual se midieron los niveles mayores de $0.37 \pm 0.01 \mu\text{g DNA/sup}$, mientras que para las superficies experimentales los valores fueron muy similares, la superficie modificada ss-aTiO con valores de $0.23 \pm 0.008 \mu\text{g DNA/sup}$, la superficies de SS con $0.21 \pm 0.011 \mu\text{g DNA/sup}$ y finalmente en la superficies de titanio SLA se detectaron $0.20 \pm 0.005 \mu\text{g DNA/sup}$. Encontrando diferencias significativas sólo entre las superficies experimentales y las superficies control, como se observa en la **figura 20**.

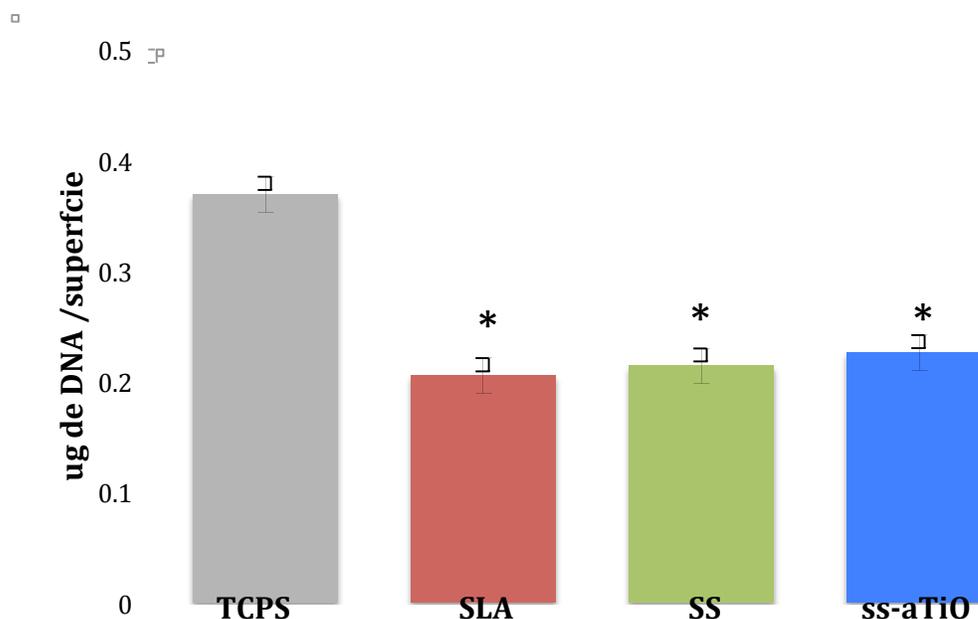


Figura 20. Efecto de la química y cristalinidad en la proliferación celular. Células mesenquimales humanas derivadas de médula ósea (hMSC's) se sembraron en las superficies de poliestireno (TCPS), de titanio (SLA), acero inoxidable de grado médico (SS) y sustratos SS modificados con el nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo (ss-aTiO) y cultivadas hasta confluencia en la superficie TCPS. El análisis de proliferación fue

evaluado a los 7 días a través de la fluorescencia de DNA de doble cadena. *p < 0.05, vs. TCPS; #p < 0.05, vs. SLA; \$p < 0.05, vs. SS.

INMUNOENSAYOS DE FUNCIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR.

En la determinación actividad osteoblástica y diferenciación celular, a través del Inmunoensayos de la actividad específica de fosfatasa alcalina, los valores de mayor actividad enzimática se observaron en las células cultivadas en superficies de titanio SLA y ss-aTiO con valores de 6.01 ± 0.41 uMol Pi/mg proteína/min y 5.45 ± 0.28 uMol Pi/mg proteína/min, respectivamente. Mientras que en la superficie SS se detectaron valores de 4.20 ± 0.28 uMol Pi/mg proteína/min y la menor actividad enzimática se detectó en la superficie control TCPS con valores de 2.32 ± 0.17 uMol Pi/mg proteína/min, como se observa en la figura 21.

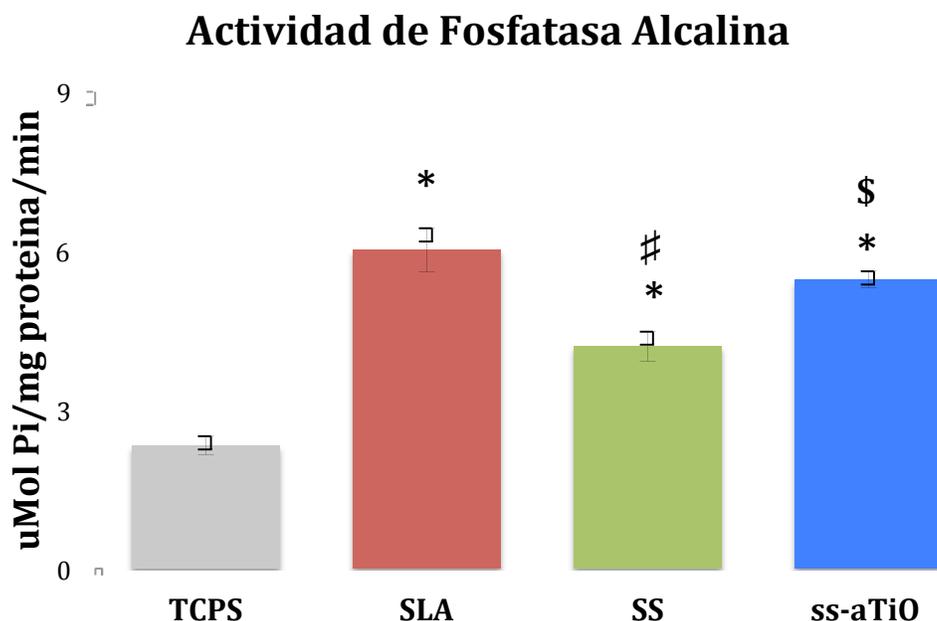


Figura 21. Efecto de un nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo en la actividad enzimática de fosfatasa alcalina. Células mesenquimales humanas derivadas de médula ósea (hMSC's) se sembraron en las superficies de poliestireno (TCPS), de titanio (SLA), acero inoxidable de grado médico (SS) y sustratos SS modificados con el nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo (ss-aTiO) y cultivadas hasta confluencia en

la superficie TCPS. Posteriormente se recolectaron con Triton X y se analizaron por el inmunoensayo de la actividad específica para ALP. *p < 0.05, vs. TCPS; #p < 0.05, vs. SLA; \$p < 0.05, vs. SS.

Respecto a la determinación de la producción de osteocalcina, la producción más alta se detectó en las células cultivadas en superficies de titanio SLA y ss-aTiO con valores de 6.02 ± 0.20 ng osteocalcina/ μ g DNA y 5.51 ± 0.31 ng osteocalcina/ μ g DNA, respectivamente. Para la superficies de SS se detectaron 3.67 ± 0.21 ng osteocalcina/ μ g DNA y la menor producción se detectó en la superficie control TCPS con valores de 1.33 ± 0.11 ng osteocalcina/ μ g DNA, como se observa en la **figura 22**.

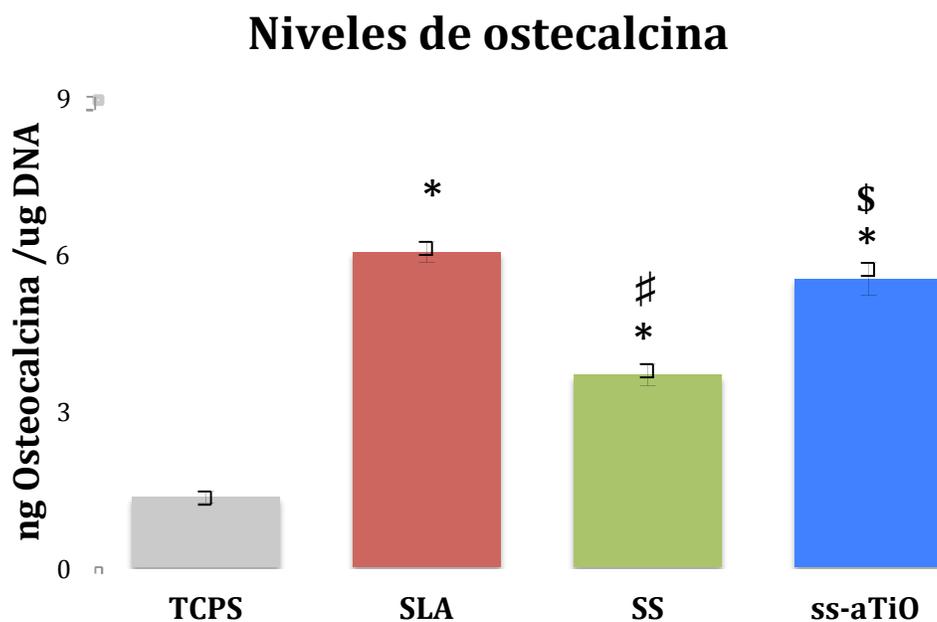


Figura 22. Efecto de un nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo en la producción de la proteína osteocalcina. Células mesenquimales humanas derivadas de médula ósea (hMSC's) se sembraron en las superficies de poliestireno (TCPS), de titanio (SLA), acero inoxidable de grado médico (SS) y sustratos SS modificados con el nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo (ss-aTiO) y cultivadas hasta confluencia en la superficie TCPS. Posteriormente se adicionó medio de cultivo fresco por 24 horas y finalmente se evaluaron los niveles de producción protéica en el sobrenadante a través del inmunoensayo de ELISA. *p < 0.05, vs. TCPS; #p < 0.05, vs. SLA; \$p < 0.05, vs. SS.

ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN PROTEICA EN EL MICROAMBIENTE GENERADO POR HBM- MSC's

En el análisis de la producción de un microambiente asociado a regeneración ósea se evaluaron cuatro moléculas relacionadas. La primera de ellas, proteína morfogenética 2 (BMP-2), asociada a función osteoblástica donde la mayor producción en el microambiente se detectó en las células cultivadas en superficies de titanio SLA con valores de 18.40 ± 0.46 ng BMP-2/ μ g DNA, seguido de la superficies de ss-aTiO con 16.22 ± 0.51 ng BMP-2/ μ g DNA, la superficie SS con 11.93 ± 0.42 ng BMP-2/ μ g DNA, mientras que para la superficie control (TCPS) se detectaron los niveles menores con 4.81 ± 0.27 ng BMP-2/ μ g DNA. Encontrando diferencias significativas entre las diferentes superficies como se observa en la **figura 23**.

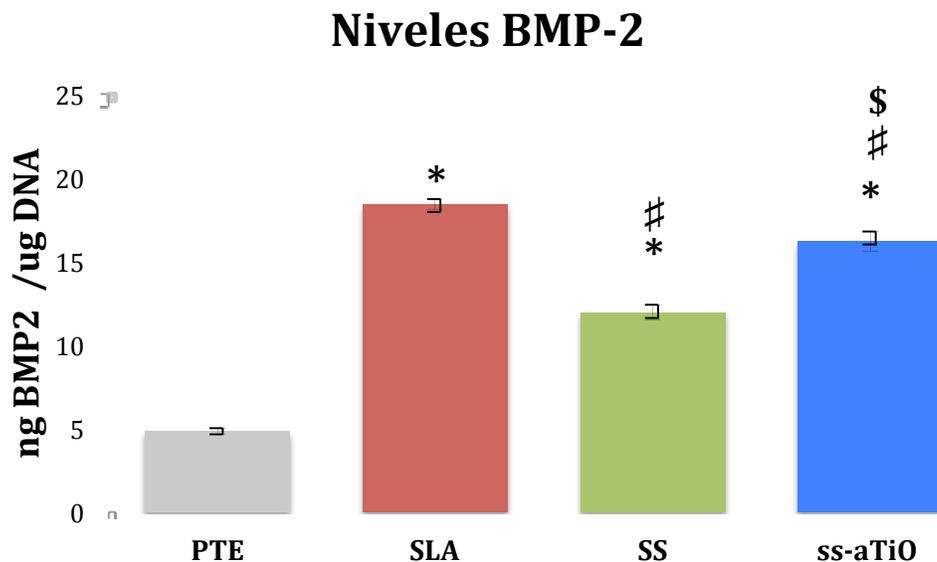


Figura 23. Efecto de un nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo en la producción de la proteína BMP-2. Células humanas mesenquimales derivadas de medula ósea (hMSC's) se sembraron en las superficies de poliestireno (TCPS), de titanio (SLA), acero inoxidable de grado médico (SS) y sustratos SS modificados con un nanorecubrimiento de óxido de

titanio amorfo (ss-aTiO) y cultivadas hasta confluencia en la superficie TCPS. Posteriormente se adiciono medio de cultivo fresco por 24 horas y finalmente se evaluaron los niveles de producción proteica en el sobrenadante a través del ensayo de ELISA. *p < 0.05, vs. TCPS; #p < 0.05, vs. SLA; \$p < 0.05, vs. SS.

Respecto a la proteína Osteoprotegerina, marcador asociado a la función osteoclástica, la mayor producción se detectó en las células cultivadas en superficies de titanio SLA con valores de 80.87 ± 2.30 ng osteoprotegerina/ μ g DNA, seguido de la superficies ss-aTiO con 70.50 ± 2.94 ng osteoprotegerina / μ g DNA. Mientras que los niveles más bajos se detectaron para las superficies SS y TCPS con 46.95 ± 2.80 ng osteoprotegerina / μ g DNA y 37.74 ± 2.01 ng osteoprotegerina/ μ g DNA, respectivamente. Encontrando diferencias significativas entre las diferentes superficies como se observa en la **figura 24**

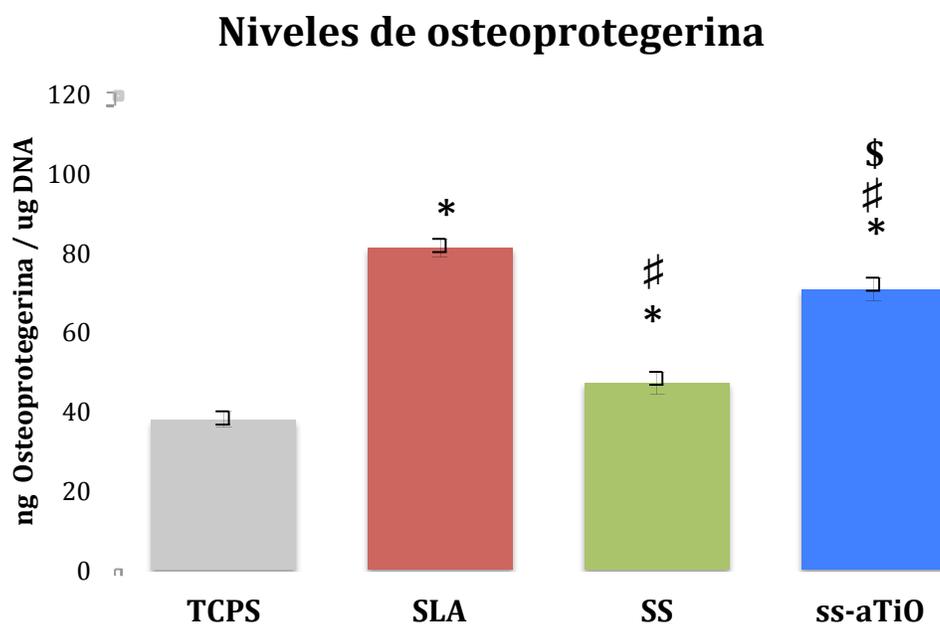


Fig. 24. Efecto de un nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo en la producción de la proteína osteoprotegerina. Células humanas mesenquimales derivadas de medula ósea (hMSC's) se sembraron en las superficies de poliestireno (TCPS), de titanio (SLA), acero inoxidable de grado médico (SS) y sustratos SS modificados con el nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo (ss-aTiO) y cultivadas hasta confluencia en

la superficie TCPS. Posteriormente se adiciono medio de cultivo fresco por 24 horas y finalmente se evaluaron los niveles de producción proteica en el sobrenadante a través del ensayo de ELISA. * $p < 0.05$, vs. TCPS; # $p < 0.05$, vs. SLA; \$ $p < 0.05$, vs. SS.

Para el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), marcador asociado en angiogénesis, los niveles más altos se detectaron en las células cultivadas en las superficies SLA y ss-aTiO con valores de 36.91 ± 1.20 ng VEGF/ μ g DNA y 33.99 ± 1.43 ng VEGF/ μ g DNA, respectivamente. superficie SS con 27.74 ± 1.43 ng osteoprotegerina / μ g DNA, mientras que para la superficie TCPS se detectaron los niveles más bajos con 15.74 ± 2.01 ng osteoprotegerina/ μ g DNA. Observando diferencias significativas entre las diferentes superficies como se muestra en la **figura 25.**

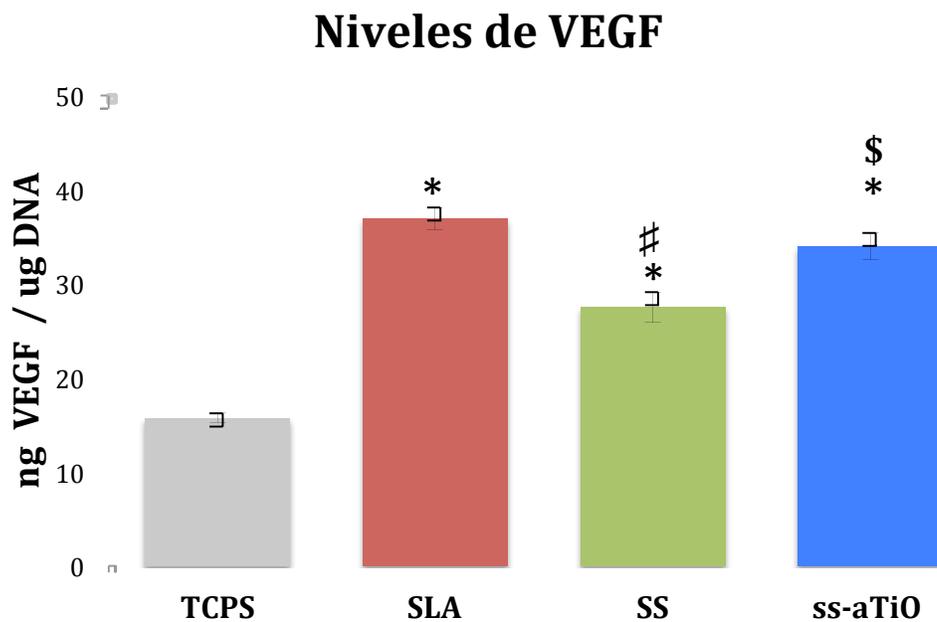


Fig. 25. Efecto de un nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo en la producción del factor de crecimiento vasculo-endotelial (VEGF). Células humanas mesenquimales derivadas de medula ósea (hMSC's) se sembraron en las superficies de poliestireno (TCPS), de titanio (SLA), acero inoxidable de grado médico (SS) y sustratos SS modificados con el nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo (ss-aTiO) y cultivadas hasta confluencia en la superficie TCPS. Posteriormente se adicionó medio de cultivo fresco por 24 horas y finalmente se evaluaron los niveles de producción protéica en el

sobrenadante a través del ensayo de ELISA. * $p < 0.05$, vs. TCPS; # $p < 0.05$, vs. SLA; \$ $p < 0.05$, vs. SS.

