

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INGENIERÍA**

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



“Incremento de la viabilidad osteoblástica a través de la liberación sostenida de (-)-Epicatequina en Nanotubos de TiO₂”

TESIS

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias

Presenta

Sandra Leticia Castillo Uribe

Director

Dr. Ernesto Alonso Beltrán Partida

Co-Director

Dr. Benjamín Valdez Salas

Mexicali, B. C., Junio del 2018

RESUMEN

Incremento de la viabilidad osteoblástica a través de la liberación sostenida de (-)-Epicatequina en Nanotubos de TiO₂.

Factores ambientales, locales y sistémicos pueden interferir con la recuperación y cicatrización de los tejidos orales después de que estos sufrieron algún daño; afectando procesos muy importantes, como la osteointegración al hueso (cantidad y calidad) y a los tejidos adyacentes. Por otra parte, Se ha encontrado que los materiales nanoestructurados son capaces de mejorar la respuesta celular, proporcionando un excelente anclaje físico con la superficie del hueso promoviendo la adherencia celular, proliferación y diferenciación de osteoblastos. Adicionalmente, se sugirió que un producto natural como es el flavonoide (-)- Epicatequina (Epi) puede mejorar la osteoinductividad. En este estudio se reporta que las dimensiones nanométricas de TiO₂ son una estrategia efectiva en aplicaciones para medicina regenerativa, haciendo énfasis en los efectos que brinda la liberación sostenida de un producto natural como es la (Epi), depositada en nanotubos de TiO₂ en la viabilidad osteoblástica. Con el objetivo de proveer mayores evidencias que den sustento al uso de recubrimientos con flavonoides naturales en nanoestructuras para aplicaciones terapéuticas y mejorar la calidad de vida del paciente que lo requiera.

Objetivo General: Sintetizar nanotubos de TiO_2 por anodizado en Ti6Al4V para la deposición y liberación de moléculas con potente actividad osteogénica para aplicaciones en regeneración ósea.

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

El presente trabajo brinda por primera vez información sobre la capacidad de los nanotubos de TiO₂ sintetizados por anodizado, para ser compatibles como sistemas de liberación prolongada de Epi, un flavonoide el cual se conoce tiene potentes efectos benéficos. También, se caracteriza fisicoquímicamente la incorporación de Epi a los nanotubos, demostrándose la capacidad de deposición del flavonoide a las nanoestructuras. Finalmente, se válida el incremento en la viabilidad ósea *in vitro* y la estimulación en la adherencia y proliferación osteoblástica por técnicas fisicoquímicas y bioquímicas. Esta tesis presenta una nueva contribución al área de la ingeniería de materiales e ingeniería de tejidos para el manejo de productos naturales con potencial capacidad para regeneración ósea.

DEDICATORIA

A mis padres y a mi pareja.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a Dios por su infinita bondad hacia mí, por dotarme de salud, de las actitudes necesarias para llegar hasta aquí y sobre todo por rodearme de las personas indicadas.

Agradezco sinceramente a mis padres por su apoyo y consejos en todo momento.

A Enrique por su apoyo, sus consejos honestos y perseverantes, motivándome a superarme día a día, siendo un pilar vital para lograr concluir con esta etapa de mi vida. Que a pesar de que el camino hasta aquí fue difícil y hubo días malos siempre te encargaste de hacerlos especiales, sacándome una sonrisa.

Agradezco a Luis Enrique y Esperanza por el apoyo y motivación constante.

Al Dr. Ernesto Alonso Beltrán Partida, asesor le agradezco todo el apoyo y la confianza que recibí de su parte así como las asesorías y consejos en la trayectoria y realización de esta investigación. Por compartir su vasta experiencia que favoreció

el desarrollo oportuno de las habilidades necesarias para el dominio de los conocimientos necesarios en mi formación integral y la realización de esta tesis. Dr., muchas gracias!

Al Dr. Benjamín Valdez Salas, por la oportunidad otorgada de pertenecer a su selecto grupo de estudiantes, por todo el apoyo otorgado, por su valiosa y generosa contribución en la realización del presente trabajo. Muchas Gracias!

Al Dr. Nicola Nedev Radnev, al Dr. Mario Alberto Curiel Álvarez, por compartir sus conocimientos en el área de las nano-ciencias, favoreciendo y enriqueciendo este trabajo de investigación.

Quiero expresar una gratitud especial al Dr. Nicolás Addiel Serafín Higuera, por todo el apoyo que me brindó, por compartirme tantos conocimientos y permitirme trabajar en su laboratorio. Su apoyo fue un cimiento en la trayectoria de este trabajo. Muchas gracias Dr.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento y financiamiento de una beca (CVU 764606) económica para lograr ejercer mis estudios de Maestría, Muchas gracias!

Finalmente agradezco al personal del Instituto de Ingeniería de la UABC por el apoyo que recibí cada que lo necesite. Muchas gracias!

CONTENIDO

RESUMEN	2
DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD.....	4
DEDICATORIA	5
AGRADECIMIENTOS.....	6
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	12
LISTA DE SÍMBOLOS.....	17
INTRODUCCIÓN	19
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
CAPÍTULO 1	29
ANTECEDENTES HISTÓRICOS E INTRODUCCIÓN EN LA MODIFICACIÓN DE SUPERFICIES DE LA ALEACIÓN Ti6Al4V EN APLICACIONES BIOMÉDICAS.	29
<i>1.1 Antecedentes históricos de los materiales utilizados en implantes.....</i>	<i>30</i>
<i>1.2 Ti6Al4V aleación de elección en aplicaciones biomédicas.....</i>	<i>32</i>
<i>1.3 Nanotopografías, Modificación de superficie.....</i>	<i>33</i>
CAPÍTULO 2	37
FLAVONOIDES: HISTORIA, ESTRUCTURA, SU PAPEL EN LA NATURALEZA, ASÍ COMO SUS MÚLTIPLES EFECTOS BENÉFICOS SOBRE LA SALUD HUMANA.	37

2.1 Historia de los flavonoides	38
2.2 Estructura de los Flavonoides	38
2.3 Flavonoides en la naturaleza	40
2.4 Los Flavonoides y sus múltiples efectos en la salud humana	41
CAPÍTULO 3	43
MATERIALES Y MÉTODOS (FASE EXPERIMENTAL).....	43
3.1 Preparación de los especímenes	44
3.2 Fabricación de nanotubos de TiO ₂ en Ti6Al4V por oxidación anódica.....	45
3.3 Preparación de las moléculas osteoactivas derivadas de los flavonoides	47
3.4 Deposición de flavonoides derivados de Epicatequinas sobre nanotubos de TiO ₂ de Ti6Al4V.....	48
3.5 Pruebas de liberación sostenida de flavonoides	49
3.6 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM).....	50
3.7 Análisis por espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS).....	50
3.8 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).....	51
3.9 Evaluación biológica.....	51
3.9.1 Cultivos celulares.....	51
3.9.2 Proliferación celular	54
3.9.3 Morfología celular analizada por FE-SEM	55
4.1 Análisis estadístico.....	56
CAPÍTULO 4	57
ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA METODOLOGÍA UTILIZADA.....	57
4.2 Resultados	58

4.3 <i>Discusión</i>	73
CAPÍTULO 5	80
CONCLUSIÓN, RECOMENDACIONES.....	80
5.1 <i>Conclusión</i>	81
5.2 <i>Recomendaciones</i>	82
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
ANEXOS	94

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Descripción	Página
Figura I: A y B. Molares humanos con lesiones cariosas [2].	20
Figura II. Típica gingivitis marginal generalizada en las papilas (Flechas) [3].	20
Figura III. A) Estado clínico en los cuadrantes 1 y 3 de un individuo con periodontitis crónica. La mayor parte de los dientes de ambos cuadrantes presentan retracción avanzada del margen de tejidos blandos. B) Radiografías correspondientes: la cara mesial del diente 16 (flecha) tienen tejido de soporte periodontal normal mientras que el diente vecino, diente 14, ha perdido varios mm de soporte óseo en la cara distal (flecha). La cara mesial del diente 14 tiene un soporte de tejido comparativamente normal (flecha). [3].....	21
Figura IV. A) Visión anterior y lateral de la situación habitual de los dientes con sus inclinaciones principales. B) Posibles alteraciones en la oclusión, la posibilidad de migración, extrusión, y contactos relaciones oclusales incorrectas como consecuencia de la pérdida de una pieza dental, molar mandibular (Flecha). [7].	23
Figura V. A) Estado clínico de un individuo con Periimplantitis, se observa, después de retirar la corona, una bolsa periimplantaria de 13 mm (Flecha). B) Radiografía correspondiente a la pérdida ósea grave (Flecha). [10].....	24
Figura VI. Estado clínico de un individuo que presenta un progreso sintomático de reacción alérgica en el cuerpo (Flechas) [12].....	26

Figura 1.3.1. A) Vista superior de NTs homogéneos. B) Vista de corte transversal de NTs [34].	35
Figura 2.2 A) Estructura general de flavonoides. B) Numeración de los átomos de carbono C y A del 2 al 8, mientras que el B van del 2 al 6 [25, 26].	39
Figura 2.3 Estructura química del estereoisómero de flavanol (-)-epicatequina [29].	41
Figura 3.1 A) Desbaste mecánico de especímenes de Ti6Al4V siguiendo las indicaciones de la norma ASTM E3-11, B) Especímenes en acabado a espejo, sustratos control descritos como Ti6Al4V.	45
Figura 3.2 A) Celda electroquímica, [22] B) Vista superior de los especímenes con nanotubos de TiO ₂ , descritos aquí como NTs.	46
Figura 3.3 A) Balanza Analítica (Ohaus Pioneer Analytical), B) Solución de flavonoides derivados de Epi a una concentración de 1 mg/ mL.	47
Figura 3.4 Deposición de Epi sobre nanotubos de TiO ₂ , descritos aquí como E+NTs.	48
Figura 3.9.1 A) Pellet celular al fondo de tubo cónico, obtenido de un centrifugado a 1200 rpm por 10 min a 4°C B) Células MC3T3 E-1 cultivadas en cajas T-25 (Corning, Tewksbury MA, USA), con 4 mL de medio.	53
Figura 3.9.3 Especímenes E+NTs y NTs con osteoblastos incubados a 24 h fijados con glutaraldehído para evaluar morfología celular por FE-SEM.	55
Figura 4.2.1 A) Ilustra la superficie plana de Ti6Al4V, observándose a alta amplificación, B) Ti6Al4V liso, observándose a bajo amplificación.	58
Figura 4.2.2 Micrografía de FE-SEM que muestra la caracterización fisicoquímica de la superficie de los materiales experimentales, descritos aquí como NTs. A)	

Vista superior de NTs homogéneos, B) Corte transversal de Nts. Las imágenes de TiO ₂ muestran NTs altamente ordenados [22].	59
Figura 4.2.3 Micrografías de AFM que muestran la caracterización fisicoquímica de la superficie de los materiales experimentales. A) Espécimen control de Ti6Al4V, B) Muestra la topografía de NTs sobre la superficie del material experimental. C) Evaluación cuantitativa de la rugosidad de superficie, * representa diferencias significativas entre los NTs desinfectados con SOW y el sustrato Ti6Al4V [21, 22].	60
Tabla 1. Análisis EDS de la composición química de las superficies experimentales.	61
Figura 4.2.4 Humectabilidad de los especímenes experimentales NTs y Ti6Al4V.	62
Figura 4.2.5 Espectro de los materiales experimentales NTs y E+NTs.	63
Figura 4.2.6 Curva de liberación sostenida de Epi a 72 h sobre los sustratos NTs, a una concentración inicial de 1 mg/mL. Los datos son las medias de tres experimentos independientes por triplicado, N=3 / P<0.05 denotando diferencias entre las medias estadísticamente significativas. * Indica la rápida liberación a las primeras horas, ** Indica la liberación continua, # Indica el valor máximo de respuesta de la liberación sostenida de Epi.	64
Figura 4.2.7 A) Línea celular MC3T3-E1, osteoblastos de calvaría de ratón. B) Centrifugado a 1200 rpm por 10 min a 4°C. C) Siembra de células en cajas T-25 (Corning), con 4 mL de medio. D) Poca proliferación de osteoblastos a 1 día de incubación. E) Osteoblastos sub-confluentes en pasaje 1. F) Pasaje 1 de osteoblastos confluentes, presentando la formación de una monocapa.	65

Figura 4.2.8 A) Caja de 12 pocillos con especímenes E+NTs, NTs y Ti6Al4V con células MC3T3-E1 incubadas en los tiempos 4 horas, 1, 3,7 días. **B)** Especímenes E+NTs, NTs y Ti6Al4V con DMSO para disolver los cristales de formazan que se formaron posterior a las 4 h que se dejó incubar el MTT. 67

Figura 4.2.9 Se muestra el comportamiento celular de osteoblastos incubados a 4 h, 24 h, 3 y 7 días respectivamente. Denotando un incremento en la adhesión y proliferación en los especímenes NTs cargados con Epi (E+NTs) en comparación con NTs y Ti6Al4V, n= 3, * P<0.05 representa altas diferencias estadísticamente significativas en comparación con el crecimiento en NTs y Ti6Al4V después de 4 h de cultivo, ** P<0.05 representa altas diferencias estadísticamente significativas en comparación con el crecimiento en NTs y Ti6Al4V después de 24 h de cultivo , # P<0.05 representa altas diferencias significativas en comparación con el crecimiento en NTs y Ti6Al4V después de 3 días de cultivo, no significancia (ns) en comparación con el crecimiento en NTs y Ti6Al4V después de 7 días de incubación. 68

Figura 4.2.10 Micrografías de SEM a alta magnificación de osteoblastos (MC3T3-E1) incubados sobre los sustratos con tratamiento de Epi (E+NTs) vs NTs sin tratamiento a 4 y 24 h. **A)** Crecimiento a 4 h sobre la superficie de E+NTs. **B)** NTs a 4 h de incubación. **C)** E+NTs a 24 h de incubación. **D)** Crecimiento de NTs a 24 h. Las flechas anaranjadas indican la presencia de filopodios fibrilares (A y C) y su fuerte anclaje celular, (B y D) filopodios delgados y traslucidos. La flecha amarilla indica una prolongación citoplasmática delgada (A) y más densa (C). La línea azul demuestra la monocapa celular más densa y definida (A y C), mientras que para (B y D) es más traslucida. El círculo rojo indica una EMC más densa. 70

Figura 4.2.11 Micrografías de SEM a bajas magnificaciones de osteoblastos (MC3T3-E1) incubados sobre los sustratos con tratamiento de Epi (E+NTs) vs NTs sin tratamiento a 4 y 24 h. **A)** Crecimiento a 4 h sobre la superficie de E+NTs. **B)** NTs a 4 h de incubación. **C)** E+NTs a 24 h de incubación. **D)** Crecimiento de NTs a 24 h. Las flechas verdes indican presencia de filopodios fibrilares y su fuerte anclaje celular. Los círculos anaranjados indican células más redondeadas con una EMC más densa. Los círculos rojos denotan uniones citoplasmáticas delgadas, filopodios delgados y traslucidos y células más alargadas. 72

LISTA DE SÍMBOLOS

Ti	Titanio puro (99% pureza).
Ti6Al4V	Aleación de Titanio-Aluminio-Vanadio.
TiO ₂	Óxidos de Titanio.
NTs	Nanotubos de TiO ₂ .
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
P	Permeabilidad.
EGCG	Epigallocatequina Galato.
Epi	(-)- Epicatequina.
NH ₄ F	Fluoruro de Amonio.
SOW	Siglas en inglés: superoxidized wáter.
E+NTs	Epi depositada en nanotubos de TiO ₂ .
PBS	Siglas en inglés: phosphate buffered saline.
nm	Nanómetros.
SEM	Microscopía electrónica de barrido.
EDS	Análisis de energía dispersiva de rayo X.

AFM	Microscopía de Fuerza Atómica.
pH	Coeficiente que indica el grado de acidez.
SBF	Suero Bovino Fetal.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
IR	Espectroscopia de infrarrojo.
EMC	Matriz Extracelular.

INTRODUCCIÓN

La salud bucal se considera una parte integral del complejo craneofacial que participa en funciones vitales como son la alimentación y la comunicación; por lo tanto, la salud bucal está relacionada con el bienestar y la calidad de vida del ser humano desde los puntos de vista funcional, psicosocial y económico [1]. Sin embargo, existen diversas enfermedades que afectan y comprometen la integridad de la salud bucal, debido al estilo de vida del ser humano (dieta e higiene bucal inadecuada), así como al acceso restringido a los servicios de salud odontológicos, la falta de cultura de la población en cuanto al cuidado de la boca y los altos costos que la atención odontológica representa, por citar algunos ejemplos.

Entre las principales enfermedades que afectan la cavidad bucal figuran los traumatismos dentales, ausencias congénitas, la caries dental y las enfermedades periodontales [2]. La caries dental, es la enfermedad más común del ser humano según Bhaskar, ya que puede definirse de distintas maneras. Una forma de describirlo, es como una secuencia de procesos de destrucción localizada en los tejidos duros dentarios, que evoluciona en forma progresiva e irreversible y que comienza en la superficie del diente y luego avanza en profundidad (Figura I) [2].

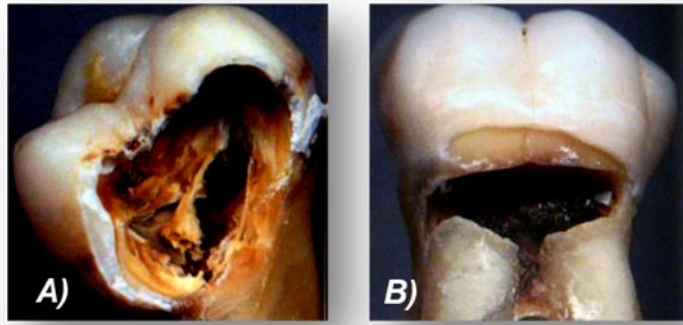


Figura I: A y B. Molares humanos con lesiones cariosas [2].

Por otra parte, las patologías periodontales son afecciones de los tejidos que rodean al diente, como la inflamación de la membrana periodontal o del ligamento periodontal y tiene dos clasificaciones: Gingivitis y periodontitis. La Gingivitis, (Figura II) se define como inflamación gingival, alteración de color y de textura que se asocia con un tejido periodontal con nivel de inserción estable, es decir (sin pérdida de inserción periodontal ni de hueso alveolar), [3].



Figura II. Típica gingivitis marginal generalizada en las papilas (Flechas) [3].

Por otra parte, la periodontitis se describe como la forma de la enfermedad periodontal que involucra la pérdida de la inserción, que conlleva a la inflamación e infección que destruyen a los tejidos de soporte de los dientes, incluyendo las encías, los ligamentos periodontales y los alvéolos dentales (hueso alveolar), (Figura III). Entre las características variables se incluyen: hipertrofia o retracción de la encía, exposición de la furcación radicular, aumento de la movilidad dental, desplazamiento y finalmente, exfoliación de los dientes [3].

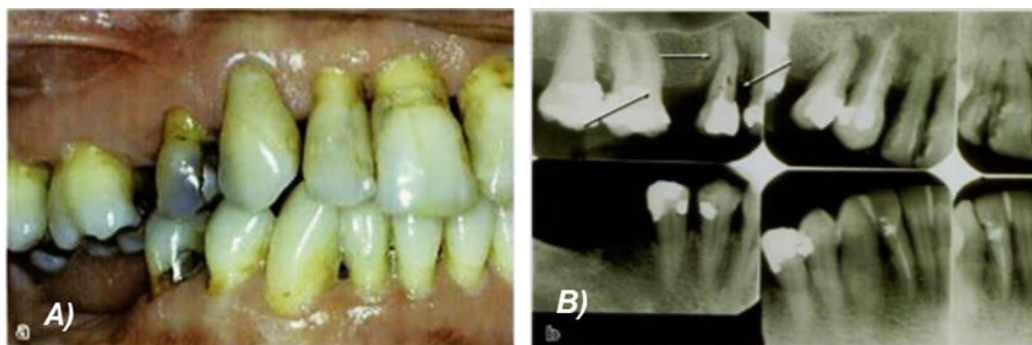


Figura III. A) Estado clínico en los cuadrantes 1 y 3 de un individuo con periodontitis crónica. La mayor parte de los dientes de ambos cuadrantes presentan retracción avanzada del margen de tejidos blandos. **B)** Radiografías correspondientes: la cara mesial del diente 16 (flecha) tienen tejido de soporte periodontal normal mientras que el diente vecino, diente 14, ha perdido varios mm de soporte óseo en la cara distal (flecha). La cara mesial del diente 14 tiene un soporte de tejido comparativamente normal (flecha). [3].

Todas estas enfermedades dentales tienen una secuela que conlleva al edentulismo, que se identifica como la ausencia total o parcial de piezas dentales, las cuales no se reemplazarán posteriormente de forma natural [4]. Al hablar de edentulismo, queda claro que la principal consecuencia se encuentra en la pérdida de la funcionalidad y de la estética, puesto que aquellos pacientes que cuenten con piezas dentales ausentes tendrán dificultades para llevar a cabo tareas tan cotidianas como son la masticación o el habla, así como también se está ante una de las particularidades que más afectan a la estética de una persona, trastorno que en una gran variedad de casos puede generar problemas psicológicos [1-5]. Sin embargo, la pérdida de piezas dentales no solamente está relacionada con la funcionalidad o estética si no también, otras consecuencias tales como la reabsorción del hueso alveolar en el lugar donde ya no se encuentra la pieza dental; así como también, hay que destacar que la pérdida de un diente puede afectar negativamente al resto de piezas dentales, y/o el desplazamiento de los dientes vecinos hacia el nuevo espacio creado, (Figura IV). [6,7]. El movimiento de los dientes genera alteraciones en la oclusión produciéndose una mala alineación de la dentadura con los problemas que ello supone

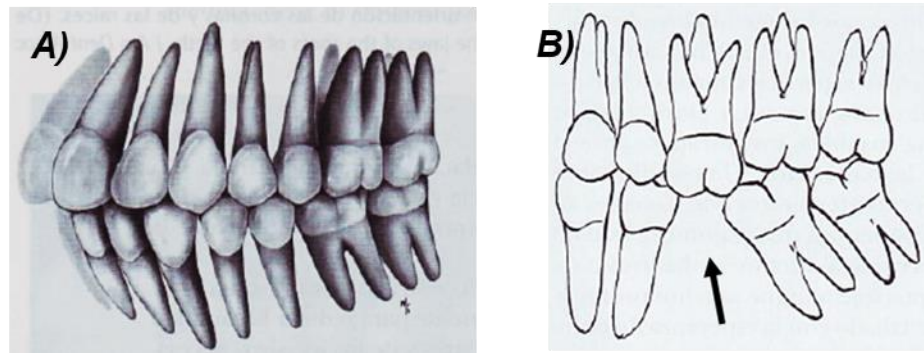


Figura IV. A) Visión anterior y lateral de la situación habitual de los dientes con sus inclinaciones principales. **B)** Posibles alteraciones en la oclusión, la posibilidad de migración, extrusión, y contactos relaciones oclusales incorrectas como consecuencia de la pérdida de una pieza dental, molar mandibular (Flecha). [7].

Además de las afecciones a la cavidad bucal, se han identificado factores locales y sistémicos que pueden contribuir al rápido fracaso de los implantes ortopédicos y dentales afectando la oseointegración, entre ellos la cantidad y calidad del hueso y tejidos circundantes, la biomecánica y otros [8]. Dentro de los factores sistémicos, se han estudiado diversas enfermedades que afectan o alteran los mecanismos de sanado, así como la remodelación ósea, dentro de las que destacan la osteoporosis, cáncer, síndrome de Sjogren, diabetes, y radiación de cabeza y cuello a pacientes con cáncer [8-9], por mencionar tan solo algunos ejemplos.

Las enfermedades sistémicas pueden afectar los tejidos orales al interferir con el sanado o incrementar el riesgo de padecer otras enfermedades. Además, estas enfermedades deben ser tratadas con medicación u otras terapias que

podrían afectar los tejidos cercanos a los implantes y el proceso de osteointegración o el hueso osteointegrado [8]. Otra de las afecciones que provocan pérdida implantaria es la Periimplantitis, que se define como: “*Reacciones inflamatorias patológicas en el tejido blando y duro que rodea a un implante osteointegrado*”. Esta pérdida ósea no se producirá si la identificación y tratamiento del proceso se realiza precozmente. La Periimplantitis, involucra a todos los tejidos periimplantarios desde el momento en el que se introduce el implante en el hueso, resultando insuficiente el concepto de no osteointegración del implante para la pérdida precoz de este, (Figura V), [10]. Con el incremento en el número de personas que por alguna de las afecciones antes mencionadas se vieron expuestos a la pérdida o ausencia dental, se ven en la necesidad de buscar una alternativa para solucionar su problema.

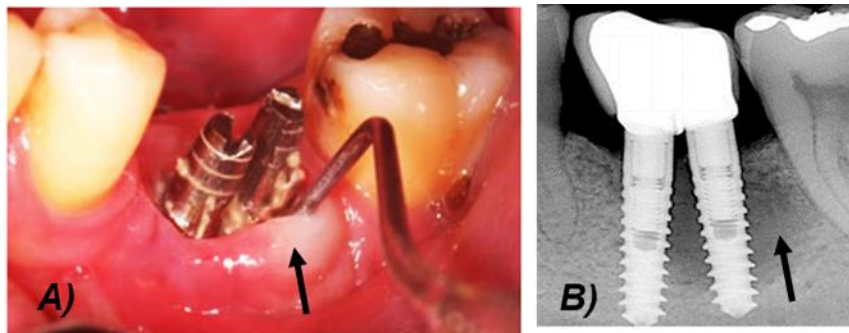


Figura V. A) Estado clínico de un individuo con Periimplantitis, se observa, después de retirar la corona, una bolsa periimplantaria de 13 mm (Flecha). **B)** Radiografía correspondiente a la pérdida ósea grave (Flecha). [10].

Se ha visto, en las investigaciones recientes, que los tratamientos óptimos para ese tipo de casos son los implantes tanto dentales como ortopédicos, es ahí donde sobresale la importancia de contar con un material que cuente con un óptimo rendimiento de biocompatibilidad para inducir la rápida osteointegración, y que sea capaz de promover un ambiente antibacteriano para mantener su efectividad durante un período deseado.

Sin embargo, con el aumento en el manejo de implantes metálicos se reporta un creciente número de fracasos de los implantes asociados a la falta de biocompatibilidad, a la corrosión, por infecciones, a la citotoxicidad del material y en ocasiones por fractura del metal a causa de estrés mecánico [11]. Lo anteriormente mencionado, ocasiona el retiro del implante generando altos costos por repetición de tratamientos quirúrgicos, así como re-hospitalizaciones y terapia farmacológica prolongada, causando en el paciente problemas económicos, sociales y trastornos psicológicos [1].

El Titanio puro (Ti), ha sido considerado como un material no alergénico. Sin embargo, se han reportado casos de pacientes susceptibles a la hipersensibilidad a este metal manifestando reacciones alérgicas, que pueden desempeñar un papel crítico en el fracaso de los implantes metálicos (ej., ortopédicos, maxilofaciales y dentales). Además, los síntomas de las reacciones alérgicas de estos materiales no están restringidos solamente a la boca; si no también, se manifiestan en las manos, las piernas y la piel de todo el cuerpo, (Figura VI), [12]. La prevalencia de reacciones

positivas sobre alergia frente a reactivos de Ti es mucho menor que la de otros materiales como el cromo, el mercurio, el níquel y el paladio. Ningún paciente ha exhibido una reacción-alergia positiva sólo para un reactivo de Ti. Por lo tanto, uno podría concluir que el Ti es un material relativamente seguro, ya que rara vez causa síntomas alérgicos [12]. Sin embargo, el Ti y el Ti6Al4V se han utilizado con éxito en Odontología y en Ortopedia durante muchos años. Estos materiales se han convertido en un material de elección para la fabricación de implantes dentales, ya que son la mejor opción para la sustitución a largo plazo de tejidos duros debido a las favorables características fisicoquímicas, mecánicas y de su biocompatibilidad con el medio bucal [11-13].



Figura VI. Estado clínico de un individuo que presenta un progreso sintomático de reacción alérgica en el cuerpo (Flechas) [12].

OBJETIVO GENERAL

Sintetizar nanotubos de TiO_2 por anodizado en Ti6Al4V para la deposición y liberación de moléculas con potente actividad osteogénica para aplicaciones en regeneración ósea.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar mecánicamente las muestras de Ti6Al4V para sintetizar nanotubos de TiO_2 por oxidación anódica.
- Obtener nanotubos de TiO_2 en Ti6Al4V , por oxidación anódica.
- Analizar la adhesión y proliferación de osteoblastos sobre las superficies con nanotubos TiO_2 .
- Deposición de Epi sobre Ti6Al4V con nanotubos de TiO_2 a evaluar.
- Evaluar la liberación de los flavonoides depositados sobre Ti6Al4V con nanotubos de TiO_2 .

→ Caracterizar la morfología celular utilizando técnicas microscópicas.

CAPÍTULO 1

Antecedentes Históricos e introducción en la modificación de superficies de la aleación Ti6Al4V en aplicaciones biomédicas.

*“Se quiere más lo que se ha conquistado con
más fatiga”*

- Aristóteles -

1.1 Antecedentes históricos de los materiales utilizados en implantes

Se han utilizado diferentes materiales para implantes dentales incluyendo polímeros, cerámica, metales compuestos y productos naturales [39]. Los implantes de metal pueden soportar las cargas durante varias décadas, factor el cual ha permitido que sean utilizados ampliamente. Sin embargo, es necesario estudiar o establecer un material que se asemeje más a la estructura humana y que sea estable en el entorno natural del tejido. Los polímeros en comparación con los metales, dan lugar a procesos de inflamación debido a que los monómeros que son inherentes a su estructura son más susceptibles a la infección, lo que aumenta la probabilidad de degradación del material, conllevando al fracaso del implante [2].

En 1911 los traumatólogos inmovilizaban fracturas óseas con dispositivos de acero inoxidable, con contenido férrico, teniendo como secuela la corrosión. En 1932 el Vitallium, una aleación exenta de hierro, fue considerada ideal, no corrosiva y biocompatible para estos fines. En 1940 un estudio en fémur de gatos comparó la corrosión del vitallium (gold estándar) respecto a otros metales, entre ellos el Ti; generando como resultado desde el punto de vista histológico y radiográfico que el Ti produjo menos efecto inflamatorio y corrosivo comparado al vitallium. Este estudio describió la característica inédita del Ti de “adherirse” al hueso [14]. Por otra parte, en 1951 se probaron tornillos experimentales de Ti en fémur de ratas, los cuales se

incorporaron al hueso; la conclusión fue que el titanio era un metal ideal en los casos en que no era necesario retirarlo y se reportó que varios pacientes humanos lo usaban sin secuelas negativas [14,40].

