

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**INSTITUTO DE INGENIERIA  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA**



**“Evaluación y caracterización de la respuesta biológica del crecimiento tisular en superficies de aleaciones de titanio nanoestructurado”**

**TESIS**

Que para obtener el grado de:  
**Doctor en Ciencias**

Presenta:  
**Ernesto Alonso Beltrán Partida**

Director:  
Dr. Benjamín Valdez Salas

Co-Directora:  
Dra. Mónica Carrillo Beltrán

Mexicali B.C., Julio de 2014

## ABSTRACT OF THE DISSERTATION

Evaluation and characterization of the biological response of tissue growth on nanostructured titanium alloys surfaces

The recent growth of nanotechnology, and its applications to regenerative medicine and tissue engineering, has promote *in vitro* studies involving mammalian cells, for the use of nanostructures that are capable of regulate cellular functions. The role of a surface provides more than just cellular support; it also works as an intelligent entity guiding and controlling cellular behavior. The fabrication of nanostructured surfaces has provided influencing characteristics enhancing the cellular performance. So, in the present work, we report the effectiveness of nanostructured dimensions for its application in regenerative medicine and tissue engineering. Emphasizing on the observed effects of nanostructures on cell behavior and focused discussions on sustained, improved biocompatibility, phenotype conservation and the bactericidal properties gained by the nano-configuration, in order to improve further evidence that give support of the application of nanostructures on therapeutic treatment and improving the quality of life for the patients that requires scaffoldings.

## RESUMEN

Evaluación y caracterización de la respuesta biológica del crecimiento tisular en superficies de aleaciones de titanio nanoestructurado

Con el reciente crecimiento de la nanotecnología, y las aplicaciones de la estructuras nanométricas en el área de la medicina regenerativa y la ingeniería tisular, se ha encontrado en estudios *in vitro* utilizando células mamíferas que las nanoestructuras son capaces de regular la funcionalidad celular. El papel de los sustratos aplicados con la finalidad de regenerar tejidos no solo es meramente un soporte mecánico, sino también son capaces de actuar como superficies inteligentes, guiando y controlando el comportamiento celular. La fabricación de nanoestructuras superficiales proveen características que influyen en el comportamiento celular, tal vez por imitar las dimensiones nanométricas de las estructuras celulares. En este estudio reportamos que las dimensiones nanométricas son una efectiva estrategia en aplicaciones para medicina regenerativa e ingeniería tisular, haciendo énfasis en la observación de los efectos de las nanoestructuras en el comportamiento celular. Con discusiones enfocadas en el sustento, mejora de la biocompatibilidad, conservación del fenotipo tisular así como la regulación bactericida que ofrecen las superficies nano-configuradas, con la finalidad de proveer mayores evidencias que den sustento al uso de

nanoestructuras para aplicaciones terapéuticas y mejorar la calidad de vida del paciente que lo requiera.

## **AGRADECIMIENTOS**

Después de concluir con este doctorado y la elaboración de esta tesis doctoral, quiero aprovechar para agradecer primeramente a Dios, por haberme dotado las herramientas, la salud, las personas y las actitudes que me llevaron a este lugar, finalizando con esta experiencia tan importante no solo para mi vida personal sino profesional.

Agradezco profunda, fuerte y sinceramente a mis madres, Nydia y Mercedes y mi padre Raúl quienes siempre me enseñaron que la manera mas satisfactoria para triunfar en la vida es trabajar duramente, siempre siendo honestos y perseverantes, recordándome que a la flojera no se le agradece nada, ustedes fueron un pilar vital para lograr concluir con esta parte tan importante de mi vida.

Al igual a toda mi familia quienes siempre me apoyaron en cualquier momento, Marisa, Clara, Raúl e Imelda muchas gracias por permitirme contar con ustedes.

También agradezco al personal del Instituto de Ingeniería de la UABC, por el apoyo que recibí cada que lo necesite, Muchas Gracias.

Al Dr. Benjamín Valdez Salas, asesor que fue un gran pilar en la elaboración así como en la trayectoria y dirección de este trabajo, le agradezco todo el apoyo y la confianza que recibí de su parte así como sus asesorías que llevaron al éxito de esta tesis, además de la amistad y consejos que recibí de su parte me llevaron a lograr concluir este trabajo, al igual como en convertirse en un ejemplo a seguir para continuar en el camino de la investigación, Dr. Muchas Gracias!.

A la Dra. Mónica Carrillo Beltrán le agradezco todo el apoyo recibido durante toda la trayectoria de este trabajo, sus consejos y asesorías.

Al Dr. Raúl Rosales de la UASLP, Muchas Gracias por todo el apoyo que me brindo, a la Dra. Cristina Velasquillo del INR, le agradezco todos los conocimientos que me brindo y permitirme trabajar en su lab., y al Dr. Francisco Villarreal de UCSD, Muchas Gracias por recibirme en su lab, y compartirme tantos conocimientos.

A mis amigos Manuel, Aldo, Irene, Wences, David entre muchos más que me brindaron todo su apoyo durante esta trayectoria tanto en lo personal como en lo profesional, y a Fernanda que me apoyo mucho, Muchas Gracias.

Finalmente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por apoyarme con una beca (CVU-348737) económica para lograr ejercer mis estudios doctorales, Muchas Gracias!

# DEDICACIÓN

A mis madres (Nydia y Mercedes), familia y amigos, pero en especial a mi padre (Raúl) que nunca olvidare.

## EPIGRAFÍA

“No podemos engañar a la naturaleza, pero si podemos ponernos de acuerdo con  
ella”

- Albert Einstein -

“Pagad a todos lo que debáis: al que impuestos, impuestos; al que tributo, tributo;  
al que temor, temor; al que honor, honor.”

- Romanos 13:7 -

# TABLA DE CONTENIDOS

ABSTRACT OF THE DISSERTATION.....	II
RESUMEN.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	V
DEDICACIÓN.....	VIII
EPIGRAFÍA.....	IX
TABLA DE CONTENIDOS.....	X
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	XIII
CAPÍTULO 1.....	1
1. Introducción: historia de la nanotecnología.....	1
1.1 Nanomedicina.....	1
1.2 Células y el comportamiento celular.....	3
1.3 Papel de la matriz extracelular.....	8
1.4 Biomateriales nanoestructurados para interacciones celulares.....	9
1.5 Ingeniería de tejidos.....	10
1.6 Nanotopografías.....	11
1.7 Titanio – nanotubos TiO <sub>2</sub> para regeneración tisular.....	12
1.8 Objetivos.....	15
CAPÍTULO 2.....	17
2.1 Consideraciones en implantes ortopédicos y dentales para oseointegración.....	17
2.2 Fase experimental.....	20
2.3 Resultados.....	28

2.4 Discusión.....	41
CAPÍTULO 3.....	48
3.1 Nanotubos de TiO <sub>2</sub> promueven el crecimiento de células de cartílago para aplicaciones en regeneración osteo-condral.....	48
3.2 Fase experimental.....	50
3.3 Resultados.....	54
3.4 Discusión.....	64
CAPÍTULO 4.....	71
4.1 Implicación del uso de nanotubos de TiO <sub>2</sub> para la regeneración vascular: Aplicaciones para stents vasculares.....	71
4.2 Fase experimental.....	75
4.3 Resultados.....	79
4.4 Discusión.....	104
CAPÍTULO 5.....	113
5.1 Propiedades antisépticas de los nanotubos de TiO <sub>2</sub> : Inhibición de la adhesión bacteriana.....	113
5.2 Fase experimental.....	115
5.3 Resultados.....	120
5.4 Discusión.....	126
CAPÍTULO 6.....	130
6.1 Conclusiones, aportaciones y recomendaciones.....	130
6.2 Conclusión general.....	130
6.3 Aportaciones a la biomedicina.....	130
6.4 Recomendaciones.....	132

REFERENCIAS..... 133

## Lista de Figuras y tablas

Descripción	Página
<b>Tabla 1.</b> Composición elemental de las diferentes superficies calculada por el análisis de EDS.....	29
<b>Figura 1.</b> Cuerpos a diferentes escalas.....	2
<b>Figura 2.</b> Ilustración esquemática tridimensional de una célula ideal.....	3
<b>Figura 3.</b> Estructura de la envoltura nuclear (NE). La NE consiste de una membrana nuclear externa (ONM) continua con el retículo endoplasmático rugoso (RER) y una membrana nuclear interna (INM).....	5
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática de la membrana celular.....	7
<b>Figura 5.</b> Interacción entre el exterior celular y el núcleo por medio de integrinas de matriz extracelular.....	8
<b>Figura 6.</b> Aplicación de los nanomateriales en la terapia de ingeniería tisular...	9
<b>Figura 7.</b> Ventajas de los nanomateriales.....	12
<b>Figura 8.</b> Aplicación biomédica del titanio y sus aleaciones.....	14
<b>Figura 9.</b> Micrografía de SEM para los nanotubos de TiO <sub>2</sub> y Ti sin anodizar (a) Ti plano sin anodizar, magnificación 1200x. (b) Caracterización física de los nanotubos de TiO <sub>2</sub> , magnificación 65,000x. (c) Nanotubos de TiO <sub>2</sub> , magnificación 120,000x. Las imágenes de TiO <sub>2</sub> muestran nanotubos altamente ordenados.....	29
<b>Figura 10.</b> Espectro de EDS para las muestras de Ti sin tratamiento y nanotubos de TiO <sub>2</sub> . (a) Ti sin tratamiento. (b) Nanotubos de TiO <sub>2</sub> .....	30
<b>Figura 11.</b> Micrografías de AFM que muestran la topografía Ti sin tratamiento y nanotubos de TiO <sub>2</sub> . a) Imagen 3D de los nanotubos de TiO <sub>2</sub> . b) Vista 3D de la superficie de Ti sin tratamiento. c) Top view de los nanotubos de TiO <sub>2</sub> . d) Top view de Ti sin tratamiento. El área de escaneo es de 5 x 5 μm <sup>2</sup> .....	31

**Figura 12.** Procedimiento para la obtención de osteoblasto. a) Cerdos raza Landrace x Yorkshire recién nacidos seleccionados para el experimento. b) Periostoplastía femoral. c) Preparación de periostios para el cultivo de osteoblastos. d) Explante a los diez días de incubación, observándose proliferación de osteoblastos. e) Pasaje 1 de osteoblastos sub-confluentes proveniente de periostio. f) Pasaje 1 de osteoblastos confluyente, presentando la formación de una monocapa..... **32**

**Figura 13.** Tinción de vida/muerte para osteoblastos cultivados sobre nanotubos de TiO<sub>2</sub> y Ti sin tratamiento. a) Células con actividad positiva a la estereasa citoplasmática (células vivas). b) Células con membrana celular dañada que permiten la unión de homodímero de etidio-1 (células muertas) observadas en TiO<sub>2</sub>. c) Proporción entre células vivas/muertas en nanotubos de TiO<sub>2</sub>. d) Células vivas observadas en Ti sin tratamiento. e) Células muertas en Ti. d) Relación células vivas/muertas en Ti..... **33**

**Figura 14.** Número de células vivas vs tiempo de incubación en cada uno de los sustratos. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de  $\pm$  la desviación estándar. El valor P se obtuvo realizando un análisis de varianzas de dos vías: \* denota significancia entre los dos sustratos a 24 h de cultivo, P<0.05, # indica diferencia altamente significativa entre los sustratos a 72 h de incubación..... **34**

**Figura 15.** Micrografía de fluorescencia ilustrando células teñidas con DAPI. a) Proliferación celular a las 72 h de incubación en nanotubos de TiO<sub>2</sub>. b) Pobre proliferación a 72 h en Ti sin tratamiento. c) Células adheridas a nanotubos de TiO<sub>2</sub> a 24h. d) Células adheridas a las 72 h de incubación..... **35**

**Figura 16.** Número de células vs tiempo de incubación. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de  $\pm$  la desviación estándar. El valor P se obtuvo realizando un análisis de varianzas de dos vías: \* indica una alta diferencia significativamente estadística entre los dos sustratos a 24 h de incubación P<0.05, \*\* denota alta diferencia significativamente estadística entre los dos sustratos a 72 h P<0.05, # demuestra alta y significativa diferencia estadística entre la cantidad de células a 24 h vs. 72h en nanotubos

de TiO<sub>2</sub>..... 36

**Figura 17.** Micrografías de SEM a alta magnificación para osteoblastos de Ti sin tratamiento vs. nanotubos de TiO<sub>2</sub> después de 24, 72 y 120 h. a) Crecimiento a 24 h en nanotubos de TiO<sub>2</sub>. b) Nanotubos de TiO<sub>2</sub> a 72 h. c) Nanotubos de TiO<sub>2</sub> a 120. d) Crecimiento a 24 h sobre Ti. e) Ti a 72h. f) Ti a 120 h. Las flechas rojas indican la presencia de ECM, la línea azul indica la monocapa celular en nanotubos a 24 h. La línea naranja muestra la elongación celular en Ti sin tratamiento a 24 h. Las flechas verdes indican la formación de filipodios, y su anclaje a la superficie. Los círculos amarillos representan la extensión de una monocapa más uniforme y madura a 72 h en nanotubos. Las flechas amarillas indican la presencia de filipodios delgados y traslucidos a 120 h sobre Ti sin tratamiento (Barra de escala es 20 µm)..... 37

**Figura 18.** Micrografías de SEM a baja magnificación para osteoblastos en superficies de Ti sin tratamiento vs nanotubos de TiO<sub>2</sub> a 72 h de crecimiento. a) Nanotubos de TiO<sub>2</sub>. b) Ti sin tratamiento. Las flechas rojas indican la formación de pliegues mas protuberantes, y el círculo rojo muestra la presencia de cuerpos celulares. Las flechas amarillas indican presencia de células mas alargadas con menores pliegues..... 38

**Figura 19.** Análisis topográfico de AFM para osteoblastos cultivados por 72 h sobre nanotubos de TiO<sub>2</sub>. a) Vista 3D. b) Top view. Las líneas punteadas azules indican los filipodios celulares y los círculos punteados representan los nanotubos de TiO<sub>2</sub>..... 39

**Figura 20.** a) Elongación nuclear b) Área de Núcleo. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de ± la desviación estándar. El valor P se determinó después de efectuar una prueba t-test: \*indica diferencia significativamente estadística en la elongación entre los dos sustratos a 24 h de incubación P<0.05, # muestra diferencia estadística entre los dos sustratos a 24 h, P<0.05..... 40

**Figura 21.** Intensidad de fluorescencia relativa de DAPI para células cultivadas sobre los sustratos de experimentación a 24 h de incubación. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de ± la desviación

estándar. El valor P se determinó después de efectuar una prueba t-test: * indica una alta diferencia significativamente estadística entre los dos sustratos a 24 h de incubación $P < 0.05$ .....	41
<b>Figura 22.</b> Obtención y proliferación de condrocitos. a) Cerdos raza Landrace x Yorkshire recién nacidos elegidos para el experimento. b) Preparación del cartílago auricular. c) Digestión de cartílago en colagenasa. d) Cultivo primario de condrocitos a baja confluencia. e) Cultivo de condrocitos semiconfluentes. f) Cultivo en confluencia presentado la formación de una monocapa.....	55
<b>Figura 23.</b> Viabilidad de condrocitos utilizando la tinción live/dead essay kit. a) Células vivas en $TiO_2$ . b) Células muertas en $TiO_2$ . c) Unión de las células vivas y muertas en $TiO_2$ . d) Células vivas en Ti. e) Células muertas en Ti. f) Proporción de las células vivas con las muertas en Ti.....	56
<b>Figura 24.</b> Cantidad de células vivas vs tiempo de incubación para las superficies experimentales. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de $\pm$ la desviación estándar. El valor P se obtuvo realizando un análisis de varianzas de dos vías: * denota significancia entre los dos sustratos a 24 h de cultivo, $P < 0.05$ , # indica diferencia altamente significativa entre los sustratos a 72 h de incubación. $N = 3$ .....	57
<b>Figura 25.</b> Micrografías de fluorescencia mostrando condrocitos teñidos con DAPI. a) Proliferación celular a las 72h en nanotubos de $TiO_2$ . b) Proliferación de a 72 h Ti. c) Adhesión a 24h en $TiO_2$ . d) Adhesión 24 h en Ti.....	58
<b>Figura 26.</b> Número de células vs tiempo de incubación. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de $\pm$ la desviación estándar. El valor P se obtuvo realizando un análisis de varianzas de dos vías: * indica una alta diferencia significativamente estadística entre los dos sustratos a 24 h de incubación $P < 0.05$ , ** denota alta diferencia significativamente estadística entre los dos sustratos a 72 h $P < 0.05$ , # demuestra alta y significativa diferencia estadística entre la cantidad de células a 24 h vs. 72h en nanotubos de $TiO_2$ .....	59

<b>Figura 27.</b> Micrografías de SEM a alta magnificación para condrocitos después de 72 y 120 h. a) nanotubos de TiO <sub>2</sub> a 72h. b) Ti a 72 h. c) TiO <sub>2</sub> a 120h. d) Ti a 120 h. (Barra de escala es 5µm para a) y b), 10µm para c) y d)....	<b>60</b>
<b>Figura 28.</b> Micrografías de SEM a baja magnificación para condrocitos a 72 y 120 h. a) nanotubos de TiO <sub>2</sub> a 72h. b) Ti a 72 h. c) TiO <sub>2</sub> a 120h. d) Ti a 120 h.. (Barra de escala es 200 µm para a) y b), 50 µm para c) y d)).....	<b>61</b>
<b>Figura 29.</b> Imágenes de AFM para cultivos a 72 h sobre TiO <sub>2</sub> . a) Imagen 3D. b) Top view. Las líneas punteadas azules indican la posible formación de una monocapa celular y los círculos punteados representan los nanotubos de TiO <sub>2</sub> .	<b>62</b>
<b>Figura 30.</b> a) Área nuclear b) Forma y elongación nuclear c) Elongación celular.....	<b>63</b>
<b>Figura 31.</b> Intensidad de fluorescencia relativa de DAPI sobre los sustratos a 24 h de incubación. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de ± la desviación estándar. El valor P se determino después de efectuar una prueba t-test: * indica una diferencia significativamente estadística entre los dos sustratos a 24 h de incubación P<0.05.....	<b>64</b>
<b>Figura 32.</b> Proliferación de condrocitos, el crecimiento se potencia en la superficie con nanotubos de TiO <sub>2</sub> y se estimula mayor síntesis de ECM.....	<b>70</b>
<b>Figura 33.</b> Células endoteliales de arteria coronaria bovina sembradas sobre cajas de cultivo. a) Baja confluencia. b) Media confluencia. c) Alta confluencia..	<b>81</b>
<b>Figura 34.</b> Viabilidad de células endoteliales utilizando la tinción live/dead essay kit. a) Unión de células vivas/muertas en nanotubos d1. b) Conjunto de vivas/muertas en Ti d1. c) Vivas/muertas en TiO <sub>2</sub> d3. d) Vivas/muertas en Ti d3. e) Vivas/muertas en TiO <sub>2</sub> d8. f) Vivas/muertas en Ti d8. g) Vivas/muertas en TiO <sub>2</sub> d30. h) Vivas/muertas en Ti d30. La barra de escala para a) – f) es de 100 µm, g) – h) es de 50 µm.....	<b>82</b>
<b>Figura 35.</b> Número de células vs tiempo de incubación. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de ± la desviación estándar. El valor P se obtuvo realizando un análisis de varianzas de una vía seguido un análisis de Tukey: * indica diferencia entre Ti vs nanotubos a d1 P<0.05, ** indica contrastes significativos entre Ti vs nanotubos a d3 P<0.05, *** indica	

cambios significativos entre Ti vs nanotubos a d8 P<0.05, \*\*\*\* muestra cambios entre Ti vs nanotubos a d30 P<0.05, # indica diferencia significativa entre nanotubos a d1 vs d3 P<0.05, ## marca cambios entre nanotubos a d3 vs d8 P<0.05, ### señala cambios entre nanotubos a d8 vs d30 P<0.05 y + indica diferencia entre Ti d8 vs d30 P<0.05..... 83

**Figura 36.** Inmunofluorescencia para eNOS. a) Células sobre TiO<sub>2</sub> a d1. b) Células en Ti a d1. c) Expresión sobre TiO<sub>2</sub> a d3. d) Células sobre Ti a d3. e) Endotelio sobre TiO<sub>2</sub> a d8. f) Células sobre Ti a d8. g) Expresión sobre TiO<sub>2</sub> a d30. h) Células sobre Ti a d30. Barra de escala es de 20 μm..... 85

**Figura 37.** Intensidad relativa de fluorescencia vs tiempo de incubación. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de ± la desviación estándar. El valor P se obtuvo realizando un análisis de varianzas de una vía seguido de un análisis de Tukey: \* diferencia estadísticamente significativa entre TiO<sub>2</sub> vs Ti a d1 P<0.05, \*\* cambios estadísticos entre TiO<sub>2</sub> vs Ti a d3 P<0.05, \*\*\* TiO<sub>2</sub> vs Ti a d8 P<0.05, \*\*\*\* TiO<sub>2</sub> vs Ti a d30 P<0.05, # Ti d1 vs Ti d30 P<0.05, ## Ti d1 vs Ti d8 P<0.05, ### Ti d3 vs Ti d30 P<0.05, #### Ti d3 vs Ti d8 P<0.05, ##### Ti d8 vs Ti d30 P<0.05, @ TiO<sub>2</sub> d1 vs TiO<sub>2</sub> d30 P<0.05, @@ TiO<sub>2</sub> d1 vs d8 P<0.05, @@@ TiO<sub>2</sub> d3 vs TiO<sub>2</sub> d30 P<0.05, @@@@ TiO<sub>2</sub> d3 vs d8 P<0.05, @@@@@ TiO<sub>2</sub> d8 vs d30 P<0.05..... 86

**Figura 38.** Inmunofluorescencia para VEGFR-2. a) Células sobre TiO<sub>2</sub> a d1. b) Células en Ti a d1. c) Expresión sobre TiO<sub>2</sub> a d3. d) Células sobre Ti a d3. e) Endotelio sobre TiO<sub>2</sub> a d8. f) Células sobre Ti a d8. g) Expresión sobre TiO<sub>2</sub> a d30. h) Células sobre Ti a d30. Barra de escala es de 20 μm..... 87

**Figura 39.** Intensidad relativa de fluorescencia vs tiempo de incubación. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de ± la desviación estándar. El valor P se obtuvo realizando un análisis de varianzas de una vía seguido de un análisis de Tukey: \* diferencia significativamente estadística entre TiO<sub>2</sub> vs Ti a d1 P<0.05, \*\* diferencia entre TiO<sub>2</sub> vs Ti a d3 P<0.05, \*\*\* cambios entre TiO<sub>2</sub> vs Ti a d8 P<0.05, \*\*\*\* diferencia entre TiO<sub>2</sub> vs Ti a d30 P<0.05, # cambio significativamente estadístico entre Ti d3 vs Ti d8..... 88

<b>Figura 40.</b> Inmunofluorescencia para MitoTracker Deep Red FM. a) Masa mitocondrial sobre TiO <sub>2</sub> a d1. b) Masa mitocondrial en Ti a d1. c) Mitocondrias sobre TiO <sub>2</sub> a d8. d) Mitocondrias sobre Ti a d8. e) Mitocondrias sobre TiO <sub>2</sub> a d30. f) Mitocondrias sobre Ti a d30. Barra de escala es de 20 μm.....	<b>90</b>
<b>Figura 41.</b> Intensidad relativa de fluorescencia para MitoDeep Red FM vs tiempos de incubación. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de ± la desviación estándar. El valor P se obtuvo realizando un análisis de varianzas de una vía seguido de un análisis de Tukey: * indica diferencia significativamente estadística para TiO <sub>2</sub> vs Ti a d1 P<0.05, ** muestra diferencia estadística entre TiO <sub>2</sub> vs Ti a d8 P<0.05, # diferencia entre TiO <sub>2</sub> d1 vs TiO <sub>2</sub> d30 P<0.05, ## diferencia entre TiO <sub>2</sub> d1 vs TiO <sub>2</sub> d8 P<0.05, ### significancia entre TiO <sub>2</sub> d8 vs TiO <sub>2</sub> d30 P<0.05, @ significancia entre Ti d1 vs Ti d8 P<0.05, @@ cambios entre Ti d1 vs Ti d30 P<0.05.....	<b>91</b>
<b>Figura 42.</b> Micrografías de SEM para BACEC a 4 h de incubación. a) Ti sin tratamiento a baja magnificación. b) Ti a alta magnificación. c) TiO <sub>2</sub> a baja magnificación. d) TiO <sub>2</sub> a alta magnificación. Las líneas rojas indican la forma de los filipodios anclados a sus respectivas superficies. Las flechas rojas muestran los filipodios presentes concernientes a cada sustrato. La barra de escala para a) – c) es de 1000 nm.....	<b>93</b>
<b>Figura 43.</b> Micrografías para BACEC a bajas magnificaciones. a) Endotelio sobre TiO <sub>2</sub> a baja magnificación. b) Endotelio sobre TiO <sub>2</sub> a alta magnificación. c) Baja magnificación en Ti. d) Alta magnificación en Ti. Las puntas de flecha blancas indican cuerpos celulares. Las puntas de flecha roja son filipodios observados. Las líneas rojas muestra la traslucida ECM. La barra de escala para a) – c) es de 500 μm, b) – d) es 20 μm.....	<b>94</b>
<b>Figura 44.</b> Evaluación del crecimiento en forma de monocapa celular a 24 h. a) Micrografía con un ángulo de 36°. b) Micrografía a 0°. c) Unión monocapa-nanotubos. Las cabezas de flecha indican los bordes de la monocapa, las cabezas de flecha roja indican la capa alineada de nanotubos. La barra de escala para a) – b) es 500 nm, para c) es de 200 nm.....	<b>96</b>

<b>Figura 45.</b> Crecimiento endotelial a diferentes tiempos de incubación analizados a baja magnificación. a) Endotelio en TiO <sub>2</sub> a d1. b) En Ti a d1. c) Monocapa TiO <sub>2</sub> a d3. d) Células en Ti a d3. e) Monocapa en TiO <sub>2</sub> a d8. f) Endotelio en Ti a d8. g) Monocapa a d30 en TiO <sub>2</sub> . h) Monocapa a d30 en Ti. La barra de escala es de 500 µm.....	<b>98</b>
<b>Figura 46.</b> Crecimiento endotelial a diferentes tiempos de incubación observados a alta magnificación. a) Endotelio en TiO <sub>2</sub> a d1. b) En Ti a d1. c) Monocapa TiO <sub>2</sub> a d3. d) Células en Ti a d3. e) Monocapa en TiO <sub>2</sub> a d8. f) Endotelio en Ti a d8. g) Monocapa a d30 en TiO <sub>2</sub> . h) Monocapa a d30 en Ti. Los círculos punteados amarillos representan los cuerpos celulares que se formaron en TiO <sub>2</sub> . Las cabezas de flecha roja indican la formación de filipodios en Ti. La línea roja indica el aplanamiento celular. Las cabezas de flechas verdes, representan los filipodios en forma de dendritas observados. La barra de escala es de 20 µm.....	<b>99</b>
<b>Figura 47.</b> Imágenes de inmunofluorescencia de actina de citoesqueleto. a) TiO <sub>2</sub> a d1. b) Ti a d1. c) TiO <sub>2</sub> a d3. d) Ti a d3. e) TiO <sub>2</sub> a 30d. f) Ti a d30. La barra de escala es de 50 µm.....	<b>102</b>
<b>Figura 48.</b> Análisis morfológico de BCAEC en Ti sin tratamiento y TiO <sub>2</sub> a 24h. a) Elongación celular. b) proporción eje menor/mayor. El valor P se obtuvo realizando una prueba t-student de dos vías: * Indica diferencia estadísticamente significativa entre TiO <sub>2</sub> vs Ti P<0.05, # Significancia estadística entre Ti vs TiO <sub>2</sub> P<0.05.....	<b>103</b>
<b>Figura 49.</b> Morfología nuclear analizada en BCAEC para cada sustrato. a) Elongación nuclear. b) Área de extensión. El valor P se obtuvo realizando un análisis de varianzas de una vía seguido de un análisis de Tukey: * significancia estadística para Ti vs TiO <sub>2</sub> d1 P<0.05, ** Ti vs TiO <sub>2</sub> a d3 P<0.05, *** Ti vs TiO <sub>2</sub> d8 P<0.05, **** TiO <sub>2</sub> vs Ti d30 P<0.05, x Ti d1 vs Ti d30 P<0.05, xx Ti d3 vs Ti d30 P<0.05, xxx Ti d8 vs Ti d30 P<0.05, @ TiO <sub>2</sub> d1 vs TiO <sub>2</sub> d30 P<0.05, @@ TiO <sub>2</sub> d3 vs TiO <sub>2</sub> d8 P<0.05, @@@ TiO <sub>2</sub> d8 vs TiO <sub>2</sub> d30 P<0.05...	<b>103</b>
<b>Figura 50.</b> Efecto de los nanotubos de en la expresión de diferentes proteínas endoteliales, así como en la masa mitocondrial.....	<b>112</b>

<b>Figura 51.</b> Curvas de crecimiento de <i>S. aureus</i> en medio TSB. a) D.O. $\lambda_{600\text{ nm}}$ vs tiempo (h). b) $\text{Log}_{10}$ vs tiempo (h).....	<b>120</b>
<b>Figura 52.</b> $\text{Log}_{10}$ UFC/mL vs tiempo de incubación para cada uno de los sustratos experimentales. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de $\pm$ la desviación estándar. El valor P se obtuvo realizando un análisis de varianzas de una vía seguido un análisis de Tukey: * indica diferencia estadística entre $\text{TiO}_2$ vs Ti d1 $P < 0.05$ , ** indica diferencia estadística entre $\text{TiO}_2$ vs Ti a d3 $P < 0.05$ , *** indica significancia entre $\text{TiO}_2$ vs Ti a d5 $P < 0.05$ , # muestra la diferencia estadística entre $\text{TiO}_2$ d1 vs $\text{TiO}_2$ d3 $P < 0.05$ , @ señala cambios significativos entre Ti d1 vs Ti d3 $P < 0.05$ .....	<b>121</b>
<b>Figura 53.</b> Micrografías de SEM para <i>S. aureus</i> sobre cada uno de los sustratos a bajo aumento. a) $\text{TiO}_2$ d1. b) Ti d1. c) $\text{TiO}_2$ d3. d) Ti d3. e) $\text{TiO}_2$ d5. f) Ti d5. La barra de escala para todas las imágenes es de 5 $\mu\text{m}$ .....	<b>123</b>
<b>Figura 54.</b> Micrografías de SEM para <i>S. aureus</i> sobre cada uno de los sustratos a alto aumento. a) $\text{TiO}_2$ d1. b) Ti d1. c) $\text{TiO}_2$ d3. d) Ti d3. e) $\text{TiO}_2$ d5. f) Ti d5. La barra de escala para todas las imágenes es de 500 nm.....	<b>124</b>
<b>Figura 55.</b> Micrografías de AFM para <i>S. aureus</i> a 24h. a) Ti. b) $\text{TiO}_2$ . La barra de escala es de 5 $\mu\text{m}$ .....	<b>125</b>
<b>Figura 56.</b> Proteínas totales adsorbidas vs tiempo. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de $\pm$ la desviación estándar. El valor P se obtuvo realizando un análisis de varianzas de una vía seguido un análisis de Tukey: * indica significancia estadística entre Ti vs $\text{TiO}_2$ d1 $P < 0.05$ , ** diferencia estadística entre Ti vs $\text{TiO}_2$ d3 $P < 0.05$ , @ muestra las diferencias entre $\text{TiO}_2$ d1 vs $\text{TiO}_2$ d3 $P < 0.05$ , # diferencias entre Ti d1 vs Ti d3 $P < 0.05$ , ## diferencia significativa entre Ti d3 vs Ti d5 $P < 0.05$ .....	<b>126</b>

# **CAPÍTULO 1**

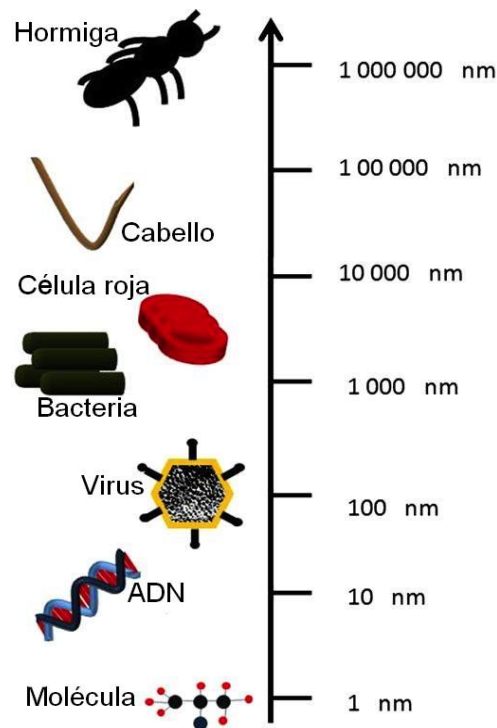
## **1. Introducción: historia de la nanotecnología.**

Conforme la tecnología ha avanzado, el ser humano ha tenido la oportunidad de dominar escalas más pequeñas de manera más precisa, lo cual le ha permitido manejar de forma más exacta el mundo microscópico. Uno de los primeros encuentros de la ciencia con la nanotecnología se originó en la conferencia titulada “There is a Plenty of Room at the Bottom” (En el fondo hay espacio de sobra), impartida en 1959 por Richard Feynman en el Instituto Tecnológico de California (1, 2). Pero la atracción no comenzó si no hasta mediados de los 80's con la publicación de Eric Drexler en 1986, con un tratamiento popular de los potenciales y las promesas de la nanotecnología (3). De acuerdo con la Iniciativa Nacional de Nanotecnología (siglas en ingles NNI) en los Estados Unidos de Norteamérica, nanotecnología se define como el desarrollo y la investigación de átomos, moléculas o macromoléculas a niveles inferiores a los 100 nm o  $100 \times 10^{-9}$  m (Figura 1) para crear estructuras y sistemas que tengan nuevas propiedades funcionales (1).