EXPRESIÓN GÉNICA DE INTEGRINAS Y MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN OSTEoblástica EN LAS hMSC'S

En relación a la diferenciación osteoblástica evaluamos el marcador génico RUNX2 el cual tuvo la mayor expresión en células cultivadas en las superficies ss-aTiO y SLA con niveles de expresión de 1.91 ± 0.09 RUNX2/GADPH y 1.86 ± 0.09 RUNX2/GADPH, respectivamente. En las superficies SS los valores de expresión fueron de 1.43 ± 0.14 RUNX2/GADPH, mientras que en las superficies control TCPS se detectaron los niveles más bajos en expresión de 0.28 ± 0.02 RUNX2/GADPH como se observa en la **figura 26**.

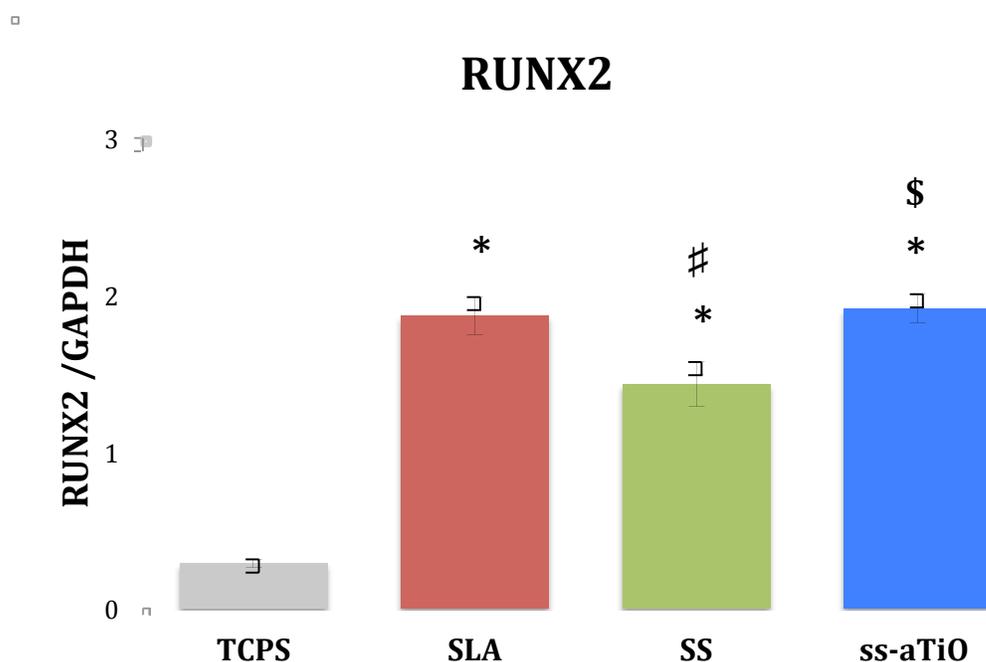


Fig. 26. Efecto de un nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo en la expresión génica de RUNX2. Células humanas mesenquimales derivadas de medula ósea (hMSC's) se sembraron en las superficies de poliestireno (TCPS), de titanio (SLA), acero inoxidable de grado médico (SS) y sustratos SS modificados con el nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo (ss-aTiO) y cultivadas hasta confluencia en la superficie TCPS.

Posteriormente se adiciono medio de cultivo fresco por 12 horas. Posteriormente se evaluaron los niveles de expresión génica en a través de PCR en tiempo real (qPCR). * $p < 0.05$, vs. TCPS; # $p < 0.05$, vs. SLA; \$ $p < 0.05$, vs. SS.

Respecto a la expresión de ITGA1, marcador asociada en adhesión celular, la mayor expresión en células cultivadas en superficies SLA y ss-aTiO y con niveles de expresión de 3.91 ± 0.27 ITGA1/GADPH y 3.75 ± 0.22 ITGA1/GADPH, respectivamente. En la superficie SS los valores de expresión fueron de 1.77 ± 0.09 ITGA1/GADPH, mientras que en la superficie control TCPS se detectaron los niveles más bajos en expresión de 0.75 ± 0.04 ITGA1/GADPH como se observa en la **figura 27**.

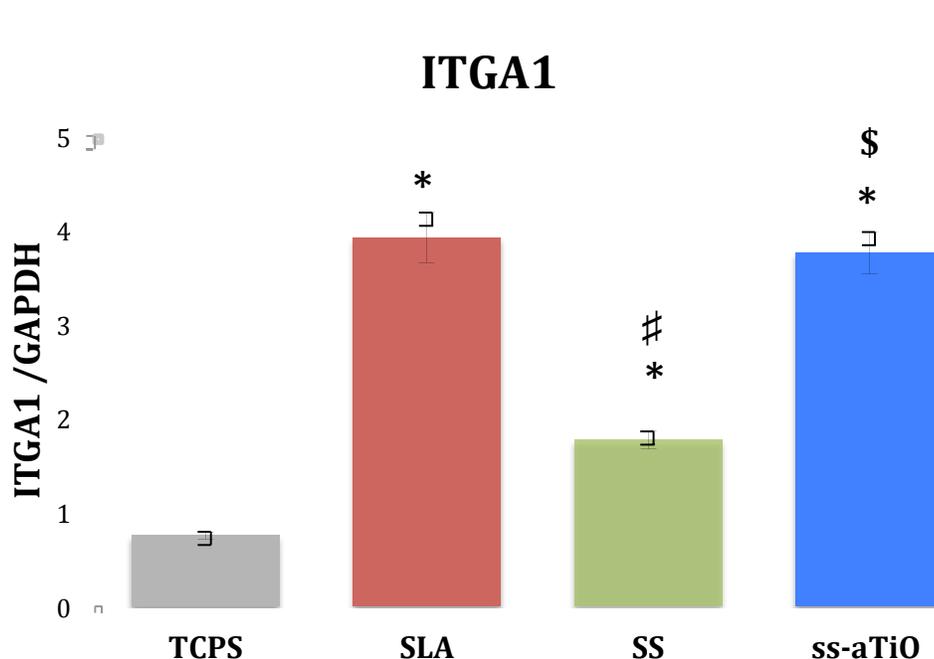


Fig. 27. Efecto de un nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo en la expresión génica de ITGA1. Células humanas mesenquimales derivadas de medula ósea (hMSC's) se sembraron en las superficies de poliestireno (TCPS), de titanio (SLA), acero inoxidable de grado médico (SS) y sustratos SS modificados con el nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo (ss-aTiO) y cultivadas hasta confluencia en la superficie TCPS. Posteriormente se adiciono medio de cultivo fresco por 12 horas. Posteriormente se evaluaron los niveles de expresión génica en a través de PCR en tiempo real (qPCR). * $p < 0.05$, vs. TCPS; # $p < 0.05$, vs. SLA; \$ $p < 0.05$, vs. SS.

En relación a la expresión de ITGA2, marcador asociada en adhesión celular y diferenciación, la mayor expresión en células cultivadas en superficies SLA y ss-aTiO con niveles de expresión de 3.66 ± 0.26 ITGA2/GADPH y 3.45 ± 0.16 ITGA2/GADPH, respectivamente. En la superficie SS los valores de expresión fueron de 2.46 ± 0.20 ITGA2/GADPH, mientras que en la superficie control TCPS se detectaron los niveles más bajos en expresión de 0.80 ± 0.04 ITGA2/GADPH como se observa en la **figura 28**.