En 1959, Branemark estudiando la reparación ósea, implantó en el peroné de conejos dispositivos trans-óseos de titanio, consciente de su biocompatibilidad. Al intentar retirar estos dispositivos, le impresionó la intensidad de la unión hueso-titanio nombrando a esta característica como óseo-integración. Aplicó esta característica única para estabilizar prótesis ortopédicas, experimentando en mandíbulas de perros. Además, en 1965 implantó dispositivos de titanio exitosamente en una mandíbula humana, colocando el primer implante dental en la zona anterior de la mandíbula de un paciente, teniendo éxito y consiguiendo la oseointegración [14].

El Ti y sus aleaciones se han utilizado con éxito tanto en Ortopedia como en Odontología durante muchos años. Se han convertido en materiales de elección para la fabricación de implantes metálicos (ej., ortopédicos, maxilofaciales y dentales), ya que son la mejor opción para la sustitución a largo plazo de tejidos duros, debido a las favorables características que poseen y más importante aún, a su alta biocompatibilidad con el medio biológico.

1.2 Ti6Al4V aleación de elección en aplicaciones biomédicas

Hablando en específico de una de las aleaciones de Ti, se puede describir al Ti6Al4V como la principal aleación que se utiliza para las aplicaciones biomédicas, por sus características fisicoquímicas y biológicas benéficas, como es la baja elasticidad, baja densidad, excelente resistencia a la corrosión, alta biocompatibilidad, resistencia mecánica, estabilidad química, así como su exitosa integración en relación al hueso circundante es decir, la osteointegración [11].

Además, se puede resaltar que el módulo de elasticidad del Ti6Al4V es similar al del hueso, lo que hace que el hueso tenga una mayor biocompatibilidad hacia el implante [13]. Sin embargo, a pesar de los hallazgos reportados aún no se resuelve la problemática asociada al aumento de la tasa de fracasos en los implantes tanto ortopédicos como dentales. Acontecimientos que surgen a consecuencia de la falta de biocompatibilidad por parte del biomaterial, evento que sugiere la importancia de comprender la interacción entre el biomaterial y el sistema biológico.

1.3 Nanotopografías, Modificación de superficie

Recientemente, se ha sugerido el manejo de materiales con superficies nanoestructuradas para mejorar la respuesta biológica de implantes médicos y dentales. Además, las nanoestructuras han sido de gran interés, debido a su elevada relación superficie/volumen volumen/superficie y el mayor grado de plasticidad biológica en comparación con las microestructuras, ya que se ha demostrado que las células reaccionan favorablemente tanto *in vitro* como *in vivo* a los cambios en la morfología celular, la orientación, la organización del citoesqueleto, la proliferación, la señalización y la expresión génica [15].

Asimismo, en términos de desarrollo de biomateriales y la tecnología de implantes, la respuesta celular puede verse regulada por las características topográficas de la superficie [15,16]. Interesantemente, se ha descrito en el campo de la biología celular tanto *in vitro* como *in vivo*, un creciente cuerpo de datos que muestran cómo las células responden de forma más eficiente a las topografías nanoestructuradas en comparación con las microestructuradas [15,19]. Información que sugiere la importante necesidad de sintetizar y manejar este tipo de superficies. Sin embargo, para obtener un material nanoestructurado es necesario realizar diferentes tratamientos de modificación de superficie al material, para lograr así, alterar las respuestas celulares que un material puede ofrecer.

Considerando como un importante modelo de interés por su invaluable necesidad clínica, surge la necesidad de realizar modificaciones en las superficies de aleaciones como es el caso del Ti6Al4V [12,17, 18]. Se han reportado diversos métodos fisicoquímicos para generar nanoestructuras en estas superficies; por ejemplo, los métodos electroquímicos, específicamente la oxidación anódica, que es una de las técnicas que permite la formación de una capa gruesa, espesa y altamente ordenada de óxido de titanio (TiO_2), formada en la superficie de los materiales de Ti y sus aleaciones, y que en función a la configuración electroquímica que se utilice puede dar origen a los nanotubos de TiO_2 (NTs) (Figura 1.3.1) [18,17,21]. Importantemente, se ha demostrado que los NTs pueden proporcionar una excelente adherencia física con la superficie del hueso promoviendo la adherencia celular, proliferación y diferenciación de osteoblastos, así como también la respuesta de células endoteliales [15,16]. Resaltando esta interesante técnica de modificación superficial, se describe que el método de oxidación anódica se produce a través de un cátodo y ánodo. Que mediante la aplicación de un potencial que es proporcional al electrolito utilizado, se formará la capa de óxido sobre la superficie del implante [13, 22].

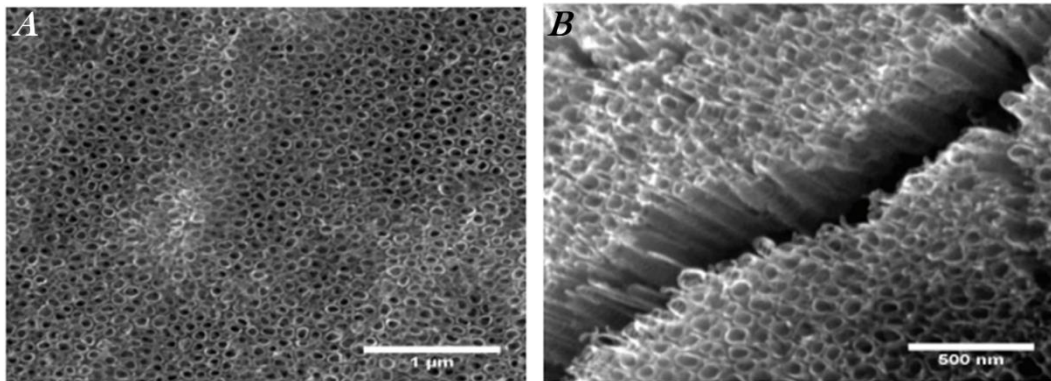


Figura 1.3.1. A) Vista superior de NTs homogéneos. **B)** Vista de corte transversal de NTs [34].

Por otra parte, se ha descrito que el diámetro y el espesor de los NTs se puede controlar por el potencial de voltaje aplicado y el tiempo de anodizado [17], lo que puede generar también NTs abiertos en la parte superior y cerrados en la parte inferior [13]. Se ha sugerido, que para regular los diferentes diámetros de NTs, se requiere ajustar la concentración y el tipo de electrolito utilizado, el tiempo de anodizado y el voltaje aplicado [13,22]. Sin embargo, aún no hay estudios precisos que demuestren los tamaños óptimos desde el punto de vista de la longitud y el diámetro de los NTs en la aleación Ti6Al4V para sugerir la actividad o comportamiento óptimo de diferentes tipos de células sobre estas importantes superficies. Por lo tanto, como resultado se ha generado una gran controversia entre los investigadores ya que unos han proporcionado información en que los diámetros de NTs pequeños (30 nm) promueven un mayor grado de adherencia de

osteoblastos, mientras que los NTs de mayor diámetro (70-100) provocan o estimulan una menor población de células con morfología celular extremadamente larga y con más altos niveles de fosfatasa alcalina [15]. Información que sugiere la estricta necesidad de elucidar estas polémicas controversias.

Por otro lado, la matriz de nanotubos preparados sobre sustratos de Ti podría utilizarse como nano-embalses para factores biológicos, fármacos o moléculas osteoactivas, estos nano-embalses podrían ser beneficiosos para la formación ósea [16, 23]. Además, estudios anteriores sugieren que los NTs podrían ser capaces de controlar proteínas o la liberación de antibióticos en el orden de 17 horas [35]. Una estrategia común para permitir la elución de drogas desde la superficie de un implante, implica la aplicación de un revestimiento de polímero cargado de drogas [17]. Si bien, puede ser efectivo en la entrega de un medicamento durante varias semanas, la degradación de polímeros puede inducir una respuesta inflamatoria, la activación de los fagocitos y creciente proliferación del músculo liso vascular, que pueden llevar al fracaso del implante [17]. Motivo que sugiere o propone la incorporación de un revestimiento sobre los NTs para que sean utilizados como nano-reservorios que permitan la liberación de moléculas osteoactivas para promover una osteointegración más efectiva.

CAPÍTULO 2

Flavonoides: Historia, estructura, su papel en la naturaleza, así como sus múltiples efectos benéficos sobre la salud humana.

*“En la vida hay algo peor que el fracaso: el
no haber intentado nada”*

-Franklin D. Roosevelt -

2.1 Historia de los flavonoides

En otro contexto, se ha recibido considerable atención en los flavonoides derivados de las Epicatequinas debido a sus múltiples efectos benéficos sobre la salud humana [24]. Estos compuestos polifenólicos fueron descubiertos por uno de los químicos más importantes del principio del siglo XX, Albert Szent-Györgyi, quien en 1930 aisló de la cascara del limón una sustancia, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares. Estos extractos fenólicos interesaron a los farmacólogos cuando se describieron sus propiedades similares a las vitaminas. Por tal motivo fueron denominados como vitamina P (permeabilidad). Sin embargo, por no ser posible confirmar que estos fueran vitaminas, este nombramiento se dejó de emplear alrededor del año 1950 [25].

2.2 Estructura de los Flavonoides

Los Flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten una estructura común, el difenilpirano (C₆-C₃-C₆), presentando dos anillos fenilos (A y B) ligados a través de un anillo heterocíclico C de pirano (Figura 2.2 A) [25]. Los átomos de carbono en los anillos C y A se enumeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2 al 6 (Figura 2.2 B) [26].

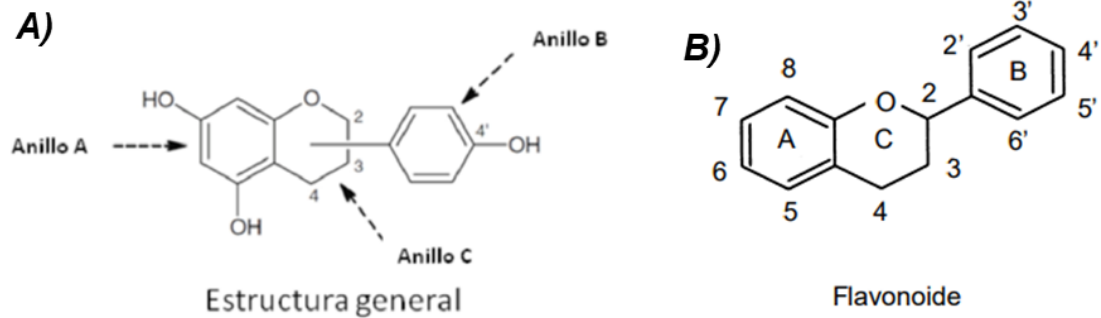


Figura 2.2 A) Estructura general de flavonoides. **B)** Numeración de los átomos de carbono C y A del 2 al 8, mientras que el B van del 2 al 6 [25, 26].

Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C [26]. En función de sus características estructurales los flavonoides se pueden clasificar en:

1. **Flavanos**, como la catequina, modelo de estudio en este trabajo, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
2. **Flavonoles**, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
3. **Flavonas**, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
4. **.Antocianidinas**, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

2.3 Flavonoides en la naturaleza

Estos flavonoides son sustancias antioxidantes naturales que se encuentran en las plantas y son los principales constituyentes de hierbas, frutas, verduras, cacao [51] o té verde [25, 27,49].

El té verde (*Camellia sinensis*), una de las bebidas más popular a nivel mundial, tiene la propiedad de ser antioxidante, cualidad que es proporcionada por varios componentes polifenólicos, también llamados catequinas [28, 29,53]. Las catequinas han demostrado poseer una potente actividad antioxidante varias veces mayor que la de la vitamina C y la vitamina E [28]. Dentro de las principales Catequinas del té verde se describen la Epigallocatequina galato (EGCG), Epigallocatequina-3-galato y Epicatequina [27].

Hablando en específico de la (-) –Epicatequina ((-) –Epi), modelo utilizado en la elaboración de este trabajo, se describe que forma parte de un grupo de cuatro estereoisómeros de flavanol que difieren en la configuración de sus carbonos 2 y 3 (carbonos quirales), basados en función de su estructura de numeración secuencial, (Figura 2.3), [29, 30]. Epi imita por completo los efectos de flavanol que contiene alimentos como el cacao, [31, 50, 51] ya que ejerce una influencia positiva en efectos metabólicos de células cultivadas, modelos animales y humanos [29,30].

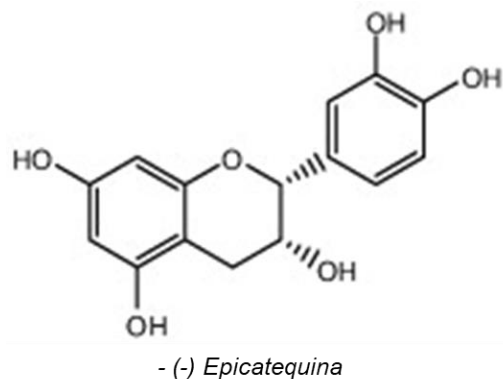


Figura 2.3 Estructura química del estereoisómero de flavanol (-)-epicatequina [29].

2.4 Los Flavonoides y sus múltiples efectos en la salud humana

Los flavonoides poseen actividad antioxidante proporcionando una nueva perspectiva en la prevención y terapia de varias enfermedades. Entre las enfermedades destacan la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, enfermedades cardiovasculares [48,51], cerebrovasculares [52], neurodegenerativas [48], obesidad [51], y ayudan en la reducción de la presión sanguínea [51] y la diabetes [24, 27,49].

Diversos estudios realizados en animales, han demostrado que los flavonoides derivados de Epicatequinas inhiben la incidencia de tumores promoviendo la prevención del cáncer [24]. Reciente evidencia demostró, que los flavonoides podrían aumentar la formación de nódulos de hueso por osteoblastos,

mejorar la osteogénesis en una célula madre mesénquimal de médula ósea, e inducir la muerte celular (apoptosis) de los osteoclastos *in vitro* [24]; por lo tanto, ejercen efectos positivos sobre las células osteoblásticas, pueden inducir la diferenciación de los osteoblastos para el proceso de maduración [28,32] y sugieren ser un agente eficaz para inhibir o suprimir la inflamación gingival y periodontal.

Es de suma importancia determinar la concentración adecuada de estos polifenoles, ya que los flavonoides en concentraciones elevadas pueden ejercer efectos negativos tanto *in vitro* como *in vivo*, mientras que a concentraciones bajas podrían mejorar el efecto osteogénico de pre incubación *in vitro* [28,32]. Información que sugiere la estricta necesidad de elucidar estas polémicas controversias.

CAPÍTULO 3

Materiales y Métodos (Fase Experimental).

“Aquel que duda y no investiga, se torna no sólo infeliz, sino también injusto”

- Pascal -

3.1 Preparación de los especímenes

En el próximo experimento se utilizaron discos de la aleación Ti6Al4V, los cuales fueron proporcionados por el Laboratorio de Corrosión y Materiales Avanzados del Instituto de Ingeniería de la UABC, Mexicali. Los especímenes consistieron en unos discos de 1.2 cm de diámetro de Ti6Al4V, los cuales se desbastaron mecánicamente comenzando por la superficie de un disco de Ti6Al4V con una hoja de SiC # 100 siguiendo las indicaciones de la norma ASTM E3-11, [33].

La norma establece que se debe empezar por desbastar el espécimen en una sola dirección bajo un flujo de agua constante e iniciando con la hoja # 100. Una vez que fueron observadas sobre la superficie líneas de pulido paralelas en una sola dirección, los especímenes fueron rotados 180° y se reanudo el proceso anterior utilizando hojas de SiC de # 100 hasta 2000, (Figura 3.1 A). Posteriormente, se procedió a pulir con alúmina de 0.30- μm y consecutivamente con alúmina de 0.05- μm hasta obtener un acabado a espejo, (Figura 3.1 B).

Finalmente, los especímenes fueron lavados en un baño ultrasónico (Modelo 5800, Branson Ultrasonic Corporation, USA) con Etanol al 70% por 15 minutos y posteriormente con agua desionizada por 15 minutos, dejándolos secar en desecador a temperatura ambiente. Estos especímenes fueron usados como sustratos control y descritos aquí como Ti6Al4V.

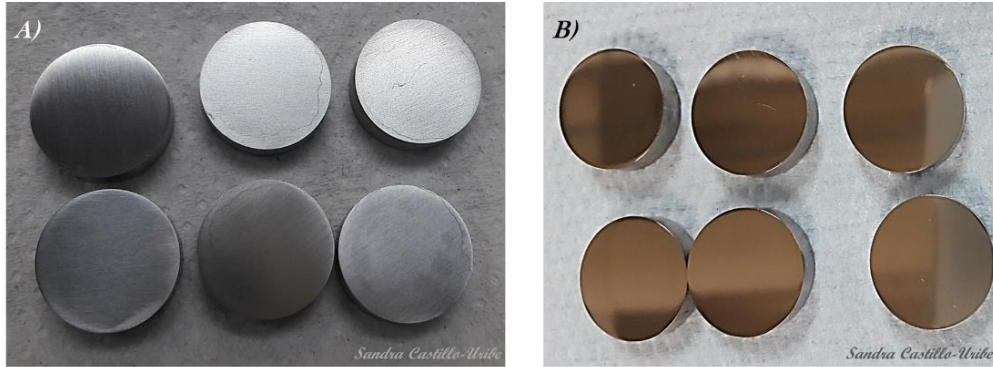


Figura 3.1 A) Desbaste mecánico de especímenes de Ti6Al4V siguiendo las indicaciones de la norma ASTM E3-11, **B)** Especímenes en acabado a espejo, sustratos control descritos como Ti6Al4V.

3.2 Fabricación de nanotubos de TiO_2 en Ti6Al4V por oxidación anódica

A continuación, el espécimen pulido fue colocado en el interior de una celda electroquímica (Figura 3.2 A) y como electrolito fue adicionado NH_4F 10 mg/L (Sigma-Aldrich, USA) y etilenglicol al 20%, los cuales fueron disueltos en agua súper-oxidada (SOW), Microdacyn 60 (Oculus Technologies, Guadalajara, JAL, México) con pH 6.8 y con asistencia de una malla de platino como contra electrodo

[18, 22]. Se aplicó un potencial de 20 V por 10 minutos a temperatura ambiente para fabricar sobre la superficie del disco nanotubos de TiO_2 de 80 nm de diámetro, descritos aquí como NTs (Figura 3.2 B).

Finalmente, los especímenes fueron retirados, y sometidos a baño ultrasónico para eliminar residuos de fluoruro a 30 MHz por 10 minutos en agua desionizada e inmediatamente transferidos a un desecador por 24 h.

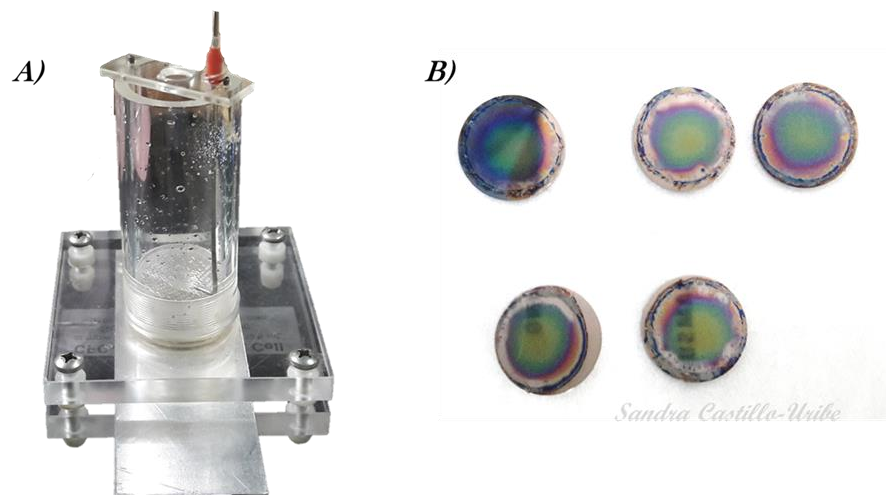


Figura 3.2 A) Celda electroquímica, [22] **B)** Vista superior de los especímenes con nanotubos de TiO_2 , descritos aquí como NTs.

3.3 Preparación de las moléculas osteoactivas derivadas de los flavonoides

En este procedimiento se utilizó el flavonoide Epicatequina ((-)- Epicatechin, $\geq 90\%$ (HPLC), Sigma-Aldrich, USA,). A continuación, en una Balanza analítica se pesó 1 mg de epicatequina (Epi), el cual se preparó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL en 1 mL de Etanol al 100 %, mezclando minuciosamente y que permitió la resuspension de dicha solución. Obteniendo una solución de Epicatequina a una concentración de 1 mg/ mL.

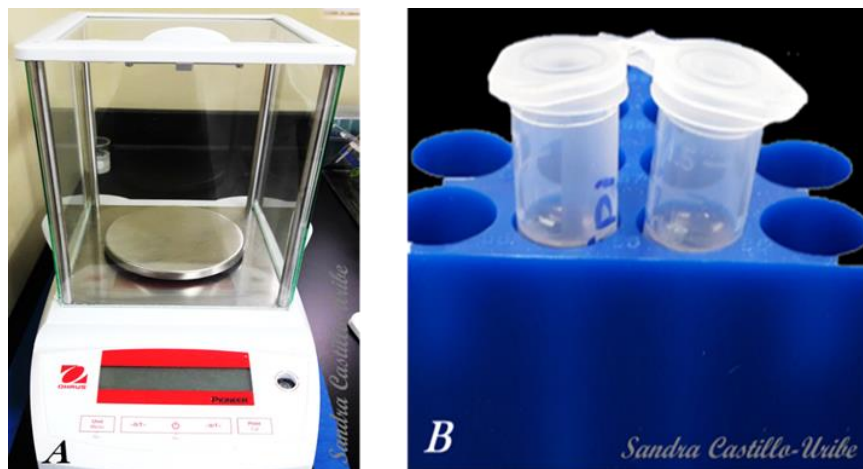


Figura 3.3 **A)** Balanza Analítica (Ohaus Pioneer Analytical), **B)** Solución de flavonoides derivados de Epi a una concentración de 1 mg/ mL.

3.4 Deposición de flavonoides derivados de Epicatequinas sobre nanotubos de TiO_2 de $Ti6Al4V$

Posterior al procedimiento de preparación de Epi, se inició la deposición en especímenes con nanotubos de TiO_2 dentro de cajas de 6 pozos (Corning, Tewksbury MA, USA), descritos aquí como E+NTs. A continuación, a un disco con nanotubos de TiO_2 se le depositaron 200 μ l de la solución de Epi, a una concentración de 1 mg / mL. Posteriormente, se dejó secar a temperatura ambiente en desecador por un tiempo de 20 minutos aproximadamente. Después de ese periodo de tiempo se colocaron 200 μ l de la solución de flavonoides y se dejaron secar como el paso anterior. Este procedimiento fue repetido hasta colocar los 1000 μ l. Esta técnica se realizó por triplicado, (Figura 3.4).

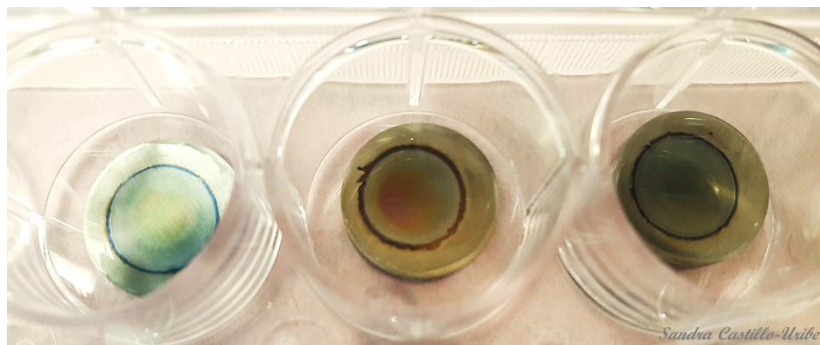


Figura 3.4 Deposición de Epi sobre nanotubos de TiO_2 , descritos aquí como E+NTs.

3.5 Pruebas de liberación sostenida de flavonoides

Este procedimiento se realizó de la siguiente manera:

1. En continuidad los especímenes E+NTs depositados con 1 mg/mL fueron colocados dentro de una caja de 6 pozos (Corning, Tewksbury MA, USA).
2. A cada espécimen se le añadieron 200 μ l de PBS y se dejaron en incubadora con agitación a una temperatura de 25°C, inmediatamente se tomaron 100 μ l del PBS del espécimen, el cual se depositó en un pozo de una caja estéril de poliestireno de 96 pozos (Corning, Tewksbury MA, USA).
3. El sustrato obtenido se guardó para realizar la lectura en espectrofotómetro con una absorbancia inicial de 278 nm (Longitud de onda de Epi), anotando el valor de absorbancia obtenida por dicho aparato.
4. Colocarle al espécimen E+NTs 100 μ l de PBS nuevo, dejar en incubadora con agitación durante 20 minutos por el lapso de tiempo de 4 h. Durante el lapso de cada 20 minutos se realizan los pasos anteriores.
5. Posteriormente, al paso de las 4 h, las lecturas se realizaron cada hora hasta completar un periodo de tiempo de 12 h, realizando los pasos anteriormente descritos.
6. Este procedimiento se realizó por 12, 24, 48 y 72 h.

3.6 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM)

La morfología estructural de los especímenes con NTs y de los sustratos control Ti6Al4V, fueron examinados por microscopía electrónica de Barrido. Se utilizó un FE-SEM (Tescan LYRA 3; Brno, Republica Checa), el cual se encuentra localizado en el Instituto de Ingeniería UABC, para tomar las imágenes, aplicando un voltaje de 15 kV para los análisis.

3.7 Análisis por espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS)

La composición química de las superficies de los especímenes se analizó utilizando el EDS que se encuentra conectado al FE-SEM, ubicado en el Instituto de Ingeniería de la UABC. Cada una de las superficies se analizó en cinco zonas diferentes, seleccionadas aleatoriamente por cuadruplicado.

3.8 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

El análisis topográfico, así como la rugosidad de superficie tanto para los especímenes NTs y los sustratos Ti6Al4V, se efectuó utilizando un AFM (Quesant Q-Scope 350, AMBIOS, Agura Hills, Ca, USA), el cual se encuentra localizado en el Instituto de Ingeniería de la UABC. El proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente utilizando un compartimiento anti-acústico para prevenir ruidos los cuales pudieran afectar el análisis. Se utilizó un escáner de 20- μm equipado con una punta de silicio de 10 nm de curvatura para todas las mediciones. Las imágenes se obtuvieron operando en modo de contacto. Cada una de las superficies se analizó en cinco zonas diferentes por cuadruplicado.

3.9 Evaluación biológica

3.9.1 Cultivos celulares

Para la realización de este estudio, se utilizó como modelo celular para la evaluación de los materiales la línea celular osteoblástica MC3T3-E1, osteoblastos de calvaria de ratón (C57BL/6, Sigma-Aldrich, USA), las cuales se cultivaron sobre las superficies experimentales utilizando Alpha Minimum Essential Medium Eagle (αMEM ; Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA), suplementado con suero

bovino fetal (SBF; Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA) al 10% y con 1 % de penicilina-estreptomina (Invitrogen, CA, USA). Las células se cultivaron en cajas T-25 (Corning, Tewksbury MA, USA), con 4 mL de medio a 37°C, 5% CO₂, hasta alcanzar aproximadamente un 80% de confluencia celular. El medio se cambió cada 3 días por medio de cultivo suplementado nuevo.

Una vez alcanzada la confluencia, se expandieron los osteoblastos MC3T3-E1, se despegaron las células y se sembraron en tres cajas T-25 (Corning, Tewksbury MA, USA), de acuerdo al siguiente procedimiento:

- Se retiró el medio viejo de las células con ayuda de un pipeteador automático y una pipeta serológica.
- Se realizaron 2 lavados agregando 4 mL de PBS 1X pH 7.3 durante 5 minutos, posterior se retiró el PBS con ayuda de pipeta serológica.
- Se adiciono de 1-2 mL de tripsina/EDTA 0.25 % (Gibco-Invitrogen, USA) y se incubó a 37°C durante 5 minutos para despegar las células presentes en la caja.
- Con la ayuda de una pipeta serológica se agregaron 4 mL de medio α MEM (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA), y se retiró la solución para transferirse a un tubo de fondo cónico de 15 mL.

- Se centrifugo a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C para formar un pellet celular al fondo del tubo cónico.
- Con ayuda de un pipeteador automático y una pipeta serológica se retiró el sobrenadante del tubo de fondo cónico, teniendo cuidado de no tocar el pellet celular. Este pellet celular se resuspendió con 5 mL de medio α MEM, suplementado con SBF al 10% y con 1 % de penicilina-estreptomicina.

Posteriormente se sembraron 100,000 células/mL en cajas nuevas T-25 (Corning, Tewksbury MA, USA), con 4 mL de medio y se incubaron a 37°C, 5% CO₂, hasta alcanzar aproximadamente un 80% de confluencia celular. El medio se cambió cada 3 días utilizando medio de cultivo suplementado nuevo.

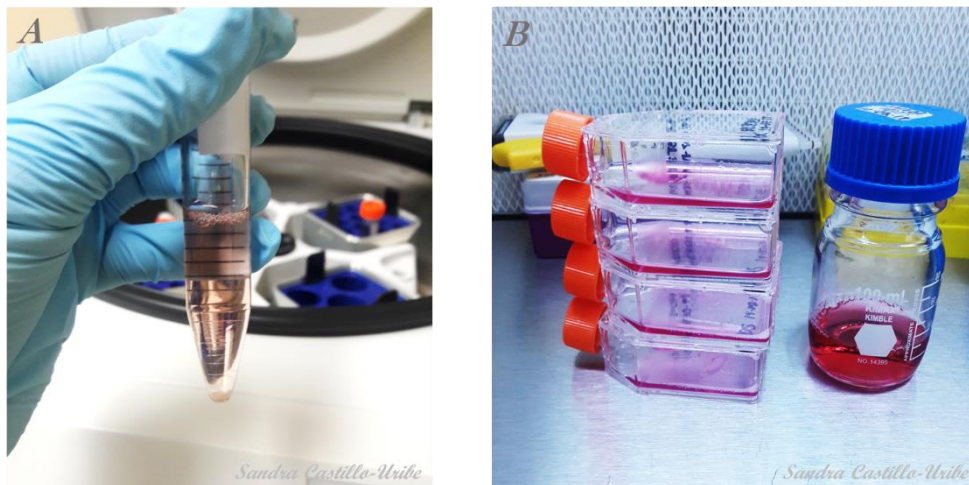


Figura 3.9.1 A) Pellet celular al fondo de tubo cónico, obtenido de un centrifugado a 1200 rpm por 10 min a 4°C **B)** Células MC3T3 E-1 cultivadas en cajas T-25 (Corning, Tewksbury MA, USA), con 4 mL de medio.