### **1.1 Nanomedicina.**

La nanomedicina es un área de la nanotecnología que a grandes rasgos se define como un exhaustivo monitoreo, control, construcción, reparación, defensa y mejora para todos los sistemas biológicos humanos, trabajando desde el nivel molecular por medio de dispositivos nanoestructurados, para alcanzar beneficios

médicos (4). Por lo tanto la nanomedicina opera a la escala de alrededor de 100 nm o menos que son dimensiones menores que las moléculas biológicas y las estructuras que se encuentran en el interior de la célula. Por ejemplo una proteína típica varía en tamaño en alrededor de 3 a 10 nm, mientras que una célula roja cuenta con un tamaño estándar de alrededor de 6000-8000 nm. La Figura 1 ilustra un ejemplo de diferentes objetos comparando sus dimensiones a escalas nanométricas.



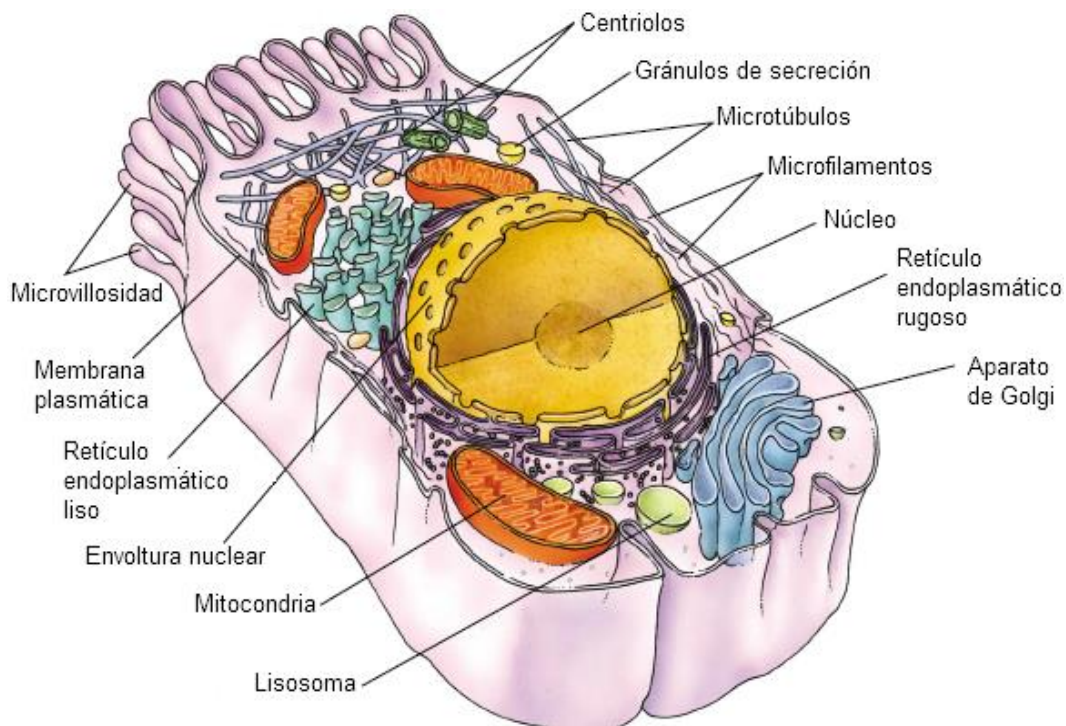
**Figura 1.** Cuerpos a diferentes escalas (4).

Interaccionando entre moléculas biológicas-sustratos nanoestructurados, la nanotecnología abre un amplio panorama en aplicaciones e investigaciones biomédicas. La interacción entre ensamblajes moleculares artificiales o nanodispositivos y la biomoléculas pueden ser comprendidos tanto en el medio

extracelular como en el interior de las células humanas. Por lo que operar a nanoescala nos permite explotar diferentes propiedades físicas como las observadas a microescala, las cuales comprenden la proporción volumen/superficie.

## 1.2 Célula y el compartimiento celular.

La unidad estructural y funcional de la vida en los organismos es la célula. En la Figura 2 podemos observar las características y los componentes complejos de una célula animal.



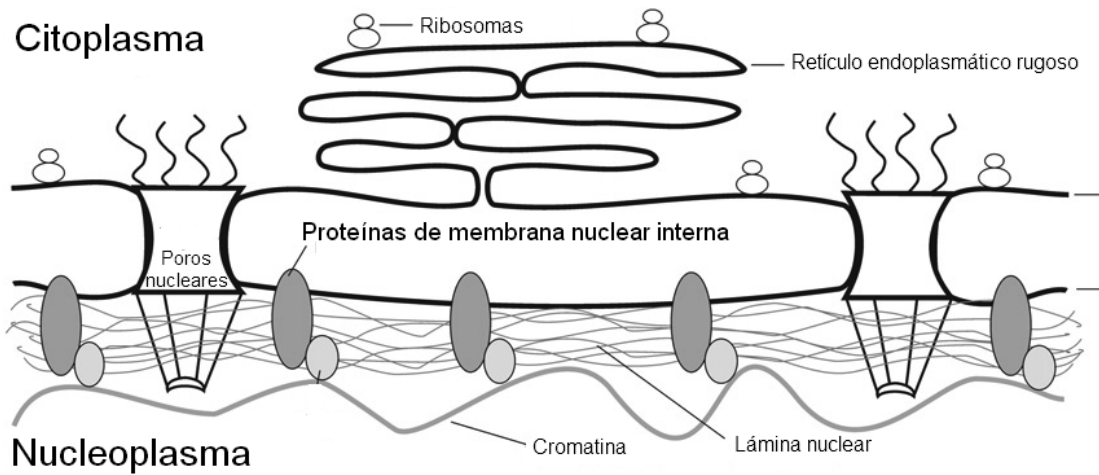
**Figura 2.** Ilustración esquemática tridimensional de una célula ideal (5).

Las células mamíferas son típicamente de 1-100  $\mu\text{m}$  de tamaño, y en general son de naturaleza esférica. Contienen su ADN encerrado dentro de una membrana como se muestra en la Figura 3, y a su vez contienen un citoplasma donde la mayoría de las reacciones metabólicas tienen lugar (6). Estas células se encuentran unidas unas a otras para formar tejidos de cuatro tipos generales (5, 7):

- *Tejido epitelial* – son células contiguas unidas estrechamente, que forman hojas y cubren o revisten el cuerpo.
- *Tejido conectivo* – es el principal encargado de brindar soporte estructural, medios para el intercambio de sustancias, proporcionar protección y defensa y brindar sitios para el depósito de grasa.
- *Tejido muscular* – son células alargadas las cuales conforman el músculo estriado o liso.
- *Tejido nervioso* – se encuentra organizado en sistema nervioso central (SNC), que comprende el encéfalo y la médula espinal y el sistema nervioso periférico (SNP), los cuales incluye los nervios craneales, nervios raquídeos y sus ganglios relacionados.

Además dependiendo del tipo específico de célula puede tomar diferentes formas, como son tubulares, elongadas, poligonales, ovaladas, etc (8). La forma de la célula dictará su función y se encuentra conformada principalmente por estímulos internos y externos (esto puede incluir estrés mecánico, tensión o

presión por interactuar con el ambiente externo o con biomoléculas de señalización).



**Figura 3.** Estructura de la envoltura nuclear (NE). La NE consiste de una membrana nuclear externa (ONM) continua con el retículo endoplasmático rugoso (RER) y una membrana nuclear interna (INM) (9).

La célula se encuentra constituida por organelos, los cuales son entidades subcelulares que se encuentran delimitadas por una membrana celular (10) y presentan una serie de funciones específicas, son como pequeños órganos que mantienen funcionando la célula.

Este trabajo se enfocará en los tres principales componentes involucrados en la adhesión, proliferación y morfología celular los cuales pueden ser descritos de manera completa en la referencia (6, 7, 10):

- *La membrana celular* – compuesta de una bicapa lipídica y una variedad de proteínas embebidas, regula el paso de moléculas e iones, administra el balance homeostático y delimita el espacio celular.
- *El citoesqueleto* – regula la morfología celular, organiza la relación de organelos y facilita el movimiento celular.

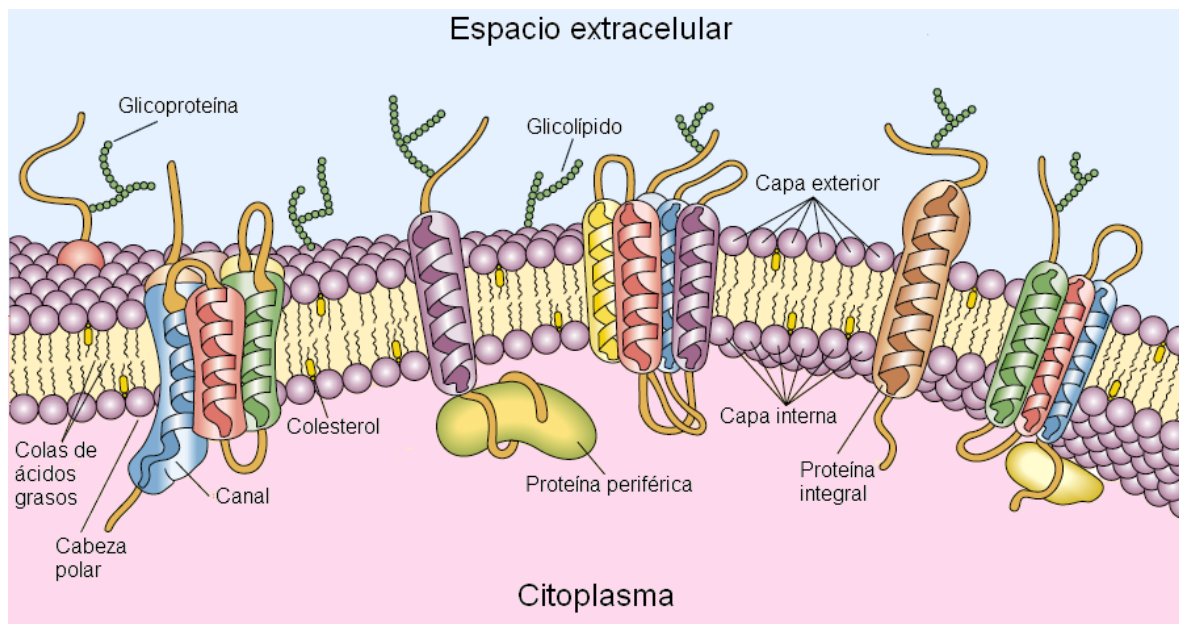
- *El núcleo* – es el contenedor de los ácidos nucleicos y control principal de las funciones celulares.

La membrana celular (Figura 4), también conocida como membrana plasmática, marca la frontera entre el espacio interior y exterior celular. Actúa principalmente como una barrera permeable y selectiva, en la cara exterior se encuentra enlazada la matriz extracelular (ECM) por medio de integrinas. Las integrinas son una gran familia de proteínas transmembranales que regulan la adhesión célula-matriz. Éstas son responsables de la comunicación del exterior celular al interior y viceversa, anclándose por la parte interna al citoesqueleto.

El citoesqueleto es el “sostén” celular, está conformado por proteínas que se encuentran en constante polimerización denominadas, filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios. También es responsable del movimiento celular, juega un papel muy importante en la división celular y permite el movimiento de organelos así como su organización. Por un extremo el citoesqueleto se ancla a la membrana celular y por el otro desemboca en el núcleo celular, asegurándolo por medio de los filamentos intermedios. El núcleo es el organelo más grande, metabólicamente activo durante el crecimiento y la diferenciación (6), es contenedor de los ácidos nucleicos y regulador de la función, crecimiento y morfología celular.

En función al enfoque de este reporte se hará una conexión entre la membrana celular, el citoesqueleto, y el núcleo de la siguiente forma:

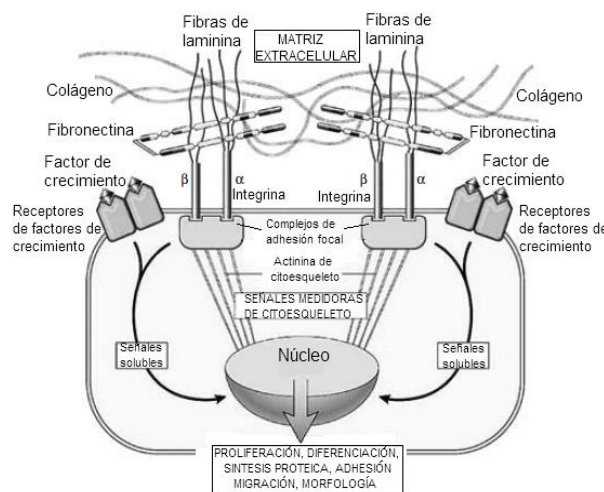
- I. La membrana celular se encuentra alterada en función a los estímulos externos que reciba por medio del contacto con la ECM, como puede ser la interacción con las superficies.
- II. Esto ocasiona que las proteínas transmembranales, como las integrinas, manden y reciban mensajes a través de los filamentos intermedios del citoesqueleto.
- III. El citoesqueleto adopta la forma celular y realiza el arreglo proteico en función a los mensajes enviados o recibidos en forma de moléculas de señalización o fuerzas de estrés, los cuales llegarán al núcleo.
- IV. El núcleo ocasiona cambios en la función celular como son proliferación, división celular, morfología, etc.



**Figura 4.** Representación esquemática de la membrana celular (5).

### 1.3 Papel de la matriz extracelular.

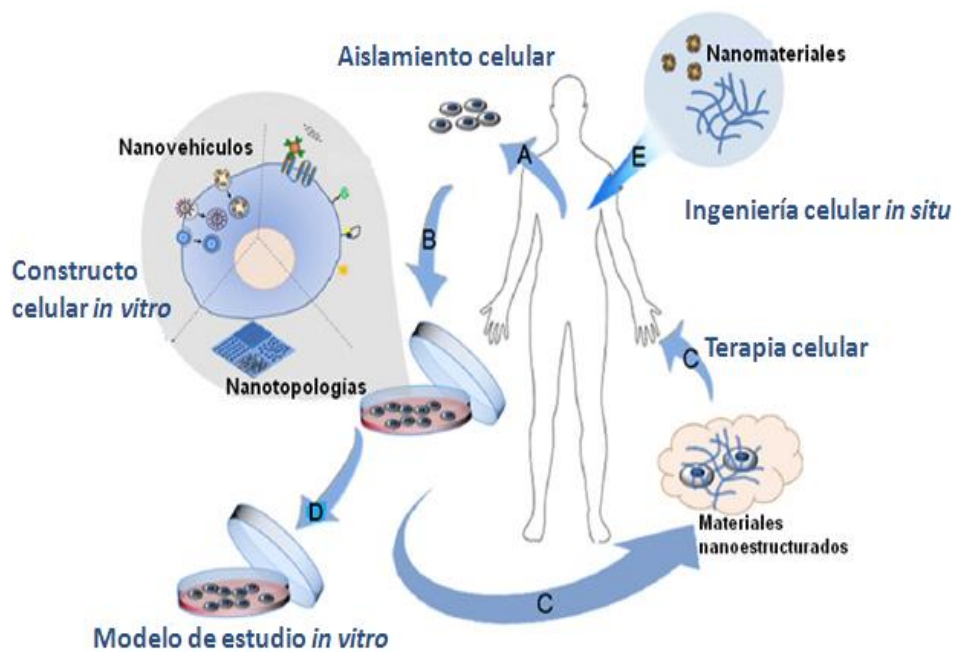
La matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) es el material biológico producido que da soporte y reside entre las células. La ECM (constituida por fibras de colágeno, laminina y fibronectina principalmente) mantiene a las células unidas unas a otras, permite que se comuniquen unas con otras, organiza las células en los tejidos y coordina las funciones celulares por medio de vías de activación intracelulares (ej. control del crecimiento celular, proliferación y expresión de genes) o estimulaciones físicas (ej. flujo de fluido biológico, presión, fricción) por medio de proteínas como son integrinas (7, 10). Las interacciones entre la ECM y el citoesqueleto se realizan por medio de integrinas (como se ilustra en la Figura 5) para dar la formación de complejos de adhesión focal, los cuales son capaces de mediar señalizaciones nucleares. Este trabajo se enfoca en la cantidad y la morfología de la ECM producida sobre superficies nanoestructuradas y la evaluación de algunos de los puntos celulares anteriormente mencionados.



**Figura 5.** Interacción entre el exterior celular y el núcleo por medio de integrinas de matriz extracelular (7, 11).

## 1.4 Biomateriales nanoestructurados para interacciones celulares.

La medicina regenerativa tiene un gran potencial para enfrentar retos clínicos reparando o reemplazando tejidos dañados con partes funcionales (12-14), como se puede observar en la Figura 6. Un biomaterial nanoestructurado para aplicaciones médicas, puede ser definido como un material tal que, (i) posee características claramente definidas en el rango nanométrico (<100 nm) y, (ii) sus propiedades nanoestructurales brindan características cruciales al material (15). Además H. Chen *et al.*, en su revisión asegura que la escala subcelular de los nanomateriales garantiza la interacción molecular de las células brindando una superior citocompatibilidad y bioactividad.



**Figura 6.** Aplicación de los nanomateriales en la terapia de ingeniería tisular (14).

Los biomateriales nanoestructurados son capaces de imitar las propiedades topográficas de la ECM de tejidos naturales (16-18). La aplicación de los biomateriales nanoestructurados en la ingeniería tisular son los andamios para crecimiento celular, vehículos para liberación de biomoléculas y como nanodispositivos para biosensores (14, 19, 20), los cuales son capaces de potenciar la tasa de población celular como se observa en la Figura 7.

## **1.5 Ingeniería de tejidos.**

*“Entonces el Señor Dios hizo caer un sueño profundo sobre el hombre, y este se durmió; y Dios tomó una de sus costillas, y cerró la carne en ese lugar. Y de la costilla que el Señor Dios había tomado del hombre, formó una mujer y la trajo al hombre” [Genesis 2:21].*

El término “ingeniería de tejidos”, fue introducido en 1987 durante la convención de la Fundación Nacional de Ciencias en los Estados Unidos (21). La ingeniería de tejidos emplea los aspectos de ingeniería tisular y transplantología, ciencia de materiales e ingeniería biomédica, para el desarrollo de sustitutos biológicos que puedan restaurar y mantener la función normal de tejidos y órganos dañados (22). Algunas vías para lograrlo incluyen técnicas de inyección de células funcionales en el sitio del tejido u órgano no funcional para estimular la regeneración y/o el uso de materiales biocompatibles para crear nuevos tejidos u órganos, por lo tanto los dos componentes más básicos en la estrategia en ingeniería tisular son las células y los biomateriales.

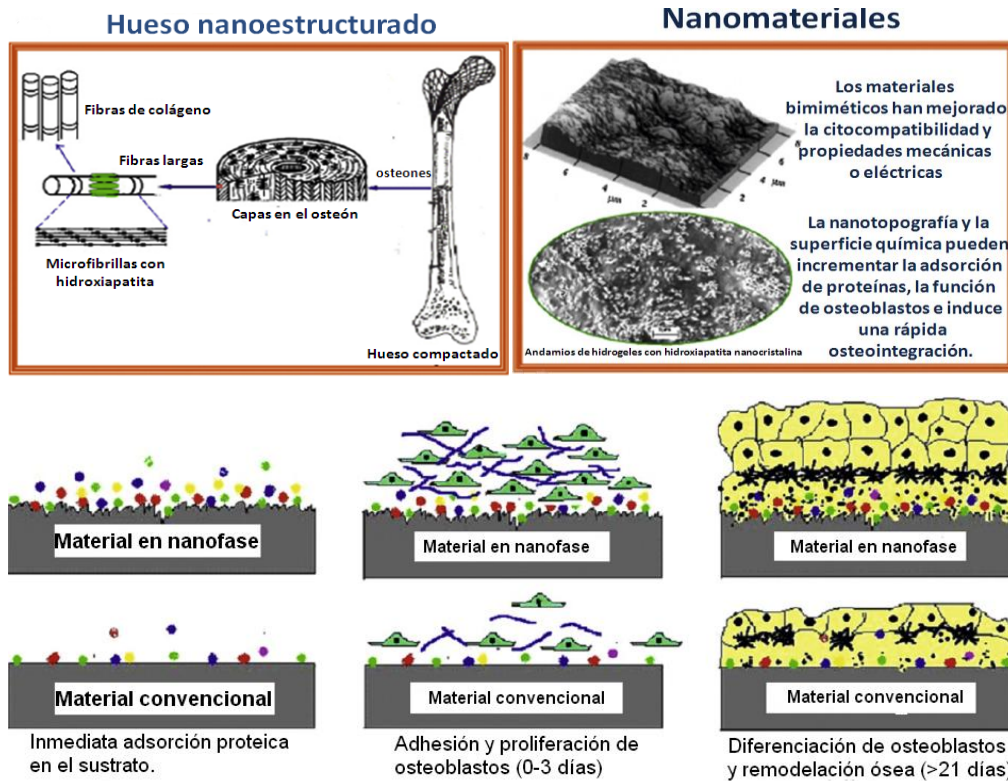
El uso o introducción de células es diseñado para estimular la regeneración, promover vascularización, y/o suplementar la producción de hormonas y factores de crecimiento (22). Por otra parte, los biomateriales, los cuales incluyen matrices tanto naturales como sintéticas (comúnmente llamados “andamios”), son herramientas muy importantes en la medicina regenerativa. Para guiar la dirección del crecimiento de tejido nuevo y proveer el ambiente propio para restaurar la estructura y función, los biomateriales pueden introducir factores bioactivos o atraer células y factores de crecimiento del cuerpo seguido el periodo de implantación (23-26).

## **1.6 Nanotopografías.**

Los nanomateriales pueden ser hechos de metales, cerámicos, polímeros, materiales orgánicos y compósitos. También se incluyen nanopartículas, nanoclusters, nanocristales, nanotubos, nanofibras, nanohilos, nanobarras, nanopelículas, etc. Para la fabricación de nanomateriales se encuentra disponible una amplia variedad de técnicas como son electrospinning, separación por fases, procesos de auto-ensamblaje, deposición de capas delgadas, deposición por vapores químicos, raspado químico, nano-impresión, fotolitografía y oxidación anódica (27, 28).

Al reducir el tamaño del material a nanoescala, se incrementa dramáticamente el área superficial, la rugosidad de superficie y la proporción entre área y volumen (29). Dada esta modificación el material puede adquirir propiedades fisicoquímicas superiores (ej., mecánicas, eléctricas, ópticas,

catalíticas, propiedades magnéticas, etc.). Las nanoestructuras pueden ser desarrolladas o auto-ensambladas en nanofibras/nanotubos los cuales son capaces de simular las dimensiones de las entidades naturales, como las fibras de colágeno (27).



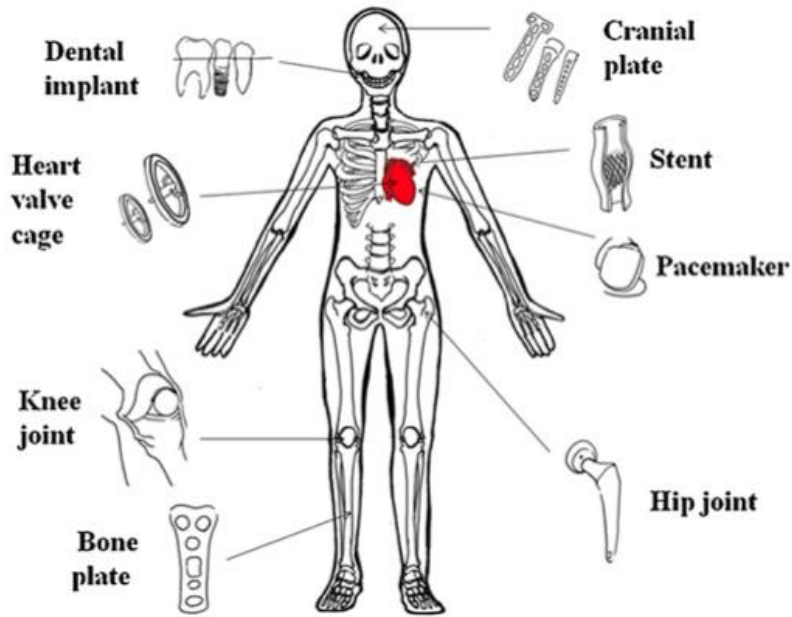
**Figura 7.** Ventajas de los nanomateriales (27).

## 1.7 Titanio - nanotubos $TiO_2$ para regeneración tisular.

Un implante médico se define como un dispositivo hecho de uno o mas materiales que son intencionalmente colocados en el cuerpo, de manera total o parcial (30). Los primeros implantes utilizados para reemplazar partes faltantes de la mandíbula o los dientes datan de la era pre-Colombina, después de 1492 (31).

El primer implante industrial fue elaborado de materiales provenientes de la industria constituidos de oro, plata, aluminio o porcelana (31). Pero presentaban marcadas reacciones a cuerpo extraño o reacciones inflamatorias con la formación de tejido fibroso, por lo que la mayoría de ellos ya no son utilizados como implantes médicos (31).

El titanio (Ti) y sus aleaciones han sido utilizados como numerosos implantes médicos incluyendo remplazos de hueso y uniones de articulaciones, implantes dentales, prótesis, implantes cardiovasculares y en tratamientos craneofaciales (32, 33) como se observa en la Figura 8. También han sido ampliamente utilizados como materiales debido a sus favorables propiedades, como son menor módulo, buena resistencia a la tracción, excelente biocompatibilidad y una resistencia mejorada a la corrosión comparado con las aleaciones de acero inoxidable 316L y aleaciones de Co-Cr (34-40). En términos de efectos nanotopográficos en el comportamiento celular, se ha observado que las cerámicas, como es el óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) (41) con diferentes nanoestructuras superficiales, es capaz de estimular la tasa de crecimiento tisular y la capacidad para la formación ósea (42-46). Además se ha observado que la síntesis de  $\text{TiO}_2$  nanoestructurado como nanotubos, nanohilos y nanofibras, han sido de gran interés debido a la alta proporción superficie/volumen y su habilidad para inducir un gran estímulo biológico, comparado con las microestructuras convencionales (40). El  $\text{TiO}_2$  nanoestructurado también ha sido ampliamente utilizado en varias aplicaciones como son biosensores, celdas solares, fotocatalizadores, fotoelectrólisis y biomateriales.



**Figura 8.** Aplicación biomédica del titanio y sus aleaciones (40).

En este proyecto haremos énfasis en el uso de los nanotubos de óxido de titanio, fabricados por métodos electroquímicos (oxidación anódica), con la finalidad de incrementar el área superficial del andamio, mejorar las propiedades mecánicas anteriormente mencionadas y aumentar la susceptibilidad a la adhesión, proliferación, biocompatibilidad, estimular la síntesis mitocondrial y conservar la morfología celular del tejido que crezca sobre esta superficie, y a la vez disminuir la tasa de adhesión y crecimiento bacteriano demostrando las propiedades antisépticas de los nanotubos de titanio.

## 1.8 Objetivos

Los objetivos globales de este trabajo son:

- 1) Investigar de manera sistemática los efectos de los nanotubos de titanio en el comportamiento celular *in vitro* por medio de diferentes técnicas de análisis bioquímico y microscópico, para en conjunto optimizar las superficie del implante y
- 2) Demostrar el potencial de los nanotubos como superficies antisépticas para disminuir la tasa de proliferación bacteriana en estas superficies.

Para lograr estos objetivos, es necesario cumplir con las metas siguientes:

- a) Obtención de osteoblastos provenientes de biopsias de periostio de fémur porcino para su expansión en el laboratorio.
- b) Extracción de condrocitos provenientes de cortes de cartílago articular porcino para propagarlos en el laboratorio.
- c) Obtención de células endoteliales de arteria coronaria provenientes de una línea celular establecida.
- d) Aplicar técnicas sustentables para la medición de la respuesta de celular a las superficies de nanotubos de titanio.
- e) Explicar la respuesta celular a las superficies de nanotubos de titanio.
- f) Evaluar las propiedades antisépticas de nanotubos de titanio por medio de análisis instrumental y microscópico.

Este estudio brinda evidencia de la importancia de la investigación en nanomedicina para mejorar y promover el conocimiento entre la relación tejido – nanomaterial. Además fortalecerá el estudio de la ingeniería de tejidos y la importancia de los nanomateriales para ser utilizados en el ámbito clínico y así brindar mejores beneficios terapéuticos.

## **CAPÍTULO 2**

### **2.1 Consideraciones en implantes ortopédicos y dentales para oseointegración.**

El hueso es el mayor tejido conectivo en el cuerpo humano y es el mayor constituyente del esqueleto (47-49). Está formado por osteoblastos (células precursoras de hueso), osteoclastos y células endoteliales que son los principales productores de los componentes orgánicos e inorgánicos de la ECM, los cuales incluyen colágeno tipo I y proteoglicanos como constituyentes orgánicos (47, 48). La matriz inorgánica contiene predominantemente Ca y P, aparentemente como cristales de hidroxiapatita depositados en la matriz de colágeno (47, 49).

Desde que la esperanza de vida se ha ido incrementado, la necesidad de mejores tratamientos para enfermedades óseas se han vuelto indispensables, por ejemplo la osteoporosis, la cual se define por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad sistémica del músculo esquelético caracterizada por la disminución en la cantidad de hueso y anomalías en la microestructura, la cual es capaz también de afectar el proceso de oseointegración (50), provocando la falla de materiales dentales y ortopédicos, por lo que es muy importante la mejora de materiales médicos para el tratamiento de patologías óseas y a la vez promover la regeneración de nuevo hueso.

Se sabe muy bien que el Ti y sus aleaciones son materiales dentales y ortopédicos biocompatibles, que ofrecen baja toxicidad, resistencia a la corrosión y propiedades favorables mecánicas. Pero un problema muy importante con el Ti

puro es que en muchas ocasiones actúa como un biomaterial inerte al ser implantado, encapsulándose por la formación de tejido fibroso para así aislarlo de los tejidos adyacentes (51). Esto se dice que es debido a una pequeña capa de  $\text{TiO}_2$  que se forma sobre la superficie (52). Dicha capa de algún modo esta compuesta de una suave y a la vez densa capa de  $\text{TiO}_2$  la cual es susceptible a la formación de tejido fibroso, prohibiendo a las células osteoblásticas formar una firme adhesión sobre la superficie y, esto puede ocasionar inflamación y la perdida del implante (53).

Se sabe que la reacción entre el implante de Ti y el nuevo hueso forma un papel muy importante en la preparación de implantes ortopédicos y dentales. Por lo que recubrimientos de materiales bioactivos como son hidroxiapatita y fosfatos de calcio son comúnmente utilizados en superficies de Ti para tornar la superficie mas bioactiva (43, 54, 55). Pero el gran inconveniente de estas técnicas es la formación de recubrimientos continuos planos, lo que vuelve difícil mantener al recubrimiento adherido al Ti debido a diferencias en el módulo mecánico ocasionando fallas en la interface hueso-implante o en la de titanio-hidroxiapatita (56, 57) por lo cual tiende a fallar la unión del implante y el hueso (58).

Las nanoestructuras recientemente han sido de gran interés debido a la alta proporción volumen-superficie y al alto grado de plasticidad biológica que ofrecen comparado con las microestructuras (42). En términos de desarrollo de biomateriales y tecnología de implantes la respuesta celular puede ser afectada por las cuestiones topográficas. Recientemente Webster et al. reportó que la bioactividad y adhesión de osteoblastos en cerámicas de titania o alumina

nanogranuladas mejoran entre un 20 – 30%, comparados con cerámicas de tamaño de grano mayor (59, 60).

Entonces así como para los nanogranulados, también se ha reportado que los nanotubos de  $\text{TiO}_2$  presentan una excepcional biocompatibilidad y disminuyen la adhesión de macrófagos a la superficie del implante. Los nanotubos de 70 – 100 nm generalmente se aceptan por poseer una buena biocompatibilidad, sin embargo aun sigue habiendo controversia respecto al diámetro óptimo de los nanotubos para aplicaciones biomédicas.

Por lo tanto, en función de optimizar las superficies de los implantes de Ti de uso médico, se evaluaron las superficie de Ti sin ninguna modificación superficial comparando contra la superficie de nanotubos de  $\text{TiO}_2$  con un diámetro de 80 nm, en función de optimizar la respuesta de osteoblastos. En esta sección se evalúa el comportamiento de osteoblastos en términos de biocompatibilidad, adhesión, proliferación, morfología celular, topografía y cuantificación relativa de ADN celular cultivados sobre Ti y  $\text{TiO}_2$  de 80 nm de diámetro. Se reporta que las superficies de  $\text{TiO}_2$  de 80 nm de diámetro tienen la capacidad de potenciar los efectos celulares de osteoblastos mediados por la superficie comparado contra Ti y superficies de nanotubos de  $\text{TiO}_2$  de 30 – 70 nm de diámetro reportados en la literatura (42).

## **2.2 Fase experimental**

### ***Fabricación de nanotubos de TiO<sub>2</sub>***

Para los siguientes experimentos, se utilizaron unos discos de la aleación Ti6Al4V los cuales fueron proporcionados por el Laboratorio de Corrosión y Materiales del Instituto de Ingeniería de la UABC, Mexicali. Los especímenes consistieron en discos de 1.5 cm de diámetro de la aleación de titanio que fueron anodizados en una solución acuosa superoxidante activada con fluoruros a potenciales de 20 V durante 5 minutos y utilizando como contraelectrodo una malla de platino. Las muestras utilizadas para todos los experimentos antes de ser manipulados se les aplicó un proceso de lavado ultrasónico para eliminar las trazas de fluoruros y 3 lavados con agua destilada, 5 minutos por cada lavado, y al finalizar se esterilizaron bajo la luz de una lámpara UV por 30 minutos cada cara del disco. Estos discos se modificaron electroquímicamente para formar sobre la superficie nanotubos de TiO<sub>2</sub> de 80 nm de diámetro. Discos de Ti planos cortados en tamaños idénticos sin ningún proceso electroquímico fueron utilizados como controles.

### ***Microscopía electrónica de barrido***

La morfología estructural de los nanotubos de TiO<sub>2</sub> y de las muestras de Ti sin tratamiento electroquímico fueron examinadas por microscopía electrónica de barrido (SEM; JSM-6010LA, JEOL).

### ***Espectroscopia de energía dispersiva***

La composición química de la superficie para los especímenes de nanotubos de TiO<sub>2</sub> y Ti se analizaron por medio de espectroscopia de energía dispersiva (EDS; JSM-6010LA, JEOL), equipo el cual se encuentra acoplado a un SEM.