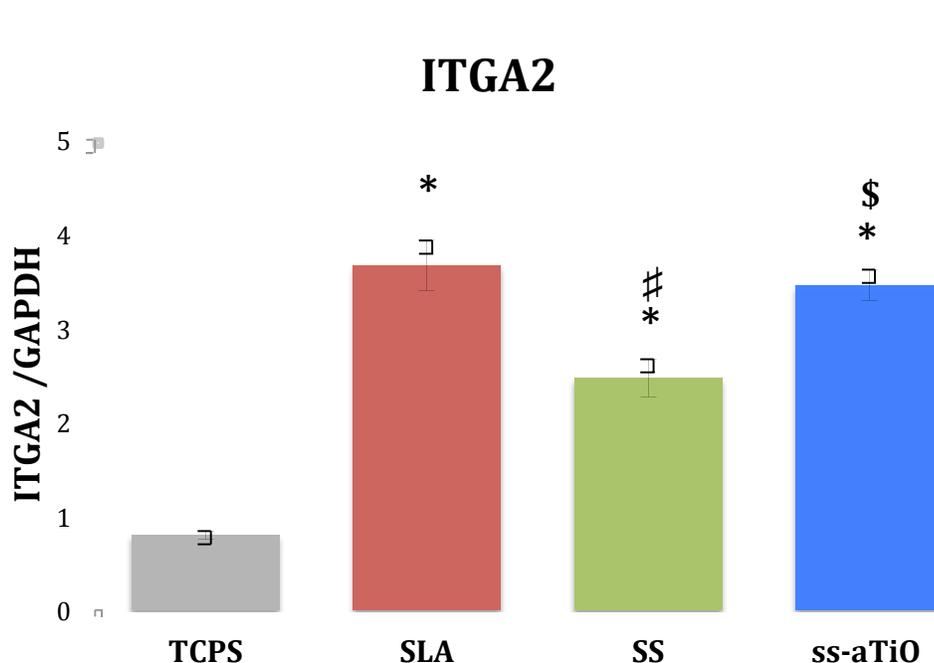


Fig. 28. Efecto de un nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo en la expresión génica de ITGA2. Células humanas mesenquimales derivadas de medula ósea (hMSC's) se sembraron en las superficies de poliestireno (TCPS), de titanio (SLA), acero inoxidable de grado médico (SS) y sustratos SS modificados con el nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo (ss-aTiO) y cultivadas hasta confluencia en la superficie TCPS. Posteriormente se adiciono medio de cultivo fresco por 12 horas. Posteriormente se evaluaron los niveles de expresión génica en a través de PCR en tiempo real (qPCR). * $p < 0.05$, vs. TCPS; # $p < 0.05$, vs. SLA; \$ $p < 0.05$, vs. SS.

En el caso ITGA5 la mayor expresión en células cultivadas en superficies TCPS con niveles de expresión de 2.59 ± 0.14 ITGA5/GADPH, seguido de la superficie SS con 2.00 ± 0.08 ITGA5/GADPH. Mientras que en las superficies ss-aTiO y SLA se detectaron los niveles más bajos de expresión con 0.93 ± 0.16 ITGA5/GADPH y 0.80 ± 0.07 ITGA5/GADPH, respectivamente, como se muestra en la **figura 29**.

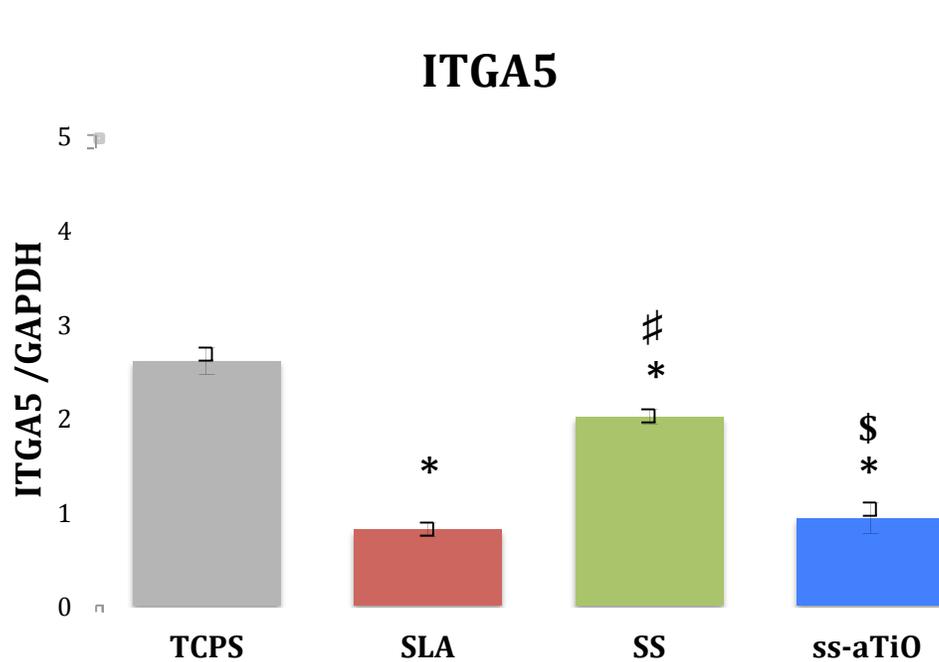


Fig. 29. Efecto de un nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo en la expresión génica de ITGA5. Células humanas mesenquimales derivadas de medula ósea (hMSC's) se sembraron en las superficies de poliestireno (TCPS), de titanio (SLA), acero inoxidable de grado médico (SS) y sustratos SS modificados con el nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo (ss-aTiO) y cultivadas hasta confluencia en la superficie TCPS. Posteriormente se adicionó medio de cultivo fresco por 12 horas. Posteriormente se evaluaron los niveles de expresión génica en a través de PCR en tiempo real (qPCR). * $p < 0.05$, vs. TCPS; # $p < 0.05$, vs. SLA; \$ $p < 0.05$, vs. SS.

En relación a la expresión de ITGAV, la mayor expresión en células cultivadas en superficies ss-aTiO y SLA con niveles de 2.67 ± 0.13 ITGAV/GADPH

y 2.62 ± 0.05 ITGAV/GADPH, respectivamente. Mientras que en las superficies TCPS y SLA se detectaron los niveles más bajos de expresión con 0.96 ± 0.05 ITGAV/GADPH y 0.84 ± 0.08 ITGAV/GADPH, respectivamente, como se observa en la **figura 30**

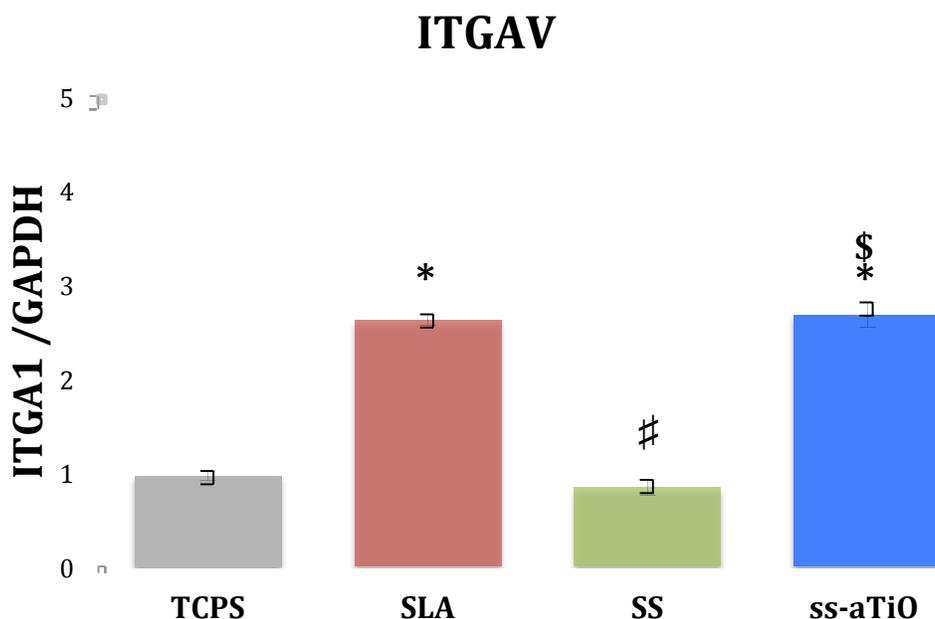


Fig. 30. Efecto de un nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo en la expresión génica de ITGAV. Células humanas mesenquimales derivadas de medula ósea (hMSC's) se sembraron en las superficies de poliestireno (TCPS), de titanio (SLA), acero inoxidable de grado médico (SS) y sustratos SS modificados con el nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo (ss-aTiO) y cultivadas hasta confluencia en la superficie TCPS. Posteriormente se adiciono medio de cultivo fresco por 12 horas. Posteriormente, se evaluaron los niveles de expresión génica a través de PCR en tiempo real (qPCR). * $p < 0.05$, vs. TCPS; # $p < 0.05$, vs. SLA; \$ $p < 0.05$, vs. SS.

Respecto a la expresión de ITGAB1, la mayor expresión en células cultivadas en superficies SLA con niveles de 2.44 ± 0.22 ITGB1/GADPH, seguido de las superficies ss-aTiO y SS con 1.94 ± 0.13 ITGB1/GADPH y 1.80 ± 0.09 ITGAV/GADPH, respectivamente. Mientras que los niveles más bajos de

expresión se detectaron en la superficie TCPS con 0.60 ± 0.03 ITGAV/GADPH, como se muestra en la **figura 31**