3.9.2 Proliferación celular

En este importante paso se colocaron los especímenes experimentales E+NTs depositados con flavonoides, NTs y Ti6Al4V en el interior de una caja estéril de poliestireno de 12 pozos. A continuación, se esterilizaron en UV por 30 minutos cada cara del sustrato. Posteriormente se sembraron 1×10^4 células/mL sobre cada uno de los especímenes y se dejaron incubar por los siguientes tiempos: 4 horas, 1, 3 y 7, días. Al cumplirse cada uno de los tiempos, se retiró el medio de cultivo, se lavaron 1 vez con PBS, y se transfirieron los especímenes a analizarse a una caja nueva de 12 pozos, se les colocaron 70 μ l de medio fresco conteniendo MTT (5 mg/ml; Sigma-Aldrich, USA) al 10 %. A continuación, se dejaron incubar a 37°C por 4 horas, al término de este tiempo se removió el medio y se adicionó 70 μ l de DMSO (Sigma-Aldrich, USA), los especímenes se dejaron incubar por 15 minutos a 37°C en incubadora con agitación para disolver los cristales de formazan que se formaron. Finalmente, se transfirieron los 70 μ l de la suspensión obtenida de cada espécimen a una caja de poliestireno de 96 pozos estéril y se realizó la lectura de la suspensión a una absorbancia de 595 nm con la ayuda de un lector de ELISA (I-Mark, Bio Rad). Este procedimiento se realizó tres veces por triplicado.

3.9.3 Morfología celular analizada por FE-SEM

En este procedimiento se colocaron un espécimen de E+NTs depositado con Epi y uno de NTs, cada una de las superficies de estudio fueron previamente esterilizadas en UV. Estas superficies fueron analizadas a 4 y 24 h de incubación en el interior de una caja estéril de 6 pozos con 15,000 células/mL sembradas sobre la superficie del espécimen.

Al concluir los respectivos tiempos de incubación, se prosiguió al lavado de la superficie de los especímenes 3 veces con PBS 1x. Posteriormente, se fijaron con glutaraldehído (Sigma-Aldrich, USA) al 5% w/v en PBS por 2 horas. Nuevamente fueron lavados 3 veces con PBS y se fijaron de nuevo con glutaraldehído por 1 hora. A continuación, se deshidrataron las superficies de cada espécimen con soluciones seriadas de etanol (50, 70, 80, 90 y 100%) durante 15 minutos cada uno. Se dejaron secar a temperatura ambiente.

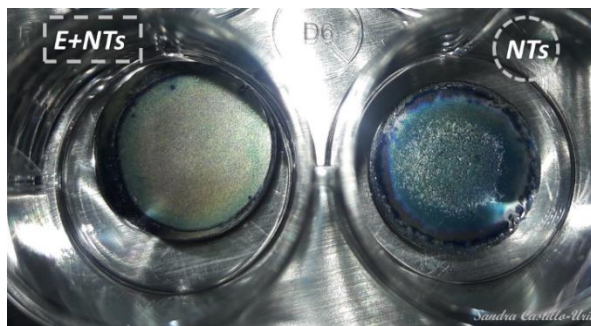


Figura 3.9.3 Especímenes E+NTs y NTs con osteoblastos incubados a 24 h fijados con glutaraldehído para evaluar morfología celular por FE-SEM.

4.1 Análisis estadístico

Con el objetivo de analizar los cambios significativos para cada uno de los experimentos propuestos se analizaron estadísticamente como se describe a continuación. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron 3 veces. Los datos numéricos se evaluaron utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., USA). Las gráficas muestran las barras de error \pm la desviación estándar asociada a los valores N.

La relevancia de los datos se evaluó, utilizando una prueba Un-paired Student's t-test (análisis para muestras emparejadas), y/o el método ONE WAY ANOVA o TWO WAY ANOVA (análisis de varianza de una o dos vías) y la comparación entre medias se realizó utilizando la prueba de Tukey en función del tipo de datos. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor $P < 0.05$.

CAPÍTULO 4

Análisis de resultados y discusión de la metodología utilizada.

*“El hombre nunca sabe de lo que es capaz
hasta que lo intenta”*

- Charles Dickens -

4.2 Resultados

La *Figura 4.2.1* muestra la caracterización morfológica estructural de una superficie de Ti6Al4V sin anodizar utilizada como sustrato control de referencia en los materiales utilizados en la elaboración de esta tesis, descrita aquí como Ti6Al4V.

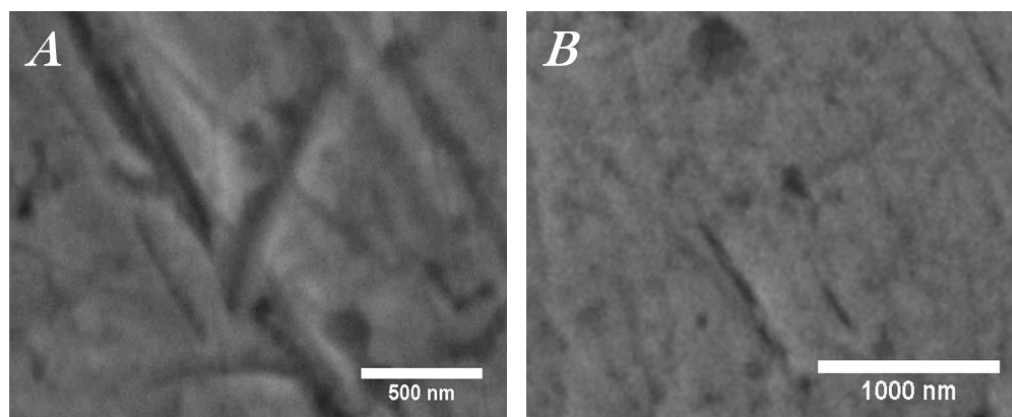


Figura 4.2.1 **A)** Ilustra la superficie plana de Ti6Al4V, observándose a alta amplificación, **B)** Ti6Al4V liso, observándose a bajo amplificación.

La *Figura 4.2.2* muestra la caracterización fisicoquímica de la superficie de los materiales experimentales, descritos en esta tesis como NTs. Sucesivo al proceso de Oxidación Anódica, se convalida la formación de una capa gruesa, espesa y altamente ordenada formada sobre toda la superficie de los especímenes de Ti6Al4V, conllevando a la presencia de NTs homogéneos, alineados y

distribuidos de manera uniforme sobre toda la superficie del sustrato, como se muestra en los análisis FE-SEM (Figura 4.2.2). Por otra parte, la capa nanoestructurada se estimó que cuenta con una longitud de 400 nm (vista sección transversal) y con un diámetro de tubo total de 80 nm (vista superior), el cual cumple con las condiciones establecidas por los objetivos de este estudio.

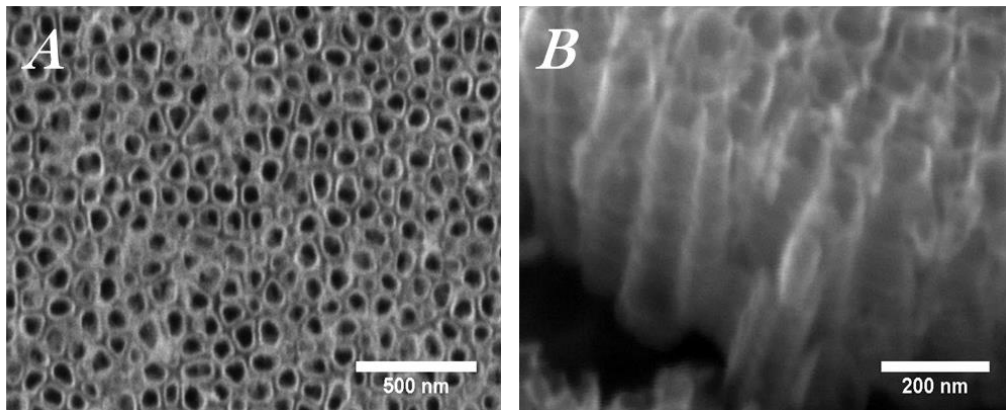


Figura 4.2.2 Micrografía de FE-SEM que muestra la caracterización fisicoquímica de la superficie de los materiales experimentales, descritos aquí como NTs. **A)** Vista superior de NTs homogéneos, **B)** Corte transversal de Nts. Las imágenes de TiO₂ muestran NTs altamente ordenados [22].

El análisis topográfico así como la rugosidad de superficie para los especímenes NTs y los controles, se efectuó utilizando AFM, *Figura 4.2.3*. La superficie de Ti6Al4V sin modificar es decir, sin anodizar muestra una superficie plana y lisa como se presenta en los análisis microscópicos (*Figura 4.2.3 A*) en comparación con las superficies de los NTs. La caracterización de AFM soporta en

conjunto con FE-SEM la formación de NTs, (*Figura 4.2.3 B*) que se observan por la presencia de nanoporos ordenados, alineados, homogéneos y la rugosidad de la superficie significativamente incrementada (*Figura 4.2.3 C*), brindando evidencia de las características tubulares de los NTs apoyando las imágenes observadas en el FE-SEM.

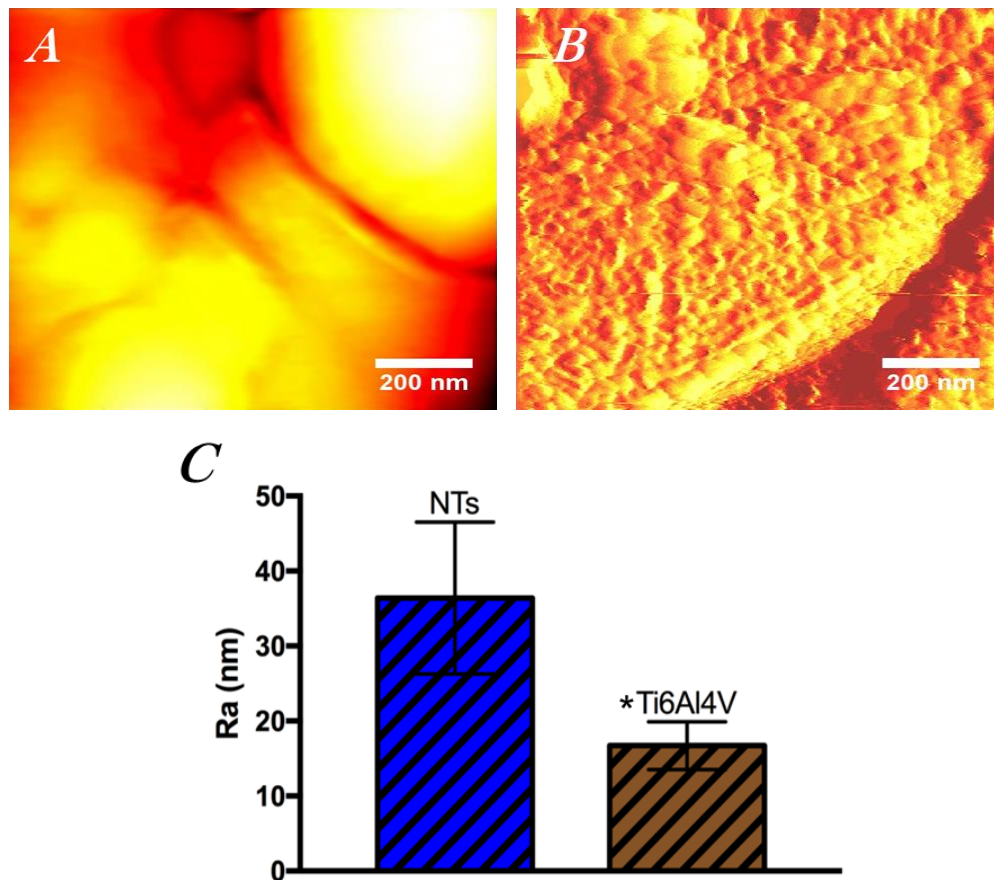


Figura 4.2.3 Micrografías de AFM que muestran la caracterización fisicoquímica de la superficie de los materiales experimentales. **A)** Espécimen control de Ti6Al4V, **B)** Muestra la topografía de NTs sobre la superficie del material experimental. **C)** Evaluación cuantitativa de la rugosidad de superficie, * representa diferencias significativas entre los NTs desinfectados con SOW y el sustrato Ti6Al4V [21, 22].

Por otra parte se realizaron análisis de EDS, para examinar la composición química de la superficie de los especímenes, donde se expone un resumen de la composición elemental (*Tabla 1*). Se pudo observar fuertemente el aumento de los valores de oxígeno y de flúor (20.32 %, y 2.91 %, respectivamente), después de utilizar Agua súper-oxidada (SOW) como medio acuoso para el procedimiento de Oxidación Anódica (*Tabla 1*), promoviendo la formación de una capa de óxido más grande y más rugosa. Además, el material E+NTs mostró un gran incremento en los porcentajes de C y niveles similares de O en comparación con las muestras de NTs, lo que sugiere que el depósito de Epi se logró sobre las muestras experimentales.

Sustratos	EDS					
	<i>Composición Elemental (%)</i>					
	C	V	Al	Ti	O	F
Ti6Al4V	3.58	4.11	6.26	86.05	-	-
NTs	1.61	3	4.06	68.10	20.32	2.91
E+NTs	30.88	-	2.65	38.33	25.24	-

Tabla 1. Análisis EDS de la composición química de las superficies experimentales.

Por contraste la humectabilidad de la aleación se vio notablemente incrementada por la Oxidación Anódica y la desinfección que brinda el agua súper-oxidada en comparación con la superficie no modificada y no desinfectada (*Figura 4.2.4*).

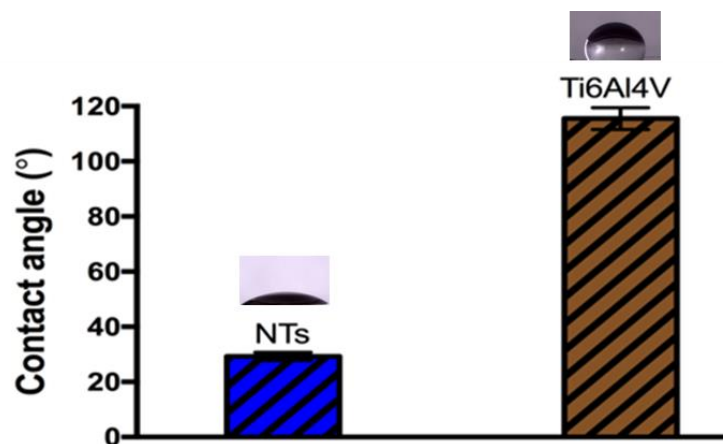


Figura 4.2.4 Humectabilidad de los especímenes experimentales NTs y Ti6Al4V.

Con el objetivo de evidenciar la deposición de un recubrimiento orgánico tal como es el flavonoide Epi, se realizó un análisis de Espectroscopia de infrarrojo (IR) para la muestra NTs y E+NTs. En la *Figura 4.2.5* la gráfica muestra un espectro en modo de transmitancia. En el espécimen E+NTs (línea de color negra), se observa claramente que el material NTs no genera ningún tipo de estiramiento o vibración dentro de la región de $3500-1000\text{ cm}^{-1}$. Información que sugiere principalmente la ausencia de compuesto orgánico. Además, se puede observar un importante pico en la región de 600 cm^{-1} , lo que se relaciona con vibraciones Ti-O provenientes de

la muestra anodizada. Por otra parte, el material E+NTs muestra la clara presencia de un pico en la región de 3300 cm^{-1} , asignado como un estiramiento O-H de los alcoholes pertenecientes al flavonoide. También, se detectó claramente un pico desplazado a 1650 cm^{-1} indicando un estiramiento R-O-R de un tetrahidropirano conjugado (lo cual se relaciona estrechamente con la molécula de Epi) y los picos a 1200 cm^{-1} indicando estiramientos vibracionales C-O. Es importante resaltar que el pico perteneciente a Ti-O se vio enmascarado por la presencia de Epi en el sustrato de NTs, lo que evidencia la presencia del flavonoide en el materia E+NTs.

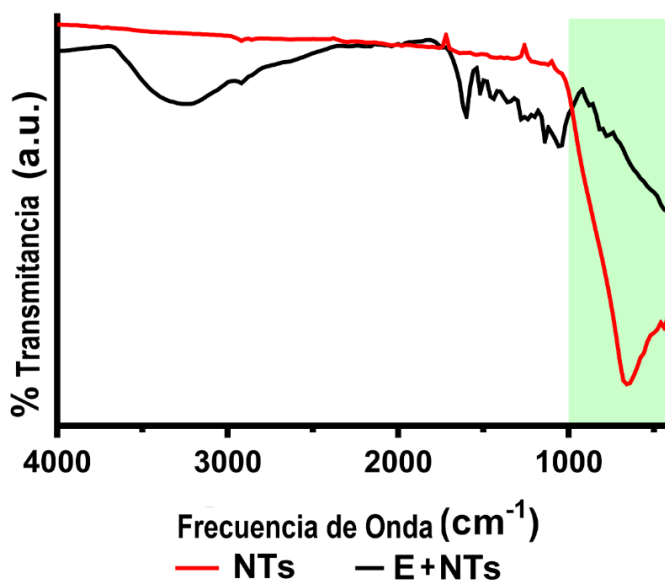


Figura 4.2.5 Espectro de los materiales experimentales NTs y E+NTs.

Por otra parte, con el objetivo de analizar y evaluar la liberación de Epi cargada en los NTs, en la *Figura 4.2.6* se muestra en la gráfica el comportamiento de Epi con base a la Curva de liberación acumulada en función al tiempo, donde se dio una rápida liberación inicial, seguida de un periodo más lento y con un comportamiento constante. Se liberó cerca del 10% de Epi en las primeras 3 horas, alcanzándose alrededor del 20% de liberación posterior a las 11 h de efectuado el ensayo. Después de 72 h, se logró detectar una liberación acumulada de aproximadamente el 25%, lo que sugiere que la liberación de Epi podría continuar por periodos más extensos, lo cual podría ser benéfico para promover el proceso de osteointegración. Con base a estudios de dosis-respuesta en osteoblastos se decidió continuar trabajando con una concentración estándar de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para cultivos celulares.

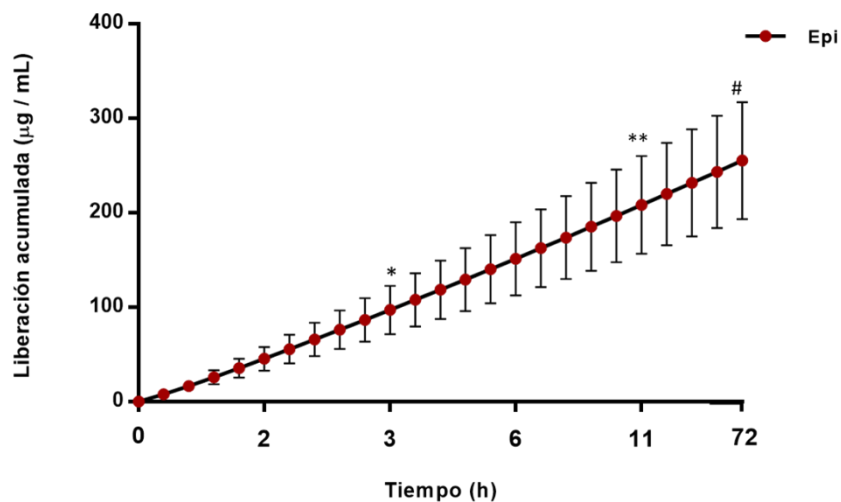


Figura 4.2.6 Curva de liberación sostenida de Epi a 72 h sobre los sustratos NTs, a una concentración inicial de 1 mg/mL . Los datos son las medias de tres experimentos independientes por triplicado, $N=3$ / $P<0.05$ denotando diferencias entre las medias

estadísticamente significativas. * Indica la rápida liberación a las primeras horas, ** Indica la liberación continua, # Indica el valor máximo de respuesta de la liberación sostenida de Epi.

Terminando con la caracterización física de los materiales experimentales, se procedió con la evaluación biológica, utilizando osteoblastos (*Figura 4.2.7 A*). Se realizaron las siembras con 4 mL de medio (*Figura 4.2.7 D, E y F*). El medio se cambió cada 3 días por medio de cultivo suplementado nuevo.

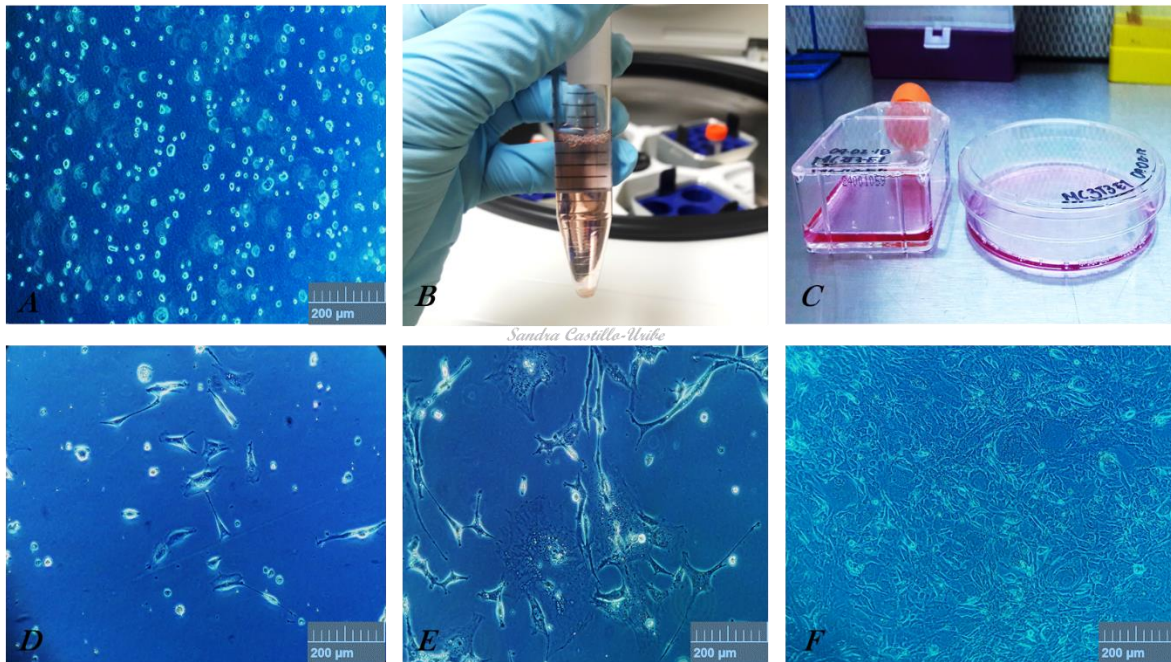


Figura 4.2.7 A) Línea celular MC3T3-E1, osteoblastos de calvaría de ratón. **B)** Centrifugado a 1200 rpm por 10 min a 4°C. **C)** Siembra de células en cajas T-25 (Corning), con 4 mL de medio. **D)** Poca proliferación de osteoblastos a 1 día de incubación. **E)** Osteoblastos sub-confluentes en pasaje 1. **F)** Pasaje 1 de osteoblastos confluentes, presentando la formación de una monocapa.

Finalizados los cultivos para expandir las células, se sembraron sobre las superficie experimentales 1×10^4 células/mL sobre cada uno de los especímenes y se dejaron incubar por los siguientes tiempos: 4 horas, 1, 3 y 7, días, *Figura 4.2.8*. Inmediatamente al ser depositadas las células y agregado el medio correspondiente (70 μ L), se observó un cambio de coloración en el medio de cultivo de los especímenes E+NTs, de una coloración rosada a un color amarillo ámbar como se muestra en la *Figura 4.2.8 A*, sugiriendo que existe una interacción entre la Epi y el medio completo con los osteoblastos sembrados.

Cumplíndose el tiempo de incubación correspondiente, se prosiguió con el ensayo de MTT descrito en la metodología de esta tesis, con el cual se evaluó la biocompatibilidad, supervivencia y proliferación osteoblástica sobre los especímenes E+NTs, NTs y Ti6Al4V, el cual se muestra en la *Figura 4.2.8 B*, observándose una coloración azul-violeta (formazan) sobre la superficie de los especímenes, convalidando la actividad mitocondrial de las células tratadas, por lo tanto la cantidad de formazan producido y presente sobre los especímenes es proporcional a la viabilidad y presencia de células osteoblasticas.

La *Figura 4.2.9* demuestra gráficamente la diferencia entre la tasa de células vivas sobre la superficie de cada sustrato evaluado a los diferentes tiempos. Se detectó una mayor cantidad de células vivas las superficies E+NTs con respecto a los NTs y el sustrato control Ti6Al4V sin tratamiento.

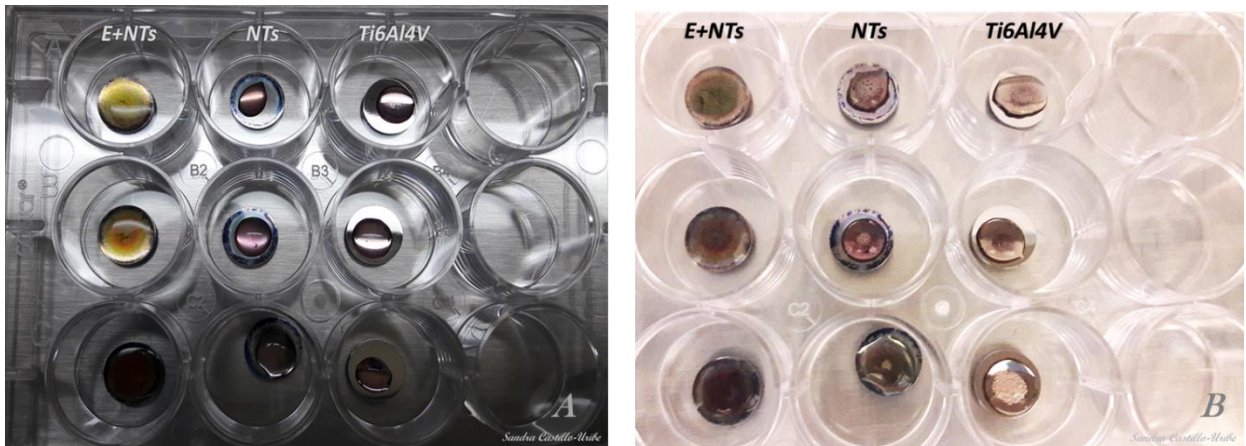


Figura 4.2.8 A) Caja de 12 pocillos con especímenes E+NTs, NTs y Ti6Al4V con células MC3T3-E1 incubadas en los tiempos 4 horas, 1, 3,7 días. **B)** Especímenes E+NTs, NTs y Ti6Al4V con DMSO para disolver los cristales de formazan que se formaron posterior a las 4 h que se dejó incubar el MTT.

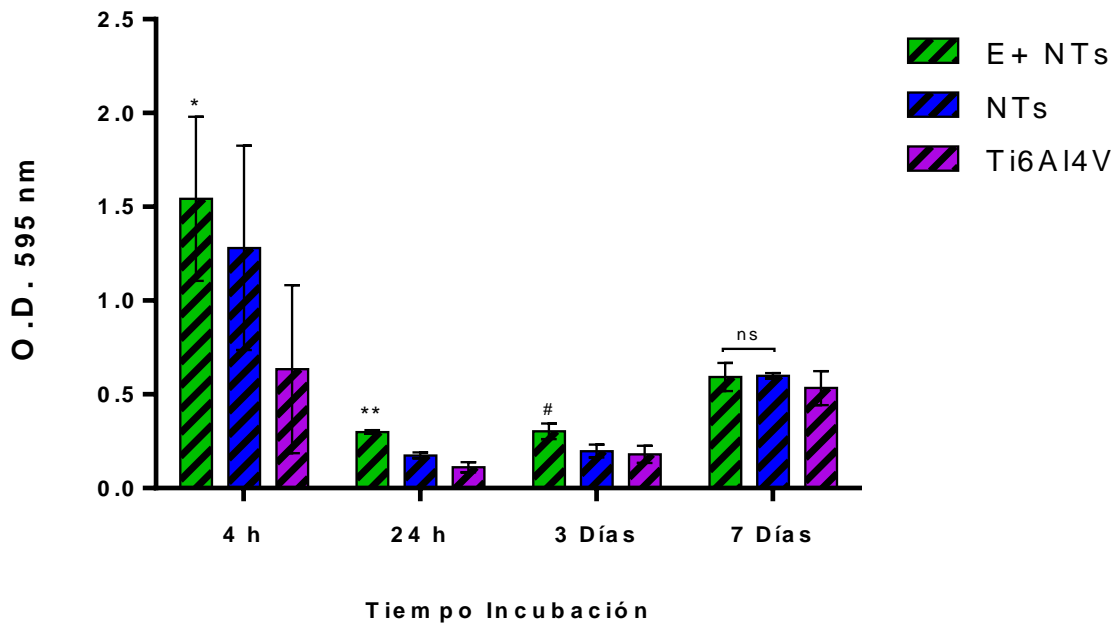


Figura 4.2.9 Se muestra el comportamiento celular de osteoblastos incubados a 4 h, 24 h, 3 y 7 días respectivamente. Denotando un incremento en la adhesión y proliferación en los especímenes NTs cargados con Epi (E+NTs) en comparación con NTs y Ti6Al4V, n= 3, * P<0.05 representa altas diferencias estadísticamente significativas en comparación con el crecimiento en NTs y Ti6Al4V después de 4 h de cultivo, ** P<0.05 representa altas diferencias estadísticamente significativas en comparación con el crecimiento en NTs y Ti6Al4V después de 24 h de cultivo , # P<0.05 representa altas diferencias significativas en comparación con el crecimiento en NTs y Ti6Al4V después de 3 días de cultivo, no significancia (ns) en comparación con el crecimiento en NTs y Ti6Al4V después de 7 días de incubación.