### ***Microscopía de fuerza atómica de las muestras***

Se utilizó un microscopio de fuerza atómica (AFM; Quesant Q-Scope 350, AMBIOS, Agura Hills, Ca, USA) para llevar a cabo las mediciones topográficas de los nanotubos de TiO<sub>2</sub> y de Ti sin tratamiento. Las mediciones para los nanotubos de TiO<sub>2</sub> y Ti sin tratamiento se llevaron a cabo a temperatura ambiente, utilizando una cámara acústica para prevenir ruidos electromagnéticos los cuales puedan afectar las condiciones. Se utilizó un escáner de 20- $\mu\text{m}$  equipado con una punta de silicio de 10 nm de curvatura para todas las mediciones. Las imágenes topográficas fueron obtenidas operando en modo de contacto y el área de escaneo fue de 25  $\mu\text{m}^2$ .

### ***Aislamiento y Cultivo celular***

Para la realización de este estudio se utilizaron osteoblastos provenientes de cerdo (PPO) raza Landrace x Yorkshire recién nacidos, los cuales fueron

proporcionados por la granja porcina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

El aislamiento de periostio se realizó de la siguiente manera:

- Se recibieron los cerdos previamente sacrificados a los cuales se les desarticularon las cuatro extremidades.
- Las extremidades se colocaron en recipientes con solución de yodo al 50% y se almacenaron a 4°C por toda la noche (8 a 12 hrs aproximadamente).
- Al día siguiente fueron descongeladas para iniciar con el aislamiento.
- Previa asepsia, antisepsia y con la ayuda de un bisturí con hoja del número 20 se realizó un corte lineal de 10cm en la zona correspondiente al fémur; incidiendo piel, fascia y músculo hasta llegar a tejido óseo, separando los tejidos blandos con un par de pinzas Kelly para obtener una visión directa del periostio.
- Se realizó un corte sobre el periostio para facilitar el anclaje de un desperiostizador, a continuación se elevó el periostio con ayuda de una pinza de disección y se procedió a la toma de una muestra de 0.5cm<sup>2</sup> de periostio.
- Se colocó la muestra de periostio en un tubo cónico de 50 ml con amortiguador salino de fosfatos (1x PBS)/ 10% de antibiótico-antimicótico.

Para el cultivo de periostio en el laboratorio se realizó la técnica de cultivo por explante de la siguiente manera:

- En el interior de una caja de Petri se colocó el tejido y se lavó tres veces con PBS/Antibiótico-antimicótico.

- Con la ayuda de un bisturí y unas tijeras, se cortó el tejido en pedazos de 5-10 mm sin perder de vista la cara íntima que estuvo en contacto al hueso.
- Se colocaron de 10 – 20 trozos de tejido en un plato tratado para cultivo celular de 35 mm (Falcon, Beckton Dickenson) y se les colocaron 100 µl de Dulbecco's Modifide Eagle Medium – Ham's F 12 (DMEM-F12; Gibco-Invitrogen, USA), suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF; Gibco-Invitrogen) y 1% penicilina/estreptomicina (PS; Gibco-Invitrogen, USA).
- Se pusieron a incubar a 37°C, 5% v/v por 1 h.
- Al finalizar el tiempo de incubación, se agregó medio de cultivo hasta cubrir los explantes, y se almacenó en la incubadora cuidando que no se despeguen por 7 días o hasta obtener confluencia.

Una vez alcanzada la confluencia, se expandieron los osteoblastos de los periostios de fémur, se despegaron las células que crecieron a partir de los explantes y se resembraron en cajas nuevas usando el siguiente procedimiento:

- Se aspiró el medio de cultivo viejo.
- Se lavó con 4 ml de PBS 1X pH 7.4, se adicionó de 1 – 2 ml de tripsina/EDTA 0.25% (Gibco-Invitrogen, USA) y se incubó a 37°C por 5 minutos, para despegar las células presentes en la caja.
- Con la ayuda de una pipeta serológica se agregaron 4 ml de Albumina 25% en PBS 1X pH 7.4, por 1 minuto y se retiró la solución para transferirse a un tubo cónico de 15 ml.

- Se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C para formar un pellet celular.
- Con el apoyo de una bomba de vacío, se aspiró el sobrenadante, teniendo cuidado de no tocar el pellet, y se resuspendió con 5 ml de DMEM-F-12 + 1 % v/v Antibiótico.
- Se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C.
- Al finalizar el tiempo, se formó un pellet celular. Se aspiró el sobrenadante teniendo cuidado de no tocar el pellet, y se resuspendió con 5 ml de DMEM-F-12+10% v/v SBF+1% v/v Antibiótico.
- Posteriormente se sembraron 500,000 células/ml en una caja de T-25, y se incubaron a 37°C, 5% v/v CO<sub>2</sub> hasta que se alcanzó el 80% de confluencia celular.

Lograda la confluencia celular en las cajas de cultivo, las células se despegaron nuevamente utilizando el procedimiento anterior, y se sembraron ~50,000 células/ml en los sustratos de interés (TiO<sub>2</sub> y Ti), los cuales fueron colocados en cajas de poliestireno de 12-pozos estériles (Corning, USA), y se almacenaron en incubadora a 37°C, 5% v/v CO<sub>2</sub> hasta cumplir con los tiempos establecidos para cada ensayo.

### ***Ensayo de biocompatibilidad de células cultivadas.***

En función de observar y contar los osteoblastos vivos adheridos en los especímenes experimentales, se realizó el estudio de viabilidad. Para llevar a cabo

el análisis se utilizó el tinción *live/dead viability/cytotoxicity assay* (Molecular Probes), que se basa en la determinación de células vivas y muertas por medio de dos análisis: actividad de la esterase para calceína-AM y el ensayo de homodímero de etidio-1 para integridad de la membrana celular. Brevemente alcanzando las 72 h de cultivo sobre los sustratos, se lavaron con PBS 1X y se colocaron a incubar por 30 minutos en una mezcla de 1mM de calceína-AM y 2 mg/ml de homodímero de etidio-1 en solución balanceada de Hanks con rojo de fenol (Gibco-Invitrogen, USA), y finalizando el tiempo se lavaron nuevamente. Después las muestras se invirtieron y se colocaron en un cubreobjetos, se montaron, se visualizaron y se fotografiaron utilizando un filtro verde (células vivas) y uno rojo (células muertas) del microscopio de fluorescencia (Axio Observer A1, Carls Zeiss, USA).

### ***Adhesión y proliferación celular***

Para la prueba de adhesión y proliferación celular, se dejaron crecer los osteoblastos sobre los sustratos por 24 y 72 h respectivamente. Alcanzando los tiempos, se retiraron las muestras de incubadora, y se lavaron con PBS 1X para remover las células que no se adhirieron. Posteriormente se realizó la tinción con 4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1:10,000 Molecular Probes, USA). Los números de núcleos fueron observados y fotografiados utilizando un filtro azul (DAPI) del microscopio de fluorescencia (Axio Observer A1, Carls Zeiss, USA), utilizando 5 campos aleatorios diferentes para cada uno de los sustratos a sus respectivos tiempos.

### ***Morfología celular analizada por SEM***

Después de 24, 72, y 120 h de incubación, se fijaron las células a los sustratos con glutaraldehído 5 w/v% (Sigma, USA) en PBS a 25°C por 2 h. Después de la fijación, se lavaron 3 veces con PSB 1X (10 minutos cada lavado). Luego las células se deshidrataron en gradientes de etanol (50, 70, y 100% v/v) por 5 minutos cada uno y se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente. Consecutivamente las muestras se recubrieron con 8 segundos de oro para el análisis en SEM. Las muestras se almacenaron a 4°C hasta el día del análisis. Se utilizó el SEM (JSM-6010LA, JEOL) para analizar la morfología de las células adheridas.

### ***Topografía celular analizada por AFM***

A las 72 h de incubación, se manejó un AFM (Quesant Q-Scope 350, AMBIOS, Agura Hills, Ca, USA) para analizar la topografía de las células incubadas en nanotubos de TiO<sub>2</sub>. Los especímenes con las muestras se llevaron al AFM y se examinaron utilizando un escáner de 20- $\mu$ m equipado con una punta de silicio con una curvatura de 10 nm. Además, las células fueron escaneadas a 1Hz en una región de 10 x 10  $\mu$ m en un ángulo de 0°. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente bajo un periodo de 20- a 30- minutos.

### ***Análisis de datos para elongación y área nuclear***

Para cuantificar las diferencias entre la morfología nuclear observada en osteoblastos sobre los diferentes sustratos a 24 h de incubación, se midió la anchura y la longitud por medio de la barra de escala y la relación entre longitud/anchura se utilizó como la proporción de la elongación, al igual se midió el área de propagación nuclear. Las mediciones se realizaron utilizando el software Image J (1.48v5 NIH, USA).

### ***Cuantificación de ADN nuclear***

La cantidad de ADN nuclear total producido en osteoblasto cultivados a 24h sobre los sustratos de TiO<sub>2</sub> vs. Ti se evaluaron cuantificando la cantidad de fluorescencia emitida por la tinción de núcleos DAPI. Las cuantificaciones se efectuaron utilizando el software Image J (1.48v5 NIH, USA).

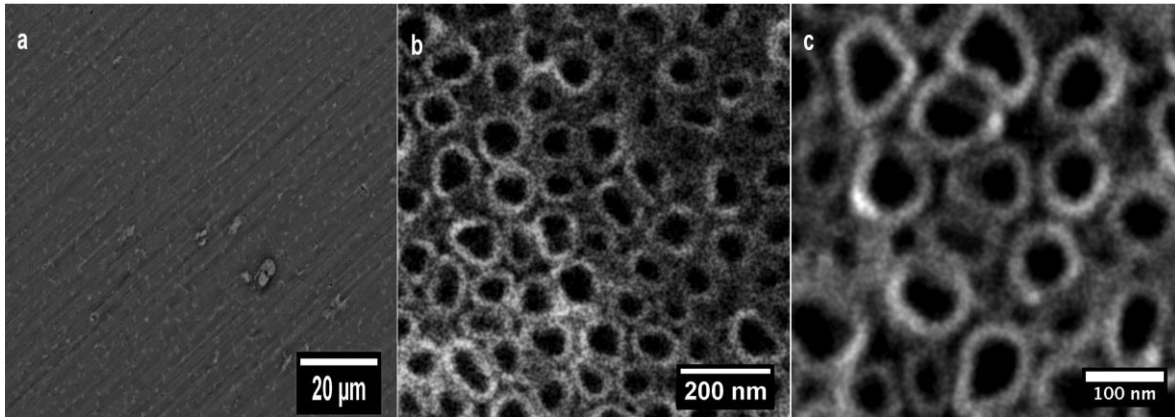
### ***Análisis estadístico y gráficas con barras de error***

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron tres veces. Los datos numéricos fueron analizados utilizando el software estadístico Prism 6 (2013), el cual se especializa en análisis y presentación de datos científicos para demostrar la significancia estadística para cada uno de los ensayos. Las gráficas muestran las barras de error como  $\pm$  la desviación estándar asociada con el tamaño de la muestra o los valores N mostrados en una caja en la

porción superior de cada gráfica. Para evaluar la relevancia de los datos, se utilizó una prueba t-test para muestras apareadas o análisis de varianza de una ó dos vías (one-way or two-way ANOVA) seguido de una prueba de Tukey en función del tipo de datos. El valor P se empleó para demostrar la significancia estadística donde  $P < 0.05$  se considera estadísticamente significativo y se describe en la leyenda de cada Figura.

## 2.3 Resultados

La Figura 9 muestra la caracterización morfológica de las superficies utilizadas en esta tesis. La Figura 9a, ilustra una superficie de Ti plana utilizada como sustrato de referencia. Seguido al proceso de anodización electroquímica, se confirma la presencia de una capa nanotubos alineados y distribuidos de manera uniforme sobre toda la superficie, observándose a baja magnificación (imagen panorámica; Figura 9b), y se observa de manera mas precisa la morfología de los nanotubos de  $\text{TiO}_2$  en la Figura 9c, la cual ilustra la nanoestructura a alta magnificación. El diámetro de los nanotubos de  $\text{TiO}_2$  se estimó utilizando la barra de escala de las imágenes de SEM en aproximadamente 80 – 90 nm, el cual cumple con las condiciones establecidas para los objetivos de este estudio.

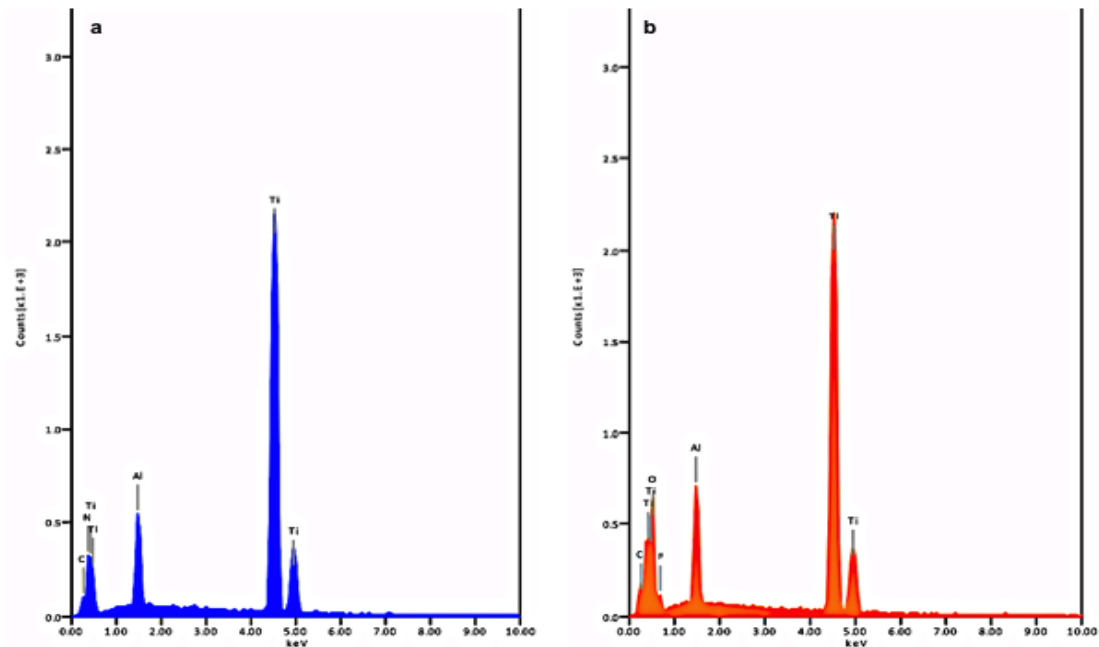


**Figura 9.** Micrografía de SEM para los nanotubos de  $\text{TiO}_2$  y Ti sin anodizar. (a) Ti plano sin anodizar, magnificación 1200x. (b) Caracterización física de los nanotubos de  $\text{TiO}_2$ , magnificación 65,000x. (c) Nanotubos de  $\text{TiO}_2$ , magnificación 120,000x. Las imágenes de  $\text{TiO}_2$  muestran nanotubos altamente ordenados.

Por otra parte se efectuaron análisis de EDS para examinar la composición elemental de cada una de las superficies de las muestras, donde presentamos el espectro de EDS que nos brinda el espectrofotómetro (Figura 10) y un resumen de la composición elemental (Tabla 1) para facilitar el análisis. Podemos observar la presencia de una elevada tasa de oxígeno para la muestra anodizada, esto debido a la formación de una capa de óxido más gruesa.

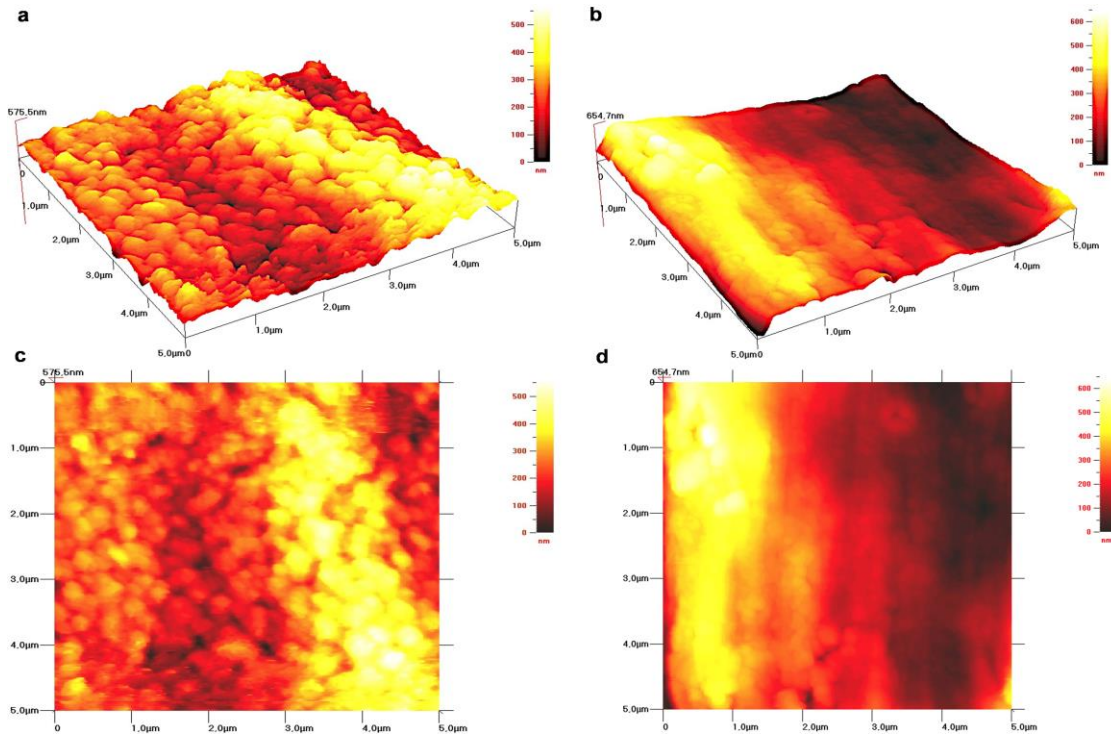
**Tabla 1.** Composición elemental de las diferentes superficies calculada por el análisis de EDS.

% Atómico	C (%)	N (%)	Al (%)	Ti (%)	O (%)	F (%)
Nanotubos de $\text{TiO}_2$	3.90	-	5.40	61.91	25.51	3.28
Ti sin tratamiento	3.45	3.38	6.06	87.11	-	-
Diferencias elementales	0.45	3.38	0.66	25.2	25.51	3.28



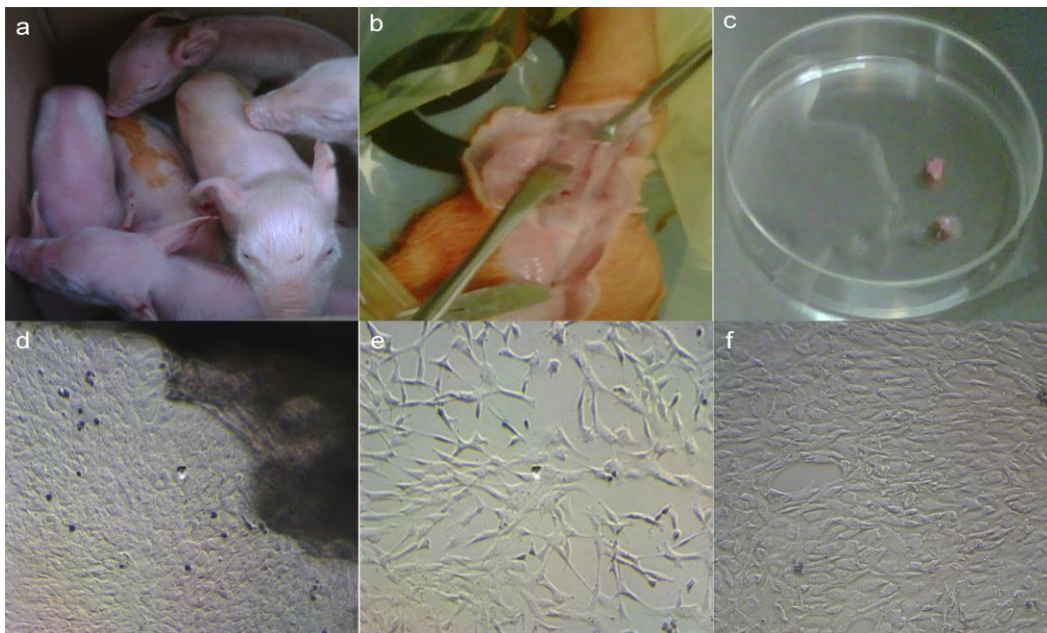
**Figura 10.** Espectro de EDS para las muestras de Ti sin tratamiento y nanotubos de  $\text{TiO}_2$ . (a) Ti sin tratamiento. (b) Nanotubos de  $\text{TiO}_2$ .

Sin embargo se realizó AFM para los especímenes con la finalidad de estudiar los cambios en la topografía de los sustratos el cual se presenta en la Figura 11. El titanio sin anodizar muestra una topografía suave y plana comparado con los nanotubos de Ti (Figura 11b; Figura 11d). Para la superficie de  $\text{TiO}_2$ , se ilustra una superficie rugosa, con una topografía de forma tubular a lo largo del campo de análisis (Figura 11a; Figura 11c), brindando evidencia de las características nanotubulares y de la rugosidad para los nanotubos de Ti y apoyando las imágenes observadas en SEM.



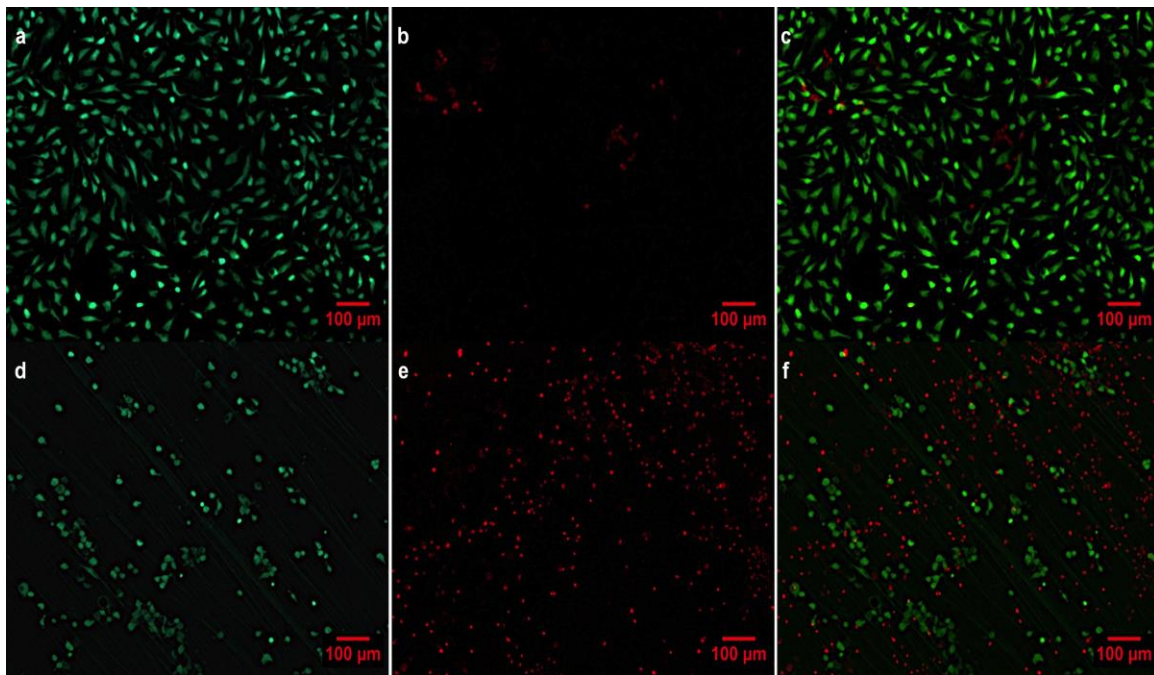
**Figura 11.** Micrografías de AFM que muestran la topografía Ti sin tratamiento y nanotubos de  $\text{TiO}_2$ . a) Imagen 3D de los nanotubos de  $\text{TiO}_2$ . b) Vista 3D de la superficie de Ti sin tratamiento. c) Top view de los nanotubos de  $\text{TiO}_2$ . d) Top view de Ti sin tratamiento. El área de escaneo es de  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ .

Terminando con la caracterización física de los materiales, procedimos con la recolección de cerdos raza Landrace x Yorkshire (Figura 12a), a continuación iniciamos la fase quirúrgica para la obtención de periostio femoral (Figura 12b), el cual se cultivó por la técnica de explante permitiéndonos obtener osteoblastos en pasaje 0 (Figura 12c y d), a continuación se expandieron obteniéndose células de pasaje 1 las cuales fueron utilizadas para todos los experimentos (Figura 12e y f).



**Figura 12.** Procedimiento para la obtención de osteoblasto. a) Cerdos raza Landrace x Yorkshire recién nacidos seleccionados para el experimento. b) Periostioplastía femoral. c) Preparación de periostios para el cultivo de osteoblastos. d) Explante a los diez días de incubación, observándose proliferación de osteoblastos. e) Pasaje 1 de osteoblastos sub-confluentes proveniente de periostio. f) Pasaje 1 de osteoblastos confluyente, presentando la formación de una monocapa.

Finalizados los cultivos para expandir las células, se sembró sobre las superficies experimentales, y se evaluó la biocompatibilidad osteoblástica con los sustratos llevando a cabo la tinción de vida/muerte, la cual se muestra en la Figura 13.

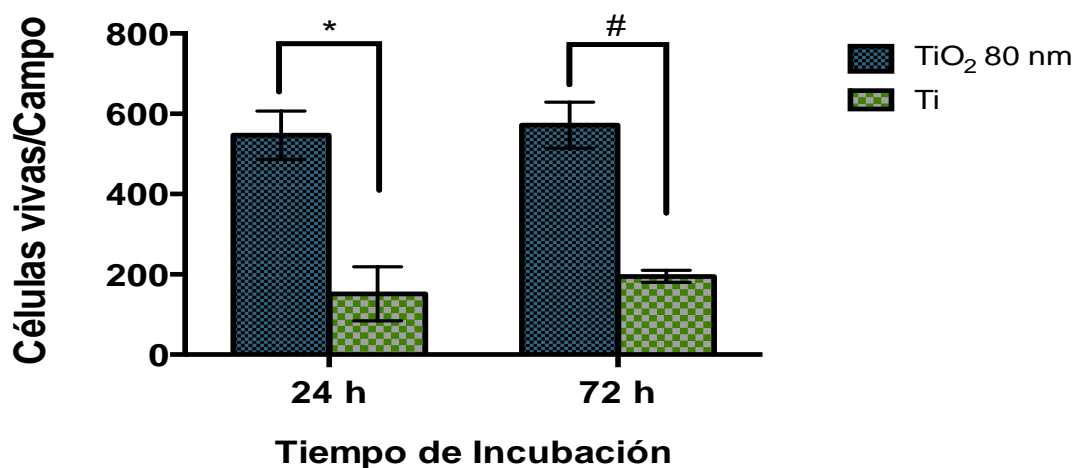


**Figura 13.** Tinción de vida/muerte para osteoblastos cultivados sobre nanotubos de  $\text{TiO}_2$  y Ti sin tratamiento. a) Células con actividad positiva a la estereasa citoplasmática (células vivas). b) Células con membrana celular dañada que permiten la unión de homodímero de etidio-1 (células muertas) observadas en  $\text{TiO}_2$ . c) Proporción entre células vivas/muertas en nanotubos de  $\text{TiO}_2$ . d) Células vivas observadas en Ti sin tratamiento. e) Células muertas en Ti. d) Relación células vivas/muertas en Ti.

Después de 72 h de cultivo sobre los nanotubos de  $\text{TiO}_2$ , se encontró una cantidad verdaderamente superior de células (Figura 13a), comparado con la superficie de Ti (Figura 13b). Además la tasa de células vivas presentes en los nanotubos de  $\text{TiO}_2$  es mucho mayor comparado con el número de células muertas en  $\text{TiO}_2$  (Figura 13b) y el número de células muertas comparado en Ti sin anodizar

(Figura 13e). La Figura 13c muestra la proporción de las células vivas/muertas en  $\text{TiO}_2$  y la Figura 13e la relación vivas/muertas de las imágenes para Ti con la finalidad de ilustrar la proporción visual entre vivas y muertas.

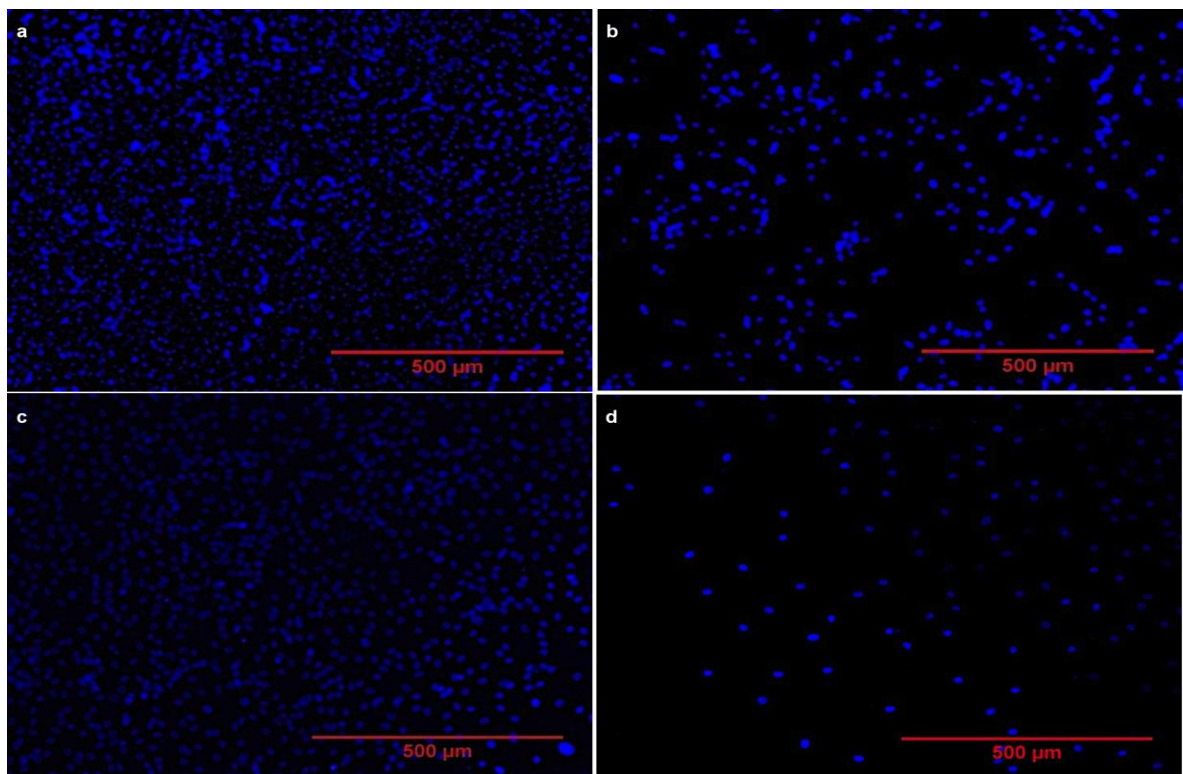
La Figura 14 demuestra gráficamente la diferencia entre la tasa de células vivas por campo a 24 y 72 h e indica la significancia estadística entre cada uno de los sustratos. Se detectó una mayor cantidad de células muertas para Ti sin tratamiento con respecto a los nanotubos de  $\text{TiO}_2$ .



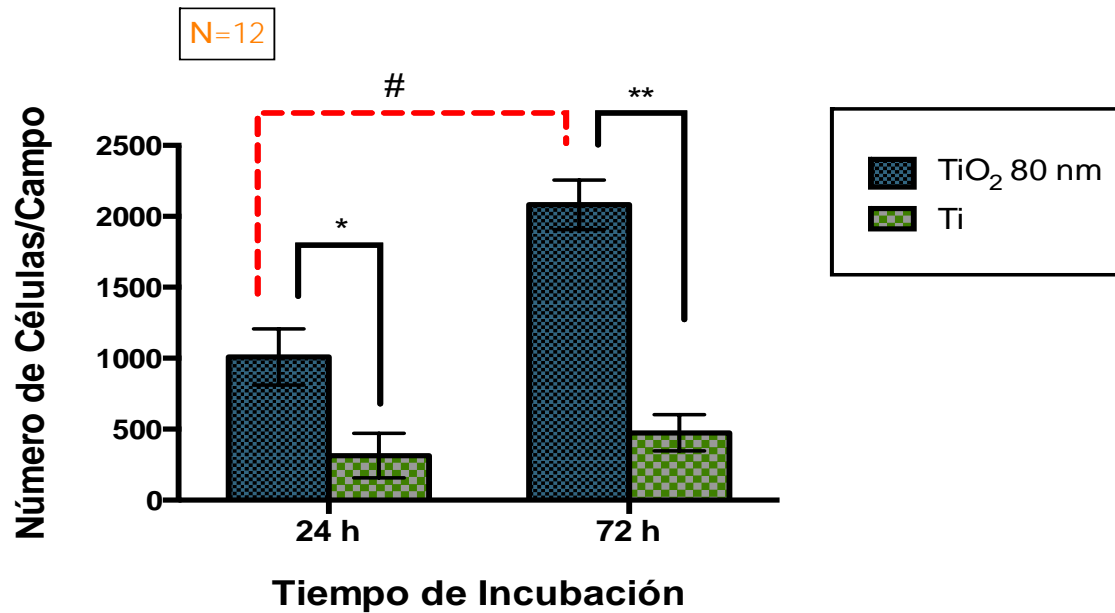
**Figura 14.** Número de células vivas vs tiempo de incubación en cada uno de los sustratos. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de  $\pm$  la desviación estándar. El valor P se obtuvo realizando un análisis de varianzas de dos vías: \* denota significancia entre los dos sustratos a 24 h de cultivo,  $P < 0.05$ , # indica diferencia altamente significativa entre los sustratos a 72 h de incubación.