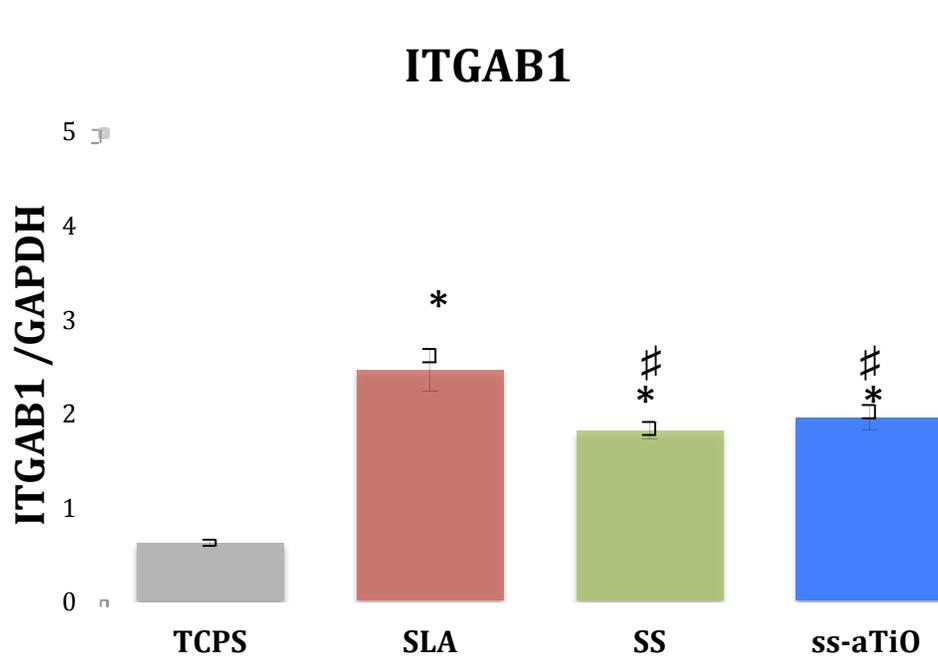


Fig. 31. Efecto de un nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo en la expresión génica de ITGAB1. Células humanas mesenquimales derivadas de médula ósea (hMSC's) se sembraron en las superficies de poliestireno (TCPS), de titanio (SLA), acero inoxidable de grado médico (SS) y sustratos SS modificados con el nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo (ss-aTiO) y cultivadas hasta confluencia en la superficie TCPS. Posteriormente se adicionó medio de cultivo fresco por 12 horas. Posteriormente, se evaluaron los niveles de expresión génica en a través de PCR en tiempo real (qPCR). * $p < 0.05$, vs. TCPS; # $p < 0.05$, vs. SLA; \$ $p < 0.05$, vs. SS.

DISCUSIÓN

En este estudio analizamos el efecto que tienen las características físicas, químicas e incluso el ordenamiento atómico superficial de materiales de uso biomédicos como el titanio y el acero inoxidable, en la respuesta celular tanto en células bacterianas como en células mesenquimales humanas.

Una superficie micro-estructurada, con potencial de oseointegración debe de tener un rango de rugosidad media (Ra) de 2-5 μm o 1-2 (Sa) (Le Guehenec et al., 2007; Wennerberg and Albrektsson, 2009). En este estudio empleamos tres métodos de modificación superficial; mecánico, químico y físico. Utilizamos el método mecánico de arenado, junto con el método químico de grabado ácido generando superficies con una Ra= $\sim 3.1 \mu\text{m}$ o Sa= $\sim 2.7 \mu\text{m}$. Posteriormente, depositamos una película delgada de óxido de titanio amorfo mediante el método de *magnetron sputtering*. Este nano-recubrimiento no modificó la micro-rugosidad generada a través del arenado y el grabado ácido. Por tanto en este estudio demostramos que las características superficiales como rugosidad media, topografía y química superficial, pueden ser controladas en dispositivos oseointegrables basados en acero inoxidable y más aún funcionalizarlos con nano-recubrimientos preservando su microestructura y micro-topografía.

Uno de los abordajes de este estudio fue el desarrollo de un nano-recubrimiento que permanezca en el material modificado durante el tiempo funcional del dispositivo. En este estudio demostramos que a través del empleo de una capa amortiguadora de titanio e incrementando la temperatura durante el depósito, se puede modificar la fuerza de adhesión del nano-recubrimiento al

sustrato de acero inoxidable. Otros grupos de trabajo, han logrado la optimización de la adhesión película-sustrato a través de la estrategia del cambio del contenido de fase del óxido de titanio de un 47% hasta un 72% de rutilo, observando que la resistencia al desprendimiento de la película se incrementa desde 5.8 N hasta 17 N (Honghong Shao et al. 2010). Krishna y col., a través del depósito de titanio y posterior oxidación del mismo por medio de oxidación térmica sobre sustratos de acero inoxidable, observaron que era 3 veces más resistente al desgaste en comparación a su contraparte no oxidada y el sustrato de acero inoxidable (Rama Krishna DV et al. 2005), lo cual en acuerdo con nuestro estudio ya que a través del depósito del óxido de titanio observamos un incremento en la resistencia al desprendimiento de la película de hasta 19 N. Por otra parte, en nuestro estudio detectamos que al emplear temperaturas cercanas a los 250° C durante el depósito, este incremento solo influía sutilmente en la adhesión del recubrimiento al sustrato de acero, sin embargo el óxido de titanio a estas temperatura de depósito comenzaba a formar una fase cristalina, lo cual fue confirmado en el análisis estructural de la estructura atómica del recubrimiento a través de XRD.

Respecto a la influencia de las características superficiales de un material sobre la respuesta celular bacteriana, en este estudio empleamos dos modelos para evaluar la adhesión y formación de biopelículas, tratando de determinar si la superficie o modificación superficial óxido de titanio con estructura atómica amorfa (ss-aTiO) podría ser considerada como anti adhesiva y/ó reguladora de la formación de una biopelícula. El primer modelo de biopelículas que analizamos fue un modelo de mono-especie utilizando individualmente cepas de *S. epidermidis* y

S. aureus, especies asociadas a infecciones en dispositivos ortopédicos (Esposito and Leone, 2008; McConoughey et al., 2014; Montanaro et al., 2011), y el otro fue un modelo multiespecie, empleando un co-cultivo de nueve especies orales representativas de biopelícula dental subgingival (Socransky and Haffajee, 2005) y asociadas peri-implantitis (Mombelli, 2002; Subramani et al., 2009).

En lo que se refiere a la adhesión de *S. aureus* y *S. epidermidis* esta ha sido correlacionada con el incremento en la hidrofobicidad del material la cual es el factor principal que promueve la adhesión bacteriana (Oliveira R et al 2001). Esto concuerda con los hallazgos encontrados en nuestro estudio cuando fueron analizadas estas especies, por otra parte, también es cierto que en un escenario clínico se ha demostrado que esta relación puede llegar a ser inversa (Quirynen et al., 1990). Esta falta de correlación entre los modelos termodinámicos y modelos *in vitro* así como situaciones clínicas más complejas puede ser explicada por la formación de películas condicionantes las cuales alteran las superficies de los dispositivos tan rápido como se adsorben los fluidos en la superficie (Almaguer-Flores et al., 2010; Bruinsma et al., 2001; MacKintosh et al., 2006). Cabe resaltar que en el modelo de biopelícula en mono-especie detectamos generalmente una menor viabilidad en la biopelícula al séptimo día comparado al primer día de incubación, esto posiblemente es consecuencia del estado metabólicamente disminuido encontrado en las especies bacterianas en biopelículas maduras (Davies, 2003). Un resultado interesante fue que la bacteria que mostró mayor número de células viables en ambos tiempos y superficies evaluadas fue *S. epidermidis* en comparación con *S. aureus*. Ambas bacterias pertenecen al género *Staphylococcus* y tienen un tamaño aprox. de 1 micra, por lo que es difícil concluir

que este resultado se deba a la relación rugosidad-tamaño de bacteria que ha sido propuesto (Wang et al., 2014) . Una explicación más plausible a este resultado podría deberse a que tanto *S. epidermidis* como *S. aureus* así como otras especies bacterianas, poseen mecanismos específicos de adhesión para ciertas proteínas, como fibrinógeno y fibronectina (MacKintosh et al., 2006), y por tanto las propiedades superficiales del biomaterial que conlleven a un cambio conformacional de estas proteínas durante su adsorción en superficie (Keselowsky et al., 2003) podrían influenciar la adhesión bacteriana y formación de la biopelícula.

Por otra parte, cuando analizamos la formación temprana y maduración de las biopelículas de especies orales *in vitro* a través del modelo multiespecie, pudimos observar que este fenómeno fue más sensible a la química superficial de los sustratos evaluados, como se ha demostrado anteriormente con modelos similares de biopelículas orales (Almaguer-Flores et al 2009). Se ha descrito que la cavidad oral puede ser colonizada por más de 700 especies diferentes de microorganismos (Aas et al. 2005), por tanto la respuesta en superficie del dispositivo oral implantable puede determinar a este complejo consorcio bacteriano puede determinar su éxito a largo plazo. Una de las características importantes de las biopelícula es que se pueden localizar en cualquier superficie, dental o implante, sin embargo su composición puede variar de acuerdo al microambiente y/ó al estado de salud o enfermedad (Koyanagi et al., 2013; Martinez-Hernandez et al., 2016).

En la cavidad oral, la formación de las biopelículas ocurre por una colonización en secuencia de ciertas especies bacterianas (Socransky and

Haffajee, 2005; Subramani et al., 2009). Algunas especies han sido identificadas como colonizadores primarios de la superficie dental, adhiriéndose y proliferando en estadios tempranos de colonización (Ej. *A. israelii* y *S. sanguinis*). Existe un segundo grupo de bacterias que funcionan como puente entre los colonizadores tempranos y tardíos que también son conocidos como patógenos putativos (Ej. *F. nucleatum*, *E. corrodens*, *Campylobacter rectus* y *P. micra*). Finalmente, hay un grupo de especies que aparece en los últimos estadios del desarrollo de la biopelícula oral, los cuales son considerados verdaderos patógenos periodontales y peri-implantarios (Ej. *P. gingivalis*, *T. forsythia*) (Kolenbrander et al., 2006) (Koyanagi et al., 2013).