Por otra parte, se realizaron análisis de FE-SEM para estudiar la morfología celular sobre los sustratos de estudio. La *Figura 4.2.10* muestra altas magnificaciones de las zonas de adhesión de los osteoblastos a dos tiempos de incubación a 4 y 24 h respectivamente. A las 4 h de incubación en los sustratos E+NTs se observa una célula más redondeada y de un tamaño más grande, con una morfología bien definida, una Matriz extracelular (EMC) más densa. Se detectaron prolongaciones citoplasmáticas muy delgadas de los osteoblastos llamadas hendiduras o nexos que denotan la unión con otras células osteoblásticas. Se observó la presencia de filopodios de forma fibrilar, lo que convalida una fuerte adhesión celular (*Figura 4.2.10 A*), comparado con lo que se ilustra en la superficie de NTs sin tratamiento de Epi, donde se observa una célula más alargada, con menores pliegues, una ECM más traslucida con filopodios delgados y traslucidos (*Figura 4.2.10 B*).

A las 24 h de incubación se puede observar una célula osteoblástica con prolongaciones citoplasmáticas más densas que mantienen a las células unidas entre sí, se denota una EMC más densa, filopodios protuberantes, alineados anclándose eficientemente promoviendo la proliferación y adhesión de la monocapa (*Figura 4.2.10 C*), comparado con la superficie de NTs sin Epi donde se muestra una célula de forma cúbica más alargada sin presencia de pliegues relacionados a EMC o filopodios por lo tanto denotan una pobre EMC (*Figura 4.2.10 D*) con respecto a la superficie cargada con Epi (E+NTS).

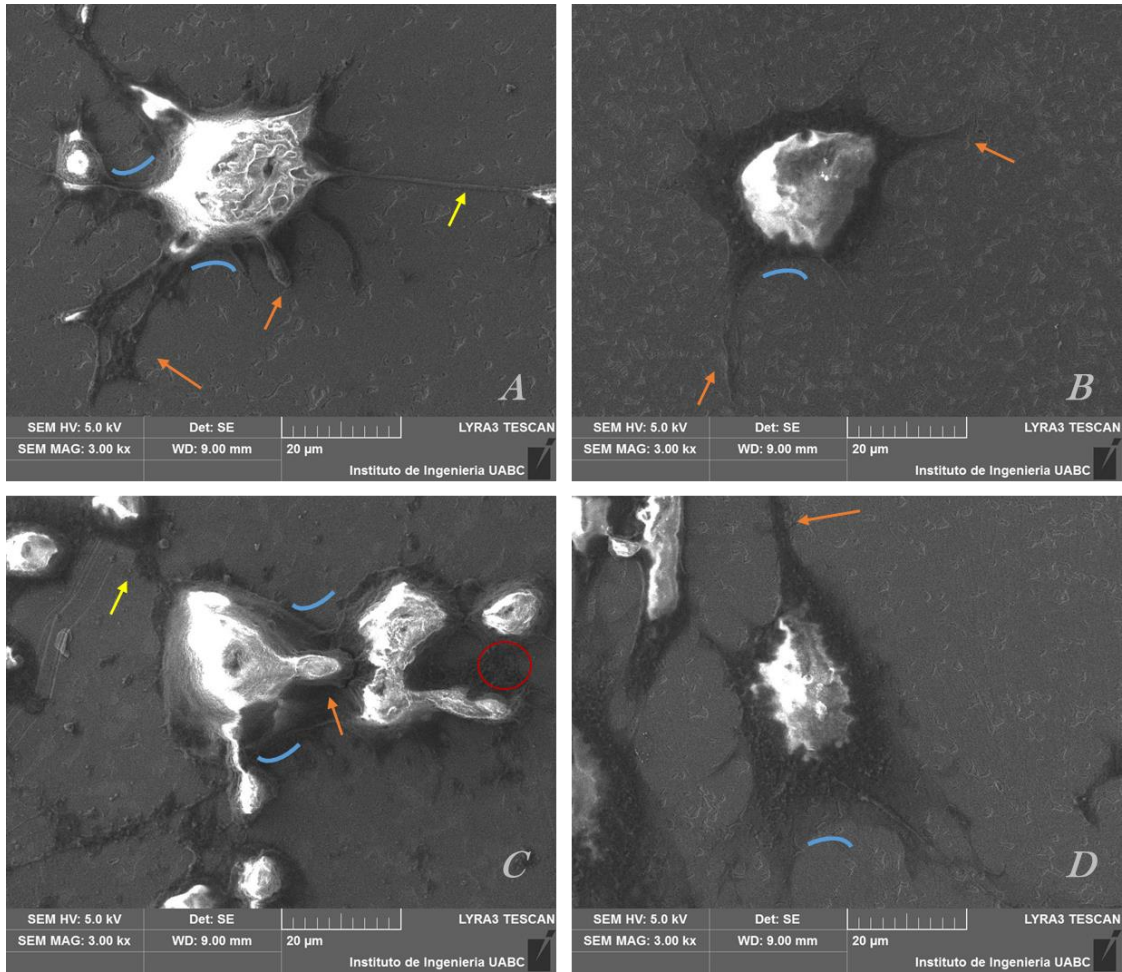


Figura 4.2.10 Micrográficas de SEM a alta magnificación de osteoblastos (MC3T3-E1) incubados sobre los sustratos con tratamiento de Epi (E+NTs) vs NTs sin tratamiento a 4 y 24 h. **A)** Crecimiento a 4 h sobre la superficie de E+NTs. **B)** NTs a 4 h de incubación. **C)** E+NTs a 24 h de incubación. **D)** Crecimiento de NTs a 24 h. Las flechas anaranjadas indican la presencia de filopodios fibrilares (A y C) y su fuerte anclaje celular, (B y D) filopodios delgados y traslucidos. La flecha amarilla indica una prolongación citoplasmática delgada (A) y más densa (C). La línea azul demuestra la monocapa celular más densa y definida (A y C), mientras que para (B y D) es más traslucida. El círculo rojo indica una EMC más densa.

La *Figura 4.2.11* muestra bajas magnificaciones de las zonas de adhesión de los osteoblastos a 4 y 24 h de incubación. A las 4 h de incubación en los sustratos E+NTs se observan células más redondeadas, con una EMC más densa, se detectan prolongaciones citoplasmáticas hendidas o nexos permitiendo la unión con otras células esto convalida la proliferación celular (*Figura 4.2.11 A*), en comparación con lo que se observa en la superficie de los sustratos NTs, donde se ilustra células cúbicas más alargada, sin presencia de prolongaciones citoplasmáticas nexos, denotando una pobre EMC (*Figura 4.11 B*).

A las 24 h de incubación se observan células osteoblasticas redondeadas, con abundantes prolongaciones citoplasmáticas manteniendo y promoviendo a la unión celular, una EMC densa, favoreciendo una proliferación y adhesión celular más homogénea (*Figura 4.2.11 C*). Mientras tanto en la *Figura 4.2.11 D* se ilustran células osteoblasticas alargadas y en algunas zonas filopodios más traslucidos y delgados.

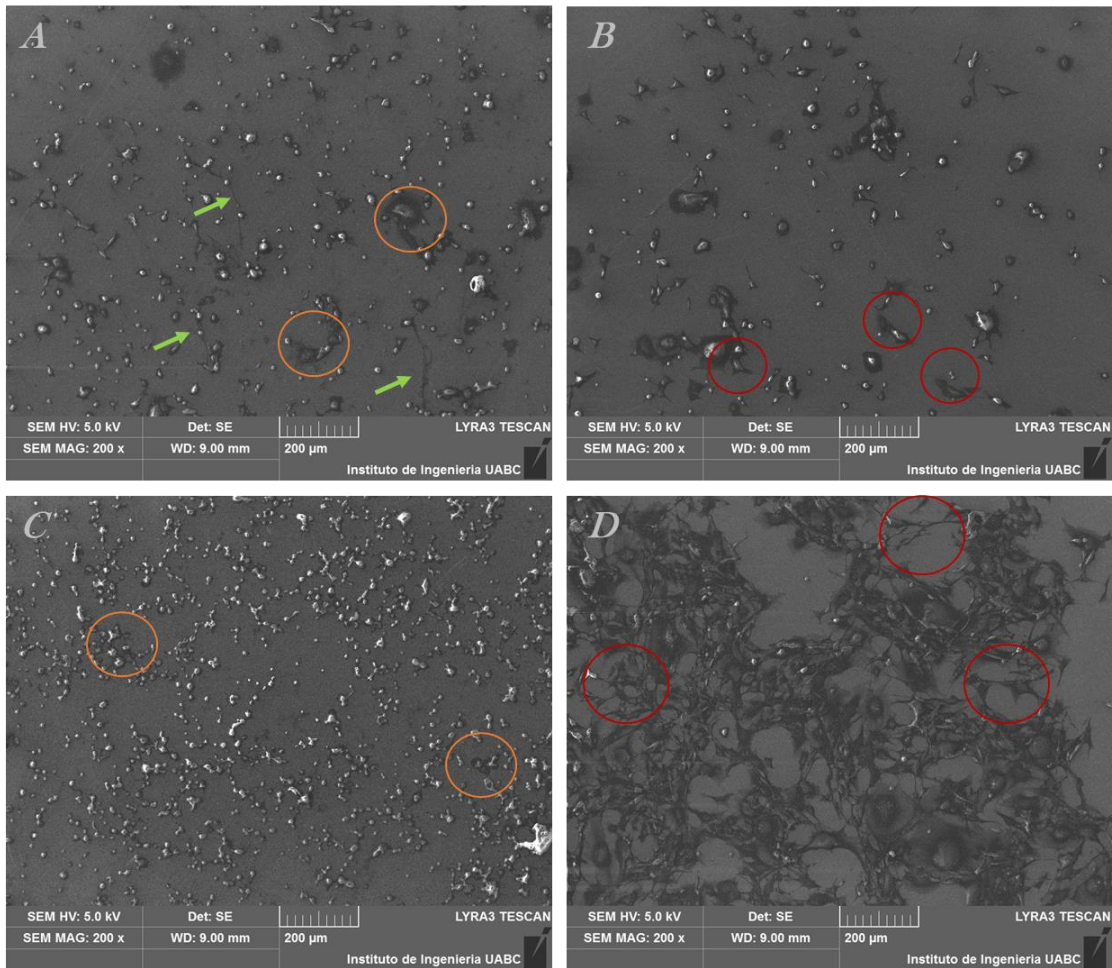


Figura 4.2.11 Micrografías de SEM a bajas magnificaciones de osteoblastos (MC3T3-E1) incubados sobre los sustratos con tratamiento de Epi (E+NTs) vs NTs sin tratamiento a 4 y 24 h. **A)** Crecimiento a 4 h sobre la superficie de E+NTs. **B)** NTs a 4 h de incubación. **C)** E+NTs a 24 h de incubación. **D)** Crecimiento de NTs a 24 h. Las flechas verdes indican presencia de filopodios fibrilares y su fuerte anclaje celular. Los círculos anaranjados indican células más redondeadas con una EMC más densa. Los círculos rojos denotan uniones citoplasmáticas delgadas, filopodios delgados y traslucidos y células más alargadas.

4.3 Discusión

Para el éxito del implante ortopédico o dental, es necesario que el material cuente con propiedades fisicoquímicas y biológicas benéficas para el paciente al que le será implantado. Unas de estas características o requerimientos son la baja elasticidad, baja densidad, excelente resistencia a la corrosión, resistencia mecánica, estabilidad química, la alta biocompatibilidad, así como su exitosa integración en relación al hueso adyacente, es decir la osteointegración [11]. Este proceso de osteointegración involucra la adhesión, proliferación, secreción de proteínas de la EMC y mineralización sobre la superficie de los materiales, hablando en particular de la aleación Ti6Al4V [36, 37]. En términos de efectos nanotopográficos sobre el comportamiento de los osteoblastos (células óseas), se ha demostrado que el óxido de titanio (TiO₂), con diferentes nanoestructuras exhibe efectos mejorados sobre las tasas de crecimiento y la capacidad de formación ósea [36, 38, 41].

Por lo tanto, este estudio se enfocó en caracterizar un material que cumpla con las expectativas ideales de biocompatibilidad, así como las propiedades osteogénicas para optimizar la osteointegración las cuales son la adhesión, proliferación, morfología y topografía celular, así como el efecto que incita la superficie de nanotubos de TiO₂ cargados con epicatequina (E+NTs) *versus* los

nanotubos de TiO₂ (NTs) en las células precursoras de hueso, es decir los osteoblastos. Las células osteoblásticas son células óseas que desempeñan un papel importante en la osteointegración, el enlace físico y químico directo en la interfaz implante-hueso [38].

Las superficies de estudio empleadas para la elaboración de este trabajo (*Figura 4.2.1*), muestran una morfología estructural de las superficies de Ti6Al4V sin anodizar utilizados como sustrato control en esta tesis, vistas a gran aumento (*Figura 4.2.1 A*) y a bajo aumento (*Figura 4.2.1 B*) denotando superficies lisas en contraste con la *Figura 4.2.2* en la cual se presentan micrografías de SEM donde se ilustran nanotubos de TiO₂ de 80 nm de diámetro, alineados en forma vertical, homogéneos, altamente ordenados, distribuidos sobre toda la superficie del material Ti6Al4V formando una capa, descritos en esta tesis como NTs (*Figura 4.2.3 A, B y C*). Las micrografías de AFM avalaron las nanoestructuras donde se muestran nanoporos ordenados, alineados, homogéneos y la rugosidad de la superficie significativamente incrementada, (*Figura 4.2.4*) brindando características tubulares de los NTs, concordando con lo reportado en [17, 21, 22].

Se realizó un análisis EDS para cada uno de los materiales de estudio, en la *Tabla 1* se encuentran los porcentajes con sus diferencias para los elementos presentes en los especímenes analizados. Se puede observar que la química para cada uno de los especímenes es similar, a excepción del oxígeno cuyo valor se incrementó a 20.32 % para los nanotubos de TiO₂ (NTs) y a 25.24 % en los sustratos cargados con Epi (E+NTs). Este efecto se puede explicar en parte debido al procedimiento de oxidación anódica el cual fomentó a la formación de una capa más

densa y rugosa de óxido sobre la superficie de los sustratos, debido al paso de corriente en un medio electrolítico que promueve a la oxidación homogénea y controlada de la capa más externa de óxido de Ti principalmente. Por otro lado, la presencia de Epi en los NTs pudo proporcionar mayor concentración de oxígeno para ser detectado durante los estudios de EDS. También, se encontró en los NTs la presencia de flúor con un 2.91 %, la cual se atribuye a restos del electrolito utilizado en el procedimiento de oxidación anódica, datos que coinciden con la literatura revisada [17, 18, 21]. Por otra parte, la humectabilidad de las superficies entre NTs y Ti6Al4V se vio notablemente diferente, presentando un importante incremento para los NTs, debido a la oxidación anódica y como medio acuoso utilizado agua súper-oxidada (SOW). Esta condición podría explicarse en parte por el reducido porcentaje de carbono en NTs (1.61 %) versus el sustrato control Ti6Al4V (3.58%), *Tabla 1*. La superficie nanoestructurada estuvo en contacto directo con SOW, proceso que puede potenciar la limpieza, desinfección y la humectabilidad del material [21].

En la Figura 4.2.6 se puede observar en la curva de liberación acumulativa, que los sustratos NTs pueden ser potencial material para soportar un producto natural como es el flavonoide Epi, porque se evidencia como el material es capaz de controlar la liberación de Epi depositada en nanotubos de TiO₂. El perfil indica que en un periodo de 72 h, Epi se libera controladamente, datos que validan que Epi puede seguir liberándose por periodos prolongados cargada y/o depositada sobre la superficie de los sustratos NTs (*Figura 4.2.8 A*), corroborando lo descrito para otro tipo de sustancias en la literatura (16, 23).

Posterior a la caracterización física de los materiales experimentales, se procedió con la evaluación biológica, utilizando la línea osteoblástica MC3T3-E1 (Figura 4.2.7 A). Desde el punto de vista de biocompatibilidad, supervivencia y proliferación osteoblástica en los implantes tanto dentales como ortopédicos, es necesario poseer una respuesta positiva y activa de osteoblastos a los materiales implantados. Por lo tanto, se evaluó la actividad osteoblástica a través de la viabilidad y acción mitocondrial utilizando el método de MTT como se describió. Se apreció fuertemente mayor actividad celular inducida por la superficie E+NTs en comparación con todas las demás, sugiriendo que el depósito de Epi y la velocidad en la que se libera de los NTs, estimula la viabilidad osteoblástica *in vitro*. Es invaluable destacar que uno de los parámetros más importantes para el éxito de un implante óseo es la velocidad de crecimiento de hueso nuevo sobre un implante, principalmente a través de la proliferación de osteoblastos activos y viables. Esta información se puede ver traducida en este estudio ya que durante todos los tiempos de evaluación de crecimiento osteoblástico (4h, 1, 3 y 7 días) se observó que el modelo E+NTs promovió la actividad celular, seguido de las nanoestructuras y de forma reducida pero presente y más lenta en Ti6Al4V plano y liso. Este comportamiento se debe probablemente a que los nanotubos de TiO₂ cargados con Epi promueven la formación y anclaje de EMC, lo cual facilita la rápida proliferación y es sustancial debido a que se requiere de una rápida osteointegración para lograr el éxito de los implantes tanto dentales como ortopédicos. Además, se ha reportado que diversos derivados de catequinas como epigallocatequina-3-galato pueden

inducir la mineralización y proliferación de células óseas derivadas de hueso alveolar humano (hABCs), a través de la estimulación de la vía canónica Wnt-3a, la vía Akt-PI3k [46, 47,54, 55] y la activación de algunos derivados de las familias de las proteínas morfogenéticas óseas [27, 45,55]. Sin embargo, parte de los resultados de viabilidad entran en controversia con lo reportado en la literatura [15], donde indican que los diámetros de NTs pequeños (30 nm) promueven un mayor grado de adherencia de osteoblastos de la línea celular osteoblástica MC3T3-E1, mientras que los NTs de mayor diámetro (70-100 nm) provocan o estimulan una menor población de células con morfología celular extremadamente larga y con más altos niveles de fosfatasa alcalina, quizá la diferencia radique en que estos autores trataron térmicamente las superficie de los sustratos a 500°C durante 2 h con el fin de cristalizar los nanotubos de TiO₂ fabricados en una estructura de anatasa, la cual pudo resultar en comportamientos significativamente diferentes con los aquí reportados. Por lo tanto, se recomiendan estudios para elucidar estas diferencias.

Por otra parte, se realizaron análisis de FE-SEM para estudiar la morfología celular sobre los sustratos en estudio. La *Figura 4.2.10* se muestra las altas magnificaciones de las zonas de adhesión de osteoblastos incubados sobre las superficies a 4 y 24 h. A las 4 h de incubación en los sustratos E+NTs se puede observar una célula más redondeada, de tamaño más grade, con su morfología bien definida donde se denota con una EMC densa y nexos delgados y largos permitiendo la unión célula-célula, estas modificaciones citológicas producen un osteoblasto diferenciado el cual secreta los colágenos (tipo 1), sialoproteínas óseas, la osteocalcina lo que sugiere la presencia de los componentes de la matriz ósea.

Nuestros datos están en concordancia con lo reportado en la literatura [42, 43], asimismo se observaron filopodios fibrilares mostrando la adhesión celular sobre la superficie del sustrato E+NTs (*Figura 4.2.10 A*) [37], en comparación con lo que se ilustra en NTs sin tratamiento de Epi (*Figura 4.2.10 B*). A las 24 h en los sustratos cargados con Epi (E+NTs), se observó lo anteriormente mencionado agregando la presencia de unos filopodios más protuberantes, densos, alineados anclándose eficientemente fomentando la adhesión y proliferación de la monocapa (*Figura 4.2.10 C*), en comparación con lo ilustrado en los sustratos NTs sin tratamiento (*Figura 4.2.10 D*). La *Figura 4.2.11* muestra las micrografías a bajas magnificaciones de las zonas de adhesión en los nanotubos cargados con Epi (E+NTs), donde se encontró un número superior de pliegues celulares, evidentes interconexiones célula-célula y la extensión de una capa celular proliferante en la superficie (*Figura 4.2.11 A y C*), mientras que en los sustratos NTs se observaron menos interconexiones célula-célula, una EMC menos densa y una menor tasa de proliferación celular (*Figura 4.2.11 B y D*). Además, en parte refuerza a los resultados observados por MTT a 4h, indicando un mayor número de células en E+NTs que en NTs. Otro beneficio que se observó es que en los sustratos cargados con Epi, la producción de EMC es altamente estimulada alusión señalada por los análisis de SEM y convalidada con los análisis de AFM, mostrando diferencias en la topografía indiscutibles sobre los sustratos E+NTs, reforzando los datos encontrados en los análisis de SEM.

Estos datos obtenidos fueron de suma importancia para dar hincapié a determinar la concentración adecuada de estos flavonoides (Epicatequina) ya que se describe en la literatura consultada que en concentraciones elevadas puede perder su efecto tanto *in vitro* como *in vivo*, mientras que a concentraciones bajas podrían mejorar el efecto osteogénico *in vitro* [28,32]. En este estudio se utilizó una concentración estándar de Epi de 30 µg/mL dando resultados osteogénicos favorables y benéficos en análisis *in vitro*.

CAPÍTULO 5

Conclusión, Recomendaciones.

*“Después de escalar una montaña muy alta,
descubrimos que hay muchas otras
montañas por escalar”*

- Nelson Mandela -

5.1 Conclusión

En este trabajo de investigación, se evaluaron los efectos de la liberación sostenida de Epi depositada sobre sustratos con nanotubos de TiO₂, con el fin de elucidar el papel de la topografía nanoestructurada conjugada con un producto natural en la fisiología celular.

La topografía de la superficie juega un papel importante e influye en la promoción de viabilidad celular.

La viabilidad celular en superficies nanoestructuradas de aleaciones de titanio se ve sinergizada por la presencia de EPI incrementando además la biocompatibilidad a implantes para aplicaciones ortopédicas y dentales.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda la cimentación de estrategias experimentales para realizar futuros trabajos *in vivo*, con la finalidad de evaluar profundamente el comportamiento y biocompatibilidad de Epi en la regeneración y biología tisular. En estos estudios preliminares, sugieren que el uso de NTs cargados con 30 µg/mL de Epi prometen potenciar la regeneración ósea favoreciendo a la osteointegración del tejido adyacente al implante y promoviendo la cicatrización (sanado) en menor tiempo.

A lo largo de la elaboración de esta tesis, se hizo énfasis en la necesidad de dar continuidad con los estudios sobre este tema, a fin de complementar los resultados con la implementación de otras técnicas, análisis, procedimientos y métodos, que lleven a resultados a fortalecer y elucidar nuevas vías de señalización involucradas en el benéfico proceso de regeneración ósea atestiguado aquí.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1].- Murguiondo M., Velásquez M., Mendoza R., González Pedraza A. (2011). Salud bucal en pacientes adultos mayores y su asociación con la calidad de vida. Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas. Vol. 16, No.2, 110-115.

[2].- Barrancos Mooney J, Barrancos P. 2006, "Operatoria Dental", (pp. 297). 4ta Edición: Editorial Panamericana.

[3].- Lindhe, Karring L. "Periodontología clínica e Implantología Odontológica". (pp. 405-425). 5ta Edición: Editorial Panamericana.

[4]. - The Academy of Prosthodontics. The Glossary of Prosthodontic Terms. The Journal of Prosthetic Dentistry. Vol. 94, No. 1 (pp. 34).

[5].- Belaúnde M., Salazar F., Castillo D., Manrique J., Orejuela F., Zavaleta C., López M. (2012). Asociación del acceso a la atención dental y el edentulismo. Rev Estomatol Herediana. Vol. 22, No.2:77-81.

[6].- Jeffrey P. Okeson. "Tratamiento de Oclusión y afecciones Temporomandibulares". (pp. 67-90). 5ta Edición: Elsevier.

[7]. - Major M.A, Stanley J.N. (2004). Wheeler's Dental Anatomy, Physiology, and Occlusion. Elsevier Science. (pp. 433-471).

[8].- Arguedas N, Alfaro E. (2013) Condiciones y tratamientos sistémicos como riesgo para la terapia con implantes dentales. Publicación científica Facultad de Odontología. No. 15, 61-68.

[9].- González J., Olmos JM. (2010). Fisiopatología de la osteoporosis y mecanismo de acción de la PTH. Osteoporosis y Metabolismo Mineral, Vol.2, No.2, S5-S17.

[10].- Sánchez J. (2008, Abril-Mayo) Periimplantitis: protocolo clínico y terapéutico. Científica dental. Vol. 5, 1, 55-69.

[11].- Prasad S, Ehrensberger M, Prasad Gibson M, Hyeongil K, Monaco Jr. E. (2015, August). Biomaterial properties of titanium in dentistry. Oral Biosciences, 57, 192-199.

[12].- Hosoki M., Nishigawa K., Miyamoto Y., Ohe G., Matsuka Y.(2015, August-December).Allergic contact dermatitis caused by titanium screws and dental implants. Japan Prosthodontic Society. Published by Elsevier.

[13]. - Minagar S, Ivanova E, Wen C. (2012 August). A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces. *Acta Biomaterialia*, 8, 2875-2888.

[14].- Rodas R. (2013, Ene-Mar).Historia de la Implantología y la oseointegración, antes y después de Branemark. *Estomatológica Herediana*. Vol. 23, No.1, 39-43.

[15].- Brammer K S, Oh S, Cobb C J, Bjursten L M, Van der Heyde H, Jin S. (2009, February-May). Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO₂ nanotube surface. *Acta Biomaterialia*. 5, 3215-3223.

[16]. - C. Popat K, Eltgroth M, J. LaTempa T, Grimes C. A, Desai T. (2007, June-July). Decreased *Staphylococcus epidermis* adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotube. *Biomaterials*. 28, 4880-4888.

[17].- Peng L, Mendelsohn A, LaTempa T, Yoriya S, Grimes C, Desai T. (2009, January-February). Long-Term Small Molecule and Protein Elution from TiO₂ Nanotubes. *Nanoletters*, 9, 5, 1932-1936.

[18].- Escamilla Rodríguez A, (Enero 2017). Modificación de Superficies de Ti y la Aleación de Ti6Al4V por Anodizado Electroquímico para la Obtención de Nano-Estructuras en Electrolitos Base Agua Súper-Oxidada., (pp. 1-204) TESIS Para obtener el grado de Doctor en Ingeniería. Instituto de Ingeniería UABC.

[19].- Beltrán-Partida E, Moreno-Ulloa E, Valdez-Salas B, Velasquillo C, Carrillo M, Escamilla A, Valdez E, Villarreal F. (2015 Mar). Improved Osteoblast and Chondrocyte Adhesion and Viability by Surface-Modified Ti6Al4V Alloy with Anodized TiO₂ Nanotubes Using a Super-Oxidative Solution. *Materials*, 8(3), 867–883.

[20].- Hao Y.Q, Li S, Hao Y.L, Zhao K, Ai H.J. (2012, November-December). Effect of nanotube diameters on bioactivity of a multifunctional titanium alloy. *Applied Surface Science*, 268, 44-51.

[21].- Beltrán-Partida E, Valdez-Salas B, Escamilla A, Curiel M, Valdez-Salas E, Nedev N, Bastidas JM. (2016 Mar). Disinfection of titanium dioxide nanotubes using

super-oxidized water decrease bacterial viability without disrupting osteoblast behavior. *Materials Science and Engineering:C: Materials for Biological Applications.*, 60, 239-245.

[22] - Beltrán-Partida E, Valdez-Salas B, Curiel-Álvarez M, Castillo-Uribe S, Escamilla A, Nedev N. (1 July 2017). Enhanced antifungal activity by disinfected titanium dioxide nanotubes via reduced nano-adhesion bonds. *Materials Science and Engineering: C, Materials for Biological Applications*, 76, 59-65.

[23].- Yang W, Deng C, Liu P, Hu Y, Luo Z, Cai K. (2016 Jul 1). Sustained release of aspirin and vitamin C from titanium nanotubes: An experimental and stimulation study. *Materials Science and Engineering: C, Materials for Biological Applications.* 64, 139-147.

[24]. - Chun H.K, Kit M.L, Wing Y.C, Ping C.L. (August 4, 2009). Effects of Tea Catechins, Epigallocatechin, Gallic acid, and Gallic acid Gallate, on Bone Metabolism. *Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7293–7297.

[25].- Limón D, Díaz A, Mendieta L, Luna F, Zenteno E, Guevara J. (Marzo, 2010). Los Flavonoides: Mecanismo De Acción, Neuroprotección Y Efectos Farmacológicos. *Mensaje Bioquímico*, Vol. XXXIV, 143-154.

[26].- Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras J.M, Tuñón M.J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, XVII (6), 271-278.

[27]. - Brahma N. Singha, Sharmila Shankarb, Rakesh K. Srivastavaa, (15 December 2011). Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochemical Pharmacology*, 82, 1807–1821.

[28].- Takayuki M, Takaaki T, Yasumasa E, Koichiro I, Tetsuji A, Daisuke E, Naofumi T, Tatsuo Y, Manabu M. (January 2011). Supplementation of green tea catechins in dentifrices suppresses gingival oxidative stress and periodontal inflammation. *Archives of Oral Biology*, 56, 48–53.

[29]. - Ottaviani, J. I., Momma, T. Y., Heiss, C., Kwik-Urbe, C., Schroeter, H., & Keen, C. L. (2011). The stereochemical configuration of flavanols influences the level and metabolism of flavanols in humans and their biological activity in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(2), 237-244.

[30]. - Moreno-Ulloa A, Nájera-García N , Hernández M , Ramírez-Sánchez I , Taub PR , Su Y , Beltrán-Partida E , Ceballos G , Dugar S , Schreiner G , Best BM , Ciaraldi TP , Henry RR , Villarreal F .. (2018 Jan 24). A pilot study on clinical pharmacokinetics and preclinical pharmacodynamics of (+)-epicatechin on cardiometabolic endpoints. *Food & Function*. 9(1), 307-319.

[31]. - Cremonini E, Bettaieb A, Haj FG, Fraga CG, Oteiza PI. (2016 Jun 1). (-)-Epicatechin improves insulin sensitivity in high fat diet-fed mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. , 599, 13-21.