Evaluando la biocompatibilidad continuamos investigando la adhesión celular, y la tasa de proliferación celular. Para llevar a cabo esta prueba se realizó tinción de núcleos (DAPI) a cada uno de los intervalos de tiempo adoptados para

este estudio en cada uno de los sustratos (Figura 15). A cada uno de los intervalos de tiempo, se encontró que el número de células adheridas a los nanotubos de  $\text{TiO}_2$  es dramáticamente mayor que en la superficie sin tratamiento. También se observa en el sustrato de nanotubos un incremento en el número de células en función al tiempo de incubación, dato el cual nos habla de la tasa de proliferación. Igualmente la Figura 16 muestra una gráfica indicando las diferencias significativas para cada sustrato a cada uno de los intervalos de tiempo.



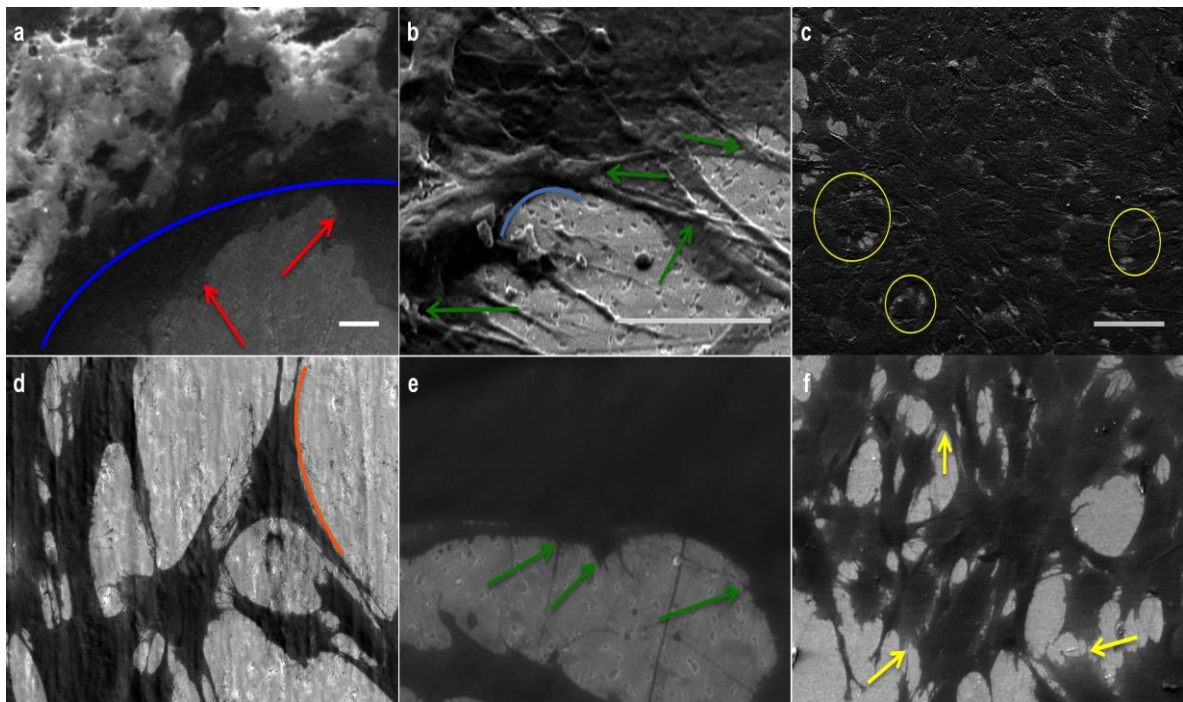
**Figura 15.** Micrografía de fluorescencia ilustrando células teñidas con DAPI. a) Proliferación celular a las 72 h de incubación en nanotubos de  $\text{TiO}_2$ . b) Pobre proliferación a 72 h en Ti sin tratamiento. c) Células adheridas a nanotubos de  $\text{TiO}_2$  a 24h. d) Células adheridas a las 72 h de incubación.



**Figura 16.** Número de células vs tiempo de incubación. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de  $\pm$  la desviación estándar. El valor P se obtuvo realizando un análisis de varianzas de dos vías: \* indica una alta diferencia significativamente estadística entre los dos sustratos a 24 h de incubación  $P < 0.05$ , \*\* denota alta diferencia significativamente estadística entre los dos sustratos a 72 h  $P < 0.05$ , # demuestra alta y significativa diferencia estadística entre la cantidad de células a 24 h vs. 72h en nanotubos de TiO<sub>2</sub>.

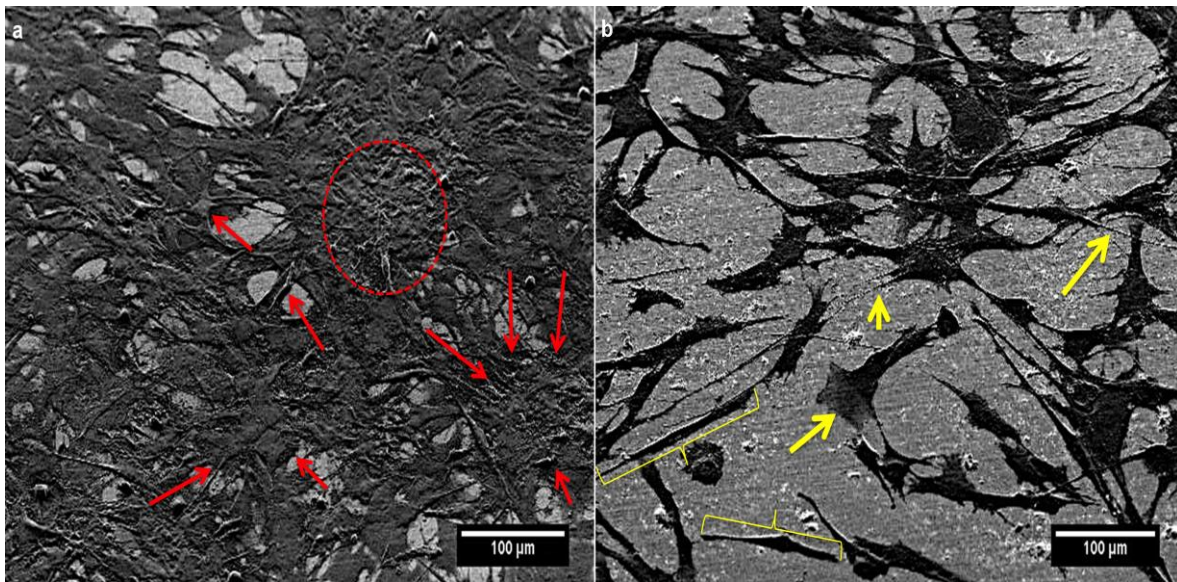
Las Figura 17 ilustra altas magnificaciones de las zonas de adhesión para osteoblastos a diferentes tiempos. Se observa en la superficie de nanotubos de TiO<sub>2</sub> a 24 h de incubación (Figura 17a) la presencia de una capa celular con abundantes invaginaciones y la expansión de matriz extracelular, mientras que en Ti sin tratamiento al mismo tiempo (Figura 17d), se encuentran osteoblastos con morfología más alargada sin presencia de pliegues asociados a la ECM o filipodios y una pobre formación de ECM con respecto a la superficie con nanotubos. A 72 h de incubación se puede observar que las células incubadas sobre la superficie con nanotubos (Figura 17b) presenta filipodios protuberantes y alineados, más

alargados, anclándose eficientemente, promoviendo la proliferación de la monocapa. También se observan mayor cantidad de pliegues y una matriz extracelular mas densa comparado con la superficie de Ti sin tratamiento (Figura 17e). En la Figura 17c, se presenta la morfología de las células a 120 h incubación, ilustrándose la proliferación de una monocapa de osteoblasto mas concentrada con evidente mayor formación de pliegues e invaginaciones y una densa matriz extracelular comparada con la superficie de Ti sin tratamiento (Figura 17f).



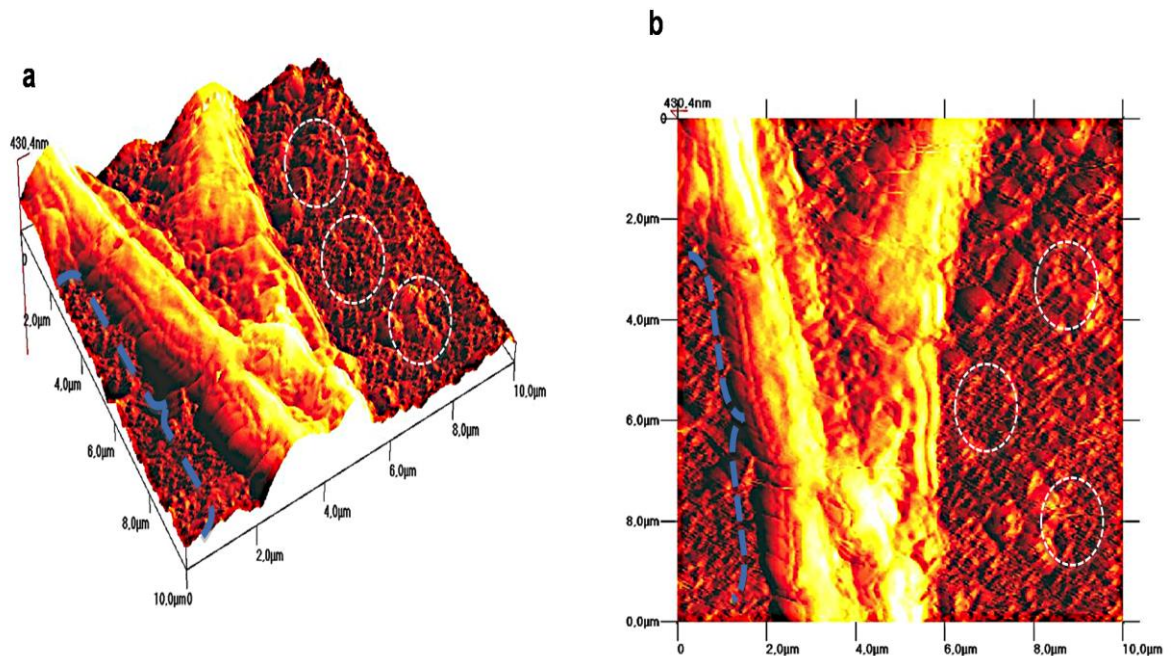
**Figura 17.** Micrografías de SEM a alta magnificación para osteoblastos de Ti sin tratamiento vs nanotubos de  $\text{TiO}_2$  después de 24, 72 y 120 h. a) Crecimiento a 24 h en nanotubos de  $\text{TiO}_2$ . b) Nanotubos de  $\text{TiO}_2$  a 72 h. c) Nanotubos de  $\text{TiO}_2$  a 120. d) Crecimiento a 24 h sobre Ti. e) Ti a 72h. f) Ti a 120 h. Las flechas rojas indican la presencia de ECM, la línea azul indica la monocapa celular en nanotubos a 24 h. La línea naranja muestra la elongación celular en Ti sin tratamiento a 24 h. Las flechas verdes indican la formación de filipodios, y su anclaje a la superficie. Los círculos amarillos representan la extensión de una monocapa más uniforme y madura a 72 h en nanotubos. Las flechas amarillas indican la presencia de filipodios delgados y traslucidos a 120 h sobre Ti sin tratamiento (Barra de escala es 20  $\mu\text{m}$ ).

Observando a bajas magnificaciones (Figura 18), se detectó una mayor proliferación celular, la presencia de cuerpos celulares con una densa ECM y, al igual que en las altas magnificaciones, la formación de filipodios de forma fibrilar, sinónimos de fuerte adhesión celular (Figura 18a), comparados con lo encontrado para la superficie de Ti sin tratamiento, donde se observa una baja población, una traslucida ECM y células muy alargadas (Figura 18b).



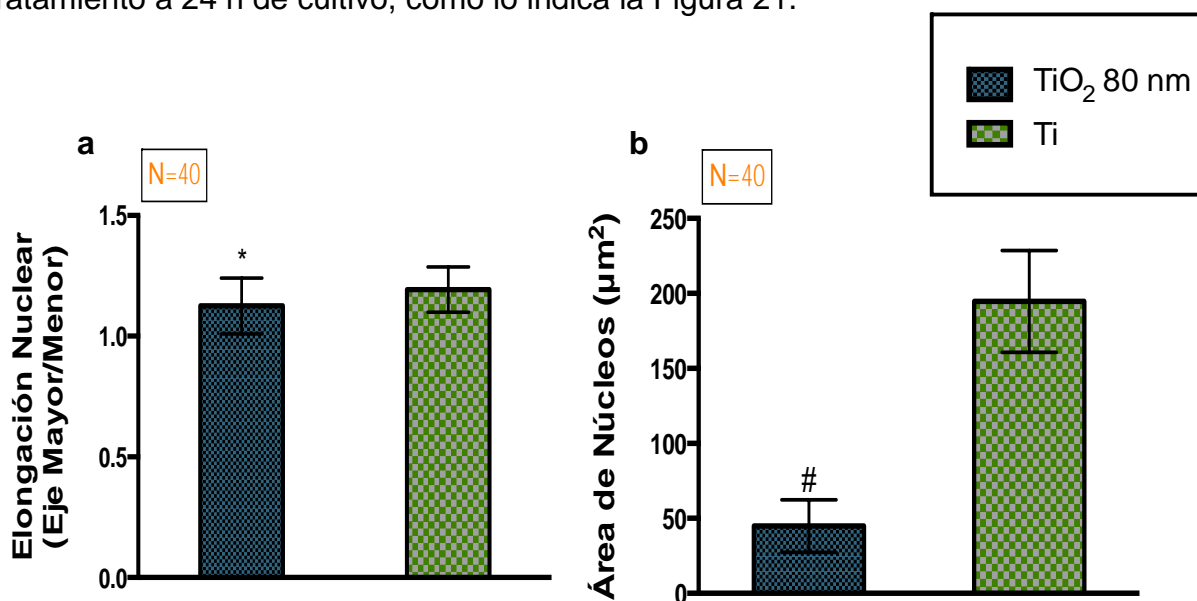
**Figura 18.** Micrografías de SEM a baja magnificación para osteoblastos en superficies de Ti sin tratamiento vs nanotubos de  $\text{TiO}_2$  a 72 h de crecimiento. a) Nanotubos de  $\text{TiO}_2$ . b) Ti sin tratamiento. Las flechas rojas indican la formación de pliegues más protuberantes, y el círculo rojo muestra la presencia de cuerpos celulares. Las flechas amarillas indican presencia de células más alargadas con menores pliegues.

El análisis topográfico para los osteoblastos a 72 h de incubación se ilustra en la Figura 19. La imagen en 3D (Figura 19a), brinda una vista tridimensional de la topografía y arroja la altura de los filipodios celulares anclados a los nanotubos de  $\text{TiO}_2$ . También la imagen en 2D (Figura 19b), muestra evidente modificación topográfica manifestando la presencia de protuberancias de formas fibrilares asociadas con los filipodios, suplementando la evidencia obtenida de las imágenes de SEM.

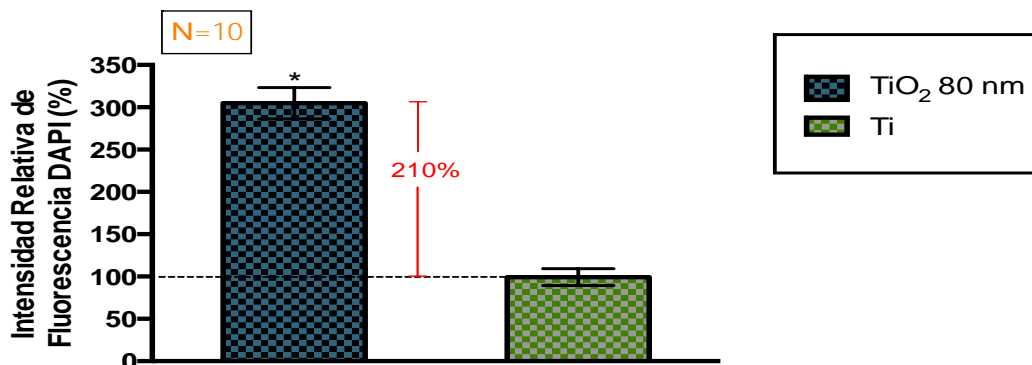


**Figura 19.** Análisis topográfico de AFM para osteoblastos cultivados por 72 h sobre nanotubos de  $\text{TiO}_2$ . a) Vista 3D. b) Top view. Las líneas punteadas azules indican los filipodios celulares y los círculos punteados representan los nanotubos de  $\text{TiO}_2$ .

Una vez caracterizada la topografía celular sobre los especímenes, se detectaron cambios significativamente mayores en la elongación nuclear para las células en la superficie de Ti sin tratamiento que en  $\text{TiO}_2$ , lo cual sugiere que el núcleo se extiende debido al estiramiento celular (Figura 20a), dato cotejable con los encontrados en SEM para morfología celular. La Figura 20b indica que además de la elongación, también hay cambios significativos en la extensión celular, indicando que en el área nanoestructurada disminuye la extensión comparado con Ti sin tratamiento. Posteriormente se encontró que la cantidad relativa de DAPI unido a ADN es estadísticamente mayor reflejándose en un incremento en la fluorescencia de ~210% para las células cultivadas en  $\text{TiO}_2$  que en Ti sin tratamiento a 24 h de cultivo, como lo indica la Figura 21.



**Figura 20.** a) Elongación nuclear b) Área de Núcleo. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de  $\pm$  la desviación estándar. El valor P se determinó después de efectuar una prueba t-test: \*indica diferencia significativamente estadística en la elongación entre los dos sustratos a 24 h de incubación  $P < 0.05$ , # muestra diferencia estadística entre los dos sustratos a 24 h,  $P < 0.05$ .



**Figura 21.** Intensidad de fluorescencia relativa de DAPI para células cultivadas sobre los sustratos de experimentación a 24 h de incubación. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de  $\pm$  la desviación estándar. El valor P se determinó después de efectuar una prueba t-test: \* indica una alta diferencia significativamente estadística entre los dos sustratos a 24 h de incubación  $P < 0.05$ .

## 2.4 Discusión

Promover el crecimiento de tejidos y la oseointegración alrededor de los implantes es un proceso el cual involucra adhesión, proliferación, secreción de proteínas de ECM y mineralización (36) en Ti y sus aleaciones. Además, de acuerdo con los estándares de la ISO, un material es considerado “bio” si no es tóxico y si permite una favorable interacción entre el tejido y el implante. Por lo tanto en este estudio se enfocó en caracterizar la biocompatibilidad, adhesión, proliferación, cuantificación relativa de ADN, la morfología y topografía celular, así como el efecto que induce la superficie de nanotubos de TiO<sub>2</sub> y Ti sin tratamiento en la elongación y diseminación nuclear en osteoblastos. Las superficies de estudio empleadas para este trabajo (Figura 9), se muestran en una micrografía

de SEM donde se observa la formación de nanotubos de  $\text{TiO}_2$  de  $\sim 80$  nm (Figura 9b; 9c), altamente alineados y en forma vertical, comparado contra Ti sin ningún tratamiento electroquímico (Figura 9a) en el que se indica una superficie suave y plana. La Figura 10 ilustra el espectro de EDS obtenido para cada una de las superficies, y en la tabla 1 se encuentran los porcentajes con sus respectivas diferencias para los elementos presentes en los especímenes analizados. Se puede ver que la naturaleza química entre cada uno de los sustratos es análoga, excepto para los porcentajes elementales de oxígeno, en los que se encuentran valores mas altos para los nanotubos (mas del 25%), esto debido a la formación de una capa de óxido mas densa y de mayor espesor ocasionado por el proceso de oxidación anódica que fue aplicado al sustrato y el porcentaje de flúor ( $\sim 3.28\%$ ) que se le atribuye a remanentes del electrolito utilizado para el anodizado, datos que concuerdan con la literatura (61-63).

Los datos presentados por el AFM (Figura 11), indican la presencia de una topografía nanogranular de forma ordenada y homogénea, con una altura de  $\sim 575$  nm, a diferencia de la superficie sin tratamiento que se observa es de naturaleza plana y suave comparado con los nanotubos, datos que fortalecen la evidente morfología observada en SEM y congruente con lo reportado Hayashi et al., en donde ellos produjeron nanotubos de  $\text{TiO}_2$  por anodización, y acto seguido aplicaron radiaciones UV para activar la superficie, reportando topografías concordantes con las nuestras (64).

Posterior al análisis microscópico y espectroscópico de los sustratos, se procedió con la obtención de osteoblastos de periostio porcino (Figura 12), la periostoplastia ejecutada permitió obtener suficientes biopsias (Figura 12c; 12e),

la cual proporcionó ~10,000,000 células/mL a partir del pasaje 1. Los osteoblastos que se aislaron y proliferaron presentaron una morfología en forma de “cabellos” (Figura 12e; 12f) lo cual concuerda con lo reportado en la literatura (65), y concuerdan con las publicadas por Portan et al., el cual cultivó osteoblastos provenientes de células de médula ósea obtenidas a partir de la aspiración de diáfisis femoral a pacientes que se les practicó el remplazo total de cadera (66).

En términos de biocompatibilidad de implantes médicos, estimular la rugosidad de la superficie es un factor importante para brindar la respuesta positiva de osteoblastos a los materiales implantados. Por lo que realizando la tinción de vida/muerte, indicó una mayor tasa de células vivas con respecto a las muertas para  $\text{TiO}_2$  (Figura 13), y también mayor cantidad de células vivas con respecto al Ti sin tratamiento, siendo significativamente diferente como lo demuestra la Figura 14 para tiempos de incubación a 24h y 72 h, resultados que concuerdan con los que reporta Oh et al, en su estudio comparativo entre  $\text{TiO}_2$  y Ti pulido (43). Una posible explicación para la alta biocompatibilidad es que los nanotubos de  $\text{TiO}_2$  al poseer una mayor área superficial comparado con Ti, permite que un mayor número de iones, pequeñas moléculas y proteínas se depositen en los nanotubos y se adhieran a la superficie, promoviendo mayor interacción célula-célula y de este modo aumentar el número de filipodios celulares anclados a la superficie nanoestructurada. Sin embargo más estudios son requeridos para confirmar esta hipótesis.

Se ha estado hablando de biocompatibilidad, pero la adhesión y la proliferación son dos procesos muy importantes para el éxito de los implantes médicos. En la Figura 15 y 16, se muestra que los osteoblastos presentan una

mayor diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) en términos de adhesión en los nanotubos comparados con Ti a 24h, debido esto posiblemente a que los nanotubos facilitan un rápido depósito de proteínas, y probablemente se encuentra de forma alineada y homogénea debido a la topografía de los nanotubos, lo cual promueve el procesos de adhesión, y por otra parte a las 72 h se determinó que la velocidad de crecimiento es claramente mayor en  $TiO_2$  que en Ti, habiendo diferencia significativa ( $P < 0.05$ ), datos que concuerdan con los resultados brindados por la tinción de vida/muerte. Este comportamiento quizá se debe por que los nanotubos promueven la formación y anclaje de ECM, lo cual facilita la rápida proliferación, y es importante debido a que se requiere de una rápida oseointegración para el éxito de los implantes ortopédicos y dentales. Nuestros datos para adhesión y proliferación siguen el mismo patrón que lo reportados en la literatura para experimentos parecidos (42, 43). Sin embargo entran en controversia con lo reportado por Hao et al., donde ellos indican que el crecimiento óptimo para osteoblastos es en nanotubos de 30 nm y entre más se incremente el diámetro del nanotubo, disminuirá la tasa de adhesión y proliferación (67). Posiblemente las diferencias entre los resultados pueda deberse a que ellos utilizan la aleación  $Ti2448$ , y que a diferencia de nosotros, ellos esterilizan utilizando radiaciones con cobalto-60 el cual emite longitudes de onda mas pequeñas que la luz UV, por lo tanto puede que se generen mayor activación de los nanotubos debido a la alta energía a la que se someten, sin embargo se requiere de estudios precisos para determinar las diferencias.

En relación a la morfología celular, los datos de SEM presentes en la Figura 17, indican considerables cambios en la morfología celular en función del tiempo

de incubación. Los nanotubos promueven la formación de una monocapa celular la cual es importante en términos de funcionalidad celular ya que se conoce que la formación de multicapas promueve la diferenciación celular, y por lo tanto la pérdida del fenotipo. Por otra parte a 24 h de incubación en Ti (Figura 17d) se encontró la presencia de menor tasa de células adheridas, datos que confirman lo reportado para las pruebas de adhesión con DAPI y vida/muerte. Además se descubrió una morfología celular mas alargada, sinónimo de una superficie más plana. Esta morfología posiblemente se deba a que como la superficie de Ti tiene una menor área superficial, no facilita la adhesión de proteínas a la superficie, provocando que la célula necesite alargarse para mejorar su anclaje y así continuar con la proliferación. Nuestros datos están en concordancia a lo reportado en la literatura (42, 68, 69). Además a las 72 h se encuentra una evidente formación y propagación de filipodios en nanotubos (Figura 17b) con respecto a Ti (Figura 17e) lo cual sugiere la posible formación de adhesiones focales, pues se sabe que es el tipo de adhesión celular más fuerte. Finalmente a las 120 h de incubación sobre los nanotubos se encontró un número superior de pliegues celulares, evidentes interconexiones célula-célula, y la extensión de una capa celular proliferante en la superficie, mientras que en Ti se observaron pobres conexiones células-células, la formación de ECM menos densa y una menor tasa de proliferación celular. El análisis a bajas magnificaciones (Figura 18) ilustra la evidente proliferación, mayor formación de filipodios, y notable presencia de cuerpos celulares, que es debido a la alta síntesis de ECM en la superficie de nanotubos comparado con la contraparte.

Otra ventaja encontrada en los nanotubos de  $\text{TiO}_2$ , es que la producción de ECM es altamente estimulada, referencia determinada en los estudios de SEM, y confirmado por los análisis de AFM (Figura 19); detectándose diferencias topográficas evidentes sobre la superficie de  $\text{TiO}_2$ , reforzando los datos encontrados en los análisis de SEM.

Como se observó en los análisis de SEM, entre más plana es la superficie, se presenta la tendencia a que los osteoblastos se adhieran y proliferen más alargados bajo estas condiciones. Interesantemente análogo a estos datos, el núcleo también exhibe un comportamiento similar, tendiendo a incrementar su elongación conforme más plana es la superficie, mostrando una forma nuclear elongada en Ti sin tratamiento (Figura 20a). Una posible hipótesis propuesta por Brammer et al., es la elongación del núcleo en parte es debido a un citoesqueleto morfológicamente elongado (42). Ha sido reportado que la forma celular que se mantiene por el ensamblaje del citoesqueleto puede facilitar una forma nuclear distorsionada, lo cual puede promover la síntesis de ADN por medio de relajación mecánica manteniendo el ADN sin desplegarlo, alterando la tasa de transporte del núcleo citoplasmático y cambiando la distribución y función de la regulación de proteínas del ADN que está asociado con la matriz de proteínas del núcleo (70). Además de los cambios en la elongación también se evaluó el área de diseminación nuclear (Figura 20b), encontrando diferencias para cada uno de los sustratos a 24 h de incubación, ilustrando que el área nuclear disminuye en los nanotubos de  $\text{TiO}_2$ . Sin embargo se requiere un mayor número de estudios para elucidar el efecto de la elongación/área nuclear con la actividad celular. En función a la hipótesis mencionada, se realizó cuantificación relativa de ADN por medio de

microscopía de fluorescencia para cada uno de los sustratos a 24 h de cultivo (Figura 21). Donde se encontró una mayor cantidad de ADN (~210% mayor que el control) para los osteoblastos en nanotubos, los cuales están expuesto a una menor elongación celular y nuclear, comparado con los datos para los núcleos en Ti sin tratamiento, abriendo la hipótesis de que entre mayor estrés por alta elongación celular y nuclear ocasionada por la superficie, menor será la síntesis de ADN, cabe mencionar entonces que con estudios más precisos se podría comprobar esta hipótesis. Estos datos dan hincapié a continuar con los estudios del efecto mecánico inducido por la superficie en la función celular, para esclarecer los mecanismos involucrados en los efectos celulares inducidos por la forma celular.

## **CAPÍTULO 3**

### **3.1 Nanotubos de TiO<sub>2</sub> promueven el crecimiento de células de cartílago para aplicaciones en regeneración osteo-condral.**

El cartílago es un tejido conectivo blanco y denso que se encuentra localizado a través del cuerpo humano en diferentes sitios como son orejas, codos, rodillas, discos vertebrales, tráquea y costillas (71). Sirve como soporte de carga para articulaciones y es caracterizado por su excelente fricción, lubricación y sus propiedades al desgaste (72, 73). Variando aproximadamente entre 5 – 7 mm de grosor, el cartílago esta compuesto principalmente de dos fases, una matriz sólida (fibras de colágeno y macromoléculas como proteoglicanos) (72, 74-76) y una fase liquida intersticial (mayormente agua) (77).

El cartílago esta constituido por condrocitos que componen aproximadamente del 1 – 10% del volumen total del cartílago articular. Estos se originan a partir de células mesodérmicas embrionarias (71). Los condrocitos maduros son capaces de mantener la salud del cartílago ya que balancean la síntesis y degradación de ECM.

La ECM compone aproximadamente el 95% del volumen total del cartílago e influye de manera significativa en las propiedades físicas del cartílago (71, 72, 78). La ECM esta compuesta por colágeno, proteoglicanos, y glicoproteínas, los cuales constituyen el 60%, 25-35%, y 15-20% en peso seco respectivamente (71,

79). El tipo de colágeno predominante es el tipo II (constituye del 90-95% del peso en seco del colágeno).

En el cartílago dañado los condrocitos generalmente son incapaces de reparar el tejido dañado. Por ejemplo en la osteoartritis (OA) que es una enfermedad progresiva que se caracteriza por la destrucción del cartílago articular por una proteólisis descontrolada de la ECM (80). Como consecuencia clínica generalmente es responsable del daño articular, asociado con dolor severo y discapacidad (81) afectando tan solo en los Estados Unidos alrededor del 9% de la población en edad de 30 años en adelante, con costos directos estimados de \$28.6 billones de dólares anualmente (82).

Algunas de las estrategias actuales utilizadas para la reparación de lesiones focales y de daño a la superficie articular, es el uso clínico de adhesivos tisulares (83, 84), tratamientos enzimáticos (85), soldar vía laser (86), mosaicoplastía (72) y el método carticel el cual se ha reportado en estudios recientes hasta un 68% de fallas en los injertos, delaminación o hipertrofia del tejido (87).

El cartílago artificial preparado a partir del cultivo de condrocitos ofrece promesas para el tratamiento de defectos en el cartílago, pero conectar este tejido blando al hueso con el fin de restablecer el cartílago defectuoso es difícil. La estrategia que se emplea en esta sección es el caracterizar un sustrato dualmente funcional que soporte la adhesión y crecimiento de tejido cartilaginoso y por otra parte promueva la oseointegración.

En función de conocer el efecto de las topografías a nanoescala en la respuesta a condrocitos, en esta sección de la tesis, evaluamos la capacidad de

los nanotubos para promover un comportamiento de condrocitos positivo en términos de adhesión, proliferación, viabilidad, conservación de la morfología celular, caracterizando la elongación celular y nuclear y cuantificación relativa de ADN.

### **3.2 Fase experimental**

#### ***Fabricación de nanotubos de TiO<sub>2</sub>.***

Los nanotubos de TiO<sub>2</sub> y los discos de Ti utilizados para esta sección son similares a los descritos en detalle en la sección 2.2 de esta tesis.

#### ***Aislamiento y cultivo celular***

Para el aislamiento y cultivo de condrocitos auriculares de cerdo utilizados en este estudio, se manejaron orejas de cerdo raza Landrace x Yorkshire recién nacidos, los cuales fueron proporcionados por la granja porcina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

El aislamiento de condrocitos se realizó de la siguiente manera:

- ✓ Se recibieron cuatro cabezas de cerdos previamente sacrificados, a los cuales se les realizó una incisión de pabellón auricular.
- ✓ El pabellón auricular se almacenó en PBS/10% antibiótico/antimicótico y se lavó tres veces en esta solución.

- ✓ Previa asepsia y antisepsia se realizó un corte lineal de 10 cm con la ayuda de un bisturí del número 20 correspondiente al pabellón auricular para retirar piel completamente dejando libre únicamente el cartílago.
- ✓ Con la ayuda de unas pinzas rectas, se cortó el cartílago en trozos de  $1\text{mm}^2$ , y se lavaron en PBS/10% antibiótico/antimicótico a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- ✓ Después se transfirieron a un tubo cónico de 50 ml con 15 ml de tripsina (Gibco-Invitrogen) previamente temperizada a  $37^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, y se colocó en agitación a 200 rpm a  $37^{\circ}\text{C}$ .
- ✓ Finalizado el tiempo, se retiró tripsina y se agregaron 15 ml DMEM-F12 sin suero, y se transportó a centrifugar por 10 minutos a 1500 rpm a  $24^{\circ}\text{C}$ .
- ✓ Se retiró el sobrenadante finalizando el tiempo y se agregaron 20 ml de colagenasa 0.3% (Sigma Aldrich, USA)/DMEM-F12 y se colocó la muestra agitar a 200 rpm a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta digerirse por completo el tejido.
- ✓ Digiéndose el tejido, se filtró la mezcla utilizando un filtro celular (BD Falcon, USA) y el filtrado se colocó en un tubo cónico de 50 ml nuevo y se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos a  $24^{\circ}\text{C}$ .
- ✓ Se retiró el sobrenadante y se lavó con DMEM-F12/SBF 10%/ antibiótico/antimicótico 1%, y se centrifugo nuevamente a 1500 rpm por 10 min a  $24^{\circ}\text{C}$ .
- ✓ Finalizando, se sembraron de 4 a 8 cajas T25 con 500,000 células/ml para cada caja y se dejaron crecer hasta obtener confluencia del 80%.

Lograda la confluencia celular en las cajas de cultivo, las células se despegaron utilizando el método descrito en la sección 2.2 de esta tesis, y se

sembraron ~50,000 células/mL en los sustratos experimentales (TiO<sub>2</sub> y Ti) y se colocaron a cultivar hasta cumplir los tiempos establecidos para cada ensayo, tal como se describe en la sección 2.2 de esta tesis.