Interesantemente, cuando analizamos a través de hibridaciones DNA-DNA la composición inicial a las 24 horas y a los siete días de incubación de la biopelícula multiespecie formada sobre las superficies experimentales, pudimos observar que en la superficies funcionalizadas (ss-aTiO) la proporción de *E. corrodens* y *S. sanguinis* fue significativamente menor al compararla con el perfil microbiológico observado sobre el sustrato de acero inoxidable, por el contrario, encontramos un incremento significativo en la proporción de *A. israelii* sobre los sustratos funcionalizados, comparándolo con las superficies de acero inoxidable y titanio SLA. Estos resultados concuerdan con estudios previos que han reportado que *E. corrodens* coloniza en una menor proporción en el caso de superficies de acero inoxidable modificadas con películas delgadas de titanio (Almaguer-Flores et al., 2010). Por otra parte, la especie *S. sanguinis* otros autores han demostrado su alta afinidad por sustratos metálicos como el titanio (Hauser-Gerspach et al., 2007). Esto podría sugerir que el nanorecubrimiento con óxido de titanio amorfo,

probablemente influye en la composición de la biopelícula multiespecie a un perfil microbiológico más asociado a un estado de salud. Es de notar, que no detectamos influencia de las características superficiales entre las diferentes superficies en los perfiles microbianos de la biopelícula oral madura a los 7 días, y solamente detectamos influencia de la química superficial en la especie *E. corrodens*, al encontrar cuentas más altas en las superficies de acero comparándolas con las superficies basadas en óxido de titanio.

Por otra parte, los perfiles microbianos encontrados en las superficies de titanio SLA mostraron mayores cuentas bacterianas con respecto a los sustratos de acero inoxidable y a nuestras superficies funcionalizadas con ss-aTiO en cada una de las especies, específicamente *S. sanguinis* y *E. Corrodens*. Además, no se detectaron cuentas de la especie *A. israelii* la cual está asociada en altas proporciones a una biopelícula dental en salud periodontal, mientras la especie *A. actinomycetemcomitans*, bacteria íntimamente asociada a peri-implantitis, predominó con altas proporciones con respecto a las otras especies en la superficie de titanio SLA, resultados acorde a reportes previos (Almaguer-Flores et al., 2012; Quirynen and Van Assche, 2012). Por otra parte, para la superficie de acero inoxidable (SS), una de las características en la composición de la biopelícula fue la alta proporción en las especies *E. corrodens*, *A. israelii* y *S. sanguinis*, mientras que en el estudio de Almaguer-Flores y col., no observaron diferencias significativas en la adhesión bacteriana a las 24 horas para la mayoría de las nueve especies evaluadas, sí observaron una disminución en la colonización por *P. intermedia* y el aumento en *P. gingivalis* (Almaguer-Flores et al.

2009), posiblemente explicado por la similitud en la hidrofobicidad y rugosidad de las superficies.

En este estudio, también evaluamos la respuesta de células mesenquimales humanas al ser colocadas sobre las diferentes superficies experimentales. Una de las metas principales de nuestro estudio era diseñar una superficie basada en acero inoxidable funcionalizada con un nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo empleando un modelo con el cual pudiéramos estudiar la influencia en la respuesta biológica asociada a regeneración ósea en el acero inoxidable de grado médico. Más aún, empleamos este modelo para determinar si las superficies tenían la capacidad de dirigir células humanas mesenquimales a un fenotipo osteoblástico a través de sus diferentes características superficiales (química, cristalinidad y rugosidad).

En cuanto a la proliferación celular, no hubo diferencias significativas de las células mesenquimales entre las diferentes superficies. Otros estudios han demostrado que la proliferación de osteoblastos es favorecida en superficies basadas en óxido de titanio en su fase de anatasa (He et al., 2008), sin embargo empleando células de tipo epitelial, se ha observado una mejor proliferación en superficies basadas en óxido de titanio en su fase amorfa (Zhou W, 2006). Por otra parte Anselme y *co/s.* analizaron varias superficies con diferente composición química y misma topografía, no encontrando diferencias significativas en la adhesión celular de osteoblastos aunque la proliferación fue variable (Anselme K et al, 1999).

Uno de los objetivos principales del estudio fue analizar moléculas asociadas a la diferenciación osteoblástica, como fosfatasa alcalina (ALP), osteocalcina (OCN), RUNX2 (marcador génico osteoblástico) observamos que la actividad, producción, expresión de estos marcadores fue en parte dependiente de la microestructura al observar en todas las muestras experimentales un incremento de estas proteínas comparadas con el control. En nuestro estudio, observamos que este efecto también fue dependiente de la química superficial al observar que las superficies funcionalizadas con óxido de titanio amorfo y las muestras de titanio SLA mostraron niveles más altos de ALP y OCN, comparándolas con las de acero inoxidable, similar a lo descrito en previos estudios (Martin JY et al. 1995)(Boyan BD et al. 2002)(Olivares-Navarrete et al 2010). Igualmente, un estudio reciente reportó la diferenciación de células derivadas de médula ósea sobre sustratos de acero inoxidable modificados con óxido de titanio a través de la técnica de sol-gel y determinaron que la actividad de la ALP y OCN fue más alta al día 18 en las superficies modificadas, sin embargo, estos ensayos fueron desarrollados en medios con aditivos osteogénicos (Marycz K et al. 2015).

Por tanto, nuestros hallazgos sugieren por una parte que la microestructura tiene el potencial de regular la diferenciación de hMSC's, a través de la producción de moléculas asociadas a osteoblastos, de la misma manera, la diferenciación es igualmente regulada por la química superficial cuando detectamos una respuesta positiva más robusta en las superficies funcionalizadas con óxido de titanio amorfo (ss-aTiO). Cabe mencionar que mientras otros trabajos han demostrado el efecto de las superficies de biomateriales metálicos, estos modelos empleados usan moléculas como BMP-2 y medio osteogénico que tienen una influencia

predominante en la diferenciación osteoblástica (Nair MB et al. 2009) (Na K et al. 2007) (Kang Q 2009) mientras que en nuestro modelo al no emplear ningún inductor en el medio que favorezca la osteogénesis o mineralización, el efecto es principalmente debido a las características de superficies y/o el microambiente creado por las células que interactúan con la superficie.

Desde que el microambiente creado por las células cuando interactúan con las superficies puede regular su respuesta de manera paracrina o autocrina, diferentes estudios han demostrado que propiedades como la rugosidad y energía libre superficial regulan la producción de proteínas asociadas a regeneración ósea como proteínas morfogénicas óseas, asociadas a función osteoblástica y diferenciación (Olivares-Navarrete et al. 2015), al igual que moléculas asociadas a la nueva formación de vasos sanguíneos como VEGF (Raines AL et al 2010), fenómeno imprescindible en la regeneración de tejido óseo, así como la producción de osteoprotegerina necesaria para disminuir la osteoclastogénesis (Schwartz Z et al. 2009). Mientras que en nuestro modelo evaluamos cómo las diferentes características de superficie influyen la creación de un microambiente asociado a regeneración ósea, es importante mencionar que la evidencia respecto a la química superficial acero inoxidable es mínima en este aspecto.

En este estudio demostramos que la producción de BMP-2, está controlada de forma principal por la química superficial, ya que los niveles fueron superiores en las superficies basadas en óxido de titanio, mientras que el efecto del orden atómico pudo haber sido disimulado por la influencia de la superficie ligeramente más rugosa en la superficies de titanio SLA, misma tendencia que observamos en

los niveles del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y osteoprotegerina, molécula asociada a la inhibición de la osteoclastogénesis (resorción ósea). Por otra parte, los niveles de proteína BMP-4 fueron igualmente regulados por la química superficial, aunque específicamente en este caso con una respuesta más robusta en las superficies basadas en acero inoxidable de grado médico. Estos resultados sugieren que las células mesenquimales al interactuar con la superficie modificada con óxido de titanio amorfo en superficies micro estructuradas, producen un microambiente más adecuado para regeneración ósea en comparación a superficies de acero no funcionalizadas.

Con respecto a la vía de señalización potencial a través de la cual suceden las producción y expresión de los diferentes factores previamente discutidos, en estudios previos se mostraron que las subunidades de integrinas, proteínas heterodiméricas en la superficie de membrana celular, son reguladas por superficies micro-estructuradas y la química superficial (García, 2005; Siebers et al., 2005; Sinha and Tuan, 1996). También ha sido demostrado que el silenciamiento de la integrina $\alpha 2\beta 1$ disminuye el potencial de diferenciación de superficies micro-estructuradas basadas en titanio (Olivares-Navarrete et al., 2008; Olivares-Navarrete et al., 2010). Es de notar que en nuestro estudio, la expresión de ITGA1, ITGA2, ITGAV y ITGB1 fue más alta en las superficies de acero funcionalizadas con óxido de titanio amorfo, sin embargo, la expresión de ITGA5 se vio regulada a la alta por la química superficial de superficies basadas en acero, lo cual sugiere que la adhesión y diferenciación de células mesenquimales en acero inoxidable puede ser principalmente reguladas a través de ITGA5. De esta manera la alta expresión de integrinas específicas en las superficies de óxido de

titanio amorfo (ss-aTiO) y titanio (SLA) sugiere probablemente como consecuencia el motivo de la creación de un microambiente osteogénico más apropiado en células mesenquimales humanas cultivadas en estas superficies.