[32]. - Yon-Joo M, Je Seon S, Seong-Oh K, Jae-Ho L, Miejeong J, Ui-Won J, Seok J, Jeong.Hee K. (20 February 2014). The effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on human alveolar bone cells both in vitro and in vivo. *Archives of Oral Biology*, 59, 539-549.

[33]. - ASTM G1-81. (1999). "Preparing, Cleaning, and Evaluating. Corrosion Test Specimens. Editorial Corrections", 1-8.

[34]. - Beltrán-Partida E, Valdez-Salas B, Escamilla A, Moreno-Ulloa A, Burtseva L, Valdez-Salas E, Curiel-Álvarez M, Nedev N. (2015 Apr 20). The Promotion of

Antibacterial Effects of Ti6Al4V Alloy Modified with TiO₂ Nanotubes Using a Superoxidized Solution. *Nanomaterials*, 2015, 9.

[35]. - K. Indira U. Kamachi Mudali T. Nishimura N. Rajendran. (December 2015). A Review on TiO₂ Nanotubes: Influence of Anodization Parameters, Formation Mechanism, Properties, Corrosion Behavior, and Biomedical Applications. *Bio- and Tribo-Corrosion*, 1, 28.

[36]. - Baoye L, Ying L, Jung L, Xiaolong F, Haipeng L, Hongshui W, Shigang X, Linxi Z, Chungyong L, Changyi L.. (2014). Influence of nanostructures on the biological properties of Ti implants after anodic oxidation. *Materials Science: Materials in Medicine*, 25, 199-205.

[37]. - Seunghan O, Chiara D, Li-Han C, Thomas R. P, Fiñones R, Sungho J. (6 April 2006). Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO₂ nanotubes. *Biomedical Materials Research*, 78A, 97-103.

[38]. - Brammer K, Frandsen C, Jin S. (June 2012). TiO₂ nanotubes for bone regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, 30, 315-322.

[39]. - Rupp F, Liang L, Geis-Gerstorfer J, Scheideler L, Hüttig F. (January 2018). Surface characteristics of dental implants: A review. *Dental Materials*, 34, 40-57.

[40]. - Goncalves O.D., Egito M, Castro C, Groisman S, Basílio M, da Phena N. L, (24 March 2018). About the elemental analysis of dental implants. *Radiation Physics and Chemistry*, in press -, Corrected proof-.

[41]. - Jason A. (October 2017). Dental Implants. *Dental Clinics of North America*, 61, 857-871.

[42]. - Michael H. R, Wojciech P. (Junio 2008). "HISTOLOGÍA. Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular". (pp. 218-252.). Buenos Aires, Argentina. 6ta. Edición: Médica Panamericana.

[43]. – Gómez de Ferraris M.E., Campos Muñoz A. Periodoncio de Inserción: Cemento, Ligamento Periodontal y Hueso Alveolar. "Histología y embriología bucodental", (368-383). Buenos Aires, Argentina. Buenos Aires Argentina. Editorial Médica Panamericana.

[44]. - Valdez-Salas B, Beltrán Partida E, Castillo-Uribe S, Curiel Álvarez M, Roumen Z, Stoytcheva M, Montero Alpírez G, Vargas Osuna L. (2017 May 18). *In Vitro*

Assessment of Early Bacterial Activity on Micro/Nanostructured Ti6Al4V Surfaces. *Molecules*, 22 (5), 832.

[45]. - Chenyu C, Jia D, Yi M, Yili Q. (2017 August 13). Green Tea Extracts Epigallocatechin-3-gallate for Different Treatments. *BioMed Research International*, 2017, 9.

[46]. - Moradzadeh M, Hosseini A, Erfanian S, Rezaei H. (2017 October). Epigallocatechin-3-gallate promotes apoptosis in human breast cancer T47D cells through down-regulation of PI3K/AKT and Telomerase. *Pharmacological Reports*, 69, 924-928.

[47]. - Kyoung-Jin M, Taeg Kyu K. (2014 March). Anticancer effects and molecular mechanisms of epigallocatechin-3-gallate. *Integrative Medicine Research*, 3, 16-24.

[48]. - Bernatova I. (15 January 2018). Biological activities of (-)-epicatechin and (-)-epicatechin-containing foods: Focus on cardiovascular and neuropsychological health. *Biotechnology Advances*, In Press, Corrected Proof.

[49]. - Quiñonez-Bastidas G, Cervantes-Dúran C, Rocha-González H, Murbartían J, Granados-Soto V. (17 October 2013). Analysis of the mechanisms underlying the antinociceptive effect of epicatechin in diabetic rats. *Life Sciences*, 99, 637-645.

[50]. - Actis-Goretta L, Lévèques A, Giuffrida F, Romanov-Michailidis F, Viton F, Barron D, Duenas-Paton M, Gonzalez-Manzano S, Santos-Buelga C, Williamson G, Dionisi F.. (15 August 2012). Elucidation of (-)-epicatechin metabolites after ingestion of chocolate by healthy humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 53, 787-795.

[51]. - Gutiérrez-Salmeán G, Ortiz-Vilchis P, Vacaseyde C, Garduño-Siciliano L, Chamorro-Ceballos G, Meaney E, Villafaña S, Villareal F, Ceballos G, Ramírez-Sánchez I. (5 April 2014). Effects of (-)-epicatechin on a diet-induced rat model of cardiometabolic risk factors. *European Journal of Pharmacology*, 728, 24-30.

[52]. - Cheng T, Wang W, Li Q, Han X, Xing J, Qi C, Lan X, Wan J, Potts A, Guan F, Wang J.. (March 2016). Cerebroprotection of flavanol (-)-epicatechin after traumatic brain injury via Nrf2-dependent and -independent pathways. *Free Radical Biology and Medicine*, 92, 15-28.

[53]. - A. Hagiwara K, D. Wright A. (2015). Chapter 71 – Tea Leaf Age, Shade and Characteristic Levels of L-Theanine, Caffeine, (-)-Epigallocatechin Gallate (EGCG), (-)-Epigallocatechin (EGC), (-)-Epicatechin (EC), and (-)-Epicatechin Gallate (ECG). *Processing and Impact on Active Components in Food*, 591-596.

[54]. - Singh BN, Shankar S, Srivastava RK. (15 December 2011). Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochemical Pharmacology*, 82 (12), 1807-21.

[55]. - Yon-Joo M, Je Seon S, Seong-Oh K, Jae-Ho L, Mijeong J, Ui-Won J, Seok Jun M, Jeong-Hee K, Hyung-Jun C.. (May 2014). The effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on human alveolar bone cells both in vitro and in vivo. *Archives of Oral Biology*, 59, 539-549.

ANEXOS



August 2016

TO WHOM IT MAY CONCERN

P r e s e n t

This is to certify that *Benjamin Valdez Salas, Ernesto Beltran-Partida, Mario A. Curiel, Alan Escamilla, Gustavo Martinez, Sandra Castillo, Zureya Fontes, Nicolas Serafin* presented the contribution: **TIO₂ NANOTUBES CLEANING BY OXIDIZED WATER SUPPRESS BACTERIAL VIABILITY**, in the Biomaterials for Medical Applications Symposium at the XXV International Materials Research Congress held in Cancun, Mexico from August 14th to 19th, 2016.

Sincerely,



José Gerardo Cabañas Moreno
President





August 2017

TO WHOM IT MAY CONCERN

P r e s e n t

This is to certify that *Benjamin Valdez, Ernesto Beltran, Mario Curiel, Aldo Moreno, Alan Escamilla, Sandra Castillo, Nicolas Serafin, Omar Morales* presented the contribution: **PROMOTED ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF TiO_2 NANOTUBES BY A DISINFECTION PROCESS**, in the Materials, Surfaces and Interfaces for Medical Applications and Health Symposium at the XXVI International Materials Research Congress held in Cancun, Mexico from August 20th to 25th, 2017.

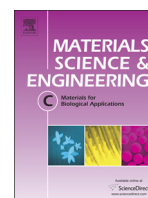
Sincerely,



Sociedad Mexicana
de Materiales A.C.

Claudia Gutiérrez-Wing
President





Enhanced antifungal activity by disinfected titanium dioxide nanotubes via reduced nano-adhesion bonds



Ernesto Beltrán-Partida^{a,b,*}, Benjamín Valdez-Salas^{a,**}, Mario Curiel-Álvarez^a, Sandra Castillo-Uribe^{a,b}, Alan Escamilla^a, Nicola Nedev^a

^a Department of Corrosion and Materials, Engineering Institute, Autonomous University of Baja California, Blvd. Benito Juárez and Normal St., 21280 Mexicali, Baja California, Mexico

^b Department of Biomaterials, Dental Materials and Tissue Engineering, Faculty of Dentistry Mexicali, Autonomous University of Baja California, Av. Zotoluca and Chinampas St., 21040 Mexicali, Baja California, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 December 2016

Received in revised form 22 February 2017

Accepted 25 February 2017

Available online 28 February 2017

Keywords:

Candida albicans
Tissue engineering
TiO₂ nanotubes
Disinfection
Osteoblasts
Dental implants

ABSTRACT

We have provided evidence that the beneficial effect of super-oxidized water (SOW) disinfected Ti6Al4V-TiO₂ nanotubes (NTs) can reduce bacterial adhesion and biofilm formation. However, the need of antifungal nanostructured surfaces with osteoactive capabilities is an important goal that has been arising for dental implants (DI) applications. Thus, in the present study we isolated and tested the effects of *Candida albicans* (*C. albicans*) on disinfected, wetter and nanoroughness NTs compared to a non-modified control. Moreover, we elucidated part of the fungal adhesion mechanism by studying and relating the mycotic adhesion kinetics and the formation of fungal nanoadhesion bonds among the experimental materials, to gain new insight of the fungal-material-interface. Similarly, the initial behavior of human alveolar bone osteoblasts (HAOb) was microscopically evaluated. NTs significantly reduced the yeasts adhesion and viability with non-outcomes of biofilm than the non-modified surface. Cross-sectioning of the fungal cells revealed promoted nano-contact bonds with superior fungal spread on the control alloy interface; meanwhile NTs evidenced decreased tendency along time; suggesting, down-regulation by the nanostructured morphology and the SOW treatment. Importantly, the initial performance of HAOb demonstrated strikingly promoted anchorage with effects of filopodia formation and increased vital cell on NTs with SOW. The present study proposes SOW treatment as an active protocol for synthesis and disinfection of NTs with potent antifungal capability, acting in part by the reduction of nano-adhesion bonds at the surface-fungal interface; opening up a novel route for the investigation of mycotic-adhesion processes at the nanoscale for bone implants applications.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Oral candidiasis (OC) is the most common and dangerous fungal infection among the oral cavity. This disease has high incidence in diabetic, cancer, malnourished, advanced aged, renal, oral-prosthetic and immunosuppressed patients [1,2]. If is not correctly managed, it could trigger a systemic mycosis (i.e. dermatologic complications) [2] which in turn can also improve the resistance to antifungals, malignant changes (e.g. hyperplastic candidiasis) or in worst case the patient's death [3]. These manifestations mainly start by an uncontrolled colonization of *C. albicans*, the main specie present in the mouth [4]. On the other hand, Titanium (Ti) and Ti-based alloys are the principal options selected for

DI manufacturing and for the clinical treatment of edentulous patients. Unfortunately, *C. albicans* is commonly isolated from peri-implantitis lesions (which lead to DI loosening) [5], suggesting to play an important role in DI failures; possibly by the virulence gained by its rapid colonization on the implant surface; and/or by synergistically interacting with other bacteria such as *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) resulting in a polymicrobial biofilm [6,7]. Moreover, a prerequisite for the initial material-bacteria interactions may involve the formation of close-contact adhesion bonds at the nanoscale between the biofilm and the rough implant surface [8,9], information that suggests the need for analytic studies characterizing those phenomena.

SOW, is an electrolyzed water that has been widely used for the disinfection of an extensive variety of medical instruments and as a root canal irrigant for endodontic procedures [10], due to its potent antibacterial effect possibly by the action of its oxidizing radicals (i.e. hypochlorous species and chlorine molecules) [11]. Recently, we explored the antibacterial efficacy of anodized NTs synthesized and disinfected by exploiting the use of SOW against *S. aureus*, which showed striking significant reduced bacterial adhesion and biofilm

* Correspondence to: E. Beltrán-Partida, Department of Biomaterials, Dental Materials and Tissue Engineering, Faculty of Dentistry Mexicali, Autonomous University of Baja California, Av. Zotoluca and Chinampas St., 21040 Mexicali, Baja California, Mexico.

** Corresponding author.

E-mail addresses: beltrane@uabc.edu.mx (E. Beltrán-Partida), benvall@uabc.edu.mx (B. Valdez-Salas).

¹ Those authors contributed equally.

formation without altering the osteoblasts behavior [12]. Moreover, the use of NTs have shown improved osteogenic activity on a wide variety of dental implants alloys; nonetheless, the presence of different NTs arrays and/or diameters can outset a promoted bacterial activity [13–15]. Thus, taking into account the above mentioned information, and the need of antifungal surfaces for DI applications; we hypothesized that a Ti6Al4V dental alloy with NTs synthesized and disinfected by SOW will promote antifungal capability (which is completely different to the antibacterial actions) to the NTs; in part via reduction of nano-adhesion bonds (a rigorous prerequisite for bacterial/fungal adhesion and biofilm formation) at the fungal-material interface (which has never been described); without affecting the osteoblast adhesion and viability, which in turn will generate a novel, easy and economic strategy for dental implants cleaning and disinfection.

The objective of the present in vitro study was to test for the first time the anti-fungal activity of NTs synthesized and cleaned by SOW; extending our previous report regarding the antibacterial capability of NTs with SOW, and realize a postulate for the role of nano-bonds between *C. albicans* and disinfected NTs (exploiting the FIB's technology as a novel tool) as a part of a possible mechanism involved in the disruption of *C. albicans* adhesion and strongly required for DI success. This is the first study focusing on the antifungal capability of Ti6Al4V-NTs (of importance for DI applications) instead of only bactericidal activity. Moreover, we were interested in to test the initial HAOb (a proper model of oral osteoblasts) behavior of our disinfected nanostructured materials for DI applications.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis and disinfection of NTs

The fabrication and cleaning of NTs was carried out as previously described with slight modifications [12]. Flat disks of Ti6Al4V (ASTM F-136; Supra Alloys Inc., Camarillo, CA, USA) with 150 mm diameter and 5 mm thickness were mirror finished by means of SiC emery paper (100 to 2000 grit) and 1- μ m alumina. Next, the samples were mounted on a special flat 125 mL cell and anodized using Microdacyn 60® super-oxidized water (Oculus Technologies, Guadalajara, JAL, Mexico) at pH 6.8, containing 10 mg/L of NH_4F (Sigma-Aldrich, USA) and 100 mg/L NaCl (Sigma-Aldrich, USA). Afterwards, a potential of 20 V was applied using a DC power supply for 5 min with a platinum mesh as counter electrode. The reaction was performed at room temperature (RT). In order to remove fluoride residues, the materials were sonicated for 5 min in double distilled water, rinsed with isopropyl alcohol and dried in a desiccator for 12 h. All experimental materials were sterilized by UV irradiation (285 nm UVB light source) for 30 min on each side, inside of a biosecurity cabinet. In contemplation to disinfect the nanostructured surface, the NTs were immersed in 20 mL of SOW for all night, dried at RT and sterilized again. We do not use a non-disinfected NTs surface as negative control, due to the strikingly potent antibacterial efficiency that was formerly reported [12].

2.2. Surface characterization

In order to reveal the surface morphology of the nanostructured surface and non-modified control, field-emission scanning electron microscopy (FE-SEM; Tescan LYRA 3, Brno Czech Republic) was applied, taking images at 20 kV accelerating voltage on different random fields. For the chemical characterization, an energy dispersive X-ray spectrometric (EDX; Tescan LYRA 3, Brno Czech Republic) analysis was executed using a silicon drift detector coupled to the FE-SEM. For a larger surface area characterization an X-ray fluorescence (XRF; Shimadzu EDX-7000, Japan) evaluation was performed. Surface roughness is a critical parameter for biological control of biomaterials surfaces [12, 16], thus it was explored by atomic force microscopy (AFM; Quesant Q-Scope 350, AMBIOS, Agura Hills, CA, USA), at RT using an anti-

acoustic box to prevent noise, which can affect the measurements. The operation scan rate was 1 Hz by contact mode. A 40- μ m X-Y and 4- μ m Z scanner equipped with a silicon tip and 10 nm tip curvature was used. The experiment scan surface area was 1 μm^2 . For quantitative roughness comparison between the surfaces, the arithmetic average (Ra) is provided. Wettability is a strict parameter required for the control and study of biomaterial's surface biological behavior, hence the static sessile drop method was conducted at RT to obtain the water contact angle following the procedure reported elsewhere [17,18]. A 15 μL droplet of double-distilled water was dripped onto each material surface using the tip of a syringe, and the shape of the droplet was evaluated taking images using a professional digital camera (Nikon 7200, NY, USA).

2.3. *Candida albicans* behavior on the surfaces

A pathogenic *C. albicans* strain isolated before the antifungal treatment from a female patient of 62 years old that was diagnosed with chronic atrophic oral denture candidiasis was used. The isolation and macroscopic characterization of *C. albicans* was done by CHROagar Candida (Beckton Dickinson, USA) method as described elsewhere [19,20]. For the preparation of the inoculums, the isolated and purified strain was freshly grown overnight on Sabouraud dextrose agar (SDA) plates (Beckton Dickinson, USA). Discrete colonies were obtained from SDA and suspended in SD broth (SDB) overnight. For the viability analysis on the materials, 50 μL of *C. albicans* suspension containing approximately 2×10^4 CFU/mL (O.D. 0.034) plus 100 μL of fresh SDB was used to cover the surface and prevent samples dryness. The inoculum was incubated on the specimens for 4, 12 and 24 h at 37 °C in a static model. After that, the materials were rinsed three times with $1 \times$ PBS to remove any unbounded cells. Each substrate was transferred into an individual well of sterile 24-well polystyrene plate (Corning, USA) with 2 mL of fresh SDB. The plate was placed in an ultrasonic bath (Branson, USA) and sonicated at 120 W for 1 min by 12 periods of 5 s each to avoid cellular lyses, and each surface was scraped off by means of a surgical blade; in order to completely detach any bounded cell. The materials were removed and the remaining suspensions were diluted with PBS and cultured at 37 °C for 24 h in SDA and counted for viability assessment. We performed SEM in order to analyze the density and morphological analysis of *C. albicans* at every incubation time [12,21]. Briefly, each disc was rinsed with warm PBS three times for 5 min respectively, fixed with 2.5% glutaraldehyde for 2 h at RT and dehydrated in graded series of ethanol solutions (30 min each). In order to directly visualize the fungal-surface interface we used FE-SEM as described elsewhere [8]. At 4 h (defined as initial adhesion) and 12 h (late adhesion) of cultivation we used a focused ion beam (FIB; coupled to the FE-SEM) in order to cross-sectioning the adhered fungal cells. Fixed cells were not sputter-coated in regard to evade the coverage of the nanostructured interface at a very high magnification scale. The magnification applied was 50,000 \times operating at 20 kV and a working distance of 5.92 mm. The FIB operation parameters were at 100 pA using a beam diameter of 3 nm at 17 kV.

2.4. Osteoblasts adhesion and viability

HAOb were isolated from human alveolar bone, immunostained to osteocalcin and cultured for the biocompatibility analysis [12,22]. The cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Invitrogen, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen, USA) and 1% antibiotic-antifungal solution (PS; Invitrogen, USA) at 37 °C in 5% CO_2 . Each sample was placed in a 12-well polystyrene plate. The cells were seeded using 1 mL of medium containing a concentration of 2×10^4 cells per mL onto the materials and stored in a CO_2 chamber for 24 h. HAOb viability assays were evaluated by means of a live/dead viability/cytotoxicity assay kit (Invitrogen, USA), with a mixture of 1 mM calcein-AM and 2 mg/mL ethidium

homodimer-1 following the manufacturer's instructions. Thereafter, the substrates were inverted onto cover slides with fluorescence mounting medium (DAKO, USA), examined and photographed with a green (live) and red (dead) filter under a fluorescence microscope (ZOE, Bio-Rad, USA). At least five fields were randomly imaged. For the structural morphology under SEM, the cells were washed and fixed as previously described [12].

2.5. Statistical analysis

At least three independent studies were performed, each in triplicate. Numerical data were analyzed using GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., USA). The significance of differences between group means was analyzed using two-tailed unpaired Student's *t*-test and one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test when appropriate. A $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results and discussion

Our anodization process successfully generated reproducible homogeneous NTs layers among the material surface as depicted by the FE-SEM analyses (Fig. 1A and B). Moreover, the nanostructured layer was estimated to length 400 nm (cross-section view) with a whole diameter of 80 nm (top view) as previously reported [12]. Furthermore, the AFM characterization supports the formation of NTs, as observed by the ordered and aligned nanoholes and the significantly improved surface roughness (Fig. 1C and H). On the other hand, the non-modified alloy presented a flat and smooth surface as depicted by the microscopic

and analytical examinations (Fig. 1D–F). Interestingly, it was strongly promoted the increased surface roughness and elevated values of oxygen and fluoride percentage (20.32% and 2.91%, respectively) by using SOW as an aqueous media for anodization (Table 1), suggesting the formation of a higher and rougher chemical oxide layer. Moreover, an elevated quantity of oxygen (24.02%) was enhanced among the anodized sample as detected by the XRF analysis (Table 1). Information that is in line with our microscopic views and previous works using different solutions but prolonged anodization times [23]. The wettability of the alloy was strikingly increased by the anodization and SOW cleaning as compared to the non-modified and non-disinfected surface (Fig. 1G). This condition could be explained in part by the reduced percentage of carbon on NTs (1.61%) versus the control (3.58%). Additionally, the material surfaces were sterilized using UV, which may causes the elimination of organic residues by the increased energy generated by photochemical activation of the huge TiO_2 nanostructured layer [24–26]. Although, both experimental materials were sterilized by UV, the nanostructured layer was in direct contact with SOW, process that may potentiated the cleaning and wettability of the material [12].

Despite rougher and hydrophilic surfaces promotes increased bacterial colonization among implant materials [27–29], in our present disinfected model we observed the exception due to the reduction of *C. albicans* adhesion up to 24 h as reported by FE-SEM (Fig. 2). In fact, Fig. 2A illustrates that NTs importantly reduced the adhesion of *C. albicans* after comparing to its counterpart which showed initial onsets of biofilm formation (Fig. 2B). Similarly, after 12 and 24 h we observed an identical behavior for NTs with SOW; suggesting not only potentiated reduction of fungal adhesion (Fig. 2C and D) but also significantly

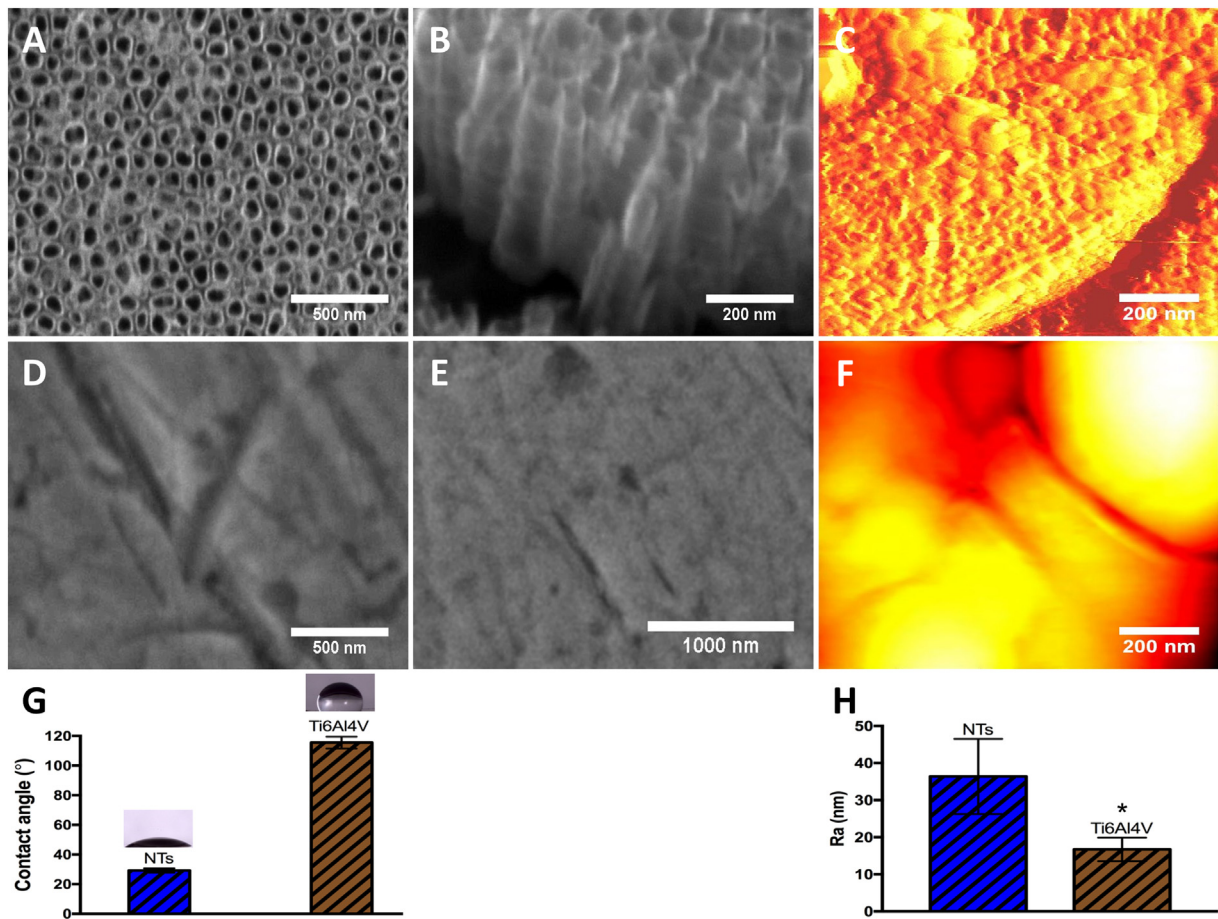


Fig. 1. Surface physicochemical characterization of the experimental materials. A) Top-view of homogeneous NTs, B) Cross-section of NTs, C) AFM of reproducible NTs, D) Ti6Al4V flat surface (high magnification), E) smooth Ti6Al4V (low magnification), F) AFM of control Ti6Al4V, G) wettability of the experimental specimens and H) quantitative surface roughness evaluations, * represents significant differences between disinfected NTs and Ti6Al4V.

Table 1
Chemical composition of the experimental surfaces.

Sample	EDX						XRF			
	Elemental composition (%)						Elemental composition (%)			
	C	V	Al	Ti	O	F	Al	V	Ti	O
NTs	1.61	3	4.06	68.10	20.32	2.91	7.07	2.89	66.02	24.02
Ti6Al4V	3.58	4.11	6.26	86.05	—	—	5.35	3.01	91.64	—

inhibited biofilm formation and colonization compared to the control specimen who yielded the generation of biofilms (Fig. 2D and E). Moreover, at 24 h an inferior mycotic colonization on NTs (Fig. 2E) was appreciated as contrasted with Ti6Al4V at 12 h and 24 h (Fig. 2D and F). Likewise, all surfaces conserved similar cell morphology.