### ***Ensayo de biocompatibilidad de células cultivadas.***

Para verificar la viabilidad celular, se llevó acabo la tinción de vida/muerte (Live/dead essay kit; Gibco-Invitrogen) alcanzándose las 72 h de incubación sobre los sustratos experimentales; se utilizo el método que esta completamente descrito en la sección 2.2 de esta tesis.

### ***Adhesión y proliferación celular.***

En función de determinar la tasa de adhesión y proliferación de condrocitos, se incubaron las células sobre los especímenes a 24 y 72 h. Cumpliéndose los tiempos se retiraron de la incubadora y se les realizó la tinción con DAPI (Molecular Probes, USA), siguiendo el método utilizado en la sección 2.2 de este proyecto.

### ***Morfología celular analizada por SEM.***

Después de 72 y 120 h de cultivo, se fijaron las células sobre los sustratos (TiO<sub>2</sub> y Ti), utilizando el método anteriormente descrito en la sección 2.2.

### ***Topografía celular analizada por AFM.***

Transcurridas 72 h de incubación, con el apoyo de un AFM se realizó el análisis topográfico de las células cultivadas sobre nanotubos de TiO<sub>2</sub> y Ti en función a como esta descrito en la sección 2.2 de esta tesis.

### ***Análisis de datos para elongación celular/nuclear y área nuclear.***

Para determinar los cambios cuantitativos entre la elongación celular y nuclear sobre las células cultivadas en los sustratos, se utilizó la barra de escala y se efectuó de acuerdo a lo establecido en la sección 2.2 de esta tesis.

### ***Cuantificación de ADN nuclear.***

La cantidad relativa de ADN nuclear total producido en condrocitos a 24 h de incubación sobre los especímenes experimentales se cuantifico en función al método establecido en la sección 2.2.

### ***Análisis estadístico y gráficas con barras de error.***

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron tres veces. Los datos fueron evaluados por medio del software Prism 6 (2013), siguiendo los parámetros estadísticos utilizados en la sección 2.2.

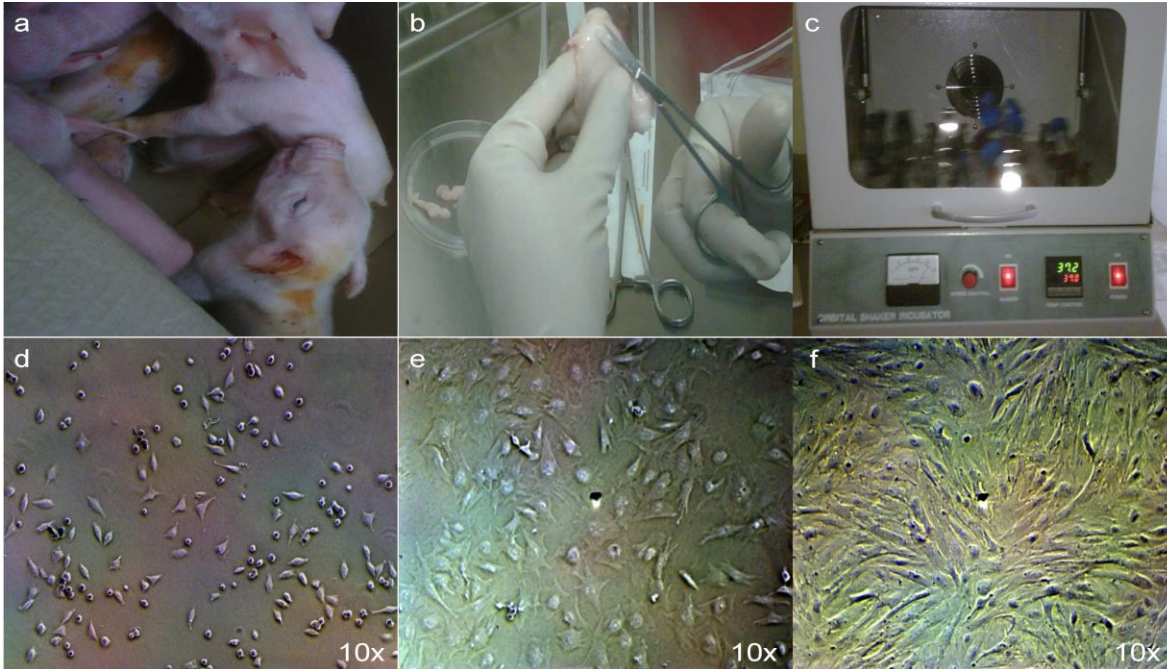
### 3.3 Resultados

Los nanotubos de  $\text{TiO}_2$  de 80 nm de diámetro fueron evaluados en función de determinar el papel que protagonizan en el comportamiento de condrocitos auriculares comparado contra discos de Ti sin ningún tratamiento.

Los sustratos utilizados para esta sección experimental fueron los mismos que se utilizaron en el capítulo 2 para optimizar el comportamiento de osteoblastos. Las micrografías de SEM mostradas en la Figura 9 son las mismas superficies utilizadas para este reporte.

Para el EDS para análisis elemental, se consideraron los mismos valores establecidos en la Tabla 1 de la sección 2.2.

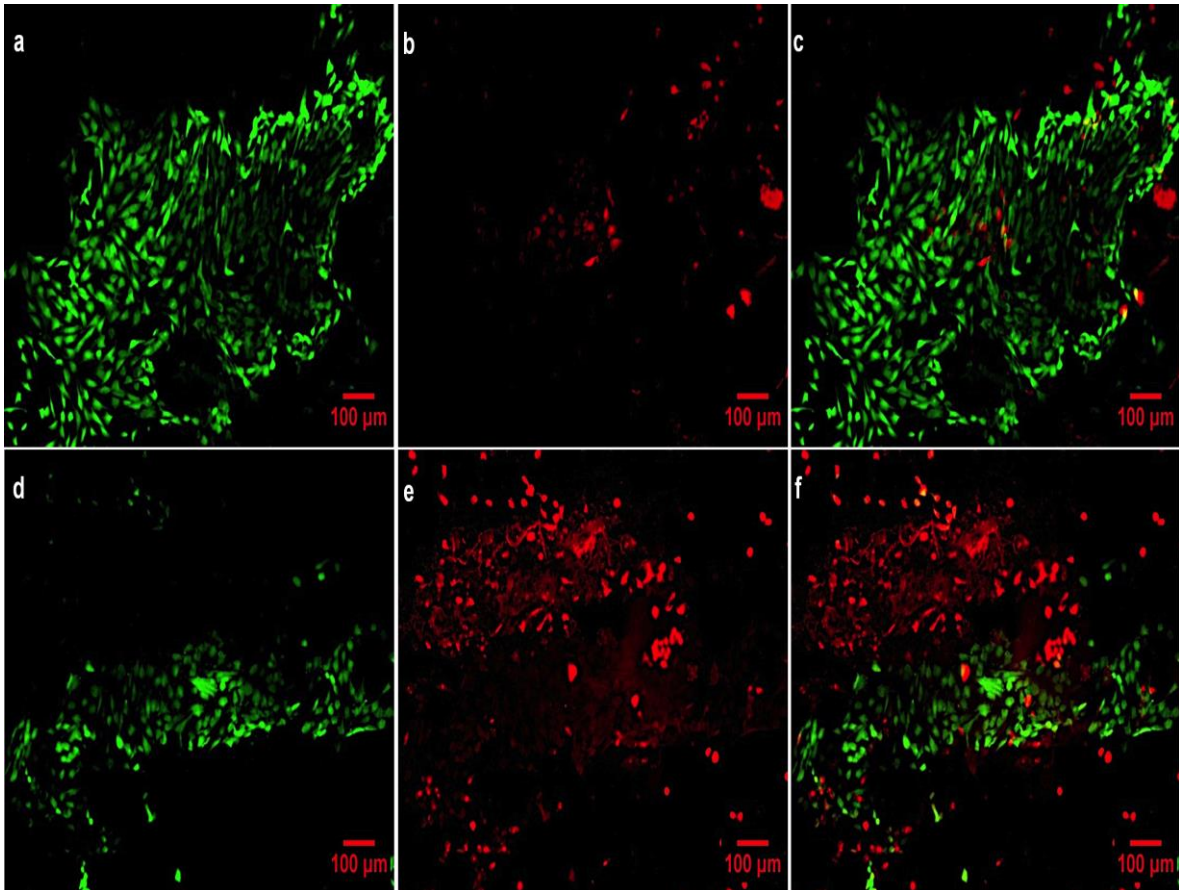
Se obtuvieron condrocitos auriculares de cerdo raza Landrace x Yorkshire y se expandieron hasta obtener confluencia como lo indica la Figura 22. Después de retirarse el pabellón auricular se extrajo el cartílago, obteniéndose un tejido color blanco como se describe en la literatura (Figura 22b). La Figura 22c muestra el proceso de digestión enzimático, y finalizado el proceso, se cultivaron los condrocitos observándose la morfología al adherirse a la caja de cultivo (Figura 22d), su proliferación a semiconfluencia (Figura 22e) y finalmente hasta obtener una confluencia total (Figura 22f).



**Figura 22.** Obtención y proliferación de condrocitos. a) Cerdos raza Landrace x Yorkshire recién nacidos elegidos para el experimento. b) Preparación del cartílago auricular. c) Digestión de cartílago en colagenasa. d) Cultivo primario de condrocitos a baja confluencia. e) Cultivo de condrocitos semiconfluentes. f) Cultivo en confluencia presentado la formación de una monocapa.

Finalmente teniendo confluencia celular para conocer el estado de viabilidad de los condrocitos cultivados sobre los sustratos, se incubaron con la tinción de vida/muerte (live/dead essay kit), una tinción fluorescente que discrimina células con membrana citoplasmática dañadas (Figura 23). La Figura 23a, muestra la células vivas teñidas de verde para  $TiO_2$ , presentando una mayor tasa de células vivas comparado con el control de Ti (Figura 23b). La tasa de células muertas se observó que es muy pequeña para la superficie de  $TiO_2$  con respecto a las células vivas y a su vez presentó una menor tasa con respecto a las muertas

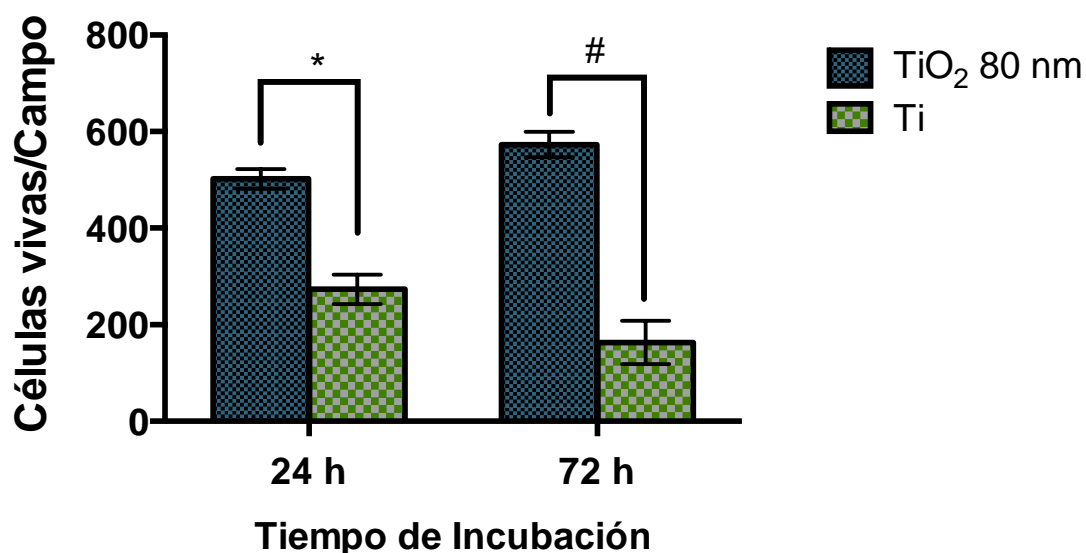
de Ti. La Figura 23c muestra el acoplamiento de las vivas con respecto a las muertas para  $\text{TiO}_2$ , y la Figura 23f para las células en Ti.



**Figura 23.** Viabilidad de condrocitos utilizando la tinción live/dead essay kit. a) Células vivas en  $\text{TiO}_2$ . b) Células muertas en  $\text{TiO}_2$ . c) Unión de las células vivas y muertas en  $\text{TiO}_2$ . d) Células vivas en Ti. e) Células muertas en Ti. f) Proporción de las células vivas con las muertas en Ti.

El análisis cuantitativo para la tasa de células vivas en las superficies de estudio se ilustra en la gráfica presente en la Figura 24. Mostrando una superior

tasa de células vivas en TiO<sub>2</sub> con respecto a Ti a 24 h y un crecimiento significativamente elevado para TiO<sub>2</sub> a 72 h de cultivo con relación a Ti.

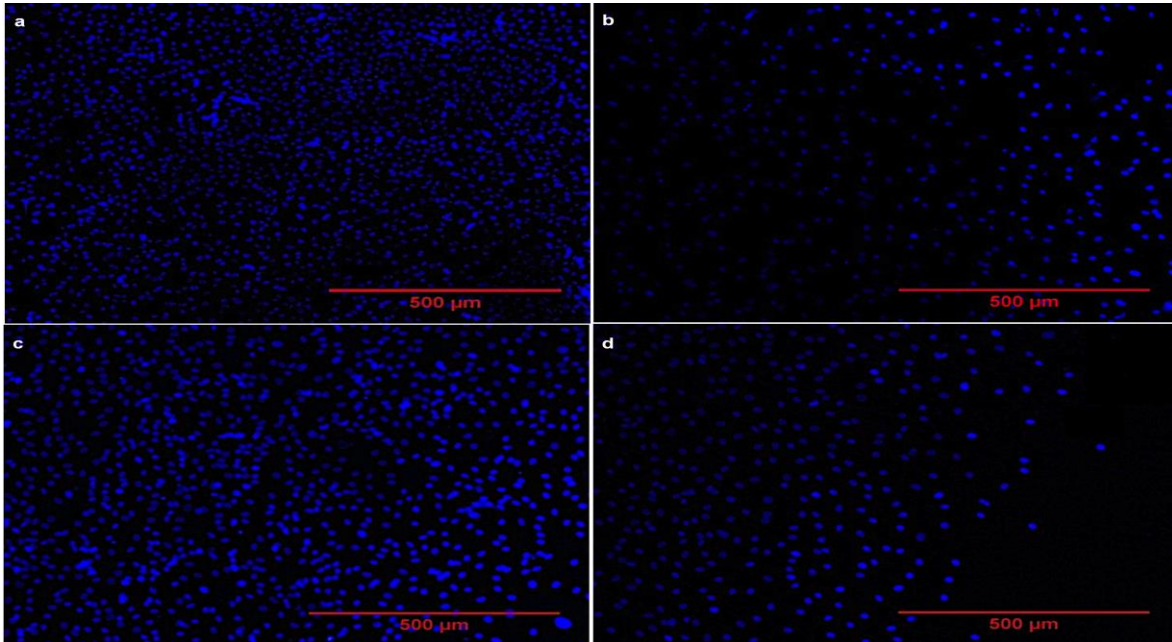


**Figura 24.** Cantidad de células vivas vs tiempo de incubación para las superficies experimentales. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de  $\pm$  la desviación estándar. El valor P se obtuvo realizando un análisis de varianzas de dos vías: \* denota significancia entre los dos sustratos a 24 h de cultivo,  $P < 0.05$ , # indica diferencia altamente significativa entre los sustratos a 72 h de incubación.  $n = 3$ .

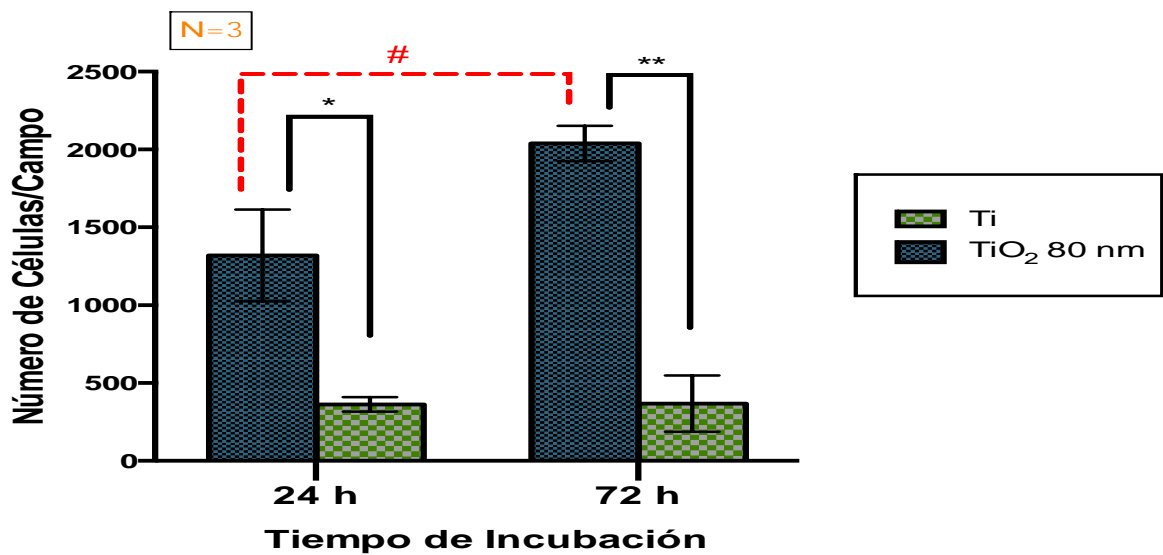
Por otra parte, determinando la tasa de células vivas con respecto al tiempo, procedimos a investigar la tasa de adhesión y proliferación.

Para efectuar los conteos, se realizó la tinción para núcleos DAPI para cada uno de los tiempos establecidos (Figura 25). Se observó una alta tasa de proliferación celular a 72 h de crecimiento sobre nanotubos de TiO<sub>2</sub> (Figura 25a)

con respecto a la superficie de Ti, y una mayor cantidad de células adheridas a 24h para los nanotubos con respecto a Ti. En la Figura 26 se representa una gráfica ilustrando las diferencias significativas para cada uno de los sustratos a cada uno de estos tiempos de incubación.



**Figura 25.** Micrografías de fluorescencia mostrando condrocitos teñidos con DAPI. a) Proliferación celular a las 72h en nanotubos de  $\text{TiO}_2$ . b) Proliferación de a 72 h Ti. c) Adhesión a 24h en  $\text{TiO}_2$ . d) Adhesión 24 h en Ti.

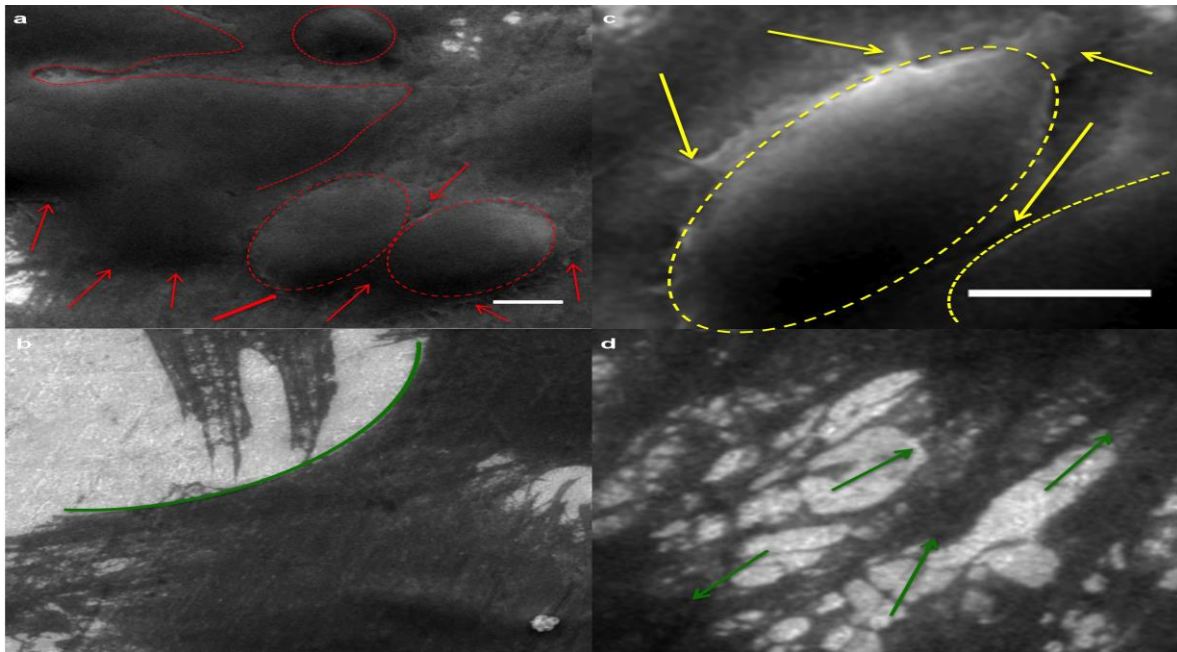


**Figura 26.** Número de células vs tiempo de incubación. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de  $\pm$  la desviación estándar. El valor P se obtuvo realizando un análisis de varianzas de dos vías: \* indica una alta diferencia significativamente estadística entre los dos sustratos a 24 h de incubación  $P < 0.05$ , \*\* denota alta diferencia significativamente estadística entre los dos sustratos a 72 h  $P < 0.05$ , # demuestra alta y significativa diferencia estadística entre la cantidad de células a 24 h vs. 72h en nanotubos de TiO<sub>2</sub>.

No solo es importante promover una alta tasa de adhesión y proliferación, si no también es vitalmente trascendente analizar la morfología celular en especial cuando hablamos en términos de condrocitos. Como se puede observar en la Figura 27 se comparan los condrocitos cultivados a 72 h y 120 h. Se observa que son capaces de adherirse a los nanotubos de TiO<sub>2</sub> de manera más eficiente comparado con los de Ti sin tratamiento.

En la Figura 27a se distingue la formación de cuerpos celulares (líneas rojas punteadas), así como de abundantes filopodios responsables del anclaje a

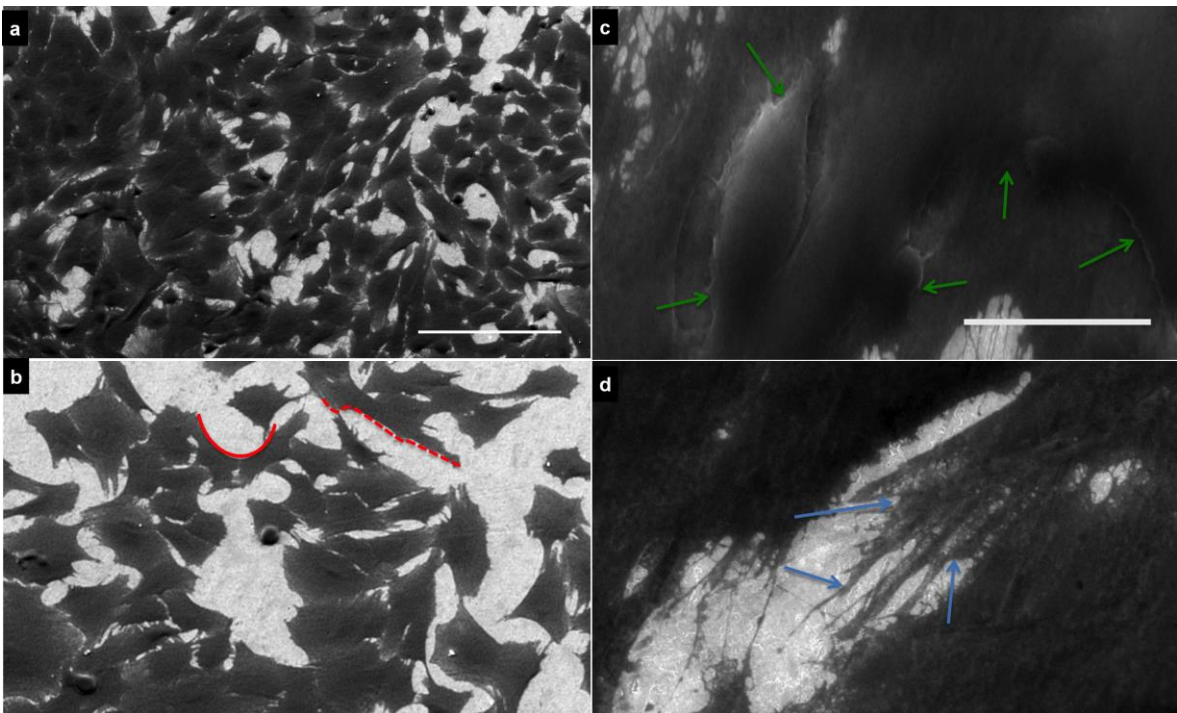
superficie, mientras que en la superficie sin tratamiento, el proceso de adhesión es pobre ya que se observa la formación de ECM mas traslucido a la superficie, con la formación de filipodios traslucidos y más tenues a 72 h de crecimiento (Figura 27b).



**Figura 27.** Micrografías de SEM a alta magnificación para condrocitos después de 72 y 120 h. a) nanotubos de  $\text{TiO}_2$  a 72h. b) Ti a 72 h. c)  $\text{TiO}_2$  a 120h. d) Ti a 120 h. (Barra de escala es  $5\mu\text{m}$  para a) y b),  $10\mu\text{m}$  para c) y d)).

Además a 120 h de crecimiento, se continua observando claras formaciones de condrocitos con cuerpos celulares mas definidos, filipodios presentes en la superficie (Figura 27c), mientras que para Ti sin tratamiento (Figura 27d), continuamos observando la formación de ECM traslucida lo cual indica pobre anclaje con la superficie.

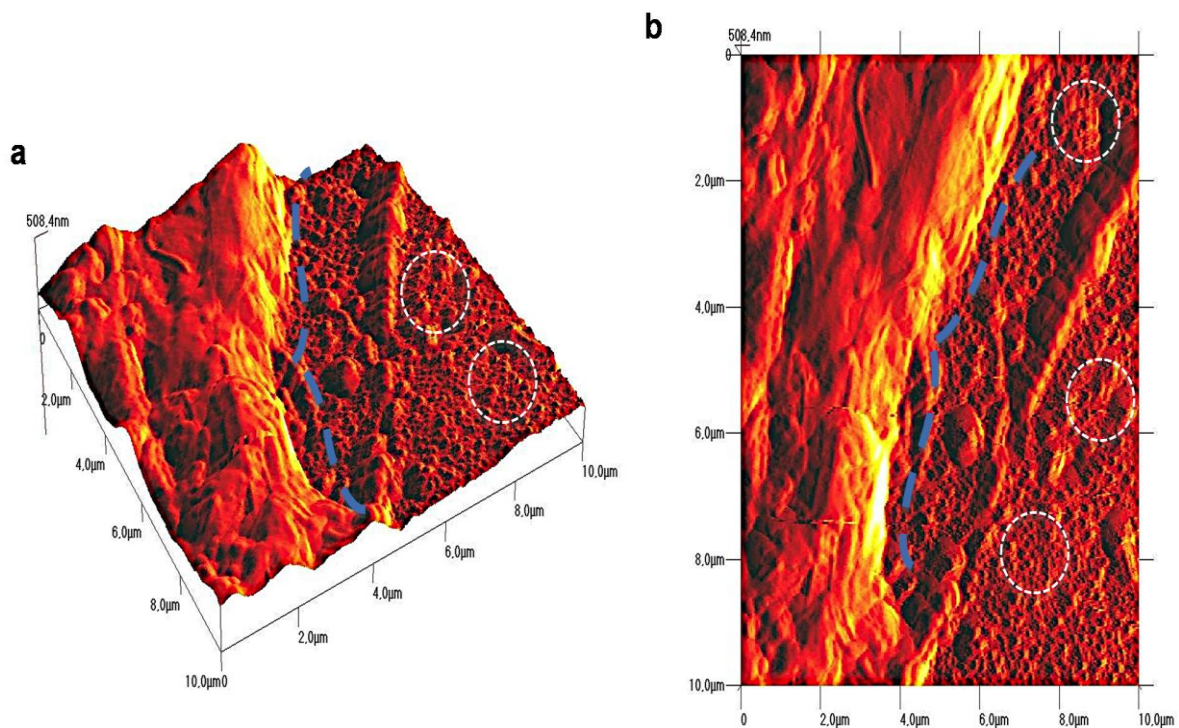
En la Figura 28, se representa el análisis a baja magnificación, observándose una mayor confluencia celular en los nanotubos de  $\text{TiO}_2$  (Figura 28a) comparado con Ti (Figura 28b). Al igual que en la imagen anterior, observamos la formación de cuerpos celulares con abundantes filipodios (Figura 28c), y una escasa formación de ECM mostrando escasas zonas de adhesión celular en Ti (Figura 28d).



**Figura 28.** Micrografías de SEM a baja magnificación para condrocitos a 72 y 120 h. a) nanotubos de  $\text{TiO}_2$  a 72h. b) Ti a 72 h. c)  $\text{TiO}_2$  a 120h. d) Ti a 120 h. (Barra de escala es 200  $\mu\text{m}$  para a) y b), 50  $\mu\text{m}$  para c) y d)).

El estudio topográfico fue llevado a cabo sobre las superficies de nanotubos a 72 h de incubación y se presenta en la Figura 29. La imagen 3D (Figura 29a), indica la presencia de pliegues de mayor altura con respecto a la superficie,

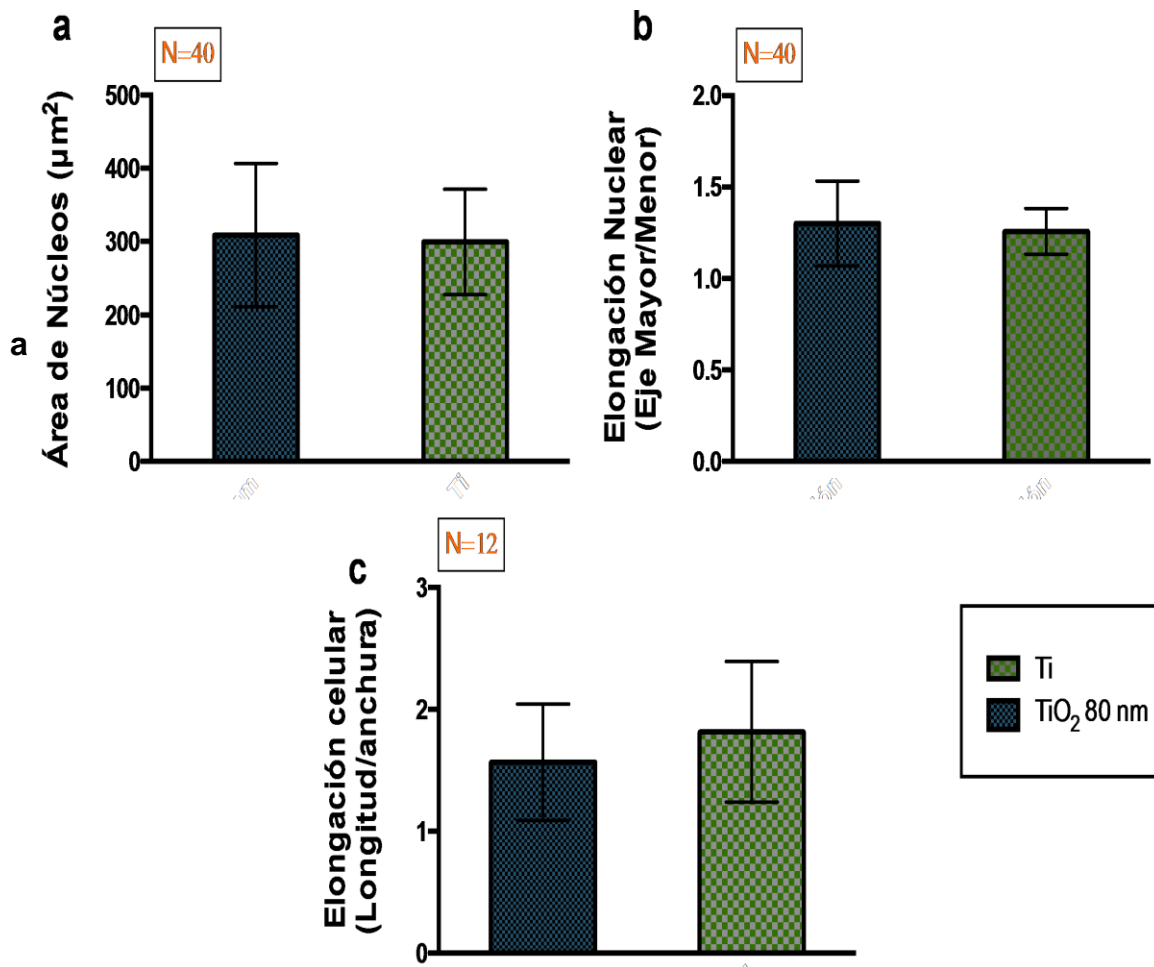
mostrando evidentes cambio topográficos. La Figura 29b proporciona una vista aérea, ilustrando una rugosidad diferente asociada a la monocapa formada por los condrocitos que se observaron en SEM.



**Figura 29.** Imágenes de AFM para cultivos a 72 h sobre  $\text{TiO}_2$ . a) Imagen 3D. b) Top view. Las líneas punteadas azules indican la posible formación de una monocapa celular y los círculos punteados representan los nanotubos de  $\text{TiO}_2$ .

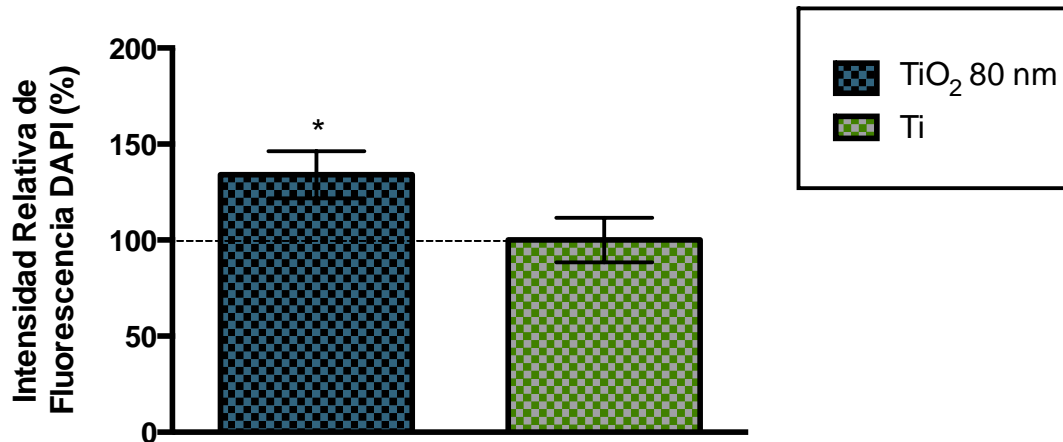
En términos de morfología celular, encontramos una configuración celular muy semejante entre los sustratos experimentales analizados en SEM. Por lo que se investigaron cambios en el área nuclear (Figura 30a), en la elongación nuclear

(Figura 30b) y en la elongación celular (Figura 30c). Sin embargo no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en cada uno de los especímenes.