CONCLUSIONES

El diseño de la superficie microestructurada ($\sim 2.5 \mu\text{m}$) de las muestras de acero inoxidable de grado médico (SS), se logró a través del arenado con dióxido de silicio (tamaño de partícula de $\sim 500 \mu\text{m}$) y un grabado con ácido sulfúrico por 90 segundos.

La optimización de la adhesión película-sustrato se logró con las variables de depósito de 100°C y una capa amortiguadora de titanio de 15 nanómetros con lo cual se incrementó la resistencia de la adhesión hasta 19 N.

El espesor del nanorecubrimiento de óxido de titanio amorfo sobre los sustratos SS (ss-aTiO) fue de aproximadamente 75 nm.

La adhesión y formación de biopelículas de *S. aureus* fue menor en las superficies funcionalizadas (ss-aTiO), mientras que *S. epidermidis* sólo mostró una disminución en el proceso de adhesión bacteriana, en las mismas superficies.

El análisis de la adhesión bacteriana y la formación de biopelículas de las especies orales, mostró que las superficies de ss-aTiO y SLA tuvieron un comportamiento similar en estos parámetros, mientras que en las superficies de acero inoxidable hubo una mayor adhesión y formación de biopelículas de especies orales.

La proporción de las especies bacterianas orales que conformaron las biopelículas sobre las superficies funcionalizadas mostró un perfil asociado con especies bacterianas relacionadas con salud periodontal y peri-implantar.

La proliferación de las hBM-MSCs, fue similar en todas las superficies analizadas.

La expresión y producción de los marcadores proteicos y génicos asociados a la diferenciación osteoblástica, fue más alta en las superficies funcionalizadas en comparación con los sustratos de acero inoxidable.

La producción de un microambiente asociado a regeneración ósea a través de factores de crecimiento como BMP-2, OPG y VEGFs fue mayor en las superficies funcionalizadas (ss-aTiO) con respecto a las superficies de acero inoxidable.

El microambiente osteogénico y diferenciación osteoblástica generado por las superficies funcionalizadas con óxido de titanio amorfo parece estar asociado a la señalización a través de ITGA1, ITGA2, ITGAV y ITGB1.

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo-Morantes CY, Irizarry-Ortiz RA, Caceres-Valencia PG, Singh SP, Ramirez-Vick JE (2012). Combinatorial growth of oxide nanoscaffolds and its influence in osteoblast cell adhesion. *J Appl Phys* 111(10):102810-1028107.
- Agrawal CM (1998). Reconstructing the Human Body Using Biomaterials. *JOM*:31-35.
- Almaguer-Flores A, Ximenez-Fyvie LA, Rodil SE (2010). Oral bacterial adhesion on amorphous carbon and titanium films: effect of surface roughness and culture media. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 92(1):196-204.
- Almaguer-Flores A, Olivares-Navarrete R, Wieland M, Ximenez-Fyvie LA, Schwartz Z, Boyan BD (2012). Influence of topography and hydrophilicity on initial oral biofilm formation on microstructured titanium surfaces in vitro. *Clin Oral Implants Res* 23(3):301-307.
- Andreiotelli M, Wenz HJ, Kohal RJ (2009). Are ceramic implants a viable alternative to titanium implants? A systematic literature review. *Clin Oral Implants Res* 20 Suppl 4(32-47).
- Antunes RA, de Lima NB, Rizzutto Mde A, Higa OZ, Saiki M, Costa I (2013). Surface interactions of a W-DLC-coated biomedical AISI 316L stainless steel in physiological solution. *J Mater Sci Mater Med* 24(4):863-876.
- Bachle M, Kohal RJ (2004). A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. *Clin Oral Implants Res* 15(6):683-692.
- Boyan BD, Schwartz Z, Lohmann CH, Sylvia VL, Cochran DL, Dean DD *et al.* (2003). Pretreatment of bone with osteoclasts affects phenotypic expression of osteoblast-like cells. *J Orthop Res* 21(4):638-647.
- Bruinsma GM, van der Mei HC, Busscher HJ (2001). Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. *Biomaterials* 22(24):3217-3224.
- Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H (1991). Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 25(7):889-902.
- Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL *et al.* (2004). Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res* 83(7):529-533.
- Cao B, Wang Y, Li N, Liu B, Zhang Y (2013). Preparation of an orthodontic bracket coated with an nitrogen-doped TiO(2-x)N(y) thin film and examination of its antimicrobial performance. *Dent Mater J* 32(2):311-316.
- Chambers TJ, Revell PA, Fuller K, Athanasou NA (1984). Resorption of bone by isolated rabbit osteoclasts. *J Cell Sci* 66(383-399).

- Chen YaD, D.D., (2006). Effect of calcination temperature on the photocatalytic activity and adhesion of TiO₂ films prepared by the P-25 powder-modified sol-gel method. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* Vol. 244(73-82).
- Choi AH, Ben-Nissan B, Matinlinna JP, Conway RC (2013). Current perspectives: calcium phosphate nanocoatings and nanocomposite coatings in dentistry. *J Dent Res* 92(10):853-859.
- Chung CJ, Hsieh, P.Y., Hsiao, C.H., Lin, H.I., Leyland, A., Matthews, A. and He, J.L., (2009). Multifunctional arc ion plated TiO₂ photocatalytic coatings with improved wear and corrosion protection. *Surface and Coatings Technology*, Vol. 203(1689–1693).
- Clark GC, Williams DF (1982). The effects of proteins on metallic corrosion. *J Biomed Mater Res* 16(2):125-134.
- Cochran DL (1999). A comparison of endosseous dental implant surfaces. *J Periodontol* 70(12):1523-1539.
- Cochran DL, Buser D, ten Bruggenkate CM, Weingart D, Taylor TM, Bernard JP *et al.* (2002). The use of reduced healing times on ITI implants with a sandblasted and acid-etched (SLA) surface: early results from clinical trials on ITI SLA implants. *Clin Oral Implants Res* 13(2):144-153.
- Cooke FW (1992). Ceramics in orthopedic surgery. *Clin Orthop Relat Res* 276):135-146.
- Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G (1994). Biofilms, the customized microniche. *Journal of bacteriology* 176(8):2137-2142.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284(5418):1318-1322.
- Costerton JW (2005). Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin Orthop Relat Res* 437):7-11.
- Darouiche RO (2001). Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. *Clin Infect Dis* 33(9):1567-1572.
- Darouiche RO (2004). Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med* 350(14):1422-1429.
- Davies D (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2(2):114-122.
- Donachie M (1998). Biomedical alloys. *Advanced Materials & Processes* 154(1):63-65.
- Eisenbarth E, Velten D, Muller M, Thull R, Breme J (2006). Nanostructured niobium oxide coatings influence osteoblast adhesion. *J Biomed Mater Res A* 79(1):166-175.
- Esposito S, Leone S (2008). Prosthetic joint infections: microbiology, diagnosis, management and prevention. *Int J Antimicrob Agents* 32(4):287-293.

- Gambogi J (2012). U.S. Geological Survey, Mineral Commodity Summaries.
- Garcia AJ (2005). Get a grip: integrins in cell-biomaterial interactions. *Biomaterials* 26(36):7525-7529.
- Ge S, Chen J, Huang N (2009). [The effect of immobilized laminin on titanium-oxide films to the behavior of human umbilical vein endothelial cells]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 26(1):97-100.
- Giavaresi G, Giardino R, Ambrosio L, Battiston G, Gerbasi R, Fini M *et al.* (2003). In vitro biocompatibility of titanium oxide for prosthetic devices nanostructured by low pressure metal-organic chemical vapor deposition. *Int J Artif Organs* 26(8):774-780.
- Gittens RA, McLachlan T, Olivares-Navarrete R, Cai Y, Berner S, Tannenbaum R *et al.* (2011). The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. *Biomaterials* 32(13):3395-3403.
- Gristina AG (1987). Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 237(4822):1588-1595.
- Hasan MM, A.S.M.A. Haseeb, H.H. Masjuki and R. Saidur (2010). Adhesion and wear behavior of nanostructured titanium oxide thin films. *International Journal of Mechanical and Materials Engineering* Vol. 5 (1):5-10.
- Hauser-Gerspach I, Kulik EM, Weiger R, Decker EM, Von Ohle C, Meyer J (2007). Adhesion of *Streptococcus sanguinis* to dental implant and restorative materials in vitro. *Dent Mater J* 26(3):361-366.
- He J, Zhou W, Zhou X, Zhong X, Zhang X, Wan P *et al.* (2008). The anatase phase of nanotopography titania plays an important role on osteoblast cell morphology and proliferation. *J Mater Sci Mater Med* 19(11):3465-3472.
- Hinuber C, Kleemann C, Friederichs RJ, Haubold L, Scheibe HJ, Schuelke T *et al.* (2010). Biocompatibility and mechanical properties of diamond-like coatings on cobalt-chromium-molybdenum steel and titanium-aluminum-vanadium biomedical alloys. *J Biomed Mater Res A* 95(2):388-400.
- Homsy CA (1970). Bio-compatibility in selection of materials for implantation. *J Biomed Mater Res* 4(3):341-356.
- Hrkac T, Rohl C, Podschun R, Zaporojtchenko V, Strunskus T, Papavlassopoulos H *et al.* (2013). Huge increase of therapeutic window at a bioactive silver/titania nanocomposite coating surface compared to solution. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 33(4):2367-2375.
- Huang N, Yang P, Leng YX, Chen JY, Sun H, Wang J *et al.* (2003). Hemocompatibility of titanium oxide films. *Biomaterials* 24(13):2177-2187.