C. albicans is known as a pathogenic specie that can potentiate its pathologic activity by the formation of hyphae [7,30]. However, in

our experimental model (NTs with SOW) we did not observed hyphae or pseudohyphae at any incubation time (see insets in Fig. 2). Results that may proposed that our material model might inhibited or reduced the activation of associated proteins involved in hypha biology (e.g. Hyr1 and Sod5), which could be clinically translated in a possible decayed in peri-implantitis by mycosis [31]. Those trends could be explained in part by a disrupted action of chitin (i.e. one of the main glucans involved in the stabilization of the glycosidic networks in yeasts, but not in bacteria), due to the presence of fluoride and the effect of SOW (a potent oxidizing agent) on the nanostructured surface [11,32]. However, more molecular studies are recommended in order to elucidate this trend. The fungal viability at all incubation times was stronger on the non-modified alloy that in those of NTs with SOW (Fig. 2G), data that its in concordance with the FE-SEM micrographs (Fig. 2A-F). Additionally, we found that the viable number of *C. albicans* was similar at 12 and 24 h on NTs, indicating that the disinfected surface abolished the vital growth of *C. albicans* with prohibited colonization rate. In a

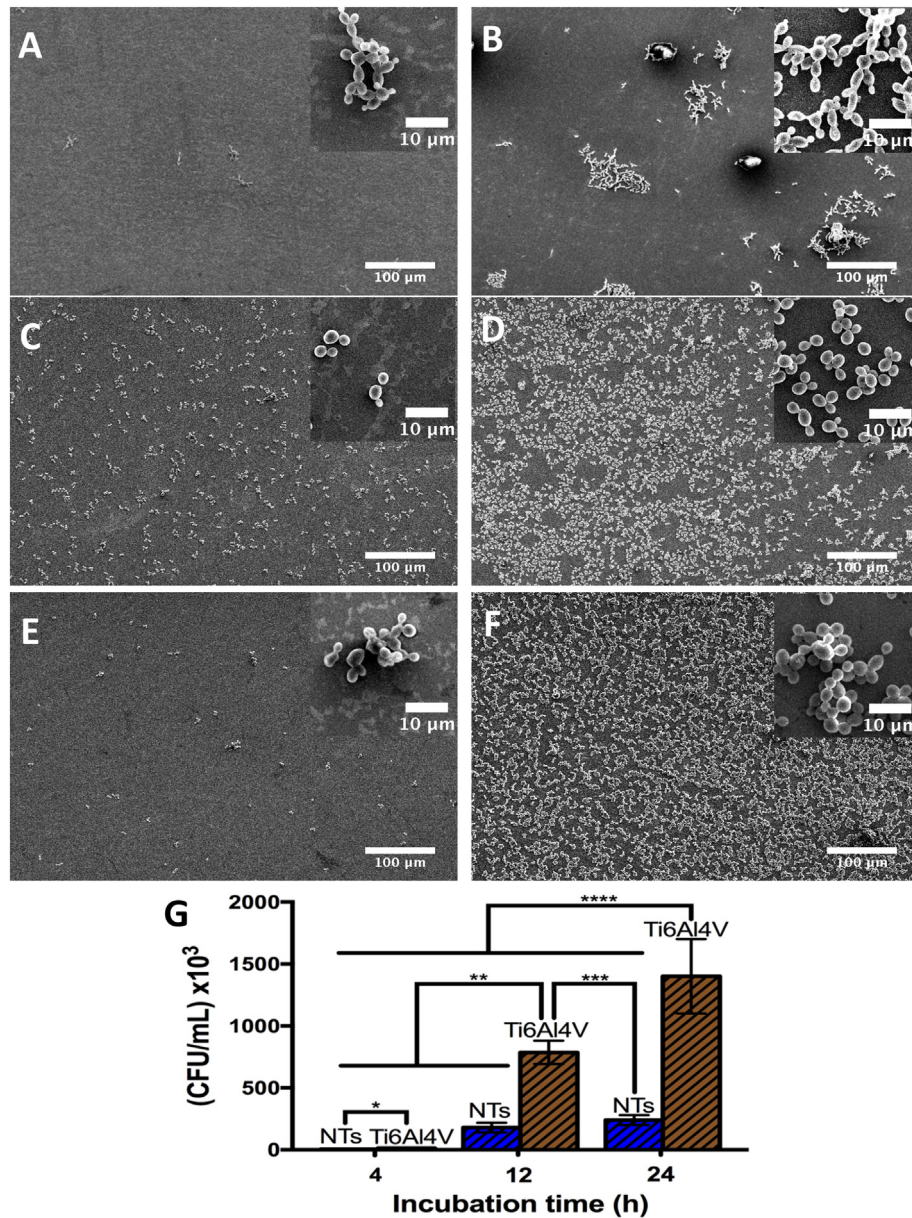


Fig. 2. *Candida albicans* behavior on the experimental surfaces. A) Disinfected NTs after 4 h of incubation, B) non-modified Ti6Al4V after 4 h, C) NTs after 12 h of culture, D) Ti6Al4V at 12 h of cultivation, E) NTs finishing 24 h of colonization, F) Ti6Al4V at 24 h of growth and G) fungal viability on the experimental surfaces as a function of time. * indicates significant differences between NTs and Ti6Al4V at 4 h. ** represents improved changes among Ti6Al4V at 12 h versus Ti6Al4V at 4 h and NTs at 4 and 12 h of incubation. *** shows meaningful variations within Ti6Al4V at 12 h and NTs after 24 h. **** points out symbolic differences among Ti6Al4V at 24 h and all the surfaces. Insets represent a high magnification view of the samples.

previous study regarding the modification of Ti to nitride coated Ti surfaces (TiN_x), it was suggested by the authors that the crystallographic phases as well as the surface roughness can modulate the formation of hyphae, suggesting that plasma nitride coatings increases surface roughness and wettability with significantly reduced colonization of *C. albicans* [7]. Moreover, Eraković et al. advocated diminished *C. albicans* adhesion after 24 h on rougher TiO_2 NTs coated with hydroxyapatite doped with silver (HA:Ag) [33]. Besides, several studies also suggested that the incorporation of TiO_2 :Ag doped layers and activated TiO_2 by UV irradiation in polymeric coatings could promote antibacterial activity, but with outcomes suggesting cytotoxic effects [34–36]. This information agrees with our results due to the reduced colonization rate by the appliances of surface modifications. Nonetheless, the present work is the first in to involve the behavior of rougher and wetter NTs (see Fig. 1G and H) without using a cytotoxic coating (which may suggests clinical security) for the reduction of clinical yeasts.

In order to explain a part of the complex mechanism involved in the behavior of the fungal adhesion, we evaluated the fungal-material interface bonding at the nanoscale by FIB (Fig. 3). In the initial adhesion phase we detected an increased assessment of contact between the fungi and the control material plus an augmented cellular spread among the surface (Fig. 3B). Meanwhile, on the NTs we only observed a lower contact interaction with a poor coverage suggesting difficulty to bond with the nanomaterial surface (Fig. 3A). This trend may in part rationalize the fact of a cellular morphology not altered, supporting that the anti-fungal mechanism involves the reduction of adhesion instead of cell killing (as hypothesized), and as has been suggested in other studies of bacterial behavior (but not of fungal activity) [37–39]. At the late adhesion stage, we witnessed superior fungal contact with more interactions between fungal cells on the non-modified material, suggesting that the promoted colonization among the alloy also involves the bonding between cell-cell which may concludes with preliminary biofilm formation (Fig. 3D). This approach in part explains the

striking and significantly increased colonization and viability observed on the alloy surface at 12 and 24 h (Fig. 2G). On the contrary, lower cell contact bonds continue to be appreciated on the NTs at the late stage (Fig. 3C), information that is supported by the reduced viability and colonization rate previously discussed (Fig. 2). This interesting tendency could be explained by the increased surface roughness (Fig. 1H) and area generated by the nanostructured alloy. Since nano-rougher surfaces may present increased spatial distance between surface peaks (fungi/valley contact), this trend may generate a higher energy interaction [8,40], resulting in a more difficult way to deposit the cellular wall over the nanostructured surface, notwithstanding the increased wettability presented on NTs with SOW. Furthermore, supporting the previous mechanism is that the formation of the nanostructured coating over the material may negatively interact with the yeast wall. As the yeast's cell wall thickness are >100 nm and their ligand linkers are mainly composed of big chain polymers [32], these parameter could interfere with the connection between the NTs and the fungal wall surface reducing cellular contact bonding; therefore, affecting mycotic colonization. Information that may be in concordance to the superior cellular spread with augmented biofilm formation at 12 and 24 h on the alloy (see Figs. 2 and 3). Luducke et al. suggested that reducing the contact area by increasing the surface roughness in the nanoscale could potentially reduce the adhesion of *Escherichia coli* and *S. aureus* (bacterial models) on Ti thin films [8]. The authors acclaimed this effect due to a superior number of contact points generated by the reduced nano-roughness, which in turn allows a major contact area for deposition of EPS matrix and bacteria adhesion [8]. Moreover, Lorenzetti et al. addressed similar outcomes of decreased *E. coli* adhesion on wetter UV-conditioned hydrothermal treated TiO_2 anatase nanostructures with added nanoroughness compared to a non-treated Ti control [41]. Also, speculating that reduced surface area impeded the active adhesion of bacteria; but without reporting the bonding behavior by FIB cross-sectioning. However, these models do not take into deliberation the

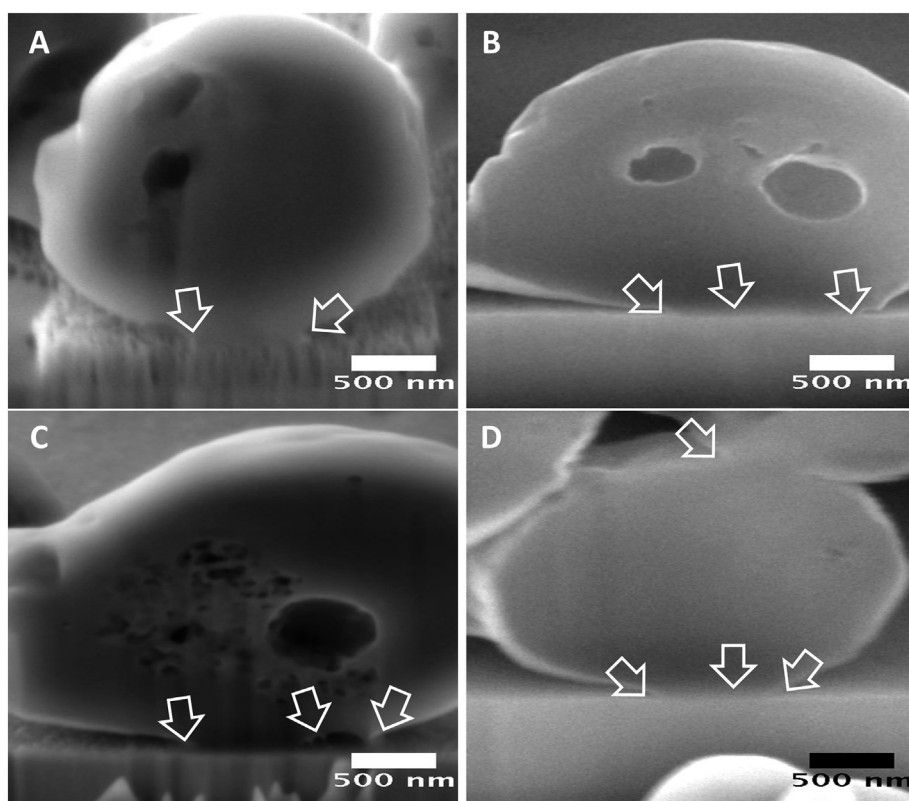


Fig. 3. Nanoscale contact points of the fungal-material interface after 4 h and 12 h of cultivation by cross-section view with FIB. A) *C. albicans* adhesion on NTs at 4 h, showing petite bonds. B) Fungal adhesion on Ti6Al4V at 4 h, with a prolonged contact to the surface. C) Late fungal adhesion at 12 h on NTs, illustrating poorer connections and D) *C. albicans* contact at 12 h, demonstrating cell-cell assembly. Close contact bonds between the cells and the surfaces are highlighted with arrows.

nanostructured morphology of the coating, which is known to play an important role in the biological behavior [42–44]. Furthermore, Svensson et al. cultured *Staphylococcus epidermidis* (a Gram + bacteria) on smooth gold layers and gold rougher surface of gold nanoparticles (AuNPs), describing lower bacteria adhesion on the AuNPs, also acclaiming that the increased nano-roughness with reduced contact area may affect the adhesion performance [45]. On the basis of the previously discussed our model could be in line with those in terms of reduced fungal adhesion on a nano-rougher and wetter surface. Nonetheless, in the present study we take in contemplation that; (1) *C. albicans* does not produce a similar cell wall and does not follow a similar biology as bacteria; (2) surface morphology may contributed to inferior adhesion, as remarkable cell-cell connection seems to be favored instead of cell-surface bonds; (3) the roughness and wettability may not play a pivotal role in encouraging fungal adhesion, as decreased and bony contact points are observed for *C. albicans* on NTs versus those described for *S. aureus*, *S. epidermidis* and *E. coli* [8,45]. Finally, (4) a disinfected surface may remove the presence of a wide variety of contaminants that might sustain contact between the organic compounds of cell wall and the surface artifacts [12,24]. Information which suggests that also fungal cells may be susceptible to nanoscale surface roughness (such as bacteria), and the use of SOW and NTs as an effective surface treatment for improved anti-fungal activity (as proposed here for the first time). However, more analytical studies involving different NTs diameters, roughness and crystallization phases are recommended in order to completely elucidate those mechanisms.

A key prerequisite for the success of DI is the optimum adhesion of vital HAOb (a model of jaw-bone) on the material surface [46]. Hence, we evaluated the osteoblastic behavior on the experimental surfaces at 24 h. Indeed, the NTs surface strongly promoted the cellular vitality (Fig. 4A) potentiating the formation of well-established and dense filopodia with interconnections between cell-cell among the nanostructured surface (Fig. 4C). Furthermore, filopodia formation has been associated to superior cellular migration, increased alkaline phosphatase activity and secretion of Ca and P along ECM (outcomes of bone formation) [47,48], which in turn suggests that SOW does not alter the human oral bone-forming functionality of NTs. Importantly, filopodia have been also considered as cellular sensing probe on microscale and even

nanoscale surface topographies; with an optimized activity on wetter and nanorougher surfaces, especially on 60–100 nm diameter NTs [48]. On the contrary, the alloy did not support an appropriate cellular formation showing an aberrant circular morphology, poorer cell adhesion, non-cell interconnections and translucent filopodias (see blue arrow in Fig. 4B and D), advocating that the alloy may promote HAOb detachment. This information proposes that the treatment of a DI with NTs disinfected by SOW, may improve the clinical efficiency in terms of reduced bacterial [12] and fungal colonization (part of peri-implantitis) by suppressed nano-adhesion bonds at the fungal-surface interface without disrupting the initial behavior of oral osteoblasts (a model different of the femur bone).

This is the first study suggesting SOW as a disinfection protocol with promising oral anti-mycotic and alveolar osteoactive results on nanostructured Ti6Al4V surfaces. Additionally, we recommend the characterization of more NTs diameters, different nanostructured morphologies and diverse sterilization procedures accompanied with more analytical and molecular techniques in order to elucidated part of the above-mentioned mechanisms.

4. Conclusions

The present study suggests the use of Ti6Al4V alloy synergistically modified with anodized and disinfected NTs by means of SOW to generate an antifungal and osteoactive nanocoating. Even more, the management of this strategy proposes the reduction of viable *C. albicans*; which could be addressed by the disruption of nano-adhesion points at the fungal-material interface, despite the increased roughness and wettability provided by the disinfected NTs. Furthermore, in agreement to our previous work this methodology will also provide antibacterial efficiency that could perform the implant surface against peri-implantitis related-infections without interfering with the important initial alveolar osteoblast performance (outcomes of jaw-bone formation). This is the first time that the behavior of yeasts on NTs is characterized by means of time-dependent points and using FIB's technology as a potent tool to understand the mycotic adhesion behavior. Our results open up a road for the study of fungal-adhesion process (different from bacterial activity) at the nanoscale for orthopedic and/or oral applications.

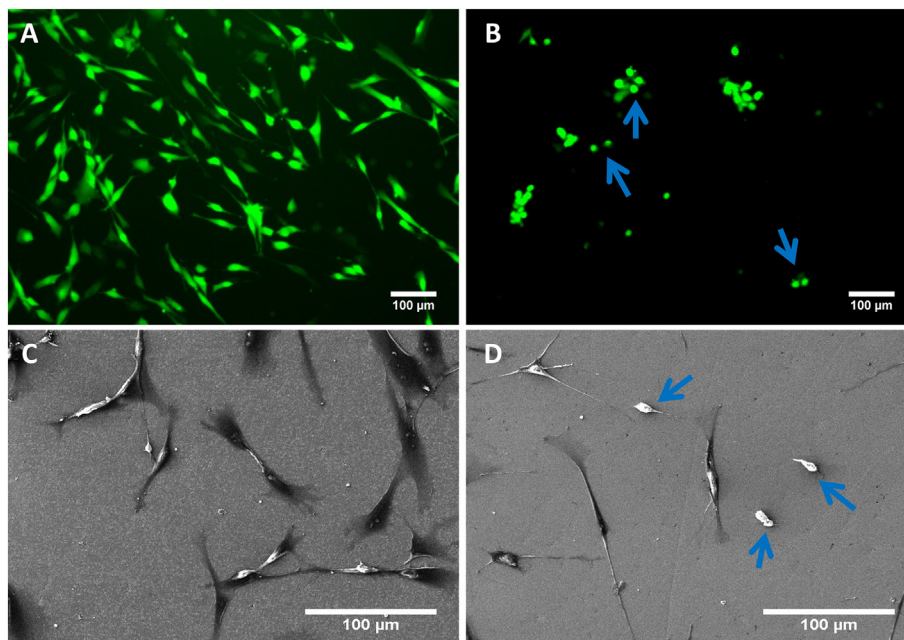


Fig. 4. Viability and morphological analysis of HAOb after 24 h of incubation. A) Vital HAOb on NTs, B) HAOb on Ti6Al4V, C) HAOb morphology on NTs showing prolonged cell-cell networks and D) HAOb morphology on Ti6Al4V. Blue arrows represent the aberrant HAOb morphology on the control alloy. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Acknowledgments

This work was supported by PRODEP (Grant UABC-PTC-469), and Autonomous University of Baja California (Grant 2058). The authors wish to thank to M.Sc. Oscar Perez, D.D.S. Gabriel Garcia, and Q.F.B. Santiago Franco for their technical support.

References

- [1] S. Rençber, S.Y. Karavana, F.F. Yılmaz, B. Erač, M. Nenni, S. Özbal, Ç. Pekçetin, H. Gurer-Orhan, M. Hoşgör-Limoncu, P. Güneri, G. Ertan, *Int. J. Nanomedicine* 11 (2016) 2641–2653.
- [2] J.C. Sardi, L. Scorzoni, T. Bernardi, A.M. Fusco-Almeida, M.J. Mendes Giannini, *J. Med. Microbiol.* 62 (2013) 10–24.
- [3] J.W. Millsop, N. Fazel, *Clin. Dermatol.* 34 (2016) 487–494.
- [4] J.C. Carmello, F. Alves, G.B.F.C.A. de Souza Costa, V.S. Bagnato, E.G. Mima, A.C. Pavarina, *PLoS One* 11 (2016), e0156947.
- [5] G.E. Salvi, M.M. Furst, N.P. Lang, G.R. Persson, *Clin. Oral Implants Res.* 19 (2008) 242–248.
- [6] M.M. Harriott, M.C. Noverr, *Trends Microbiol.* 19 (2011) 557–563.
- [7] J. Wang, Y. An, H. Liang, Y. Tong, T. Guo, C. Ma, *Arch. Oral Biol.* 58 (2013) 1293–1301.
- [8] C. Lüdecke, M. Roth, W. Yu, U. Horn, J. Bossert, K.D. Jandt, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 145 (2016) 617–625.
- [9] K. Anselme, P. Davidson, A.M. Popa, M. Giazzon, M. Liley, L. Ploux, *Acta Biomater.* 6 (2010) 3824–3846.
- [10] J.M. Davis, J. Maki, J.K. Bahcall, *J. Endod.* 33 (2007) 567–569.
- [11] J. Medina-Tamayo, E. Sanchez-Miranda, H. Balleza-Tapia, X. Ambriz, M.E. Cid, D. Gonzalez-Espinosa, A.A. Gutierrez, C. Gonzalez-Espinosa, *Int. Immunopharmacol.* 7 (2007) 1013–1024.
- [12] E. Beltrán-Partida, B. Valdez-Salas, A. Escamilla, M. Curiel, E. Valdez-Salas, N. Nedev, J.M. Bastidas, *Mater. Sci. Eng. C* 60 (2016) 239–245.
- [13] Z. Guo, C. Chen, Q. Gao, Y. Li, L. Zhang, *Mater. Lett.* 137 (2014) 464–467.
- [14] M. Grandcolas, J. Ye, N. Hanagata, *Mater. Lett.* 65 (2011) 236–239.
- [15] A. Roguska, A. Belcarz, M. Pisarek, G. Ginalska, M. Lewandowska, *Mater. Sci. Eng. C* 51 (2015) 158–166.
- [16] R. Olivares-Navarrete, S.E. Rodil, S.L. Hyzy, G.R. Dunn, A. Almaguer-Flores, Z. Schwartz, B.D. Boyan, *Biomaterials* 51 (2015) 69–79.
- [17] R. Hang, X. Huang, L. Tian, Z. He, B. Tang, *Electrochim. Acta* 70 (2012) 382–393.
- [18] E. Beltrán-Partida, B. Valdez-Salas, A. Moreno-Ulloa, A. Escamilla, M.A. Curiel, R. Rosales-Ibanez, F. Villarreal, D.M. Bastidas, J.M. Bastidas, *J. Nanobiotechnol.* 15 (2017) 10.
- [19] M.A. Pfaller, A. Houston, S. Coffmann, *J. Clin. Microbiol.* 34 (1996) 58–61.
- [20] D. Beighton, R. Ludford, D.T. Clark, S.R. Brailsford, C.L. Pankhurst, G.F. Tinsley, J. Fiske, D. Lewis, B. Daly, N. Khalifa, et al., *J. Clin. Microbiol.* 33 (1995) 3025–3027.
- [21] E. Beltrán-Partida, B. Valdez-Salas, A. Escamilla, A. Moreno-Ulloa, L. Burtseva, E. Valdez-Salas, M. Curiel Alvarez, N. Nedev, *J. Nanomater.* 2015 (2015) 9.
- [22] D. Marolt, M. Rode, N. Kregar-Velikonja, M. Jeras, M. Knezevic, *PLoS One* 9 (2014), e92969.
- [23] R. Hang, Y. Liu, S. Liu, L. Bai, A. Gao, X. Zhang, X. Huang, B. Tang, P.K. Chu, *Corros. Sci.* 103 (2016) 173–180.
- [24] M. Saita, T. Ikeda, M. Yamada, K. Kimoto, M.C.-I. Lee, T. Ogawa, *Int. J. Nanomedicine* 11 (2016) 223–234.
- [25] N. Tsukimura, M. Yamada, F. Iwasa, H. Minamikawa, W. Att, T. Ueno, L. Saruwatari, H. Aita, W.-A. Chiou, T. Ogawa, *Biomaterials* 32 (2011) 4358–4368.
- [26] E.D. de Avila, B.P. Lima, T. Sekiya, Y. Torii, T. Ogawa, W. Shi, R. Lux, *Biomaterials* 67 (2015) 84–92.
- [27] F. Poncin-Epaillard, J.M. Herry, P. Marmey, G. Legeay, D. Debarnot, M.N. Bellon-Fontaine, *Mater. Sci. Eng. C* 33 (2013) 1152–1161.
- [28] L. Mei, H.J. Busscher, H.C. van der Mei, Y. Ren, *Dent. Mater.* 27 (2011) 770–778.
- [29] A. Almaguer-Flores, R. Olivares-Navarrete, M. Wieland, L.A. Ximénez-Fyvie, Z. Schwartz, B.D. Boyan, *Clin. Oral Implants Res.* 23 (2012) 301–307.
- [30] T. Chien, T.-L. Tseng, J.-Y. Wang, Y.-T. Shen, T.-H. Lin, J.-C. Shieh, *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 779 (2015) 78–85.
- [31] A. Gil-Bona, C.M. Parra-Giraldo, M.L. Hernández, J.A. Reales-Calderon, N.V. Solis, S.G. Filler, L. Monteoliva, C. Gil, J. Proteome 127 (Part B) (2015) 340–351.
- [32] B.R. Coad, S.E. Kidd, D.H. Ellis, H.J. Griesser, *Biotechnol. Adv.* 32 (2014) 296–307.
- [33] S. Eraković, A. Janković, C. Ristoscu, L. Duta, N. Serban, A. Visan, I.N. Mihăilescu, G.E. Stan, M. Socol, O. Iordache, I. Dumitrescu, C.R. Luculescu, D. Janačković, V. Mišković-Stanković, *Appl. Surf. Sci.* 293 (2014) 37–45.
- [34] F.-C. Yang, K.-H. Wu, J.-W. Huang, D.-N. Horng, C.-F. Liang, M.-K. Hu, *Mater. Sci. Eng. C* 32 (2012) 1062–1067.
- [35] C. Fonseca, A. Ochoa, M.T. Ulloa, E. Alvarez, D. Canales, P.A. Zapata, *Mater. Sci. Eng. C* 57 (2015) 314–320.
- [36] N. Abbas, G.N. Shao, M.S. Haider, S.M. Imran, S.S. Park, S.-J. Jeon, H.T. Kim, *Mater. Sci. Eng. C* 68 (2016) 780–788.
- [37] I. Izquierdo-Barba, J.M. García-Martín, R. Álvarez, A. Palmero, J. Esteban, C. Pérez-Jorge, D. Arcos, M. Vallet-Regí, *Acta Biomater.* 15 (2015) 20–28.
- [38] F. Reffuveille, M. Nicol, E. Dé, P. Thébault, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 146 (2016) 895–901.
- [39] S.M. Diza, F. Lotfipour, M. Barzegar-Jalali, M.H. Zarrintan, K. Adibkia, *Mater. Sci. Eng. C* 44 (2014) 278–284.
- [40] D. Siegismund, A. Undisz, S. Germerodt, S. Schuster, M. Rettenmayr, *Acta Biomater.* 10 (2014) 267–275.
- [41] M. Lorenzetti, I. Dogša, T. Stošćicki, D. Stopar, M. Kalin, S. Kobe, S. Novak, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7 (2015) 1644–1651.
- [42] B. Ercan, E. Taylor, E. Alpaslan, T.J. Webster, *Nanotechnology* 22 (2011) 295102.
- [43] C. Pérez-Jorge, A. Conde, M.A. Arenas, R. Pérez-Tanoira, E. Matykina, J.J. de Damborenea, E. Gómez-Barrena, J. Esteban, *J. Biomed. Mater. Res. A* 100A (2012) 1696–1705.
- [44] F. Hizal, C.-H. Choi, H.J. Busscher, H.C. van der Mei, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8 (2016) 30430–30439.
- [45] S. Svensson, M. Forsberg, M. Hulander, F. Vazirisani, A. Palmquist, J. Lausmaa, P. Thomsen, M. Trobos, *Int. J. Nanomedicine* 9 (2014) 775–794.
- [46] M.R. Kaluderović, J.P. Schreckenbach, H.-L. Graf, *Mater. Sci. Eng. C* 69 (2016) 1429–1441.
- [47] S. Oh, C. Daraio, L.-H. Chen, T.R. Pisanic, R.R. Fiñones, S. Jin, *J. Biomed. Mater. Res. A* 78A (2006) 97–103.
- [48] K.S. Brammer, S. Oh, C.J. Cobb, L.M. Bjursten, H.V.d. Heyde, S. Jin, *Acta Biomater.* 5 (2009) 3215–3223.

Article

In Vitro Assessment of Early Bacterial Activity on Micro/Nanostructured Ti6Al4V Surfaces

Benjamin Valdez-Salas ^{1,*},†, Ernesto Beltrán-Partida ^{1,2,†}, Sandra Castillo-Urbe ¹, Mario Curiel-Álvarez ¹, Roumen Zlatev ¹, Margarita Stoytcheva ¹, Gisela Montero-Alpírez ¹ and Lidia Vargas-Osuna ³

¹ Instituto de Ingeniería, Departamento de Corrosión y Materiales, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd. Benito Juárez y Calle de la Normal s/n, Mexicali C.P., 21040 Baja California, Mexico; beltrane@uabc.edu.mx (E.B.-P.); sandra.castillo@uabc.edu.mx (S.C.-U.); mcuriel@uabc.edu.mx (M.C.-Á.); roumen@uabc.edu.mx (R.Z.); margarita.stoytcheva@uabc.edu.mx (M.S.); gmontero@uabc.edu.mx (G.M.-A.)

² Facultad de Odontología Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California, Av. Zotoluca y Chinampas, s/n, Mexicali C.P., 21280 Baja California, Mexico

³ Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd. Benito Juárez y Calle de la Normal s/n, Mexicali C.P., 21040 Baja California, Mexico; lidia.vargas@uabc.edu.mx

* Correspondence: benval@uabc.edu.mx; Tel.: +52-686-566-4150

† These authors contributed equally and are considered as co-first authors.

Academic Editors: Krasimir Vasilev, Alex Cavallaro and Peter Zilm

Received: 29 March 2017; Accepted: 16 May 2017; Published: 18 May 2017

Abstract: It is imperative to understand and systematically compare the initial interactions between bacteria genre and surface properties. Thus, we fabricated a flat, anodized with 80 nm TiO₂ nanotubes (NTs), and a rough Ti6Al4V surface. The materials were characterized using field-emission scanning electron microscopy (FE-SEM), energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) and atomic force microscopy (AFM). We cultured in vitro *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) to evaluate the bacterial-surface behavior by FE-SEM and viability calculation. In addition, the initial effects of human osteoblasts were tested on the materials. Gram-negative bacteria showed promoted adherence and viability over the flat and rough surface, while NTs displayed opposite activity with altered morphology. Gram-positive bacteria illustrated similar cellular architecture over the surfaces but with promoted surface adhesion bonds on the flat alloy. Rough surfaces supported *S. epidermidis* viability, whilst NTs exhibited lower vitality. NTs advocated promoted better osteoblast organization with enhanced vitality. Gram-positive bacteria suggested preferred adhesion capability over flat and carbon-rich surfaces. Gram-negative bacteria were strongly disturbed by NTs but largely stimulated by flat and rough materials. Our work proposed that the chemical profile of the material surface and the bacterial cell wall characteristics might play an important role in the bacteria-surface interactions.

Keywords: bacterial adhesion; nanostructure; titanium implant; Gram-positive; Gram-negative; biomaterial infections; TiO₂ nanotubes

1. Introduction

Titanium (Ti) and Ti-based alloys (such as Ti6Al4V) are amongst the most used metallic materials for different bone replacements [1,2]. As Ti present important attributes such as low toxicity, corrosion resistance (in physiological environments), proper mechanical properties and, more importantly, excellent biocompatibility (mainly when implanted in healthy patients), Ti is considered the most important option for orthopedic implantable devices [3].

Despite the fact that orthopedic surgical procedures are executed under strict sterilization techniques, implant-associated infections (i.e., peri-prosthetic infections) are still present and are

considered one of the main challenges in orthopedic surgery [4–6]. A rising approach for the molecular control of bacteria adhesion and consequent biofilm formation (which is considered the main bacterial organization associated with implant infections) is the synthesis of nanostructured materials with defined morphology and homogenous topographies [7–9]. For example, Puckett et al. [7] suggested that nanostructured and nanorougher Ti surfaces can control the adhesion of important orthopedic related bacteria such as *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *S. epidermidis*, and *P. aeruginosa* (Gram-negative bacteria) by reducing the retention number of live bacteria and increasing the level of retained dead cells after 1 h of incubation. Moreover, Pérez-Jorge et al. [8] advocated decreased *S. aureus* and *S. epidermidis* (Gram-positive bacteria) colonization over nanoporous and nanotubular Ti6Al4V surfaces after comparing them to those of flat topographies, illustrating a similar behavior between the two bacterial models. However, these important works did not solidly analyze the impact of the morphological properties of bacteria; they did not highlight the bacteria genre properties at the surface-bacterial interactions and did not compare the modulatory effects of nanostructured surfaces versus those of a micro-rough surface. Thus, we hypothesized that the surface physicochemical features of a flat, rough, and nanostructured Ti6Al4V alloy and the bacterial genre (Gram-positive or negative) will promote different microbiological behaviors on a Ti6Al4V surface, suggesting that part of the bacterial adhesion capability will be modulated by the bacteria's ability to produce adhesion-bonds at the nanoscale-bacterial interface with varied bacterial morphologies.

The present study evaluates and compares for the first time the bacterial-surface interaction at the micro- and nanoscale levels, as well as the adhesion and viability of *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* (crucial models of orthopedic related biomaterial infections) onto a nanotubular (defined as NTs), microstructured (labeled as rough), and a smooth (indicated as Flat) Ti6Al4V alloy. The main objective was to describe the part of the mechanism involved in the initial bacterial behavior, the effect of Gram-positive and Gram-negative bacteria, and the protagonist role of the morphological/topographical properties of the material surface for bone implant applications. Moreover, the early trend of human osteoblast fashioning was interrogated as an endeavor to provide an important profile analysis of these medical imperative materials.