**Figura 30.** a) Área nuclear b) Forma y elongación nuclear c) Elongación celular.

Posteriormente, se cuantificó la cantidad relativa de fluorescencia para DAPI en cada uno de los sustratos a 24 h de crecimiento (Figura 31). El análisis indica una cantidad relativamente mayor DAPI unido al ADN (~34%) en nanotubos de TiO<sub>2</sub>, observándose diferencias estadísticas (P=0.03), comportamiento sorpresivo en función a los datos anteriores.



**Figura 31.** Intensidad de fluorescencia relativa de DAPI sobre los sustratos a 24 h de incubación. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de  $\pm$  la desviación estándar. El valor P se determinó después de efectuar una prueba t-test: \* indica una diferencia significativamente estadística entre los dos sustratos a 24 h de incubación  $P < 0.05$ .

### 3.4 Discusión

En esta sección se estudió la morfología, la producción de ECM, la viabilidad, el comportamiento celular en función a la rugosidad de la superficie en términos de elongación celular y nuclear, la intensidad relativa de DAPI, así como la adhesión y proliferación de condrocitos auriculares porcinos sobre superficies nanotubulares de TiO<sub>2</sub>, con un diámetro de ~80 nm producidos por oxidación anódica para aplicaciones en ingeniería tisular de cartílago. En la Figura 22, se observa la morfología poligonal característica para condrocitos cultivados sobre cajas de poliestireno tratadas para cultivo celular, los cuales no presentaron un fenotipo-fibroblástico, y fueron utilizados para los estudios presentes en esta sección. A las 72 h de crecimiento sobre nanotubos de TiO<sub>2</sub>, se encontró la

elevada presencia de células vivas (células teñidas de verde) con respecto a Ti (Figura 23c), mientras que en Ti sin tratamiento se encontró una mayor proporción de células muertas con respecto a las vivas (Figura 23f), y la Figura 24 presenta diferencias estadísticas en el conteo para el número de células vivas en TiO<sub>2</sub> a 24 y 72 h con respecto al Ti, indicando que la configuración nanotubular favorece la vitalidad de los condrocitos. Nuestros resultados concuerdan con las investigaciones que reportó Brammer et al., ellos en sus experimentos evaluaron condrocitos cultivados en diferentes tamaños de nanotubos de TiO<sub>2</sub>, y publicaron mayor tasa de células vivas para nanotubos de 50 – 100 nm utilizando diacetato de difluoresceína (FDA), una tinción citoplasmática fluorescente (88).

De cualquier modo, entre mayor es la rugosidad de superficie mejor será la facilidad de los condrocitos para adherirse, tal como lo indica la Figura 25, observándose una mayor cantidad de células adheridas a 24 h y mayor número de núcleos teñidos a 72 h para nanotubos de TiO<sub>2</sub>. La Figura 26, resume los conteos de núcleos por campo, indicando diferencias estadísticas para los condrocitos adheridos en nanotubos a 24 h y a 72 h con respecto a Ti, y también cambios estadísticamente significativos entre 24 h y 72 h de incubación en nanotubos de TiO<sub>2</sub>, sugiriendo proliferación celular. Nuestros datos están en acuerdo a lo reportado para adhesión de condrocitos en nanotubos de ~70 nm (89). Posiblemente el incremento en la adhesión celular se deba a la estructura nanotubular, que de algún modo imita las dimensiones naturales de algunas proteínas importantes en la ECM de condrocitos como es colágeno (27), el cual forma triple hélice que se auto ensambla en nanofibras de 300 nm de longitud y

1.5 nm de diámetro (27) mostrando una configuración nanométrica. Por otra parte también el incremento en el área superficial promueve la interacción entre las proteínas que regulan la adhesión de condrocitos.

En las micrografías de SEM (Figura 27 y 28) los especímenes con nanotubos aparentemente poseen superioridad induciendo una respuesta positiva de los condrocitos, estimulando la formación de filipodios comparado con la superficie de Ti. El Ti sin tratamiento por otra parte induce a la formación de filipodios más delgados, translucidos y alargados. Una posible hipótesis es la sugerida por Burns et al., que se deba a que en las superficies de  $\text{TiO}_2$  se adsorban con facilidad proteínas de ECM sintetizadas por los condrocitos como son fibronectina y vitronectina los cuales poseen una longitud de 130 nm (89) y 15 nm (90) respectivamente y son capaces de mediar la adhesión de condrocitos, sin embargo se requieren de más estudios para demostrarlo.

Por otra parte se asume que los contactos focales los cuales forman los filipodios deben de poseer una longitud específica para promover la adhesión (91). Además que algunos estudios proponen que el aplanamiento celular no siempre es compatible con diferentes tipos de células (88, 92-94) como es en el caso de los condrocitos, que poseen un fenotipo muy sensible.

Se demostró que los nanotubos de  $\text{TiO}_2$  son capaces de potenciar la rápida confluencia celular comparado con Ti, pero inesperadamente encontramos una morfología celular muy semejante entre los sustratos, posiblemente se deba a que

en la superficie de Ti se forma una espontanea capa delgada de óxido la cual es de la misma naturaleza química que la de los nanotubos, facilitando la adhesión de proteínas de ECM y de esta manera se permite que se adopten la misma morfología poligonal; más estudios se requieren para esclarecer estos descubrimientos.

La morfología a nanoescala se sabe que promueve el crecimiento celular, y posiblemente juega un papel importante en la regulación de las propiedades bioquímicas del condrocito promoviendo la síntesis de glucosaminoglucanos (GAGs) así como la expresión de colágeno tipo II. Brammer et al, reportó que la síntesis de GAGs se incrementa en nanotubos de  $\text{TiO}_2$  de 50 – 100 nm de diámetro preparados por oxidación anódica y seguidos horneados a 500 °C en función de cristalizar los nanotubos formados (88), además Antonioli et al., demuestra significativo incremento en la regulación de colágeno tipo II para condrocitos cultivados en superficies de Ti recubiertas con nanotubos de carbono alineados verticalmente (VACNT) (95). Por otra parte, nuestros nanotubos se fabricaron por un método de anodizado diferente (datos no reportados), por lo que posiblemente los marcadores condrocíticos se encuentren mayormente expresados en nanotubos que en Ti como lo indica la literatura; sin embargo estudios bioquímicos se requieren para demostrar la funcionalidad de los condrocitos sobre nuestros nanotubos.

La Figura 29, muestra evidentes cambios en la topografía de los sustratos, indicando una topografía con configuración de forma fibrilar, de aspecto similar a

los observados para los filipodios en SEM. Este estudio en conjunto con el incremento en la adhesión y proliferación celular, así como la evidente formación de filipodios observados en SEM, nuevamente nos llevan a la hipótesis de que nuestros nanotubos de  $\text{TiO}_2$  promueven mayor síntesis de ECM, y, que se requieren de cuantificaciones de GAG's así como de colágeno tipo II para demostrarlo.

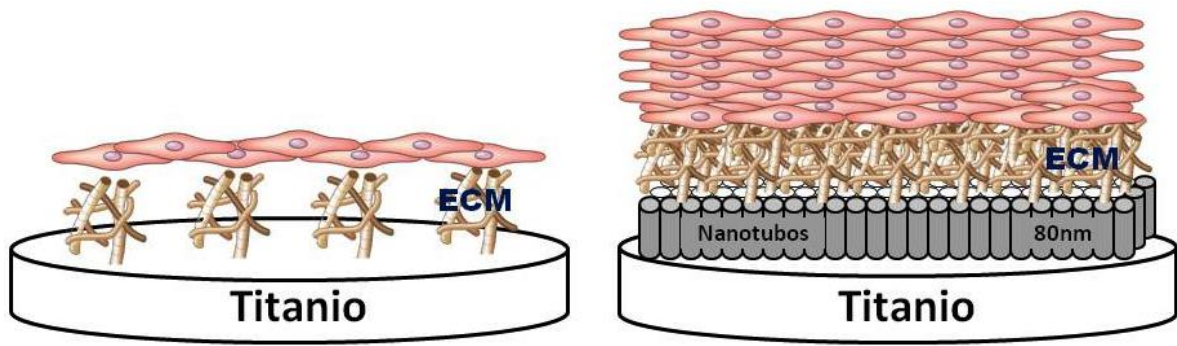
Se ha sugerido que las divergencias en las respuestas celulares pueden ser explicadas por la presencia de diferencias en las curvaturas de las porosidades brindando óptima compresión y tensión a los receptores mecánico-celulares (96). En función a esta hipótesis y a los datos encontrados con respecto a morfología celular para condrocitos entre los dos sustratos, procedimos a medir la elongación celular y nuclear, así como el área nuclear, para respaldar los resultados encontrados en las micrografías de SEM. En la Figura 30 se presentan las gráficas para cada uno de los parámetros mencionados, donde se observó un ligero incremento en la elongación celular para los condrocitos cultivados en Ti sin tratamiento, pero los cambios no fueron estadísticamente significativos ( $P < 0.48$ ), al igual para el cambio en el área nuclear y en la elongación nuclear, datos que respaldan las pruebas analizadas en SEM.

Posteriormente, cuantificamos la intensidad relativa de fluorescencia para DAPI, en función de determinar si hay una mayor síntesis de ADN entre cada uno de los sustratos. Los resultados presentes en la Figura 31 indican aumento significativo en la intensidad de fluorescencia para condrocitos incubados en

nanotubos de  $\text{TiO}_2$  a 24 h. La intensidad de las tinciones específicas en ADN están relacionados con la estructura de la cromatina, lo que está aproximadamente correlacionado con la actividad transcripcional (97).

También está correlacionado el incremento de la síntesis de ADN con la proliferación celular (98), lo que nos ayuda a explicar el aumento significativo en la proliferación en nanotubos de  $\text{TiO}_2$ , dato que abre la hipótesis de que las superficies nanotubulares estimulan el incremento en la síntesis de ADN, como lo que reportan Kim et al., donde evalúan que condrocitos diferenciados a partir de células mesenquimales sobre nanotubos de  $\text{TiO}_2$  de ~ 70 nm de diámetro, expresan mayor actividad para Erk (extracelular signal-regulated kinase) comparado contra Ti,  $\text{TiO}_2$  30 nm y 50 nm de diámetro (51), así como también la activación de las vías de MAPK (mitogen-activated protein kinase)/p38 se han reportado involucradas para diferentes biomateriales (99, 100).

El titanio es un material metálico de uso ortopédico y dental ampliamente aceptado. Los resultados obtenidos en esta sección sugieren que los nanotubos de  $\text{TiO}_2$  estimulan la adhesión y proliferación de condrocitos como indica el esquema representado por la Figura 32. Por lo que un implante de Ti recubierto completamente con nanotubos puede ser un amplio candidato para ser utilizado en algunos tipos de daños asociados al cartílago, brindando efectos positivos en la regeneración de este.



**Figura 32.** Proliferación de condrocitos, el crecimiento se potencia en la superficie con nanotubos de  $\text{TiO}_2$  y se estimula mayor síntesis de ECM.

## CAPÍTULO 4

### **4.1 Implicación del uso de nanotubos de TiO<sub>2</sub> para la regeneración vascular: Aplicaciones para stents vasculares.**

El interior de todos los vasos sanguíneos está compuesto por una monocapa de células endoteliales (EC), y son uno de sus componentes principales (101). En un adulto normal de 70 kg el endotelio está constituido de aproximadamente  $1 \times 10^{13}$  células, pesando aproximadamente 1 kg (102) y EC ocupan aproximadamente un área superficial de más de 1,000 m<sup>2</sup> (103). La estructura y la funcionalidad de las EC's son importantes para mantener la función circulatoria. El endotelio en condiciones saludables es capaz de responder a señales físicas y químicas por medio de la producción de un amplio rango de factores que regulan el tono vascular, la adhesión celular, tromboresistencia, la proliferación de músculo liso celular y la inflamación de la pared de los vasos sanguíneos (104). Como barrera el endotelio es semipermeable y controla el transporte de moléculas grandes y pequeñas (102, 105).

Los pioneros Furchgott y Zawadzki publicaron por primera vez la liberación de un factor relajante-endotelial que subsecuentemente se demostró que era óxido nítrico (NO) (106). El NO es generado a partir de la L-arginina por acción de la óxido nítrico sintasa (eNOS) en presencia de cofactores como la

tetrahidrobiopterina (BH4) (104, 107). El endotelio también regula la hiperpolarización de las células de músculo liso vascular por medio de vías independientes de NO, las cuales incrementan la conducción de potasio y subsecuentemente la despolarización del músculo liso vascular, manteniendo el tono vascular (104, 108). En la fisiología vascular normal, la NO juega un papel muy importante manteniendo la pared vascular en un estado inactivo inhibiendo la inflamación, la proliferación celular y la trombosis.

Alteraciones en la homeostasis vascular pueden llevar a enfermedades como la aterosclerosis, la cual es considerada como una enfermedad inflamatoria progresiva de las arterias y también por la acumulación de lípidos, carbohidratos, proteínas y el exceso de proliferación celular (109, 110). Fue la principal causa de enfermedad coronaria y ataques al corazón siendo responsable de más de 589,000 muertes en el 2005 (111) y alrededor del 50% de todas las muertes en occidente (109, 112) y en Europa occidental (113). La aterosclerosis es un proceso complejo que involucra células inflamatorias y factores que interactúan en diferentes estados de su desarrollo.

Esta enfermedad inicia en las primeras etapas de la vida, pero usualmente toma décadas para que se desarrolle una lesión sintomática. Durante el paso de la vida, la mayor parte de las placas ateroscleróticas se mantiene asintomáticas, algunas pueden ser obstructivas y algunas se pueden romper o erosionar llevando a un evento aterotrombótico como es un síndrome coronario agudo (114-116). La

ruptura de esta placa es la mayor causa de los síntomas por trombos en arterias coronarias y carótidas (116).

Para tratar los problemas de arterias ateroscleróticas, una opción ampliamente utilizada es la intervención por medio de angioplastía coronaria transluminal percutánea (ACTP) con colocación de stent. Este procedimiento es mínimamente invasivo utilizado para desbloquear las arterias coronarias y permitir el flujo de sangre sin obstáculos hacia el músculo cardiaco (117, 118), y fue desarrollado por primera vez en 1970s como un método alternativo para la cirugía de revascularización por bypass . Recientemente la Asociación Americana para el Corazón (siglas en ingles AHA) reportó que aproximadamente se llevaron acabo un millón de procedimientos de colocación de stents al año en los Estados Unidos (119), de los cuales aproximadamente el 25% - 30% sufre restenosis o recurrencia de estrechamiento arterial (120-122). La biología de la restenosis incluye redistribución de plaquetas, trombosis, e hiperplasia de la neoíntima (123).

La aplicación de los stents liberadores de fármacos ha destacado como tratamiento clínico por su habilidad de reducir la re-estenosis intra-stent (124, 125). De cualquier modo estos sistemas están ampliamente enfocados en la supresión de la proliferación del músculo liso vascular (VSMC). Un meta-análisis reciente indicó que estas terapias fueron asociadas con un alto riesgo de trombosis tardía en el stent, debido a la retrasada re-endotelización de la lumen causado por recubrimiento liberador de medicamento (126, 127). Para el éxito de un stent se requiere de la formación de una monocapa de endotelio sano que no solo previene

la coagulación sino también la proliferación de músculo liso vascular, a parte es fundamental para mantener la homeostasis vascular.

En función de estimular una respuesta positiva sobre el stent, es importante promover la interacción tejido/material para brindar un proceso de sanación más rápido. Un punto importante para las superficies de los stents es inhibir la agregación plaquetaria es decir deben ser tromboresistente (118). Por lo tanto, al seleccionarse los materiales para la fabricación de stents, estos deben cumplir con propiedades que sean capaces de promover una completa integración del injerto al vaso sanguíneo y facilitar la endotelización.

Algunos estudios sugieren el uso de superficies nanoestructuradas como promotores de la re-endotelización (128), sin embargo la nano-configuración óptima para promover la eficiente proliferación celular, así como la expresión de marcadores endoteliales aún no a sido completamente esclarecida.

De acuerdo a esta hipótesis en esta sección se estudió el proceso de re-endotelización en sustratos metálicos *in vitro*, explorándose el uso de nanotubos de titanio para su endotelización con células endoteliales de arteria coronaria bovina (BCAECs). El efecto de las superficies nanotubulares se evaluó basado en viabilidad, adhesión y propagación, expresión de marcadores endoteliales como son eNOS (óxido nítrico sintasa endotelial) y VEGFR-2 (receptor del factor de crecimiento vascular endotelial 2), biomasa mitocondrial, morfología celular y la caracterización del efecto en la elongación celular y nuclear.

## **4.2 Fase experimental**

### ***Fabricación de nanotubos de TiO<sub>2</sub>***

Las superficies de nanotubos de TiO<sub>2</sub> alineados verticalmente y los discos de Ti utilizados para esta sección son similares a los descritos en detalle en la sección 2.2 de esta tesis.

### ***Cultivo de células endoteliales***

BCAECs fueron obtenidos de Cell Applications, Inc. El medio para el cultivo celular fue DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) bajo en glucosa y suplementado con 10% FBS y 1% antibióticos/antimicótico (Gibco-Invitrogen). Las células fueron cultivadas en 95% humedad 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Todos los experimentos se llevaron a cabo entre el pasaje 7-10.

### ***Ensayo de biocompatibilidad de células cultivadas***

Para verificar la viabilidad celular, se llevó a cabo la tinción de vida/muerte (Live/dead assay kit; Gibco-Invitrogen) a los siguientes tiempos día 1 (d1), día 3 (d3), día 8 (d8) y día 30 (d30) sobre cada uno de los sustratos experimentales, se utilizó el método que está completamente descrito en la sección 2.2 de esta tesis para cada uno de los experimentos.

### ***Adhesión y proliferación celular***

En función de determinar la tasa de adhesión y proliferación de las BACECs, se incubaron las células sobre los especímenes a d1, d3, d8 y d30. Cumpliéndose los tiempos, se retiraron de la incubadora y se les realizó la tinción con DAPI (Molecular Probes, USA), siguiendo el método utilizado en la sección 2.2 de este proyecto.

### ***Inmunofluorescencia de eNOS y VEGFR-2***

Después de cada uno de los siguientes días: d1, d3, d8 y d30, las células fueron fijadas en paraformaldehído al 4% en PBS 1X por 45 minutos a 37°C. Una vez fijadas, las células se lavaron tres veces (5 minutos/lavado) en PBS 1X. Para permeabilizar las células, se les agregó Triton X-100 0.1% en PBS 1X por 30 minutos a 37°C. Luego las células fueron lavadas tres veces en PBS 1X (5 minutos/lavado). Entonces las células se incubaron por 1 hora a 37°C en solución bloqueadora 1%BSA (albumina de suero bovina, Sigma Aldrich)/1X PBS. Después de la incubación las células fueron lavadas tres veces en PBS 1X (5 minutos/lavado). A continuación se colocó el anticuerpo primario utilizando rabbit anti-eNOS (Abcam, ab5589) y mouse anti-VEGF (Abcam, ab1316) disueltos 1:100 en solución bloqueadora. Después las células se lavaron en PBS 1X tres veces (5 minutos/lavado) y se les adicionó los siguientes anticuerpos secundarios: Alex Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1:500, Molecular Probes) y Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (1:500 Molecular Probes) en solución bloqueadora y se dejaron

incubando por 1 hora a temperatura ambiente. En función de teñir los núcleos, se lavaron las células tres veces en PBS 1X (5 minutos/lavado), y se les colocó DAPI (1:1000, Molecular Probes) por 15 minutos a temperatura ambiente. De nuevo las células fueron lavadas tres veces con PBS 1X (5 minutos/lavado). Finalmente las muestras se invirtieron y se montaron en un cubreobjetos con una gota de glicerol 20% (v/v), y se visualizaron en un microscopio invertido de fluorescencia (Olympus IX51).

### ***Tinción Mitocondrial***

Para determinar la cantidad de masa mitocondrial presente en cada uno de los sustratos a d1, d8 y d30, se sembraron 50,000 células/ml, cumpliéndose cada uno de los tiempos de incubación, las células se lavaron tres veces con PBS 1X (5 minutos/lavado) a 37°C. A continuación las células se expusieron a MitoTracker Deep Red FM (500nm, Molecular Probes) a 37°C por 45 minutos. Luego se lavaron tres veces con PBS 1X (5 minutos/lavado). Después se fijaron en paraformaldehído al 4% (v/v) a 37°C por 20 minutos. Seguidamente, las células se permeabilizaron con Triton X-100 0.1% por 20 minutos. Luego se lavaron tres veces con PBS 1X (5 minutos/lavado) y consecutivamente se bloquearon en solución bloqueadora por 1 hora a temperatura ambiente. Inmediatamente se lavaron tres veces con PBS 1X y se colocaron DAPI (1:1000) por 15 minutos para realizar tinción de núcleo. Luego se lavaron tres veces con PBS 1X e inmediatamente se invirtió la muestra y se colocó en un cubreobjetos con 5µl de

glicerol 20% (v/v) y se observó bajo el microscopio de fluorescencia usando un filtro rojo (mitocondrias) y uno azul (DAPI).

### ***Morfología celular analizada por SEM***

Después de 4h, d1, d3, d8 y d30 de cultivo, se fijaron las células sobre los sustratos (TiO<sub>2</sub> y Ti), utilizando el método anteriormente descrito en la sección 2.2.

### ***Inmunotinción de actina de citoesqueleto***

A cada uno de los siguientes días de incubación: d1, d3, d8 y d30; las células fueron fijadas en paraformaldehído al 4% en PBS 1X por 45 minutos a 37°C. Una vez fijadas, las células se lavaron tres veces (5 minutos/lavado) en PBS 1X. Para permeabilizar las células, se les agregó Triton X-100 0.1% en PBS 1X por 30 minutos a 37°C.

Luego las células fueron lavadas tres veces en PBS 1X (5 minutos/lavado). Entonces estas se incubaron por 1 hora a 37°C en solución bloqueadora 1%BSA/1X PBS. Después de la incubación las células fueron lavadas tres veces en PBS 1X (5 minutos/lavado). A continuación se agregó Alexa Fluor 488 phalloidin (1:300 Molecular Probes) y se colocaron a incubar a 37°C por 1 hora. Se lavaron las células con PBS1X y se les colocó DAPI (1:1000) por 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron tres veces con PBS 1X e inmediatamente se montaron en un cubreobjetos con 5µl de glicerol 20% (v/v) y se

observaron bajo el microscopio de fluorescencia, usando un filtro verde (actina) y uno azul (DAPI).

### ***Análisis de datos para elongación celular/nuclear y área nuclear***

Para determinar los cambios cuantitativos entre la elongación celular y nuclear sobre las células cultivadas en los sustratos, se utilizó la barra de escala y se efectuó de acuerdo a lo establecido en la sección 2.2 de esta tesis.

### ***Análisis estadístico y gráficas con barras de error***

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron tres veces. Los datos fueron evaluados por medio del software Prism 6 (2013), siguiendo los parámetros estadísticos utilizados en la sección 2.2.

## **4.3 Resultados**

La morfología en monocapa juega un papel muy importante en el endotelio. La regeneración del endotelio es de crucial importancia después de la colocación de un stent, así como mantener activos algunos de sus receptores involucrados en la proliferación celular. Por lo tanto comparamos Ti sin tratamiento y nanotubos de TiO<sub>2</sub> utilizados en los capítulos anteriores, y se caracterizaron en términos de

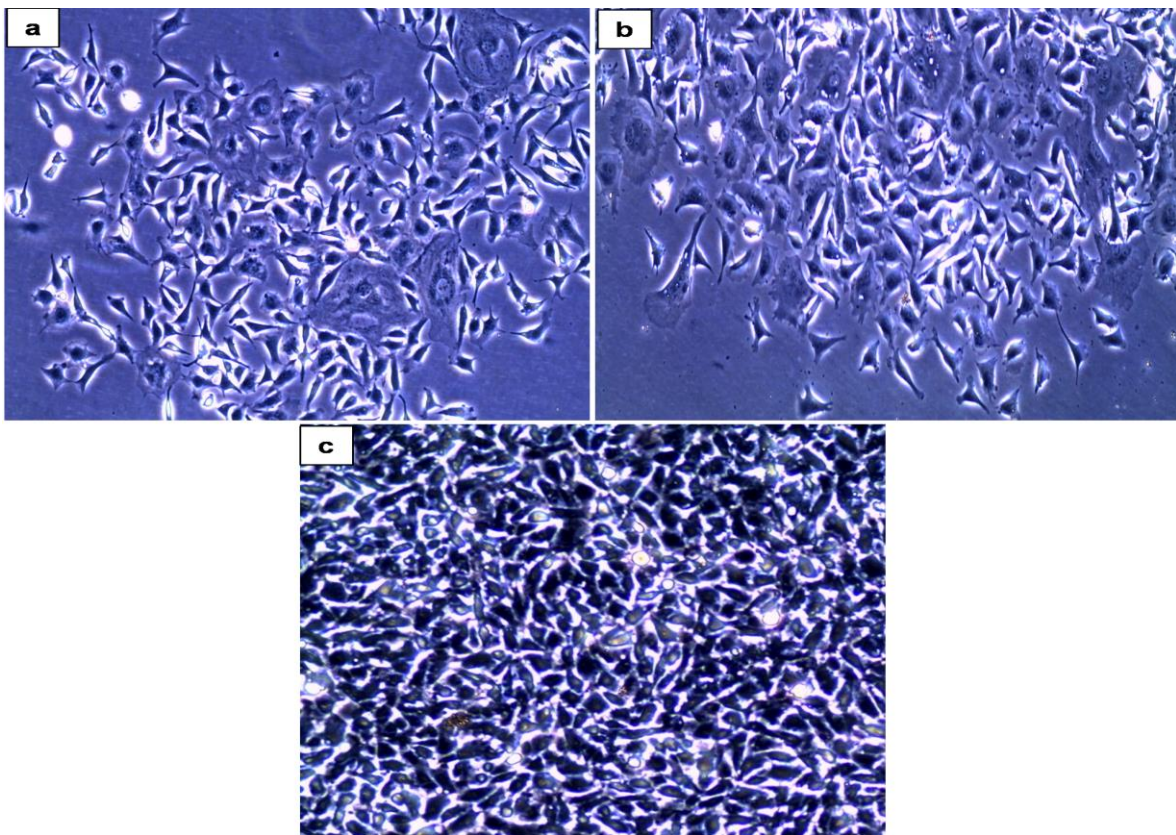
adhesión, proliferación, viabilidad, expresión de eNOS, VEGFR-2, biomasa mitocondrial, crecimiento en formación de monocapa y morfología celular.

Como fuente celular, se utilizaron BACECs, las cuales se cultivaron en caja tratadas para cultivo de células mamíferas hasta obtenerse confluencia celular, la morfología de las células se pueden observar en la Figura 33. Se puede apreciar una morfología poligonal en las imágenes a baja y mediana confluencia típicas del endotelio (Figura 33a, Figura 33b), y el crecimiento en forma de monocapa que se aprecia en la Figura 33c.

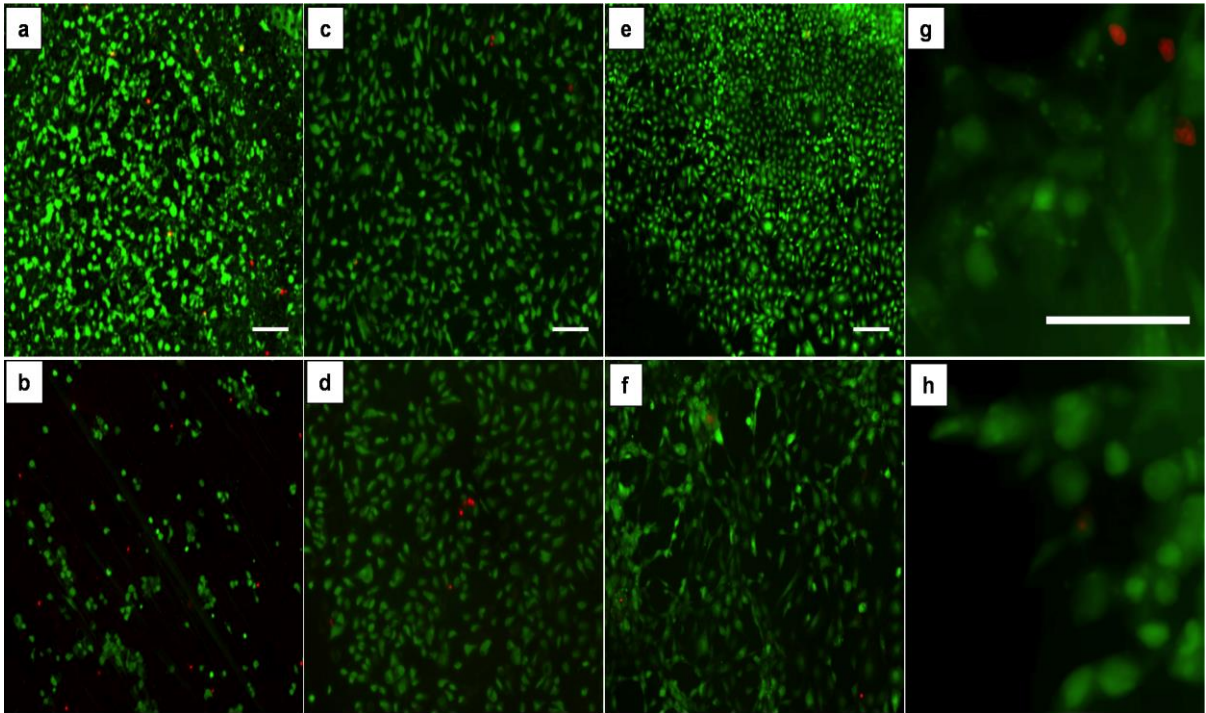
Al cumplirse los días establecidos para los experimentos se procedió a realizar la evaluación celular. Se realizó la tinción de vida/muerte (Figura 34), en la que se encontró que el metal sin tratamiento no brinda las condiciones adecuadas para la formación de la monocapa celular.

A d1 se observó que en los nanotubos hay un mayor número de células vivas con respecto a Ti (Figura 34b). Continuando el crecimiento al d3 se apreció un número similar de células vivas comparado con nanotubos d1, indicando que se mantiene el número de células vivas, sin embargo se encontró un menor número de células vivas para Ti con respecto a nanotubos a d3, pero mayor número comparado con Ti d1; posiblemente el crecimiento celular se atrasa en el metal descubierto. Al d8 se observa un mayor número comparado con nanotubos a d1 y d3, y a la vez con Ti d1 y d3, y el número de células vivas en Ti a d8 es menor que en d3. Con respecto al d30, en términos de viabilidad se observó una

tasa similar de viabilidad. Al d30 ambas superficies estaban cubiertas, sin embargo la morfología observada para Ti sin tratamiento indica que posiblemente se estén despegando las células de la superficie. Con respecto a los nanotubos, aparentemente se forma una monocapa de células vivas para cada tiempo, observándose células mas alargadas posiblemente por estar mejor adheridas a la superficie.



**Figura 33.** Células endoteliales de arteria coronaria bovina sembradas sobre cajas de cultivo. a) Baja confluencia. b) Media confluencia. c) Alta confluencia.

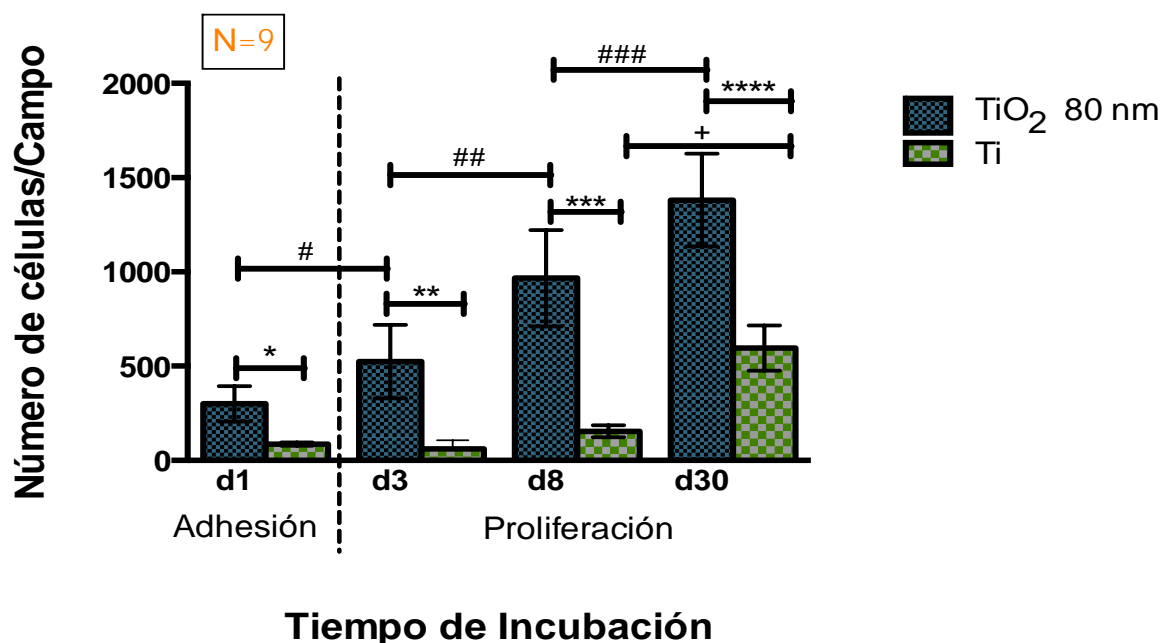


**Figura 34.** Viabilidad de células endoteliales utilizando la tinción live/dead essay kit. a) Unión de células vivas/muertas en nanotubos d1. b) Conjunto de vivas/muertas en Ti d1. c) Vivas/muertas en TiO<sub>2</sub> d3. d) Vivas/muertas en Ti d3. e) Vivas/muertas en TiO<sub>2</sub> d8. f) Vivas/muertas en Ti d8. g) Vivas/muertas en TiO<sub>2</sub> d30. h) Vivas/muertas en Ti d30. La barra de escala para a) – f) es de 100 μm, g) – h) es de 50 μm.