- Jaworski R, Pawlowski, L., Roudet, F., Kozerski, S. and Petit, F., (2008). Characterization of mechanical properties of suspension plasma sprayed TiO₂ coatings using scratch test. *Surface and Coatings Technology* Vol. 202(2644–2653).
- Karpagavalli R, Zhou A, Chellamuthu P, Nguyen K (2007). Corrosion behavior and biocompatibility of nanostructured TiO₂ film on Ti6Al4V. *J Biomed Mater Res A* 83(4):1087-1095.
- Keselowsky BG, Collard DM, Garcia AJ (2003). Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *J Biomed Mater Res A* 66(2):247-259.
- Kolenbrander PE, Palmer RJ, Jr., Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI (2006). Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000* 42(47-79).
- Koyanagi T, Sakamoto M, Takeuchi Y, Maruyama N, Ohkuma M, Izumi Y (2013). Comprehensive microbiological findings in peri-implantitis and periodontitis. *J Clin Periodontol* 40(3):218-226.
- Kuo DHaT, K.H., (2002). Growth and properties of titania and aluminum titanate thin films obtained by r.f. magnetron sputtering. *Thin Solid Films* 420–421(497–502).
- Kuwabara A, Hori N, Sawada T, Hoshi N, Watazu A, Kimoto K (2012). Enhanced biological responses of a hydroxyapatite/TiO₂ hybrid structure when surface electric charge is controlled using radiofrequency sputtering. *Dent Mater J* 31(3):368-376.
- Lackner JM, Waldhauser, W., Ebner, R., Major, B. and Schöberl, T., (2004). Pulsed laser deposition of titaniumoxide coatings at room temperature—structural, mechanical and tribological properties. *Surface and Coatings Technology* Vol. 180-181(585–590).
- Lappalainen R, Santavirta SS (2005). Potential of coatings in total hip replacement. *Clin Orthop Relat Res* 430:72-79.
- Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y (2007). Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* 23(7):844-854.
- Lilja M, Genvad A, Astrand M, Stromme M, Enqvist H (2011). Influence of microstructure and chemical composition of sputter deposited TiO₂ thin films on in vitro bioactivity. *J Mater Sci Mater Med* 22(12):2727-2734.
- Lindgren M, Astrand M, Wiklund U, Engqvist H (2009). Investigation of boundary conditions for biomimetic HA deposition on titanium oxide surfaces. *J Mater Sci Mater Med* 20(7):1401-1408.
- MacKintosh EE, Patel JD, Marchant RE, Anderson JM (2006). Effects of biomaterial surface chemistry on the adhesion and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* in vitro. *J Biomed Mater Res A* 78(4):836-842.

- Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J, Jr. *et al.* (1995). Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res* 29(3):389-401.
- Martinez-Hernandez M, Olivares-Navarrete R, Almaguer-Flores A (2016). Influence of the Periodontal Status on the Initial-Biofilm Formation on Titanium Surfaces. *Clin Implant Dent Relat Res* 18(1):174-181.
- McConoughey SJ, Howlin R, Granger JF, Manring MM, Calhoun JH, Shirliff M *et al.* (2014). Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future Microbiol* 9(8):987-1007.
- Meffert RM (1999). Ceramic-coated implant systems. *Adv Dent Res* 13(170-172).
- Mombelli A (2002). Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. *Periodontol* 2000 28(177-189).
- Montanaro L, Speziale P, Campoccia D, Ravaioli S, Cangini I, Pietrocola G *et al.* (2011). Scenery of Staphylococcus implant infections in orthopedics. *Future Microbiol* 6(11):1329-1349.
- Narayanan R, Seshadri SK, Kwon TY, Kim KH (2008). Calcium phosphate-based coatings on titanium and its alloys. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 85(1):279-299.
- NIH (2010). National Institutes of Health NIH Technology Assessment Conference Summary.
- Olivares-Navarrete R, Raz P, Zhao G, Chen J, Wieland M, Cochran DL *et al.* (2008). Integrin alpha2beta1 plays a critical role in osteoblast response to micron-scale surface structure and surface energy of titanium substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(41):15767-15772.
- Olivares-Navarrete R, Hyzy SL, Hutton DL, Erdman CP, Wieland M, Boyan BD *et al.* (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.
- Ong JL, Prince CW, Lucas LC (1995). Cellular response to well-characterized calcium phosphate coatings and titanium surfaces in vitro. *J Biomed Mater Res* 29(2):165-172.
- Pan J, Leygraf C, Thierry D, Ektessabi AM (1997). Corrosion resistance for biomaterial applications of TiO₂ films deposited on titanium and stainless steel by ion-beam-assisted sputtering. *J Biomed Mater Res* 35(3):309-318.
- Patel R (2005). Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin Orthop Relat Res* 437(1):41-47.
- Prodanov L, Lamers E, Domanski M, Luttge R, Jansen JA, Walboomers XF (2013). The effect of nanometric surface texture on bone contact to titanium implants in rabbit tibia. *Biomaterials* 34(12):2920-2927.

- Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, van Steenberghe D (1990). The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man. *J Clin Periodontol* 17(3):138-144.
- Quirynen M, Van Assche N (2012). RCT comparing minimally with moderately rough implants. Part 2: microbial observations. *Clin Oral Implants Res* 23(5):625-634.
- Raines AL, Olivares-Navarrete R, Wieland M, Cochran DL, Schwartz Z, Boyan BD (2010). Regulation of angiogenesis during osseointegration by titanium surface microstructure and energy. *Biomaterials* 31(18):4909-4917.
- Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P (1998). Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys* 20(2):92-102.
- Rossi S, Tirri T, Paldan H, Kuntsi-Vaattovaara H, Tulamo R, Narhi T (2008). Peri-implant tissue response to TiO₂ surface modified implants. *Clin Oral Implants Res* 19(4):348-355.
- Roy RK, Lee KR (2007). Biomedical applications of diamond-like carbon coatings: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 83(1):72-84.
- Ryan TJ (2007). Infection following soft tissue injury: its role in wound healing. *Curr Opin Infect Dis* 20(2):124-128.
- Shah AG, Shetty PC, Ramachandra CS, Bhat NS, Laxmikanth SM (2011). In vitro assessment of photocatalytic titanium oxide surface modified stainless steel orthodontic brackets for antiadherent and antibacterial properties against *Lactobacillus acidophilus*. *Angle Orthod* 81(6):1028-1035.
- Siebers MC, ter Brugge PJ, Walboomers XF, Jansen JA (2005). Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review. *Biomaterials* 26(2):137-146.
- Sinha RK, Tuan RS (1996). Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials. *Bone* 18(5):451-457.
- Socransky SS, Haffajee AD (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 38(135-187).
- Steinemann SG (1998). Titanium--the material of choice? *Periodontol* 2000 17(7-21).
- Subbiahdoss G, Kuijjer R, Grijpma DW, van der Mei HC, Busscher HJ (2009). Microbial biofilm growth vs. tissue integration: "the race for the surface" experimentally studied. *Acta Biomater* 5(5):1399-1404.
- Subramani K, Jung RE, Molenberg A, Hammerle CH (2009). Biofilm on dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants* 24(4):616-626.
- Sul YT, Johansson C, Wennerberg A, Cho LR, Chang BS, 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.

Thomas P, Thomas M, Summer B, Dietrich K, Zauzig M, Steinhauser E *et al.* (2011). Impaired wound-healing, local eczema, and chronic inflammation following titanium osteosynthesis in a nickel and cobalt-allergic patient: a case report and review of the literature. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 93(11):e61.

Venables J (2000). Introduction to surface and thin film processes Cambridge: Cambridge University Press.

Vincent JL (2003). Nosocomial infections in adult intensive-care units. *Lancet* 361(9374):2068-2077.

Wang Y, da Silva Domingues JF, Subbiahdoss G, van der Mei HC, Busscher HJ, Libera M (2014). Conditions of lateral surface confinement that promote tissue-cell integration and inhibit biofilm growth. *Biomaterials* 35(21):5446-5452.

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).

Williams D (2001). The golden anniversary of titanium biomaterials. *Med Device Technol* 12(7):8-11.

Williams DF, Cahn RW, Bever MB (1990). Concise encyclopedia of medical & dental materials. 1st ed. Oxford, England ; New York Cambridge, Mass., USA: Pergamon Press ; Distributed in North and South America by MIT Press.

Williams DF (2009). On the nature of biomaterials. *Biomaterials* 30(30):5897-5909.

WSA (2012). World Steel in Figures: World Steel Association.

Zhang L, Chen D, Wang K, Yu F, Huang Z, Pan S (2009). Blood compatibility improvement of titanium oxide film modified by doping La(2)O(3). *J Mater Sci Mater Med* 20(10):2019-2023.

Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL *et al.* (2005). High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A* 74(1):49-58.

Zhou W, Zhong X, Wu X, Yuan L, Shu Q, Xia Y *et al.* (2007). Plasma-controlled nanocrystallinity and phase composition of TiO₂: a smart way to enhance biomimetic response. *J Biomed Mater Res A* 81(2):453-464.

Zitter H, Plenk H, Jr. (1987). The electrochemical behavior of metallic implant materials as an indicator of their biocompatibility. *J Biomed Mater Res* 21(7):881-896.