2. Results and Discussion

2.1. Ti6Al4V Surface Physicochemical Properties

Field Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM) clearly revealed the presence of a flat and smooth surface with slightly irregular surface properties (Figure 1a,d). Moreover, the anodized material illustrated the formation of well-defined 80 nm NTs on the surface, as represented in Figure 1b,e, following similar results as previously reported [10]. On the other hand, the rough alloy surface evidently showed an irregular surface with outcomes of surface imperfections (Figure 1c,f). Importantly, part of our experimental materials (Flat and Rough) are partially similar to those of some commercially available surgical Ti implants [11]. For example, the Brånemark[®] Implant System (Manufactured by NobelBiocare AB S-402 26 Göteborg, Sweden) is fabricated by a machined technique, which generates clearly visible, well-defined, unidirectional structures, following a similar morphology to that observed with our flat material. Moreover, our rough surface is in concordance with the 3i ICE Implant System (3i Implant Innovation Inc., Palm Beach Gardens, FL, USA), which showed similar surface imperfections on a rough polished surface, information that suggests that the biological behavior of our tested materials could be in line to those of commercial implantable systems.

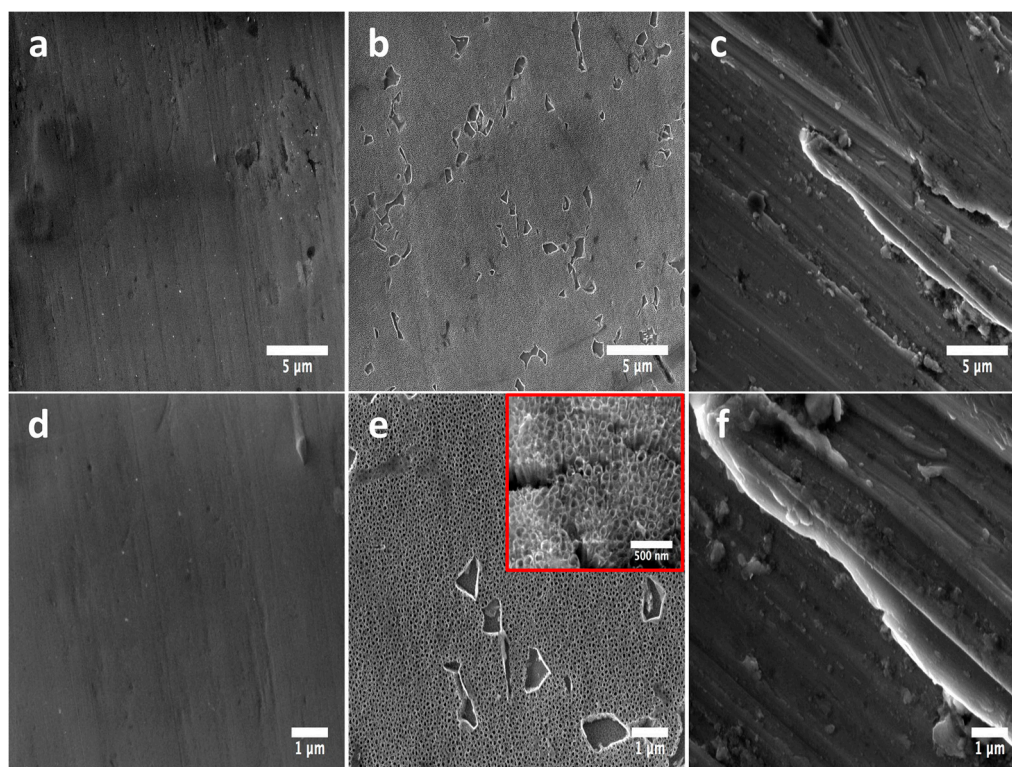


Figure 1. FE-SEM micrographs illustrating the surface morphology of the experimental materials: (a) Flat-Ti6Al4V surface showing a flat and smooth surface; (b) anodized 80 nm nanotubes (NTs) highlighting the homogenous formation of a nanostructured layer; (c) Rough-Ti6Al4V surface presenting irregular grooves among the material; (d) high zoom of the flat surface demonstrating the non-presence of a nanostructured surface; (e) high amplification of the NTs confirming the nanotubular homogeneity (inset represents a superior magnification, which described the nanotubular morphology); (f) high magnification of the rougher surface.

Surface chemistry plays an important role in the control of the biological properties of biomaterials [12]. Thus attention was paid to the surface elemental composition, and the results presented in Table 1. Interestingly, the flat and rough surfaces present significant differences in the oxygen content (not detectable on Flat and 5.98% on Rough) compared to the NTs (23.46%). This important difference could be related to the anodization process [10]. It is well known that anodization using fluoride electrolytes is able to strongly oxidize the surface of Ti-based materials, resulting in promoted levels of oxygen due to a thicker oxide layer formed over the surface. Moreover, our controlled anodization arrangement allowed the homogenous oxidation of the material surface with nanotubular morphology, information that it is in line with previous reports that also used fluoride [7,8]. On the other hand, the wettability parameter for the flat material is $70.02^\circ \pm 2.96^\circ$ [13], for the NTs is $31.56^\circ \pm 2.62^\circ$ [13], and for the rough surface is considered to be approximately $60.4^\circ \pm 5.8^\circ$ [14]. The information suggests that the more hydrophilic material is the NTs, followed by the rough, and finally by the flat surface; however, with significant differences among them.

Table 1. Chemical composition of the materials surfaces by energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX).

Sample	C	V	Al	Ti	O	F
Flat	3.22	4.12	5.60	87.06	-	-
NTs	1.33	-	4.12	68.38	23.46	2.71
Rough	3.99	3.89	6.70	79.44	5.98	-

The analytical surface roughness properties generated by the Atomic Force Microscopy (AFM) analysis strongly supports the information acquired by the FE-SEM examinations. As presented in Figure 2, the rough material showed an exuberant rougher surface after comparing it to the NTs and the flat surface. Moreover, the NTs also presented superior roughness to the flat polished material; information that is in line with the FE-SEM results and with previous works of anodized versus flat Ti surfaces [10,15].

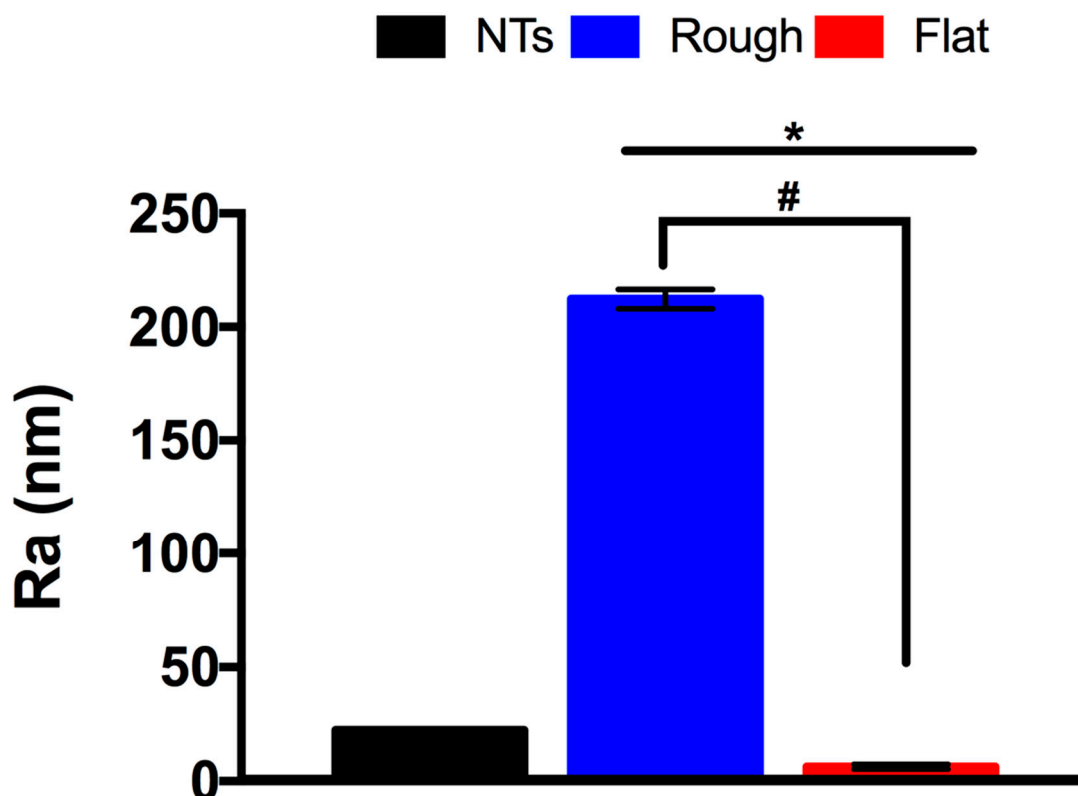


Figure 2. Analytical surface roughness comparison of the experimental substrates. * indicates significant differences between NTs and all the materials. # shows imperative changes among the rough and flat specimens.

2.2. Bacterial Activity of the Materials

S. epidermidis is an important Gram-positive bacteria that plays a vital role in orthopedic implant-related infections [6]. Therefore, taking into consideration this important issue, we evaluated its adhesion process at 2 and 6 h (Figure 3). At 2 h, a promoted adhesion rate can be observed over the flat surface, compared to the NTs and even with the rough material. This is surprising information, which suggests that a flat Ti6Al4V surface can stimulate faster *S. epidermidis* adhesion. After 6 h of incubation, we detected an increased amount of bacteria over all the work surfaces; however, of notable importance was a superior adhesion frequency over the flat material (with outcomes of biofilm formation) compared to the nanostructured and the rough material. On the other hand, a similar tendency was detected over the NTs and the rough-Ti6Al4V, information that is controversial to other reported studies [16], but its important to remain that flat polished surfaces are not a necessary option for avoiding bacterial adhesion.

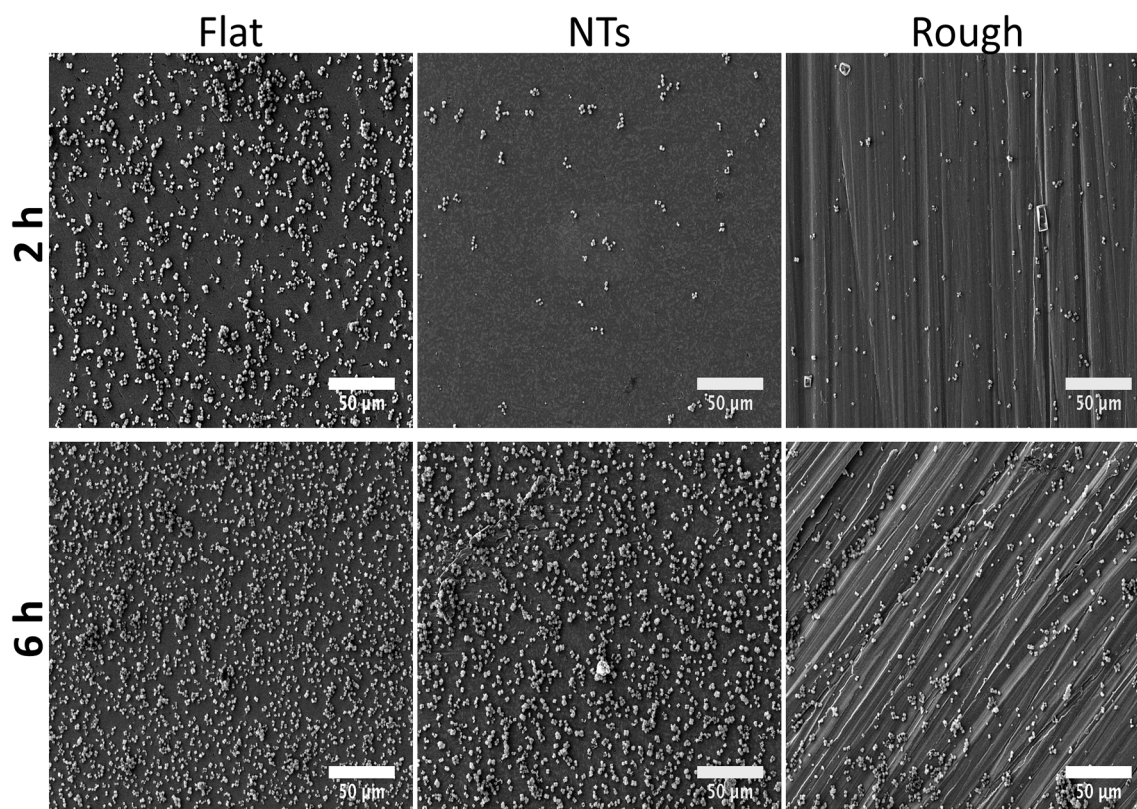


Figure 3. Initial and late colonization behavior of *S. epidermidis* over the experimental specimens as a function of time. A superior number of *S. epidermidis* can be highlighted over the flat surface at all incubation times.

Bacterial morphology is of crucial importance for the characterization and interpretation of the possible involved mechanisms in cellular adhesion. Thus, in order to evaluate this important characteristic we applied a higher magnification to the adherent cells (Figure 4). The flat material presents similar bacterial morphology at both incubation times. Similarly, the rougher surfaces (NTs and Rough) showed parallel outcomes of cellular organization with a grape-like cluster arrangement. Moreover, the flat surface illustrated greater cell-cell adherence, suggesting initial biofilm formation; meanwhile, the NTs slightly advocate this organization. Additionally, significantly decreased staphylococci viability was detected over the NTs compared to the flat and rough materials at all incubation times (Figure 5). The NTs material probably illustrated decreased *S. epidermidis* adhesion and viability due to the low levels of fluoride (an antibacterial element) that are generated during the anodization process. As previously suggested for anodized nanostructured surfaces with higher levels of fluoride [8,17], the presence of F is capable of disrupting the adhesion process of bacteria, resulting in it being more difficult for bacteria to grow, as illustrated here. However, is important to highlight that our nanostructured material presents lower F content (2.71%) than those previously reported (4–6%) in Perez-Jorge et al. [8] and (4.76–13.59%) in Ercan et al. [17], which could suggest lower cellular toxicity. These important behaviors are in agreement with preceding works that evaluated and compared the structural capability of *S. epidermidis* over flat, nanostructured, and microstructured materials [18].

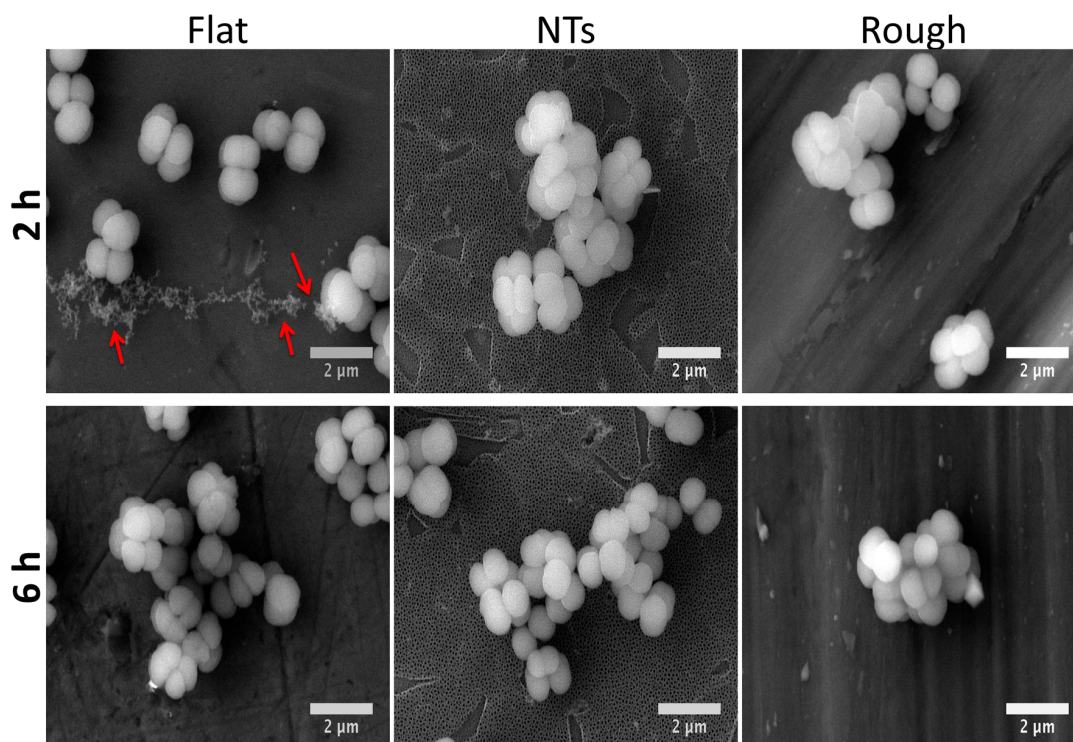


Figure 4. *S. epidermidis* organization onto the materials' surfaces at 2 and 6 h of incubation. Note that the flat surface mainly stimulates the synthesis of exopolysaccharides at 2 h of growth (red arrows).

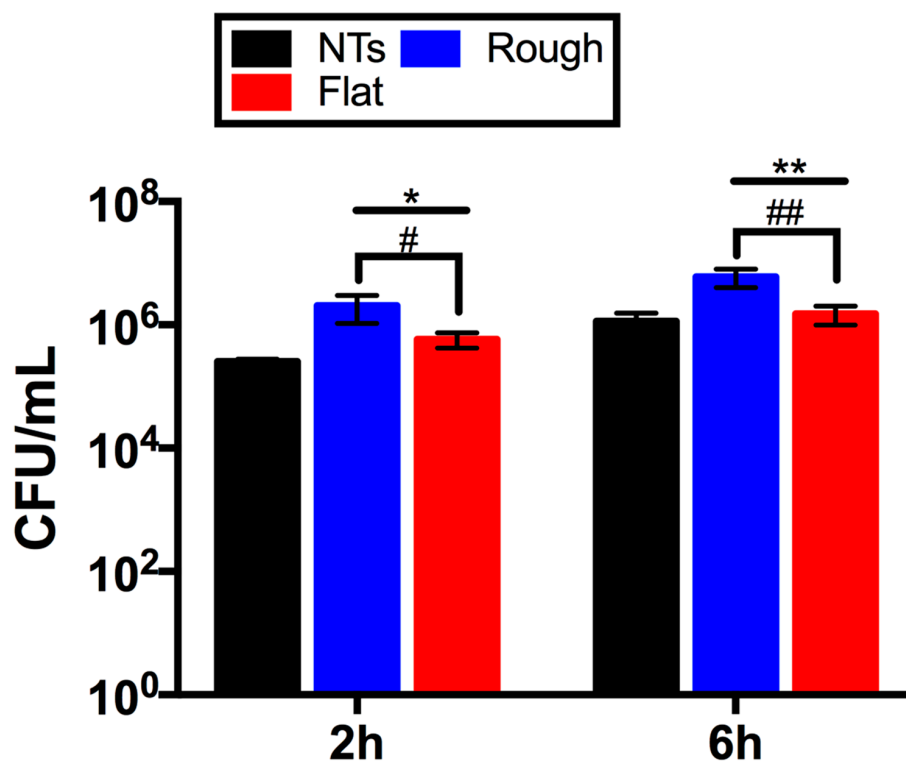


Figure 5. *S. epidermidis* viability onto the materials' surfaces at 2 and 6 h of cultivation. * denotes significant differences between rough and flat materials versus NTs at 2 h. # symbolizes major changes in the flat and rough surfaces at 2 h. ** illustrates important variations between NTs and flat and rough specimens at 6 h. ## symbolize discrepancies for rough and flat samples at 6 h.

Gram-negative bacteria (mainly *P. aeruginosa*) have been seriously involved in the microbiota related to orthopedic implant-associated infections [19]. Consequently, we evaluated the *P. aeruginosa* colonization activity in the experimental materials (Figure 6). The initial growing phase (2 h) showed important outcomes in colony organization on the rough surface and continued with an inferior tendency for the NTs and a poorer colony-forming capability on the flat material but with more consistent bacterial spreading. It is important to discuss that the promoted bacilli activity shown over the flat and rough experimental materials models evaluated here are consistent with previous works regarding the effect of surface roughness and the comparison of nanostructured morphologies versus microstructured materials [20,21]. The data suggest a greater affinity of *P. aeruginosa* with the rough and flat surface than the nanotubular one. This interesting trend could be explained in part by to the promoted carbon percentage detected on the flat and rough materials. As an elevated percentage of carbon in metallic materials was associated with an increased hydrophobicity [13,22] and *P. aeruginosa* has been suggested as a partially hydrophobic bacteria [23], it could be congruent to speculate that carbon-richer surfaces may be more related to attracting and promoting bacterial anchorage than hydrophilic surfaces. This information is consistent with the bacterial behavior and bacilli morphology (aberrant morphology mainly on NTs) (Figure 7) observed here.

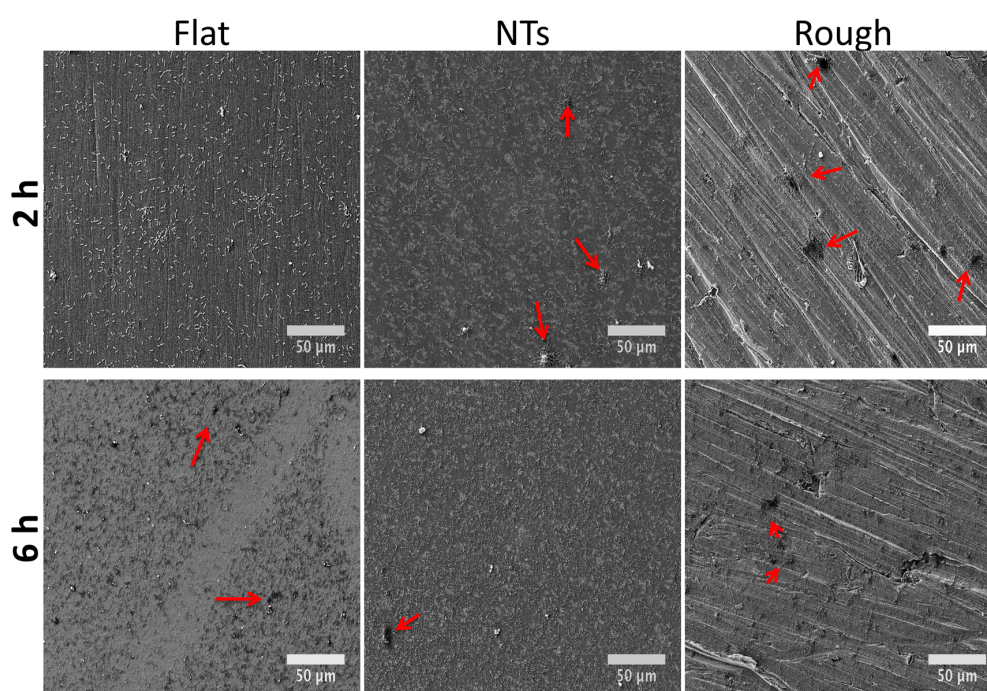


Figure 6. *P. aeruginosa* colonization over the materials at 2 and 6 h of growth. Red arrows symbolize the initial formation of bacterial colonies.

A crucial parameter required to evaluate and predict the bacterial behavior of biomaterials is the viable activity presented over the analyzed surfaces. Therefore, we characterized *P. aeruginosa* viability over the experimental surfaces (Figure 8). We detected that the NTs significantly decrease the viable number of colony forming units (CFU) after comparing them to the rough and flat materials at all incubation times. Moreover, similar behavior was detected after comparing the rough and flat surfaces (at 2 and 6 h), suggesting that the rougher material may allow more bacterial retention but with low outcomes of a robust cellular adhesion, as depicted in Figures 6 and 7. Furthermore, as mentioned above we could suggest that the electrostatic attraction stimulated by the flat surface may be bigger (more hydrophobic) than that of the rough material, resulting in promoted viable cells (possibly by cell-cell bounding) over the rough surface but with decayed cellular adhesion, as observed here. However more molecular analyses such as the inhibition of bacterial receptors involved in the adhesion

process, real time polymerase chain reaction (RT-PCR), western blot, and immunofluorescence assays are recommended in order to clarify those interesting interrogations.

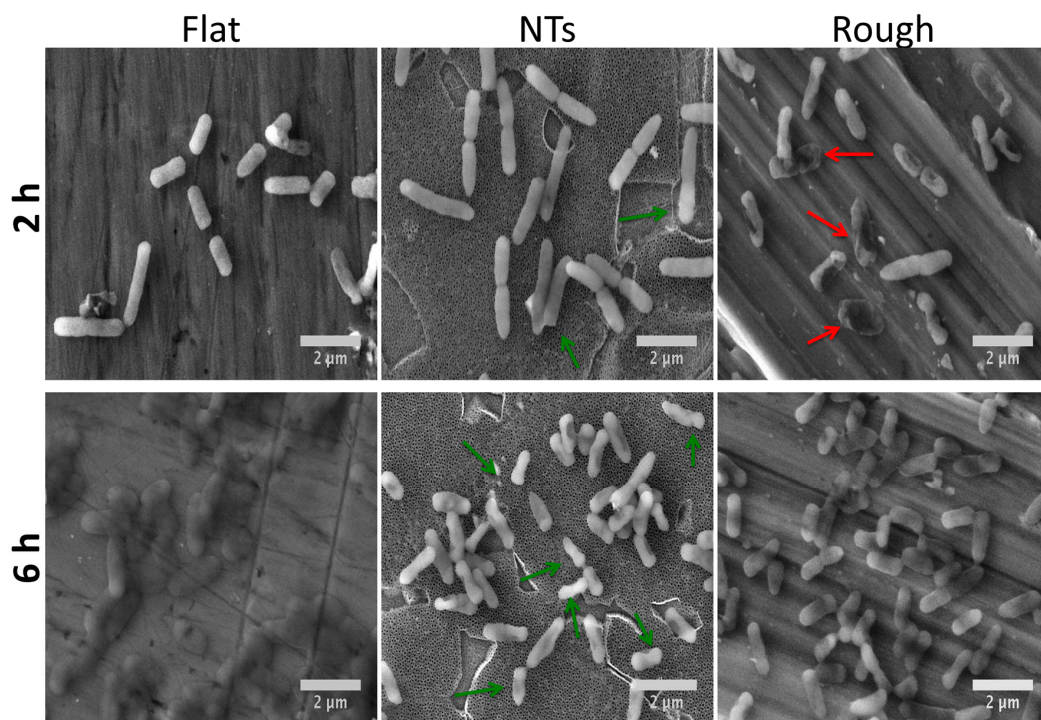


Figure 7. *P. aeruginosa* aggrupation on the materials at 2 and 6 h of growth. Red arrows symbolize aberrant bacilli morphology on the rough material. Green arrows highlight the deformed bacilli structure of the NTs.

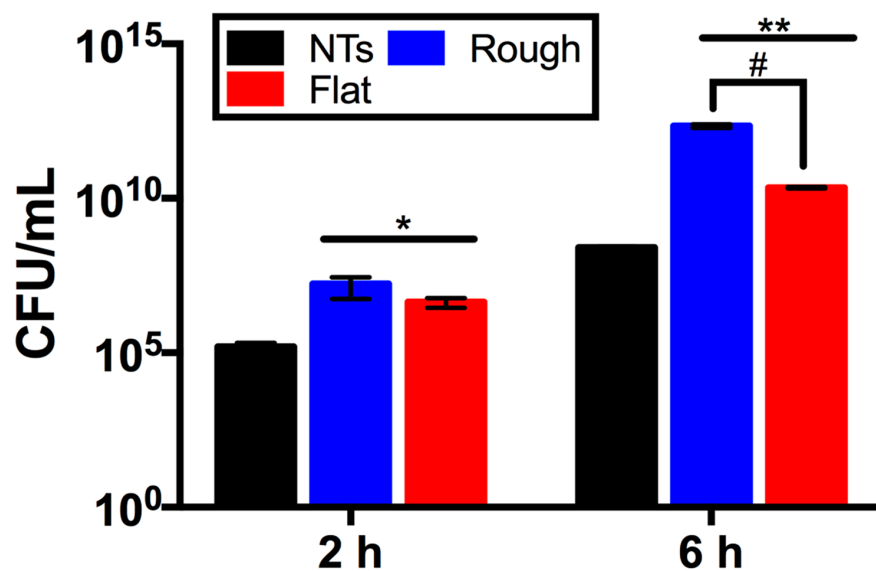


Figure 8. Analytical evaluation of *P. aeruginosa* viability over the experimental surfaces. * indicates significantly differences between NTs and the tested materials at 2 h. ** represents important differences comparing NTs and working surfaces at 6 h. # denotes critical changes between rough and flat materials at 6 h.

Interestingly, staphylococci morphology at the initial adhesion phase displayed a well-defined architecture over the experimental materials (Figure 9a–c). However, on the NTs, the formation of tiny

bonds directly contacting the external mouths of the NTs (Figure 9b) can be advocated, suggesting that the initial adhesion process could be disrupted by the chemical and/or morphological properties of the NTs [17]. Moreover, it can be appreciated that there is a greater number of cell-cell connections on NTs instead of cell-surface interactions; meanwhile the flat material strongly induced cellular anchorage to the material surface. Our elevated magnification zooms (with high definition) bring out important evidence that suggests promoted *S. epidermidis* anchorage on the flat material compared to the NTs. Since it has been speculated that the Gram-positive cell wall may be partially hydrophobic [23] and the Flat Ti6Al4V is believed to be the more hydrophobic experimental material, this information could explain part of the discoveries observed here. On the other hand, *P. aeruginosa* was more enlarged, suggesting it was better anchored on the flat material (Figure 9d). Meanwhile the bacilli morphology on the NTs was shorter with poorer cell bonding points (Figure 9e). The rough surface was detected to have a more closely related morphology to that observed on the flat material but with a smaller cell size. Despite the important roughness differences presented by the flat and rough materials, we could advocate that both surfaces are pretty similar from a chemical point of view, information which could explain part of the similar bacilli bonding and morphological behaviors detected over those surfaces.