Después de analizar la viabilidad celular sobre cada uno de los sustratos experimentales, continuamos realizando los exámenes de adhesión y proliferación endotelial utilizando la tinción de DAPI (Figura 35).

En la gráfica presente en la Figura 35, se observa un evidente crecimiento de células adheridas en los nanotubos d1 con respecto a Ti d1, mientras que en los nanotubos al d3 se aprecia un mayor crecimiento con respecto a los nanotubos a d1 siendo significativo, y un mayor crecimiento de los nanotubos al d3 con respecto al Ti d3. A los 8 días (d8), se aprecia un crecimiento superior en nanotubos con respecto a nanotubos a d1 y d3, y también contra Ti d8,

observándose una gran diferencia entre ambos sustratos, finalmente al d30 de proliferación, se observa un mayor incremento en los nanotubos con respecto a los anteriores días, al igual contra Ti d30, sin embargo en Ti d30 se aprecia un mayor crecimiento con respecto a los días pasados para las células incubadas en Ti.

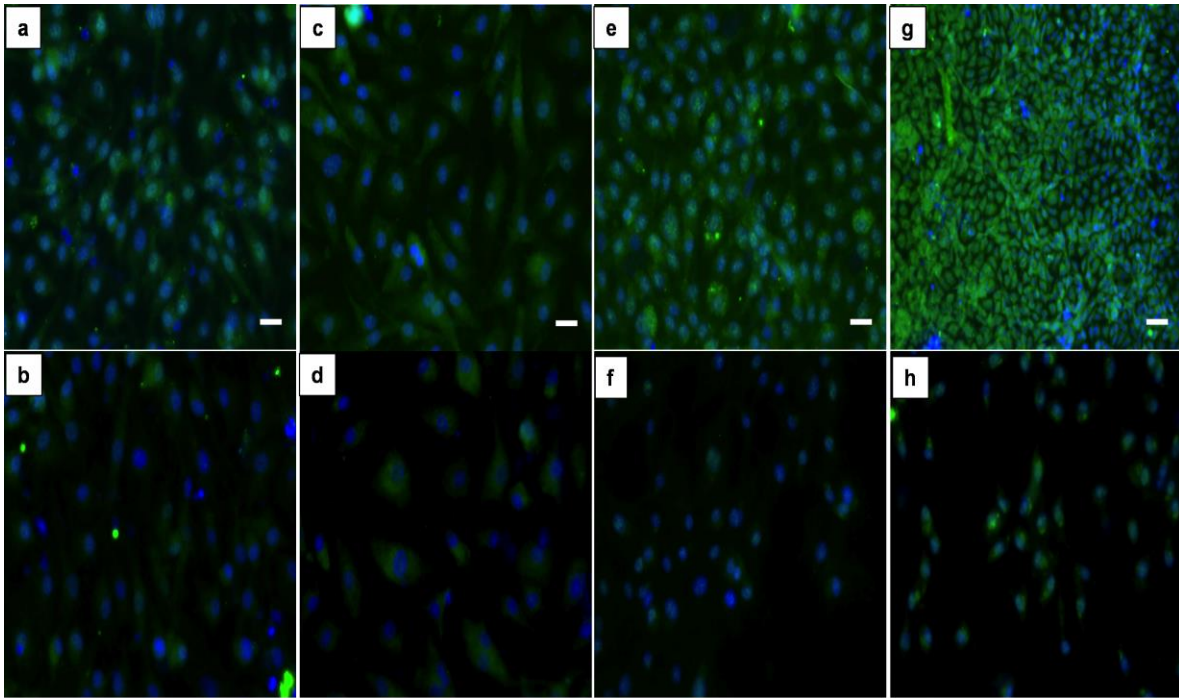


**Figura 35.** Número de células vs tiempo de incubación. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de  $\pm$  la desviación estándar. El valor P se obtuvo realizando un análisis de varianzas de una vía seguido un análisis de Tukey: \* indica diferencia entre Ti vs nanotubos a d1  $P < 0.05$ , \*\* indica contrastes significativos entre Ti vs nanotubos a d3  $P < 0.05$ , \*\*\* indica cambios significativos entre Ti vs nanotubos a d8  $P < 0.05$ , \*\*\*\* muestra cambios entre Ti vs nanotubos a d30  $P < 0.05$ , # indica diferencia significativa entre nanotubos a d1 vs d3  $P < 0.05$ , ## marca cambios entre nanotubos a d3 vs d8  $P < 0.05$ , ### señala cambios entre nanotubos a d8 vs d30  $P < 0.05$  y + indica diferencia entre Ti d8 vs d30  $P < 0.05$ .

Conociendo el comportamiento de las células endoteliales a diferentes tiempos de incubación sobre cada uno de los sustratos en términos de viabilidad y proliferación, observamos significativa superioridad de los nanotubos contra Ti sin tratamiento. Es importante conocer la actividad endotelial, por lo tanto investigamos la expresión de eNOS a cada uno de los tiempos experimentales sobre cada uno de los especímenes como se aprecia en la inmunofluorescencia presente en la Figura 36.

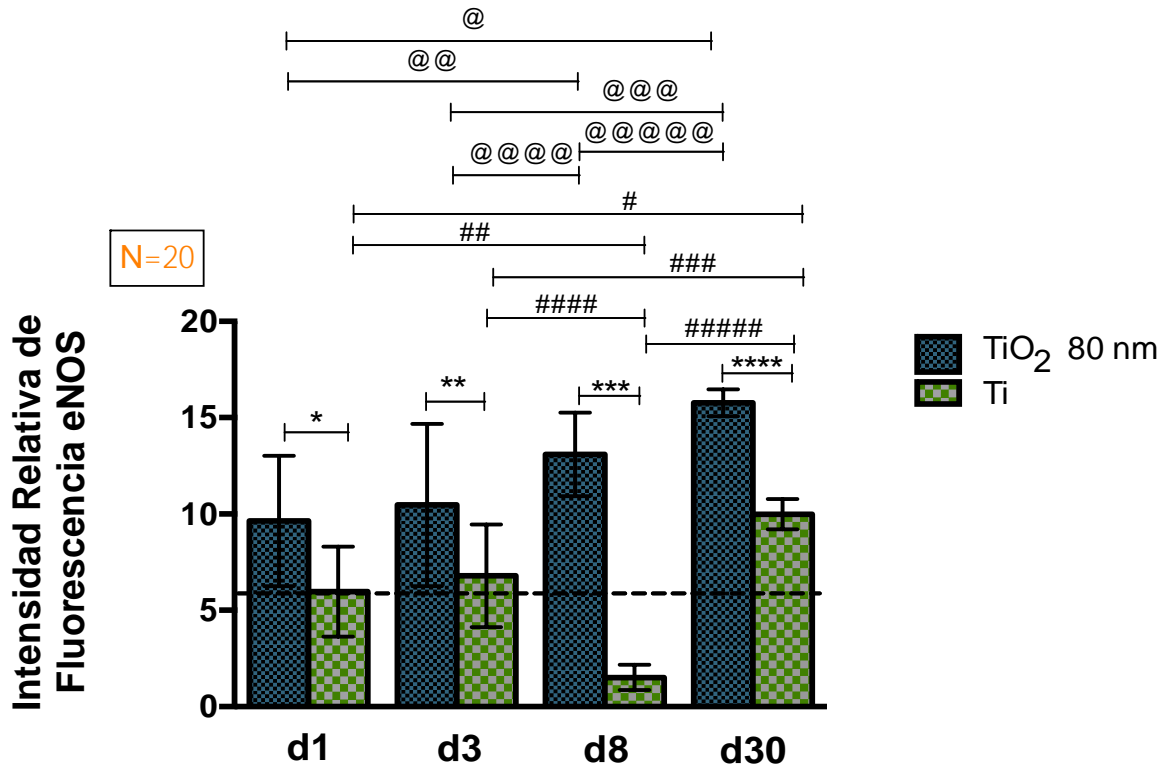
Podemos observar en la Figura 36a, mayor intensidad para eNOS a d1 comparado contra Ti a d1 (Figura 36b), sin embargo se aprecia que a d3 en TiO<sub>2</sub> la intensidad es mayor comparado con d1 y también comparado contra Ti d3. Además se observa una morfología ligeramente mas alargada en TiO<sub>2</sub> d3 comparado contra Ti en la que se aprecian formas circulares. Al d8 en TiO<sub>2</sub> (Figura 36e), se observa mayor intensidad de fluorescencia comparado contra los tiempos anteriores para los dos sustratos y también contra Ti d8 (Figura 36f), así como también se distingue una forma similar a las del d3 y d1.

Finalmente, al d30 en los nanotubos se encontró que eNOS esta mayormente expresado (Figura 36g) comparado con los días anteriores. Así también, la superficie nanoestructurada estimula mayor expresión comparado contra Ti a d30 (Figura 36h). También a este tiempo, se observó que en Ti a d30 había mayor expresión de eNOS comparado contra los tiempos en anteriores Ti.



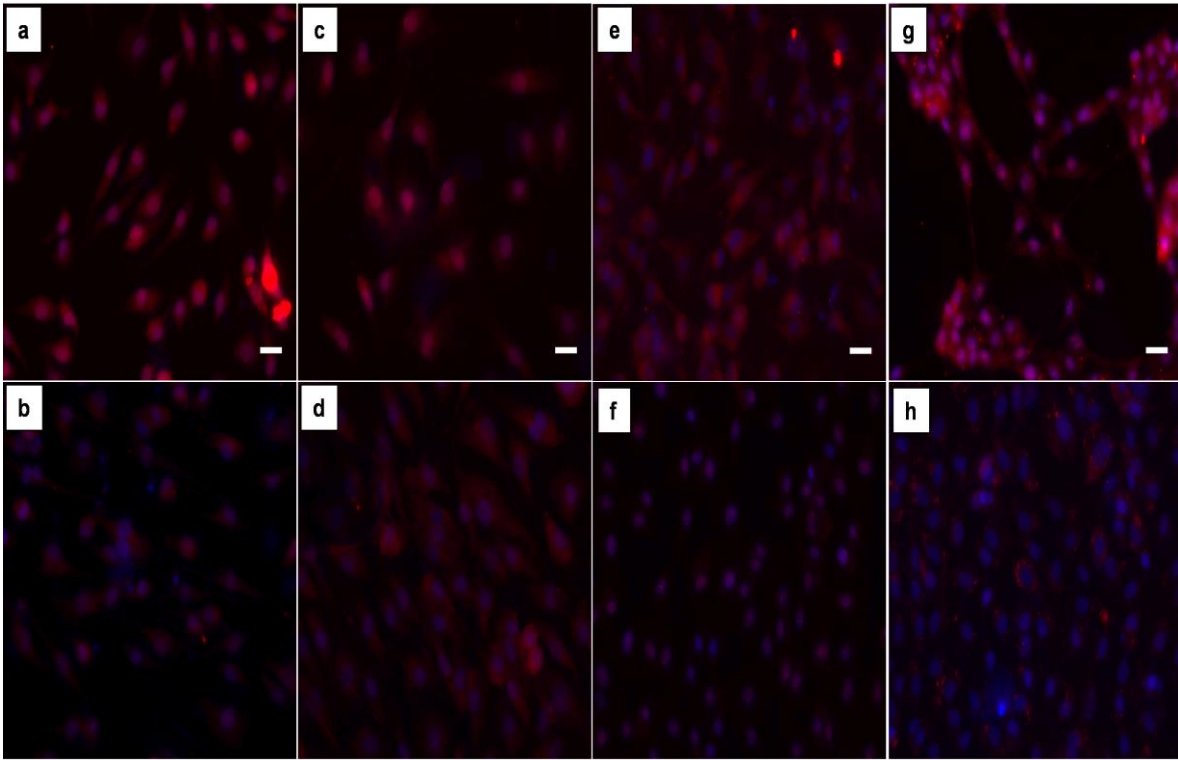
**Figura 36.** Inmunofluorescencia para eNOS. a) Células sobre  $\text{TiO}_2$  a d1. b) Células en Ti a d1. c) Expresión sobre  $\text{TiO}_2$  a d3. d) Células sobre Ti a d3. e) Endotelio sobre  $\text{TiO}_2$  a d8. f) Células sobre Ti a d8. g) Expresión sobre  $\text{TiO}_2$  a d30. h) Células sobre Ti a d30. Barra de escala es de 20  $\mu\text{m}$ .

En la Figura 37 se presenta una gráfica representando la intensidad de fluorescencia de eNOS vs el tiempo de incubación. Se observaron cambios significativos entre cada uno de los sustratos conforme avanza el tiempo, observándose mayor fluorescencia en  $\text{TiO}_2$  con respecto a Ti sin tratamiento, datos que concuerdan con las imágenes representativas presentadas en la Figura 36.



**Figura 37.** Intensidad relativa de fluorescencia vs tiempo de incubación. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de  $\pm$  la desviación estándar. El valor P se obtuvo realizando un análisis de varianzas de una vía seguido de un análisis de Tukey: \* diferencia estadísticamente significativa entre TiO<sub>2</sub> vs Ti a d1 P<0.05, \*\* cambios estadísticos entre TiO<sub>2</sub> vs Ti a d3 P<0.05, \*\*\* TiO<sub>2</sub> vs Ti a d8 P<0.05, \*\*\*\* TiO<sub>2</sub> vs Ti a d30 P<0.05, # Ti d1 vs Ti d30 P<0.05, ## Ti d1 vs Ti d8 P<0.05, ### Ti d3 vs Ti d30 P<0.05, #### Ti d3 vs Ti d8 P<0.05, ##### Ti d8 vs Ti d30 P<0.05, @ TiO<sub>2</sub> d1 vs TiO<sub>2</sub> d30 P<0.05, @@ TiO<sub>2</sub> d1 vs d8 P<0.05, @@@ TiO<sub>2</sub> d3 vs TiO<sub>2</sub> d30 P<0.05, @@@@ TiO<sub>2</sub> d3 vs d8 P<0.05, @@@@@ TiO<sub>2</sub> d8 vs d30 P<0.05.

La síntesis y expresión de eNOS durante la proliferación endotelial es un factor clave para el éxito en la regeneración endotelial, sin embargo otros receptores se también son importantes en el proceso de re-endotelización como es el caso de VEGFR-2 que se presenta en la Figura 38.

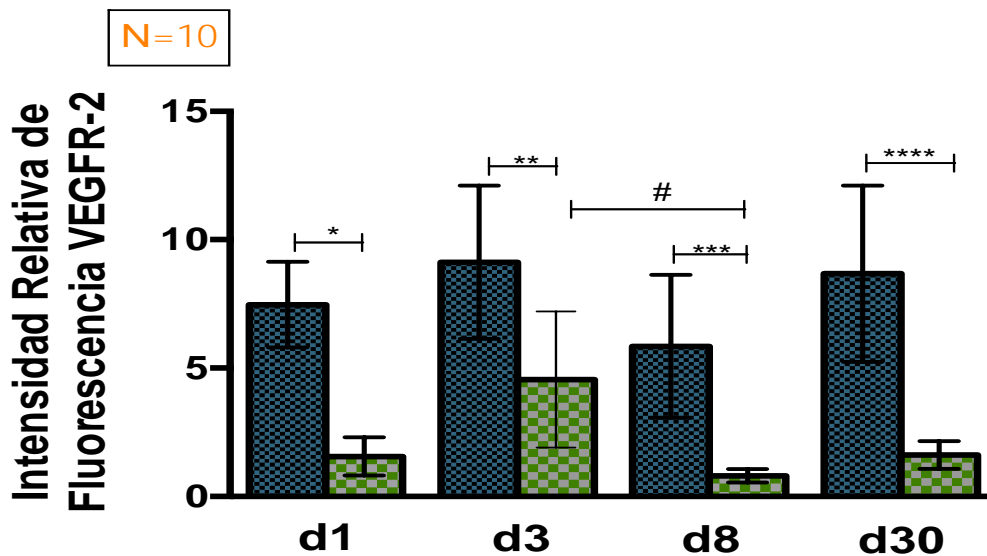


**Figura 38.** Inmunofluorescencia para VEGFR-2. a) Células sobre  $\text{TiO}_2$  a d1. b) Células en Ti a d1. c) Expresión sobre  $\text{TiO}_2$  a d3. d) Células sobre Ti a d3. e) Endotelio sobre  $\text{TiO}_2$  a d8. f) Células sobre Ti a d8. g) Expresión sobre  $\text{TiO}_2$  a d30. h) Células sobre Ti a d30. Barra de escala es de 20  $\mu\text{m}$ .

En las tinciones para VEGFR-2 podemos observar cambios en las intensidades de fluorescencia, apreciándose una mayor intensidad para las células sembradas sobre los especímenes de  $\text{TiO}_2$  con respecto a las cultivadas sobre Ti a cada uno de los tiempos de incubación establecidos. En la Figura 38a se observan células con una morfología mas alargada en comparación con las observadas sobre Ti (Figura 38b) al igual para el resto de los tiempo estudiados en

cada uno de los sustratos; morfología que coincide con las observadas en las inmunofluorescencia realizadas para localizar eNOS a cada uno de estos tiempos (Figura 36).

En la Figura 39, podemos observar gráficamente los cambios indicando las diferencias en la expresión de VEGFR-2 entre cada uno de los sustratos a los diferentes tiempos.



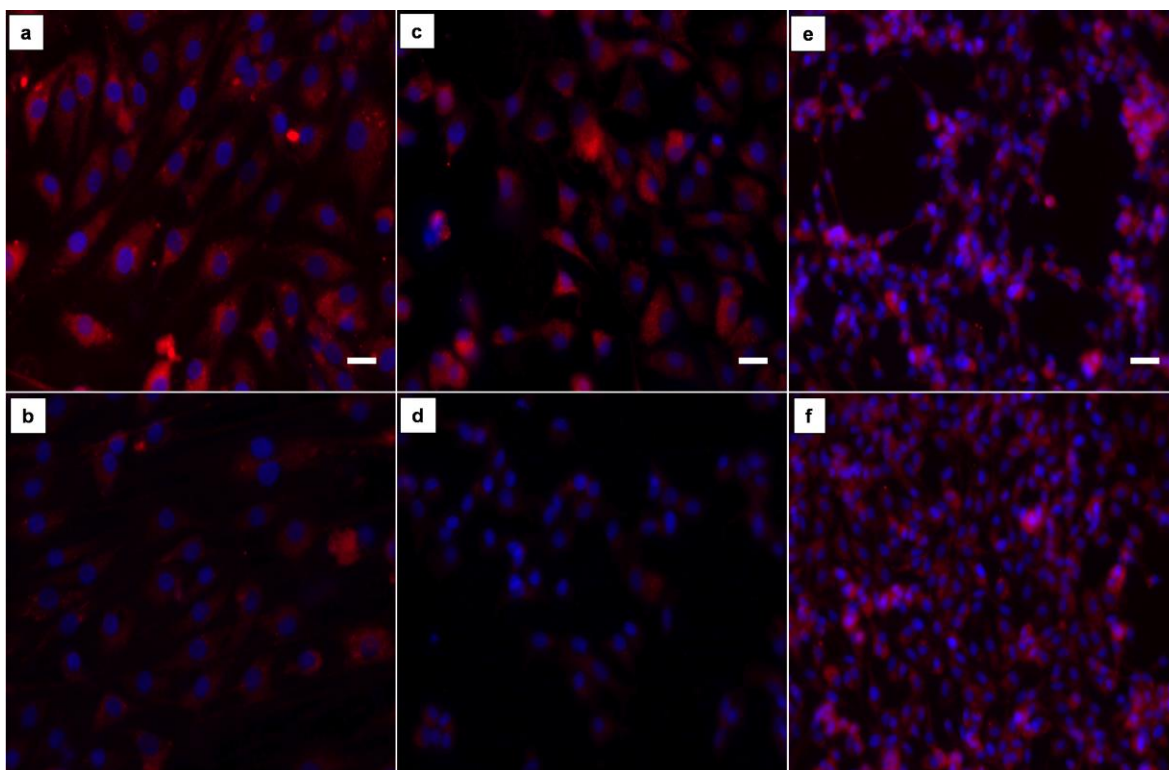
**Figura 39.** Intensidad relativa de fluorescencia vs tiempo de incubación. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de  $\pm$  la desviación estándar. El valor P se obtuvo realizando un análisis de varianzas de una vía seguido de un análisis de Tukey: \* diferencia significativamente estadística entre TiO<sub>2</sub> vs Ti a d1  $P < 0.05$ , \*\* diferencia entre TiO<sub>2</sub> vs Ti a d3  $P < 0.05$ , \*\*\* cambios entre TiO<sub>2</sub> vs Ti a d8  $P < 0.05$ , \*\*\*\* diferencia entre TiO<sub>2</sub> vs Ti a d30  $P < 0.05$ , # cambio significativamente estadístico entre Ti d3 vs Ti d8.

Se observó una mayor expresión en TiO<sub>2</sub> a d1 comparado contra Ti d1, pero al d3 se observa mayor expresión en la superficie de TiO<sub>2</sub>, sin embargo los cambios no fueron significativamente estadísticos. Al igual la intensidad para Ti a d3 se incrementó con respecto a Ti d1, pero sin cambios estadísticamente diferentes. Luego al d8 sobre TiO<sub>2</sub>, se observó un decaimiento en la intensidad, con respecto a d1 y d3, sin embargo no se encontró una diferencia significativa. El mismo comportamiento se encontró para Ti d8 con respecto a d1 y d3; comparándose con d3, las diferencias que se encontraron son significativas, sin embargo contra d1 no lo son. Al igual al d30, se incrementó ligeramente la intensidad para Ti con respecto a d8 sin ser significativo, pero los valores son menores con respecto a Ti d3 y TiO<sub>2</sub> d30. Por otro lado, el incremento observado a d30 en TiO<sub>2</sub> se mantuvo sin cambios significativos para cada uno de los tiempos de incubación lo cual resulto sorprendente.

Después de analizar la expresión de VEGFR-2 y eNOS, que son receptores de gran importancia involucradas en el crecimiento y la salud endotelial (129), consideramos valorar la cantidad de masa mitocondrial presente en cada uno de los sustratos a los diferentes tiempos de incubación, con la finalidad de cuantificar el efecto del crecimiento endotelial sobre los diferentes sustratos en términos de masa mitocondrial.

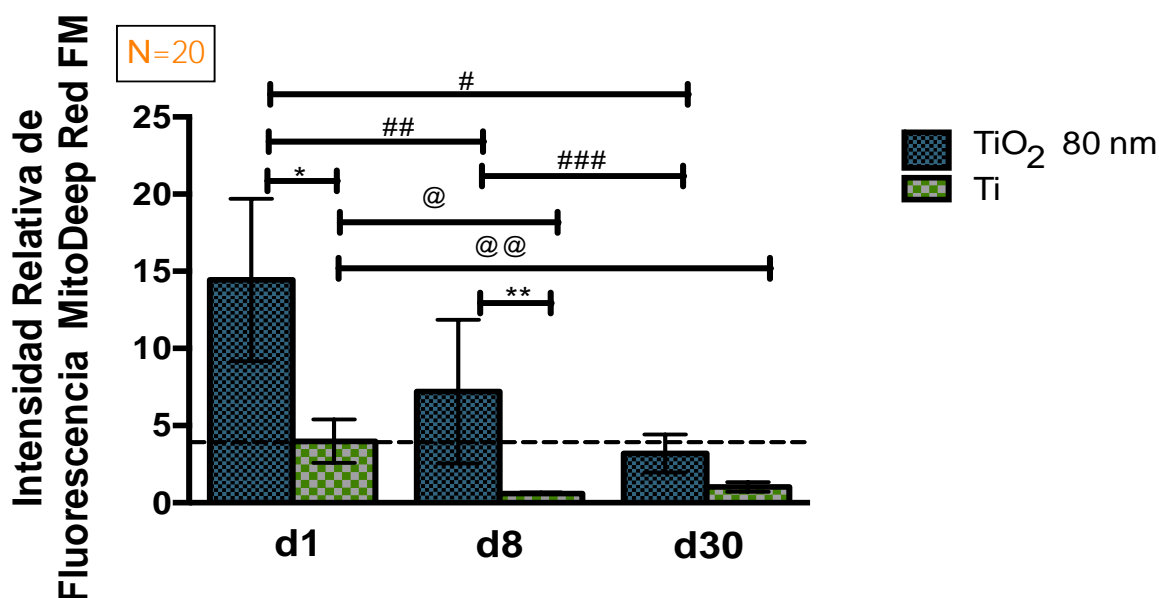
En la Figura 40 pudimos observar que en TiO<sub>2</sub> a d1 hay una mayor intensidad de fluorescencia mitocondrial comparado contra Ti sin tratamiento, al

igual observamos que en  $\text{TiO}_2$  se presenta mayor intensidad comparado contra Ti, pero menor contra  $\text{TiO}_2$  a d1. La morfología celular que se revela con la tinción es muy parecida a los observados en las inmunofluorescencias para eNOS y VEGFR-2. Finalmente al d30, se observaron intensidades muy parecidas en  $\text{TiO}_2$  comparado contra Ti sin tratamiento.



**Figura 40.** Inmunofluorescencia para MitoTracker Deep Red FM. a) Masa mitocondrial sobre  $\text{TiO}_2$  a d1. b) Masa mitocondrial en Ti a d1. c) Mitocondrias sobre  $\text{TiO}_2$  a d8. d) Mitocondrias sobre Ti a d8. e) Mitocondrias sobre  $\text{TiO}_2$  a d30. f) Mitocondrias sobre Ti a d30. Barra de escala es de 20  $\mu\text{m}$ .

Por lo tanto procedimos a cuantificar la intensidad de fluorescencia relativa, para esclarecer si efectivamente se encontraban diferencias estadísticas entre cada uno de los sustratos a los diferentes tiempos de incubación, análisis que se presenta en la Figura 41. En la gráfica se describen las diferencias estadísticas a nivel de biomasa mitocondrial para cada uno de los muestras de estudio a diferentes tiempos de incubación.



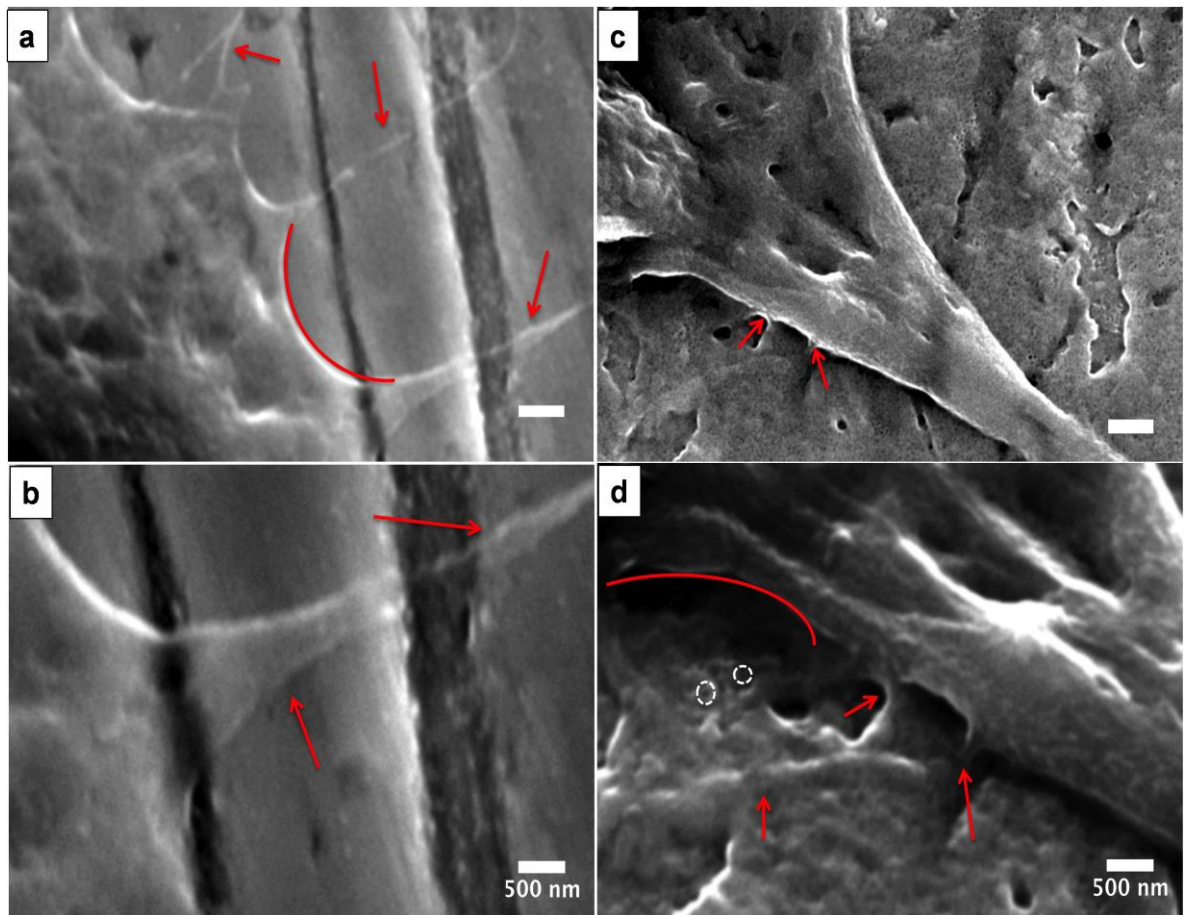
**Figura 41.** Intensidad relativa de fluorescencia para MitoDeep Red FM vs tiempos de incubación. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de  $\pm$  la desviación estándar. El valor P se obtuvo realizando un análisis de varianzas de una vía seguido de un análisis de Tukey: \* indica diferencia significativamente estadística para TiO<sub>2</sub> vs Ti a d1 P<0.05, \*\* muestra diferencia estadística entre TiO<sub>2</sub> vs Ti a d8 P<0.05, # diferencia entre TiO<sub>2</sub> d1 vs TiO<sub>2</sub> d30 P<0.05, ## diferencia entre TiO<sub>2</sub> d1 vs TiO<sub>2</sub> d8 P<0.05, ### significancia entre TiO<sub>2</sub> d8 vs TiO<sub>2</sub> d30 P<0.05, @ significancia entre Ti d1 vs Ti d8 P<0.05, @@ cambios entre Ti d1 vs Ti d30 P<0.05.

Pudimos observar que en el d1 sobre el sustrato de  $\text{TiO}_2$  hay mayor cantidad de mitocondrias presentes comparados contra Ti al mismo tiempo, sin embargo al d8 disminuyó de manera significativa la masa mitocondrial sobre ambos sustratos, pero la masa en  $\text{TiO}_2$  d8 fue mayor que en Ti d8. Sorpresivamente se encontró que en  $\text{TiO}_2$  al d30 había menor masa mitocondrial con respecto a los días anteriores, sin embargo encontramos que la cantidad de mitocondrias es mayor con respecto a Ti, pero las diferencias no fueron estadísticamente significantes.

Al finalizar los análisis bioquímicos anteriormente presentados, se continuó evaluando los procesos de adhesión celular así como proliferación en términos de morfología celular. Al concluirse 4 h de crecimiento endotelial sobre cada uno de los sustratos, se prepararon las muestras para análisis en SEM, con la finalidad de observar la morfología celular durante el proceso de adhesión, las imágenes se ilustran en la Figura 42. En la micrografía a 4 h se observa claramente que las células sobre Ti tienen mayor dificultad para adherirse a la superficie (Figura 42a), además se distinguen menores puntos de anclaje, filipodios mas traslucidos, y menor producción de ECM (Figura 42b).

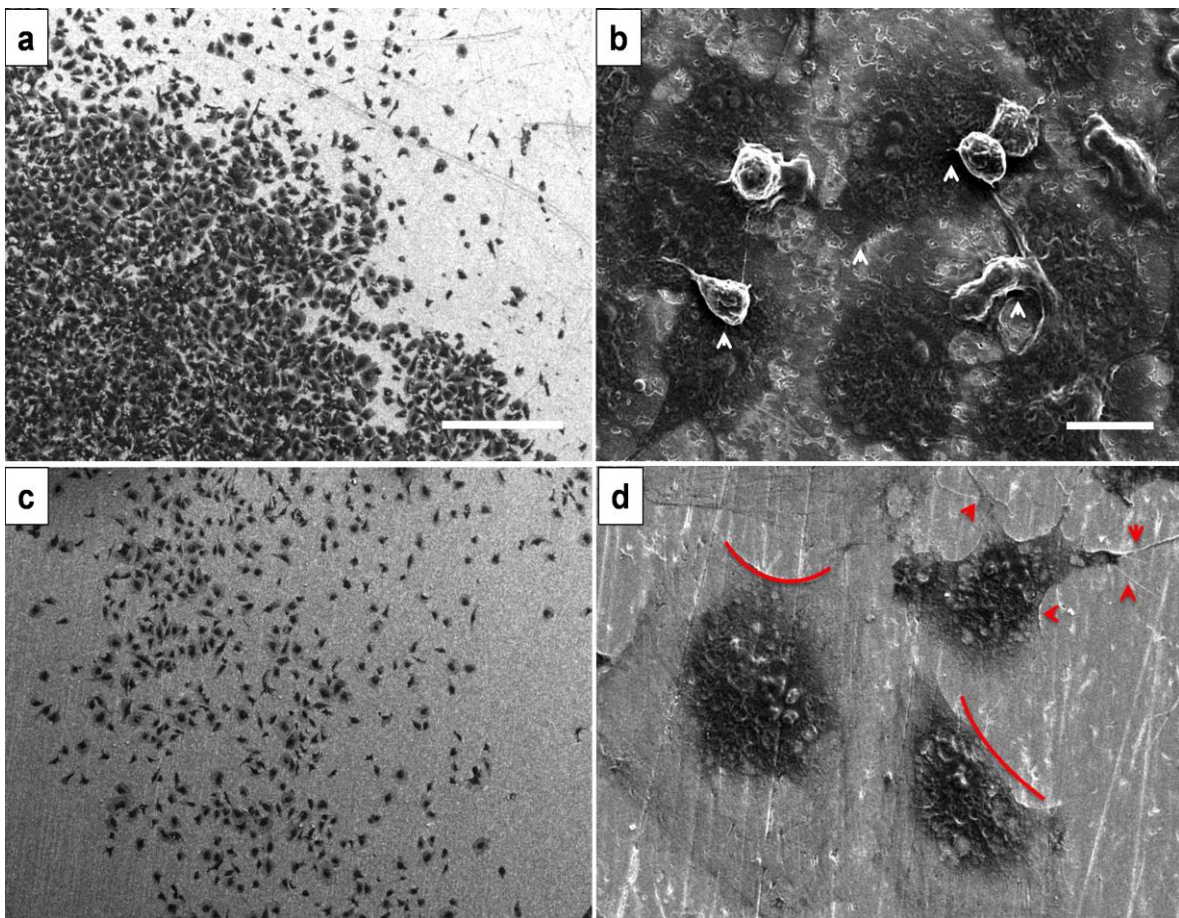
Por otra parte en las superficies nanotubulares, se observaron a bajas magnificaciones (Figura 42c), la formación de filipodios mas “gruesos” con una configuración mas alargada, con un alto grado de contacto, bastantes pliegues asociados a las células, mayores puntos de anclaje mostrados por las flechas rojas y a altas magnificación.