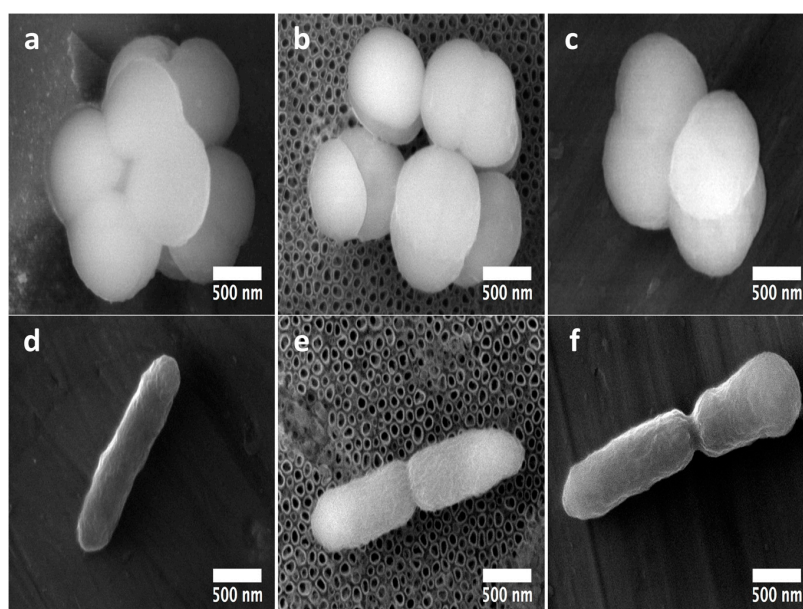


Figure 9. Nano-scale comparative bacteria-surface interactions among Gram-positive and Gram-negative bacteria on the experimental materials at 2 h: (a) *S. epidermidis* micrograph on the Flat-Ti6Al4V material; (b) 80 nm NTs clearly showing the poor adhesion patterns of *S. epidermidis*; (c) *S. epidermidis* adhesion over the rough Ti6Al4V; (d) *P. aeruginosa* interaction over the flat Ti6Al4V; (e) bacilli contact on NTs; (f) *P. aeruginosa* onto the Rough material.

At 6h of incubation (late adhesion), we elucidated promoted *S. epidermidis* anchorage with more defined and spread adhesion-bonds (red arrows) over the flat surface (Figure 10a). On the other hand, *S. epidermidis* showed tiny bonds (at nanoscale) strictly contacting the mouths of the NTs (Figure 10b, green arrows), proposing disturbed adhesion that connects to the nanostructured material. On the contrary, the rough surface illustrated a compact-like morphology (Figure 10c), suggesting more cell-cell attraction instead of cell-surface bonding, information that could explain the controversial decreased bacterial colonization observed in the rough material at 6h. Similarly to the flat surface behavior on *S. epidermidis*, the *P. aeruginosa* activity showed an elongated morphology, suggesting better anchorage to the material (Figure 10f). In the same way, the rough Ti6Al4V inspired a similar prolonged morphology with improved cell-surface bonds, as depicted by the blue arrows in Figure 10f. However, the nanostructured surface was able to enthuse a disturbed morphology to the bacteria

that was in direct contact to the surface (Figure 10e, green arrow), leaving alone only the formation of cell-cell bindings, evidence that could explain the lower *P. aeruginosa* viability observed on the NTs (Figure 8).

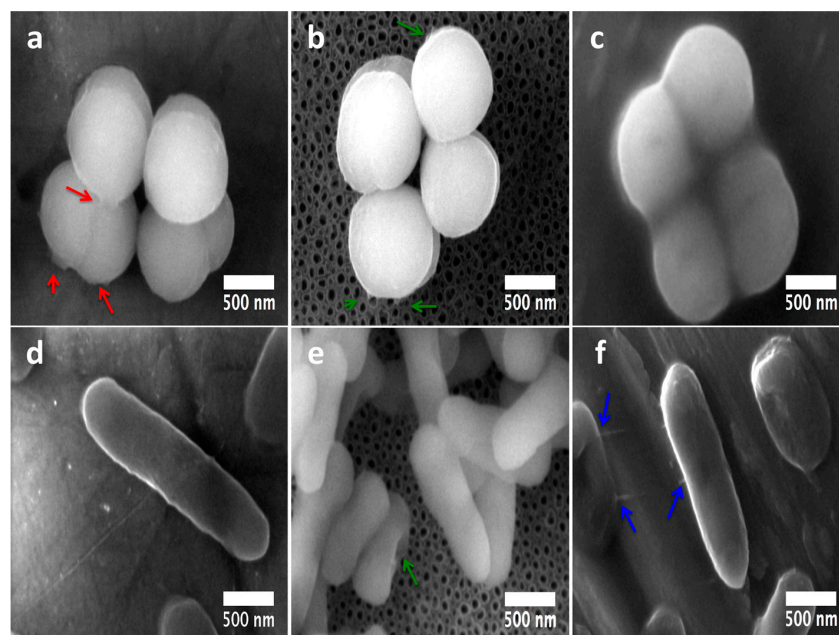


Figure 10. Nano-scale comparative bacteria-surface interactions among Gram-positive and Gram-negative microorganisms over the surfaces at 6 h: (a) *S. epidermidis* on the Flat-Ti6Al4V material (the red arrows highlight the huge contact bonds among the surface and the cell-cell interactions); (b) 80 nm NTs illustrating decreased adhesion of *S. epidermidis* (green arrows points out tiny surface adhesion-bonds); (c) *S. epidermidis* adhesion on the rough material; (d) *P. aeruginosa* largely disseminated on the Flat Ti6Al4V; (e) deformed bacilli interaction on NTs (the green arrow represents deformed morphology of direct interacting bacteria to the NTs); (f) *P. aeruginosa* growth on the rough material (the blue arrows show the bacterial interaction bonds above the surface).

Importantly, *S. epidermidis* (Gram-positive) showed decreased bacterial bonds over the NTs and a constant morphology at the early and late incubation times compared to the *P. aeruginosa* that slightly bonds to the NTs. This interesting compartment could be explained in part by the physicochemical properties of the bacterial walls. As Gram-positive bacteria have a thicker peptidoglycan layer localized at the external phase of the cell than Gram-negative bacteria [24], it may contribute to a decreased affinity to the material surfaces. Moreover, it is important to indicate that peptidoglycan is a denser polysaccharide layer (partially hydrophobic) that may not have a good ability anchor to the nanostructured layer [25]. Meanwhile, the flat, carbon-rich surface allowed better bacterial bonding. Furthermore, is vital to highlight that the staphylococci spp. presented a more opaque cell aspect with promoted cell-cell bonding compared to that of *P. aeruginosa* (which presented a translucent morphology) cultured over the experimental materials. Moreover, an increased number of bonding points for the *P. aeruginosa* was identified on the rough material at 6h compared to those of *S. epidermidis* (Figure 10c,f). However, promoted bacterial deformation (which suggest improved adhesion) was detected for the *P. aeruginosa* but not on *S. epidermidis*. This interesting trend (which has never been deeply discussed) could be due to the structural properties of the Gram-negative cell wall. Since Gram-negative microorganisms present a more fluid double membrane layer at the external phase with a thinner peptidoglycan layer (compared to Gram-positive) [26], they may allow promoted membrane anchorage with easier deformation capability (possibly by bacteria motility), which could explain the enlarged and deformed cell architecture that was formerly reported here. Although, other molecular

studies such as the inhibition of bacterial receptors involved in the adhesion and mobility processes, RT-PCR, western blot, and immunofluorescence assays are recommended in order to explain these interesting interrogations.

2.3. Human Osteoblast Behavior

Figure 11 illustrates the initial behavior of osteoblasts cultured on the experimental materials. The flat surface allowed decreased cellular anchorage with non-outcomes of well-defined cellular adhesion as there was no visible filopodia formation and a lower number of viable cells (Figure 11a,d). On the other hand, the NTs showed promoted filopodia formation with an increased amount of cell bonding (Figure 11b, red arrows), as well as a surprisingly improved number of viable cells (Figure 11e). Furthermore, the rough surface advocated an elevated number of growing cells, as evidenced by FE-SEM (Figure 11c), but with low results of adhered viable osteoblasts, as evidenced by the fluorescence staining (Figure 11f). These interesting observations suggest that flat Ti6Al4V surfaces do not favor the osteoblast anchorage; meanwhile the rough surface promotes increased levels of osteoblasts but without organized cellular growth. In addition, the NTs stimulated and promoted an ordered growing capability, information which suggests that nanostructured material could be more favorable for stimulating cellular organization with promising osteoactive capability. Our results are strongly congruent with previous works [27].

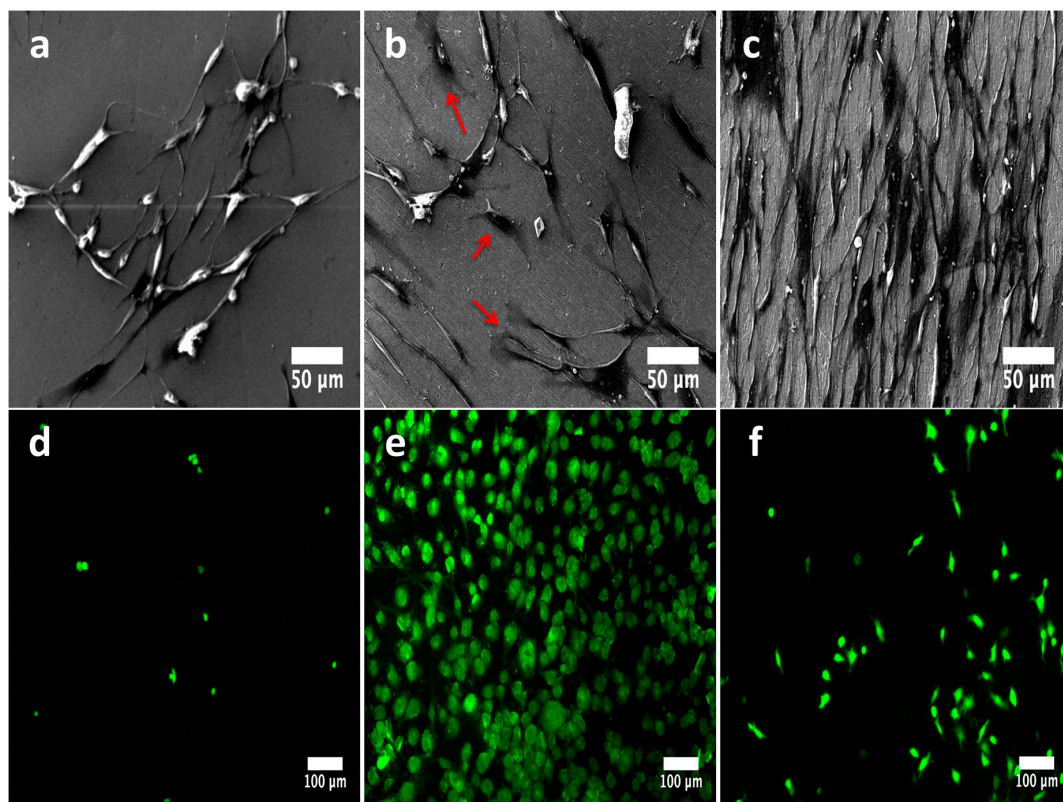


Figure 11. Osteoblast behavior cultured on the investigational materials after 24 h: (a) adhered osteoblasts on the flat surface; (b) 80 nm NTs illustrating promoted adhesion with long and interconnecting filopodia projections (red arrows highlight the formation of anchored sites); (c) cultured osteoblasts on the rough disk; (d) representative viable cells detected on the flat material; (e) vital osteoblasts analyzed on the NTs; (f) anchored vital osteoblasts on the rough Ti6Al4V.

It is important to compare and highlight the main differences between the viability behavior of bacteria and osteoblasts. Interestingly, the NTs were capable of decreasing the initial adhesion step of

both bacteria (Gram + and –); meanwhile, NTs were the most optimal option for osteoblasts. These interesting activities could be related to the surface nano-roughness provided by the NTs; as speculated in previous works, nanostructured materials can control at the molecular scale the deposition of proteins involved in the initial osteoblastic interactions [10,28]. In addition, nano-rough surfaces can disrupt the initial deposition of bacteria due to the substantial differences presented between the diameter of the NTs and the cell-wall size, which is bigger than the NTs, information that could explain the effects observed especially for *S. epidermidis*. Moreover, the NTs are significantly more hydrophilic than the rough and flat materials, information that suggests that NTs allow better control of osteoblastic adhesion without generating an aberrant morphology (see Figure 11). On the other hand, the improved wettability found on NTs could contribute to disturbed electrostatic interactions between the NTs and bacteria [23], mainly for *P. aeruginosa*. Table 2 presents a summarized comparison between the experimental materials and the cellular models evaluated here.

Table 2. Summarized comparison between the physicochemical surface properties and the optimum surface option for cellular behavior. ‘x’ represents low viability, ‘xx’ indicates regular viability, and ‘xxx’ strong viability. ‘*’ expressed low adhesion, ‘***’ displayed regular adhesion, and ‘****’ announces high adhesion.

	Flat	NTs (Nano-Rough)	Rough
<i>S. epidermidis</i>	xx ***	x *	xxx **
<i>P. aeruginosa</i>	xx **	x *	xx **
Osteoblasts	x	xxx	x

3. Materials and Methods

3.1. Ti6Al4V Surfaces Development

3.1.1. Synthesis of NTs

For the manufacturing of homogenous and reproducible 80 nm diameter NTs, we performed electrochemical anodization as previously described [29,30]. Briefly, flat mirror polished (100 to 2000 grit and 1- μ m alumina) disks of Ti6Al4V (ASTM F-136; Supra Alloys Inc., Camarillo, CA, USA) with 150 mm diameters and 5 mm thicknesses were assembled in a special 125 mL electrochemical cell and anodized using Microdacyn 60[®] super-oxidized water (Oculus Technologies, Guadalajara, Jal, Mexico) at pH 6.8, supplemented with 10 mg/L of NH₄F (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) and 100 mg/L NaCl (Sigma-Aldrich, USA). Next, a potential of 20 V was applied for 5 min at room temperature (RT) using a DC power supply and a platinum mesh as a counter electrode. Afterwards, the samples were cleaned for 5 min under sonication, rinsed with isopropyl alcohol, and desiccated for 12 h. Importantly, all experimental specimens were sterilized using UV irradiation (285 nm UVB light source) for 30 min each side inside of a class II biosecurity cabinet. Finally, a sterilized flat mirror polished Ti6Al4V disk was used as a control for all the experimental assays.

3.1.2. Rough Ti6Al4V Surface

In order to increase the surface roughness of the Ti6Al4V substrates, we performed mechanical polishing following a metallographic procedure using SiC emery paper (from 100 to only 400 grit) (part of the procedure described in ASTM E3-11). Next, the samples were ultrasonically washed in acetone, ethanol, and water (three times for 5 min each), with the purpose of removing any abrasive particle generated by the mechanical polishing. Finishing, the samples were dried into a desiccator for 24 h and sterilized as described above.

3.2. Surface Physicochemical Characterization

3.2.1. FE-SEM Analysis of the Experimental Materials

As an endeavor to characterize the surface morphology of the samples, we applied FE-SEM (Tescan LYRA 3, Brno, Czech Republic), taking micrographs at 20 kV accelerating voltage on diverse random fields.

3.2.2. Chemical Characterization

The chemical assays were performed using EDX (Tescan LYRA 3, Tescan, Brno, Czech Republic), with a silicon drift detector coupled to the FE-SEM.

3.2.3. Roughness Evaluation

In contemplation of the material's surface roughness, we performed AFM (Quesant Q-Scope 350, AMBIOS, Agura Hills, CA, USA), equipped with an anti-acoustic box to prevent noise, which can affect the measurements. The operation scan rate was 1 Hz by contact mode at RT. A 40- μm X-Y and 4- μm Z, a scanner equipped with a silicon tip and 10 nm tip curvature was used. The scan surface area was 1 μm^2 . For quantitative assessment of the roughness topographies, we provide an analytical analysis of the arithmetic average (Ra).

3.3. Bacterial Behavior among the Experimental Surfaces

3.3.1. Bacterial Culture

For the bacterial-surface interaction analyses *S. epidermidis* (ATCC 12228) and *P. aeruginosa* (ATCC 27853) (microbial models of orthopedic importance) were used [7,31]. For the formulation of the inoculums, both strains were freshly grown overnight on tryptic soy agar (TSA) plates (Beckton Dickinson, Sparks, MD, USA). Discrete colonies of each bacteria were obtained from TSA plates and separately suspended in tryptic soy broth (TSB) to an optical density (O.D.) of 0.05 (*S. epidermidis*) and 0.04 (*P. aeruginosa*) with pH 7.0; assessed using a spectrophotometer (LAMBDA 25, Perkin Elmer, CT, USA).

3.3.2. Bacterial Adhesion and Viability Assays

For the assessment of the bacterial behavior on the materials, 100 μL of each microbial suspension containing approximately 1×10^7 CFU/mL (O.D. 0.05 and 0.04) plus 100 μL of warm TSB was used to fully cover the surface and avoid sample desiccation. The inoculums were incubated onto the specimens for 2 and 6 h at 37 °C in a static model. After each incubation time, the surfaces were washed three times in 1X PBS for 5 min to discard any unanchored bacteria. Next, each material model was deposited into an individual well of a sterile 24-well polystyrene plate (Corning, Corning, NY, USA) containing 1 mL of fresh TSB. The plate was positioned in an ultrasonic bath (Branson, Branson, MO, USA) and sonicated at 120 W for 1 min at periods of 5 s to evade cellular lyses. Thereafter, the surfaces were scraped off using a sterile surgical blade to entirely detach any bounded cell. The materials were taken off and the remaining suspensions were diluted with Phosphate Buffer Saline (PBS) and cultured at 37 °C for 24 h in TSA and counted for analytical assessment.

3.3.3. Bacterial Approach by FE-SEM

Bacterial morphology is of importance to understand the mechanisms regarding bacterial adhesion and bonding anchorage to materials' surfaces [23]. Moreover, the colonization rate is vital to assess the bacterial behavior over biomaterials, so, in order to address these critical parameters, we performed FE-SEM on each material at 2 h (indicated as initial adhesion phase) and 6 h (late adhesion phase) of incubation. Briefly, each sample was rinsed with PBS three times for 5 min respectively, fixed with 2.5% glutaraldehyde for 2 h at RT and dehydrated in graded series of ethanol solutions (30 min each).

As an endeavor to detail and directly visualize the bacterial morphology and the cellular bonding on the surface, we applied high resolution FE-SEM with a very high magnification scale [29,32]. Fixed cells were not sputter-coated in order to avoid the coverage of the nano-bonding phase at a very high amplification. The zoom applied was 100,000 \times , operating at 10 kV and a working distance of 6 mm.

3.4. Human Osteoblasts Characterization over the Materials

3.4.1. Osteoblasts Culture

Human osteoblasts were cultured using Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco-Invitrogen) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco-Invitrogen) at 37 °C in 5% CO₂. Each experimental sample was positioned in an individual well of a 12-well polystyrene plate (Corning, NY, USA). Next, the cells were cultured using 1 mL of medium containing a concentration of 2×10^4 cells per mL of the materials and stored in a CO₂ chamber for 24 h [10].

3.4.2. Cellular Viability by Fluorescence Microscopy

Osteoblast viability after 24 h of incubation was explored among the experimental substrates using a live/dead viability/cytotoxicity assay kit (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), mixing 1mM calcein-AM and 2 mg/mL of ethidium homodimer-1 following the manufacturer's instructions. Afterwards, the materials were inverted and mounted onto cover slides with a fluorescence mounting medium (Sigma-Aldrich, USA), characterized and photographed with a green (live) and red (dead) filter under an inverted fluorescence microscope (ZOE, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). At least five fields were randomly imaged.

3.4.3. Osteoblast Morphology by FE-SEM

In order to characterize the early cellular morphology among the tested surfaces after 24 h of culture, we performed FE-SEM. The cells were washed, fixed, and dehydrated as described in Section 3.3.

4. Conclusions

The present study assess for the first time the evaluation, comparison, and discussion of flat, nanostructured, and rough Ti6Al4V surfaces on the behavior of bacterial adhesion of two important orthopedic bacterial models. Moreover, the important structural and viable properties detected between Gram-positive and Gram-negative bacteria (discussed for the first time here) used here were pointed out. Our results reveal that chemical differences among the material surfaces can modulate strong alterations in bacterial activity with critical change to the cellular architecture, allowing the formation of promoted or reduced bacteria-surface interactions, instead of only surface roughness properties. Moreover, the nanostructured surface advocated the lower bacterial viability and the reduced cell adhesion capability with decreased results of colonization movement. Importantly, the nanostructured surface stimulates a superior osteoblast organization with elevated filopodia formation to the flat and even rough material, proposing the nanostructured Ti6Al4V surfaces as optimal for bone implant applications. The NTs were able to alter the ideal bacterial activity over Gram-positive and Gram-negative materials. Our results open up a novel pathway for the investigation and comparison of the effects of Gram-positive and Gram-negative cell walls on the behavior of biocompatible surfaces for the understanding of implant-related infections.

Acknowledgments: The authors want to thank to Autonomous University of Baja California for the grant 2060 provided by 19va Convocatoria Interna de Apoyos a Proyectos de Investigación due to their financial support.

Author Contributions: The process design, experimental work, data analysis, and writing of the manuscript were performed by Ernesto Beltrán-Partida and Benjamín Valdez-Salas. Mario Curiel-Alvarez and Gisela Montero-Alpírez contributed to the FE-SEM analyses. Sandra Castillo-Urbe and Lidia Vargas-Osuna

contributed to the statistical analysis. Roumen Zlatev and Margarita Stoytcheva worked with the material preparations and anodization processes.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Warnke, P.H.; Springer, I.N.G.; Wiltfang, J.; Acil, Y.; Eufinger, H.; Wehmöller, M.; Russo, P.A.J.; Bolte, H.; Sherry, E.; Behrens, E.; et al. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* **2004**, *364*, 766–770. [[CrossRef](#)]
2. Balla, V.K.; Banerjee, S.; Bose, S.; Bandyopadhyay, A. Direct laser processing of a tantalum coating on titanium for bone replacement structures. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 2329–2334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Liu, S.; Wang, B.; Zhang, P. Effect of Glucose Concentration on Electrochemical Corrosion Behavior of Pure Titanium TA2 in Hanks' Simulated Body Fluid. *Materials* **2016**, *9*, 874. [[CrossRef](#)]
4. Kazemzadeh-Narbat, M.; Kindrachuk, J.; Duan, K.; Jenssen, H.; Hancock, R.E.W.; Wang, R. Antimicrobial peptides on calcium phosphate-coated titanium for the prevention of implant-associated infections. *Biomaterials* **2010**, *31*, 9519–9526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Antoci, V., Jr.; Adams, C.S.; Parvizi, J.; Davidson, H.M.; Composto, R.J.; Freeman, T.A.; Wickstrom, E.; Ducheyne, P.; Jungkind, D.; Shapiro, I.M.; et al. The inhibition of Staphylococcus epidermidis biofilm formation by vancomycin-modified titanium alloy and implications for the treatment of periprosthetic infection. *Biomaterials* **2008**, *29*, 4684–4690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Taheri, S.; Cavallaro, A.; Christo, S.N.; Smith, L.E.; Majewski, P.; Barton, M.; Hayball, J.D.; Vasilev, K. Substrate independent silver nanoparticle based antibacterial coatings. *Biomaterials* **2014**, *35*, 4601–4609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Puckett, S.D.; Taylor, E.; Raimondo, T.; Webster, T.J. The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. *Biomaterials* **2010**, *31*, 706–713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Pérez-Jorge, C.; Conde, A.; Arenas, M.A.; Pérez-Tanoira, R.; Matykina, E.; de Damborenea, J.J.; Gómez-Barrena, E.; Esteban, J. In vitro assessment of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus adhesion on TiO₂ nanotubes on Ti–6Al–4V alloy. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2012**, *100A*, 1696–1705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Taheri, S.; Cavallaro, A.; Christo, S.N.; Majewski, P.; Barton, M.; Hayball, J.D.; Vasilev, K. Antibacterial Plasma Polymer Films Conjugated with Phospholipid Encapsulated Silver Nanoparticles. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2015**, *1*, 1278–1286. [[CrossRef](#)]
10. Beltrán-Partida, E.; Moreno-Ulloa, A.; Valdez-Salas, B.; Velasquillo, C.; Carrillo, M.; Escamilla, A.; Valdez, E.; Villarreal, F. Improved Osteoblast and Chondrocyte Adhesion and Viability by Surface-Modified Ti6Al4V Alloy with Anodized TiO₂ Nanotubes Using a Super-Oxidative Solution. *Materials* **2015**, *8*, 867. [[CrossRef](#)]
11. Massaro, C.; Rotolo, P.; De Riccardis, F.; Milella, E.; Napoli, A.; Wieland, M.; Textor, M.; Spencer, N.D.; Brunette, D.M. Comparative investigation of the surface properties of commercial titanium dental implants. Part I: Chemical composition. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2002**, *13*, 535–548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. García, J.L.; Asadinezhad, A.; Pacherník, J.; Lehocký, M.; Junkar, I.; Humpolíček, P.; Sába, P.; Valášek, P. Cell Proliferation of HaCaT Keratinocytes on Collagen Films Modified by Argon Plasma Treatment. *Molecules* **2010**, *15*, 2845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Beltrán-Partida, E.; Valdéz-Salas, B.; Moreno-Ulloa, A.; Escamilla, A.; Curiel, M.A.; Rosales-Ibáñez, R.; Villarreal, F.; Bastidas, D.M.; Bastidas, J.M. Improved in vitro angiogenic behavior on anodized titanium dioxide nanotubes. *J. Nanobiotechnol.* **2017**, *15*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ponsonnet, L.; Reybier, K.; Jaffrezic, N.; Comte, V.; Lagneau, C.; Lissac, M.; Martelet, C. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. *Mater. Sci. Eng. C* **2003**, *23*, 551–560. [[CrossRef](#)]
15. Zhang, Y.; Zhang, L.; Li, B.; Han, Y. Enhancement in Sustained Release of Antimicrobial Peptide from Dual-Diameter-Structured TiO₂ Nanotubes for Long-Lasting Antibacterial Activity and Cytocompatibility. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 9449–9461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Barbour, M.E.; O'Sullivan, D.J.; Jenkinson, H.F.; Jagger, D.C. The effects of polishing methods on surface morphology, roughness and bacterial colonisation of titanium abutments. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, *18*, 1439–1447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ercan, B.; Taylor, E.; Alpaslan, E.; Webster, T.J. Diameter of titanium nanotubes influences anti-bacterial efficacy. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 295102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Wu, Y.; Zitelli, J.P.; TenHuisen, K.S.; Yu, X.; Libera, M.R. Differential response of Staphylococci and osteoblasts to varying titanium surface roughness. *Biomaterials* **2011**, *32*, 951–960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Widmer, A.F. New Developments in Diagnosis and Treatment of Infection in Orthopedic Implants. *Clin. Infect. Dis.* **2001**, *33* (Suppl. 2), S94–S106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Truong, V.K.; Pham, V.T.H.; Medvedev, A.; Lapovok, R.; Estrin, Y.; Lowe, T.C.; Baulin, V.; Boshkovikj, V.; Fluke, C.J.; Crawford, R.J.; et al. Self-organised nanoarchitecture of titanium surfaces influences the attachment of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 6831–6840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Almaguer-Flores, A.; Olivares-Navarrete, R.; Wieland, M.; Ximénez-Fyvie, L.A.; Schwartz, Z.; Boyan, B.D. Influence of topography and hydrophilicity on initial oral biofilm formation on microstructured titanium surfaces in vitro. *Clin. Oral Implant. Res.* **2012**, *23*, 301–307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Zhao, L.; Mei, S.; Wang, W.; Chu, P.K.; Wu, Z.; Zhang, Y. The role of sterilization in the cytocompatibility of titania nanotubes. *Biomaterials* **2010**, *31*, 2055–2063. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Truong, V.K.; Lapovok, R.; Estrin, Y.S.; Rundell, S.; Wang, J.Y.; Fluke, C.J.; Crawford, R.J.; Ivanova, E.P. The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion to ultrafine-grained titanium. *Biomaterials* **2010**, *31*, 3674–3683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Labischinski, H.; Maidhof, H. Chapter 2 Bacterial peptidoglycan: Overview and evolving concepts. *New Compr. Biochem.* **1994**, *27*, 23–38.
25. Kim, S.J.; Schaefer, J. Hydrophobic Side-Chain Length Determines Activity and Conformational Heterogeneity of a Vancomycin Derivative Bound to the Cell Wall of Staphylococcus aureus. *Biochemistry* **2008**, *47*, 10155–10161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Osborn, M.J.; Rosen, S.M.; Rothfield, L.; Zeleznick, L.D.; Horecker, B.L. Lipopolysaccharide of the Gram-Negative Cell Wall. Biosynthesis of a complex heteropolysaccharide occurs by successive addition of specific sugar residues. *Science* **1964**, *145*, 783–789.
27. Lumetti, S.; Manfredi, E.; Ferraris, S.; Spriano, S.; Passeri, G.; Ghiacci, G.; Macaluso, G.; Galli, C. The response of osteoblastic MC3T3-E1 cells to micro- and nano-textured, hydrophilic and bioactive titanium surfaces. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2016**, *27*, 68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Oh, S.; Brammer, K.S.; Li, Y.S.; Teng, D.; Engler, A.J.; Chien, S.; Jin, S. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 2130–2135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Beltrán-Partida, E.; Valdez-Salas, B.; Curiel-Álvarez, M.; Castillo-Urbe, S.; Escamilla, A.; Nedev, N. Enhanced antifungal activity by disinfected titanium dioxide nanotubes via reduced nano-adhesion bonds. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Beltrán-Partida, E.; Valdez-Salas, B.; Escamilla, A.; Curiel, M.; Valdez-Salas, E.; Nedev, N.; Bastidas, J.M. Disinfection of titanium dioxide nanotubes using super-oxidized water decrease bacterial viability without disrupting osteoblast behavior. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *60*, 239–245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Campoccia, D.; Montanaro, L.; Arciola, C.R. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials* **2006**, *27*, 2331–2339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Lüdecke, C.; Roth, M.; Yu, W.; Horn, U.; Bossert, J.; Jandt, K.D. Nanorough titanium surfaces reduce adhesion of Escherichia coli and Staphylococcus aureus via nano adhesion points. *Coll. Surf. B Biointerfaces* **2016**, *145*, 617–625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Sample Availability: Samples of “nanostructured Ti and Ti6Al4V” could be available from the authors.



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).