También se observaron contactos mas íntimos entre la ECM y los nanotubos (Figura 42d), datos que mostraron que en términos de anclaje o adhesión, los nanotubos de 80 nm facilitan el depósito de proteínas y la adhesión celular.



**Figura 42.** Micrografías de SEM para BACEC a 4 h de incubación. a) Ti sin tratamiento a baja magnificación. b) Ti a alta magnificación. c) TiO<sub>2</sub> a baja magnificación. d) TiO<sub>2</sub> a alta magnificación. Las líneas rojas indican la forma de los filipodios anclados a sus respectivas superficies. Las flechas rojas muestran los filipodios presentes concernientes a cada sustrato. La barra de escala para a) – c) es de 1000 nm.

En función a los datos sobre el anclaje celular descritos anteriormente, se procedió a comparar las morfologías endoteliales utilizando magnificaciones panorámicas (bajos acercamientos), con la finalidad de analizar la morfología de las células adheridas a 4 h de incubación (Figura 43).

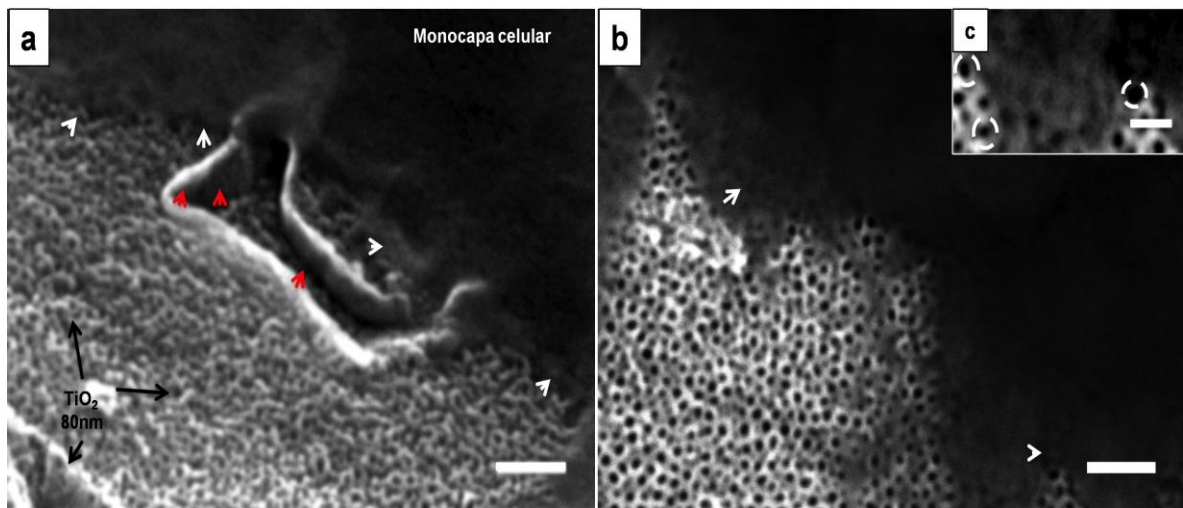


**Figura 43.** Micrografías para BACEC a bajas magnificaciones. a) Endotelio sobre  $\text{TiO}_2$  a baja magnificación. b) Endotelio sobre  $\text{TiO}_2$  a alta magnificación. c) Baja magnificación en Ti. d) Alta magnificación en Ti. Las puntas de flecha blancas indican cuerpos celulares. Las puntas de flecha roja son filipodios observados. Las líneas rojas muestra la traslucida ECM. La barra de escala para a) – c) es de 500  $\mu\text{m}$ , b) – d) es 20  $\mu\text{m}$ .

En la Figura 43a se observa una mayor cantidad de células endoteliales adheridas tan solo a 4 h de crecimiento, apreciándose una morfología en forma de “frijol” característica del endotelio. Encontramos que el Ti sin tratamiento dificulta la adhesión celular, ya que fueron muy pocas las células adheridas con respecto a  $\text{TiO}_2$  (Figura 43c). A mayor magnificación, se observó la formación de cuerpos celulares con abundante ECM anclados a la superficie y bastantes interconexiones entre células, imágenes que nos sugieren que los nanotubos potencian la adherencia celular. En contraste las células adheridas sobre Ti presentaron una forma circular como-fibroblástica, con una ECM aparentemente delgada y escasa, pobres interconexiones célula-célula, además la cantidad de pliegues observados son muy bajos con respecto a  $\text{TiO}_2$ , datos congruentes con los encontrados en la Figura 42.

Es importante promover una alta tasa de adhesión endotelial sobre las superficies de los stents al ser implantados, pero la proliferación endotelial debe de guiarse en forma de monocapa tal como se mencionó en la introducción de este capítulo. Tal esta reportado que el endotelio forma una monocapa que recubre la parte íntima de los vasos sanguíneos, y es la que se encuentra en contacto directo con los fluidos sistémicos, por lo que es de vital importancia que el tejido-*De novo* que crecerá sobre un stent lo haga en forma de monocapa, por lo que procedimos a caracterizar el crecimiento endotelial como monocapa, análisis que se presenta en la Figura 44. Se observa que la proliferación a 24h es en forma de monocapa, que se va expandiendo en función al tiempo de incubación. En la Figura 44a, se hace evidente la presencia de una capa celular

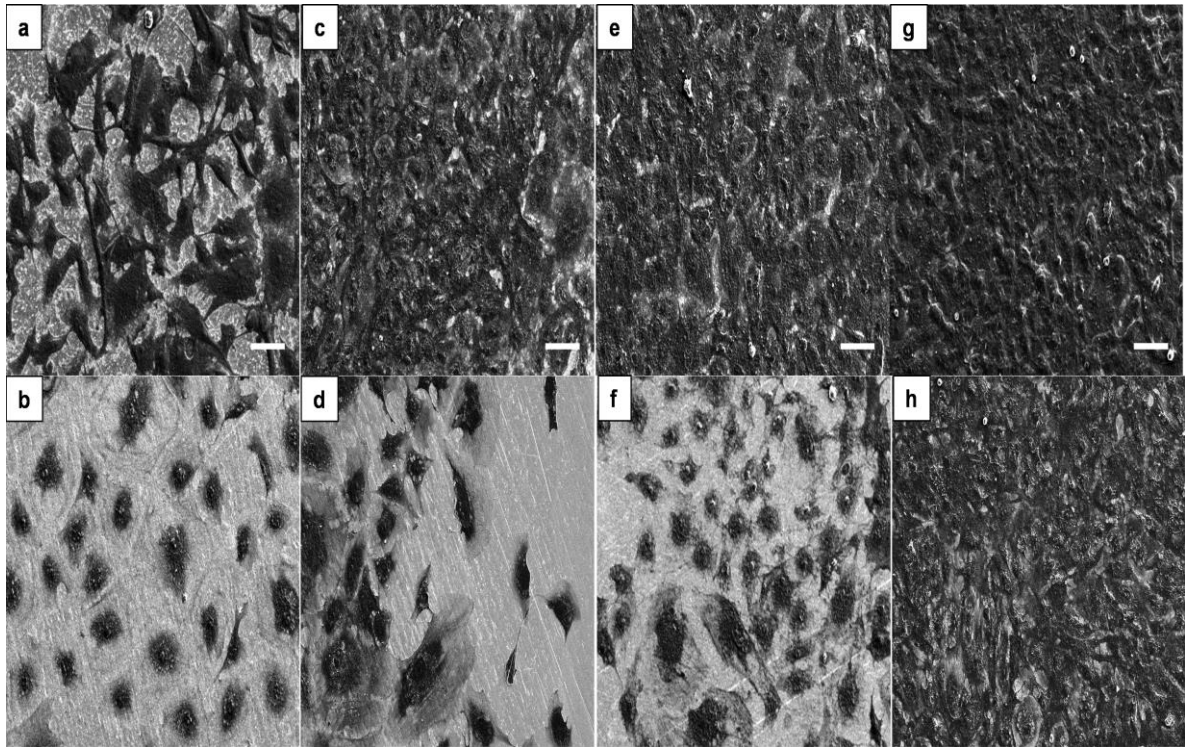
anclada a la superficie y vecinamente es visible una capa de nanotubos de  $\text{TiO}_2$  alineados verticalmente analizándose a un ángulo de  $36^\circ$ . En la Figura 44b, se observa la clara morfología en forma de monocapa a un ángulo de  $0^\circ$  que prolifera sobre los nanotubos de titanio, y finalmente en la Figura 44c, se muestra la interacción entre la capa de nanotubos y la capa celular a altas magnificaciones.



**Figura 44.** Evaluación del crecimiento en forma de monocapa celular a 24 h. a) Micrografía con un ángulo de  $36^\circ$ . b) Micrografía a  $0^\circ$ . c) Unión monocapa-nanotubos. Las cabezas de flecha indican los bordes de la monocapa, las cabezas de flecha roja indican la capa alineada de nanotubos. La barra de escala para a) – b) es 500 nm, para c) es de 200 nm.

A continuación, habiendo evaluado la tendencia a la formación en monocapa, se procedió a caracterizar el crecimiento endotelial a cada uno de los diferentes tiempos de incubación anteriormente establecidos con la finalidad de evaluar la conservación de la morfología endotelial y caracterizar el proceso de proliferación. En la Figura 45, se muestra el crecimiento celular a diferentes

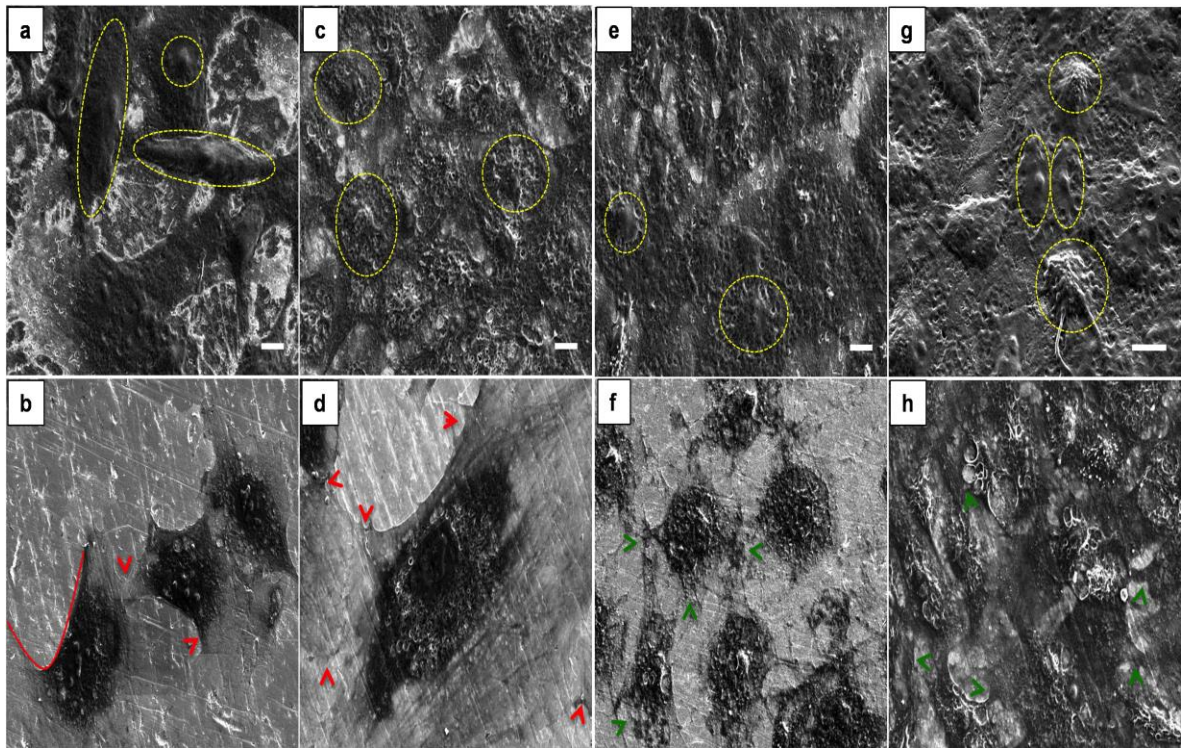
tiempos en cada uno de los especímenes. A d1 en TiO<sub>2</sub> (Figura 45a), se aprecia a magnificación panorámica (bajo aumento) la formación de pliegues celulares, característicos de los cuerpos así como interconexiones célula-célula y abundante ECM, con respecto a Ti donde se observaron células con escasa ECM (Figura 45b). Luego a 3 días de incubación, encontramos la formación de una capa celular mas densa sobre TiO<sub>2</sub>, observándose campos confluentes (Figura 45c), mientras que en Ti (Figura 45d) aun se distinguían bastantes espacios (poca confluencia), además una morfología celular muy agrandada pero con mas conexiones celulares comparado con el d1. Continuando los tiempos de incubación, al día 8, se observa una capa confluyente, bastante densa, con la formación de cuerpos celulares mas definidos y proliferante (Figura 45e), mientras que en Ti observamos pocas células presentes en la superficie mostrando evidencia de la dificultad en la que entran las células para proliferar en Ti, también se observó una morfología circular con la presencia de filipodios en forma de dendritas (Figura 45f), posiblemente por estrés celular ocasionado por la superficie, pero con mayor confluencia comparado con los días anteriores. Finalmente, se analizó la proliferación a 30 días en TiO<sub>2</sub> se encontró una capa bastante densa con cuerpos celulares confluentes, con la formación de una “cama” de ECM bastante densa (Figura 45g), mientras que en Ti sin tratamiento (Figura 45h), se aprecia el crecimiento de una capa celular delgada, aparentemente mas traslucida que la que se observa en la Figura 45c, sin embargo más confluyente que en los días anteriores.



**Figura 45.** Crecimiento endotelial a diferentes tiempos de incubación analizados a baja magnificación. a) Endotelio en  $\text{TiO}_2$  a d1. b) En Ti a d1. c) Monocapa  $\text{TiO}_2$  a d3. d) Células en Ti a d3. e) Monocapa en  $\text{TiO}_2$  a d8. f) Endotelio en Ti a d8. g) Monocapa a d30 en  $\text{TiO}_2$ . h) Monocapa a d30 en Ti. La barra de escala es de 500  $\mu\text{m}$ .

Hemos descrito la morfología celular en función a lo observado a bajas magnificaciones, datos que nos brindan bastante información con respecto a la forma de la proliferación celular. Por lo tanto se procedió a describir la morfología celular y de la capa que se forma a cada uno de los tiempos experimentales en orden de caracterizar los diferentes cambios morfológicos ocasionados por las superficies en función al tiempo, datos que se describen en la Figura 46. En dicha Figura, se confirmaron las tendencias observadas para la Figura 45, distinguiéndose que al día 1 de crecimiento en  $\text{TiO}_2$  se observan cuerpos celulares alargados con abundante ECM sintetizado sobre la superficie (Figura 46a),

mientras que en Ti se confirma una morfología mas plana y una ECM muy transparente (Figura 46b). Avanzando el tiempo de proliferación, al día 3 se observan en los nanotubos la formación de una monocapa con abundantes cuerpos celulares, mayor ECM que en el día 1 y mayor confluencia debido a que se distinguen menores espacios de la superficie sin depósitos celulares, mientras que en Ti, observamos que las células depositadas se fueron alargando aun más, tornándose más plano, con una morfología como-fibroblastica, presentando todavía una ECM traslucida y tenue, con filipodios muy pequeños (Figura 46d).



**Figura 46.** Crecimiento endotelial a diferentes tiempos de incubación observados a alta magnificación. a) Endotelio en  $TiO_2$  a d1. b) En Ti a d1. c) Monocapa  $TiO_2$  a d3. d) Células en Ti a d3. e) Monocapa en  $TiO_2$  a d8. f) Endotelio en Ti a d8. g) Monocapa a d30 en  $TiO_2$ . h) Monocapa a d30 en Ti. Los círculos punteados amarillos representan los cuerpos celulares que se formaron en  $TiO_2$ . Las cabezas de flecha roja indican la formación de filipodios en Ti. La línea roja indica el aplanamiento celular. Las cabezas de flechas verdes, representan los filipodios en forma de dendritas observados. La barra de escala es de 20  $\mu m$ .

Al día 8 de incubación, la monocapa en TiO<sub>2</sub> se observó más confluyente, desapareciendo más espacios libres de la superficie, continuando la presencia de cuerpos celulares y siguiendo un crecimiento lineal posiblemente inducido por la superficie (Figura 46e), mientras que en Ti a d8, se confirmó la presencia de filipodios celulares con forma dendrítica, abriendo la hipótesis de que posiblemente entran en un estado de estrés, o tal vez se estaban despegando por efectos del sustrato. También se observó menos ECM y una morfología más circular con respecto a los días anteriores. Para concluir los tiempos establecidos, se evaluó la morfología a 30 días, se observó para TiO<sub>2</sub> la formación de una monocapa mucho más madura, densa, con cuerpos celulares más desarrollados, sin espacios libres asociados a la superficie, continuando con un crecimiento aparentemente ordenado posiblemente inducido por la superficie nanométrica, en general una capa confluyente sin aparente estrés celular (Figura 46g), mientras que en Ti (Figura 47h) se encontró la presencia de una capa delgada y tenue, con células aparentemente más estresadas, con menor formación de ECM indicando posiblemente que hubo menor anclaje a la superficie, aún se distingue la superficie por la translucidez de la capa que proliferó, pero se encontró mayor formación de cuerpos celulares con respecto a los días anteriores.

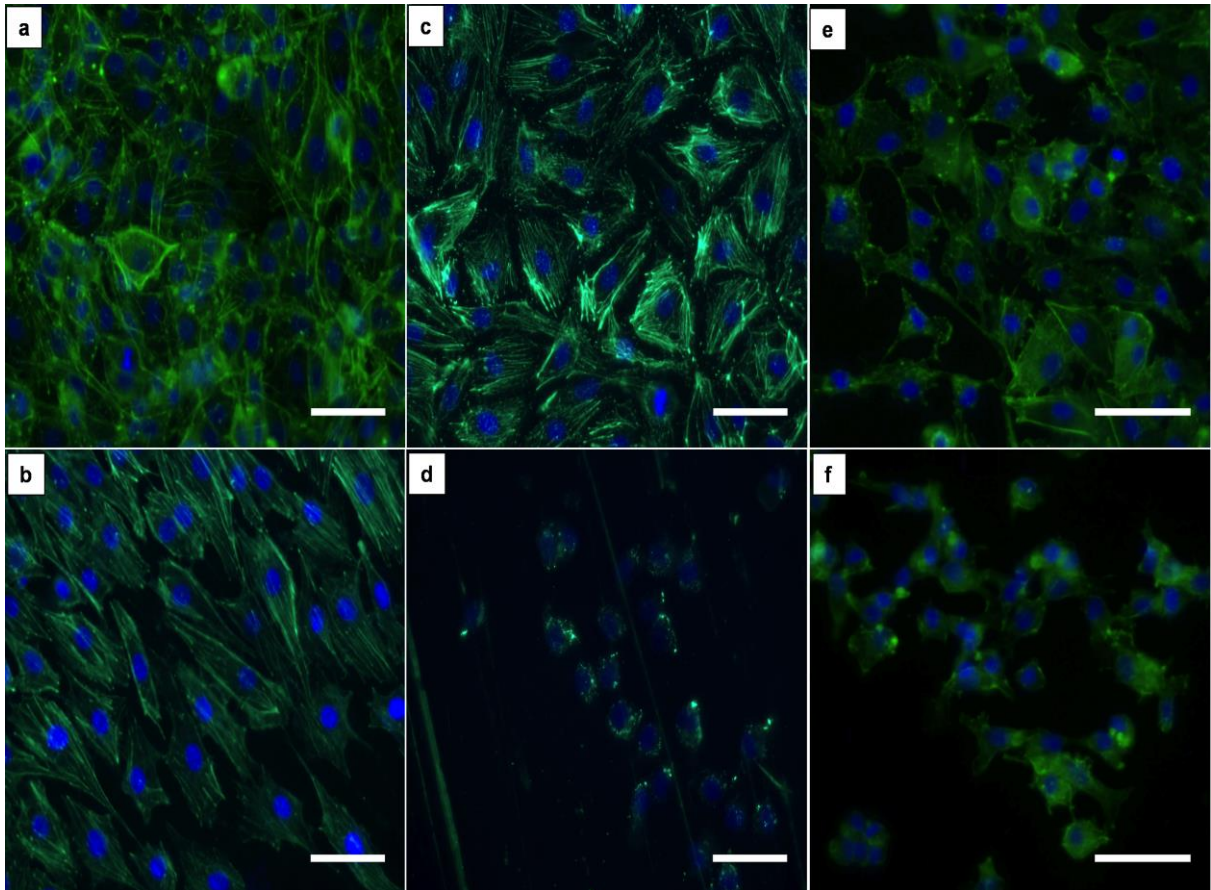
Los resultados de actina mostraron que la morfología y la organización del citoesqueleto de BCAEC dependen de la topografía de los diferentes sustratos. Las imágenes en la Figura 47 sugieren que los nanotubos promueven la movilidad celular debido a la alta formación de lamelipodios sobre el sustrato comparado

contra Ti. En las Figuras 47a, c y e se observaron que poseen una morfología poligonal, con abundantes puntos aparentemente focales, y con crecimiento ordenado. Sin embargo en la Figura 43b, se observó una morfología más alargada, con menores puntos aparentemente focales, sin embargo el crecimiento fue de forma ordenada. Para la morfología en las Figuras 47d y e, aparentemente las células adquirieron una morfología circular, posiblemente se estaban despegando ya que solo se identificó correctamente los núcleos, datos que concuerdan a los analizados en SEM. Para ninguno de esos tiempos se encontraron puntos que aparenten ser focales.

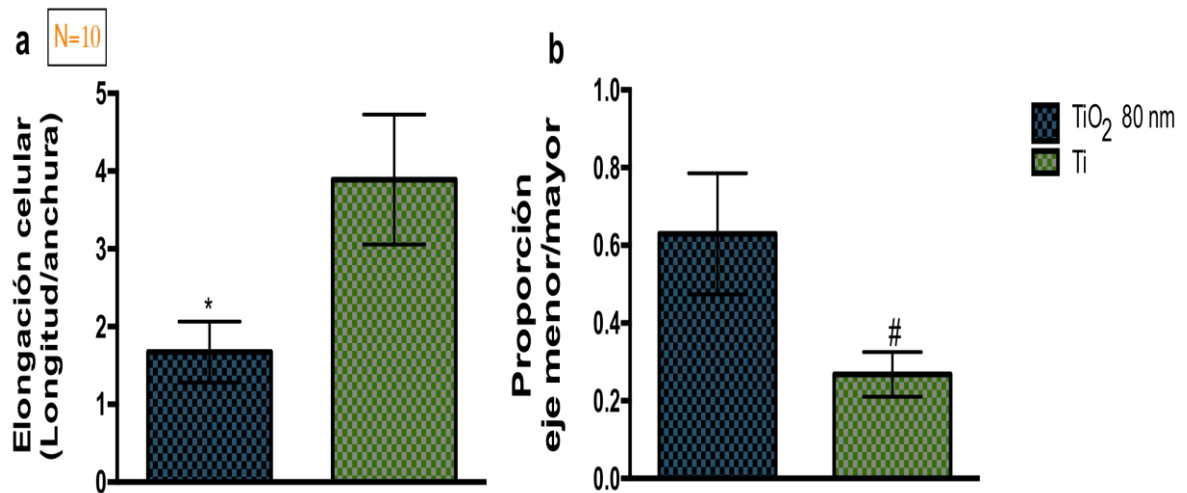
El análisis morfológico basado en las observaciones de actina se muestran en la Figura 48 indicando que los nanotubos influyen en la elongación y forma celular. La Figura 48a muestra un incremento significativo en la elongación celular, para Ti sin tratamiento datos que indican que las células necesitan alargarse significativamente para iniciar la proliferación comparado contra  $\text{TiO}_2$ . Por otra parte la Figura 48b, indica que la morfología endotelial es menos plana en los nanotubos (el valor de 1 es para estructuras perfectamente redondas y 0 para una línea recta) que en Ti a 24 h.

Al igual que la morfología celular, también es importante analizar los cambios en la morfología nuclear. Basados en las tinciones de DAPI realizadas en los diferentes análisis, evaluamos la extensión nuclear, así como el área nuclear para ambos sustratos como se indica en la Figura 49. No se encontraron cambios estadísticos en la elongación nuclear para cada uno de los tiempos de incubación

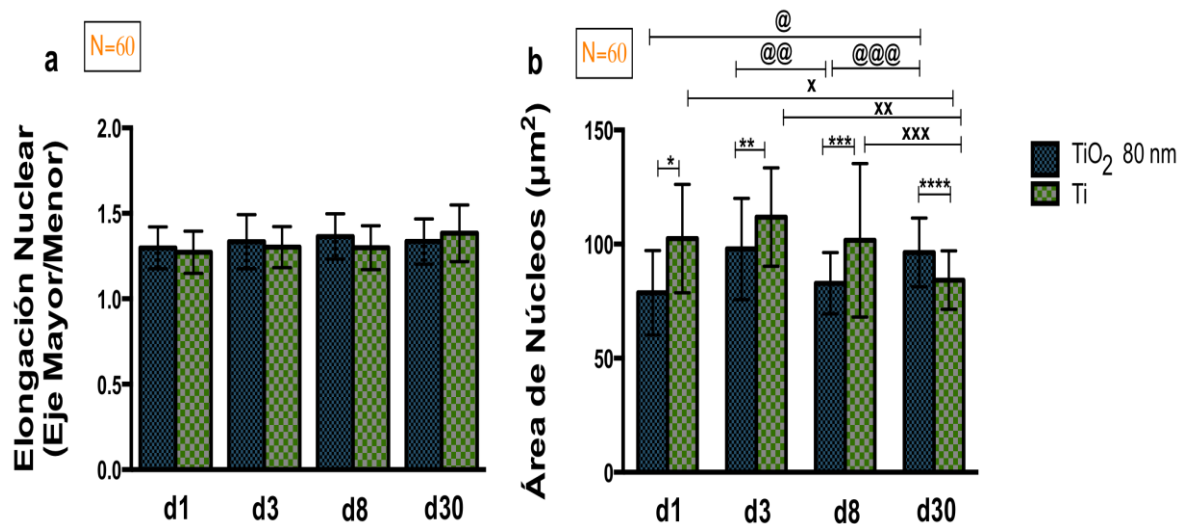
sobre ambos sustratos, sin embargo el esparcimiento nuclear se ve afectado por la superficie (Figura 49b), observándose cambios significativos con mayor extensión nuclear para BCAEC que crecieron sobre Ti, excepto al d30, donde sorpresivamente encontramos que la superficie a plazos mas largos promueve el incremento en la extensión celular.



**Figura 47.** Imágenes de inmunofluorescencia de actina de citoesqueleto. a)  $\text{TiO}_2$  a d1. b) Ti a d1. c)  $\text{TiO}_2$  a d3. d) Ti a d3. e)  $\text{TiO}_2$  a 30d. f) Ti a d30. La barra de escala es de 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 48.** Análisis morfológico de BCAEC en Ti sin tratamiento y  $\text{TiO}_2$  a 24h. a) Elongación celular. b) proporción eje menor/mayor. El valor P se obtuvo realizando una prueba t-student de dos vías: \* Indica diferencia estadísticamente significativa entre  $\text{TiO}_2$  vs Ti  $P < 0.05$ , # Significancia estadística entre Ti vs  $\text{TiO}_2$   $P < 0.05$ .



**Figura 49.** Morfología nuclear analizada en BCAEC para cada sustrato. a) Elongación nuclear. b) Área de extensión. El valor P se obtuvo realizando un análisis de varianzas de una vía seguido de un análisis de Tukey: \* significancia estadística para Ti vs  $\text{TiO}_2$  d1  $P < 0.05$ , \*\* Ti vs  $\text{TiO}_2$  a d3  $P < 0.05$ , \*\*\* Ti vs  $\text{TiO}_2$  d8  $P < 0.05$ , \*\*\*\*  $\text{TiO}_2$  vs Ti d30  $P < 0.05$ , x Ti d1 vs Ti d30  $P < 0.05$ , xx Ti d3 vs Ti d30  $P < 0.05$ , xxx Ti d8 vs Ti d30  $P < 0.05$ , @  $\text{TiO}_2$  d1 vs  $\text{TiO}_2$  d30  $P < 0.05$ , @@  $\text{TiO}_2$  d3 vs  $\text{TiO}_2$  d8  $P < 0.05$ , @@@  $\text{TiO}_2$  d8 vs  $\text{TiO}_2$  d30  $P < 0.05$ .

## 4.4 Discusión

Las células endoteliales son uno de los principales constituyentes celulares de los vasos sanguíneos, y una de sus principales funciones es separar la sangre de los tejidos adyacentes (101, 130). Durante la colocación de stents es de vital importancia el anclaje, proliferación así como la viabilidad del tejido nuevo que crecerá sobre el material. Hemos reportados en los capítulos anteriores que la nanotopografía es capaz de controlar el comportamiento de diferentes tipos celulares. A partir de estos hallazgos procedimos con la evaluación de nanotubos de TiO<sub>2</sub> de 80 nm, utilizando BCAEC, células que fueron obtenidas de fuentes comerciales.

La restauración del endotelio después de la implantación del stent es un proceso crítico, por lo que se evaluó la viabilidad sobre las superficies utilizando el kit de vida/muerte (Figura 34). Encontramos una tasa superior de células vivas con respecto a las muertas para ambas superficies, sin embargo en los sustratos con nanotubos se encontró un número superior de células vivas, formando una aparente monocapa celular, y con una morfología parecida con las observadas en las cajas de cultivo al inicio de los experimentos, por otra parte en los sustratos de Ti encontramos una morfología “redondeada” principalmente a la 24 h, datos que nos brindan la hipótesis de que las células posiblemente se estaban despegando y en función a eso perdieron su morfología, datos que están en acuerdo con los reportados por Brammer et al. (131) para endotelio en nanotubos con diámetro de

~100 nm, sin embargo futuros estudios con incremento estadístico en el número de muestras son requeridos para confirmar estas tendencias.

La viabilidad es importante durante el crecimiento de tejido nuevo sobre un stent, pero es de vital importancia la rápida re-endotelización por lo que procedimos a evaluar la tasa de adhesión y proliferación (Figura 35). Encontramos mayor adhesión celular a las 24 h de crecimiento con respecto a Ti, y la proliferación fue superior para las células presentes en los nanotubos, comparado con el lento crecimiento encontrado para Ti, nuestras tasas de proliferación tuvieron tendencias similares a las reportadas por Shafir et al., donde inmovilizó iNOS sobre un sustrato metálico y los dejó proliferar por 3 y 5 días (132), también concordantes con los reportes de Zhong et al. donde funcionalizaron polidopamina sobre sustratos de nanotubos de titanio con el fin de promover la endotelización y disminuir la proliferación de músculo liso vascular (133), y fortaleciendo el uso de las nanoestructuras, nuestros resultados están en acuerdo con lo que publica Loya et al., ellos evaluaron la proliferación endotelial en nanofibras depositadas por plasma, que fueron capaces de estimular mayor proliferación comparado contra sustratos sin tratamientos (134). Por otra parte Choudhary et al. reportó incrementos en la proliferación endotelial en cultivos de hasta 5 días en titanio comercial nanoestructurado demostrando que a largos plazos se incrementa la proliferación (135), datos que fortalecen nuestras evidencias. Sin embargo nuestros resultados estuvieron en contraste con los reportados por Park et al., ya que ellos publican que las superficies de nanotubos de 15 nm de diámetro con altas y bajas concentraciones de fluoruros promueven mayor proliferación que la contraparte a mayores dimensiones (136), posiblemente estos datos se deban al

tipo de electrolitos utilizados para el proceso de fabricación de los nanotubos, así como el proceso global de oxidación.

En este estudio demostramos que la superficie regula la expresión de proteínas endoteliales, por ejemplo, se realizó la inmunotinción y la cuantificación de eNOS en cada uno de los sustratos. Sorpresivamente encontramos que a cada tiempo de estudio la expresión de eNOS se incremento en el nanomaterial comparado contra Ti, posiblemente se deba a que la superficies nanoestructuradas son capaces de promover la proliferación celular, quizás por la activación de la vía de MAPK que esta fuertemente asociada a la proliferación (99), implicada en la mecanotransducción endotelial (137) y en la angiogénesis (138), también se conoce que su activación promueve la fosforilación eNOS (139). Nuestra hipótesis se fortalece por los resultados de los estudios de mRNA que publico Peng et al., en los que reporto mayor expresión de MAPK/P38 sobre nanotubos de Ti a 30 y 100 nm de diámetro comparados contra Ti sin tratamiento (140). Otra posible explicación para la sobreexpresión de eNOS, es que las superficies son capaces de estimular la regulación de AKT (proteína quinasa B), la cual cataliza la fosforilación de eNOS en el residuo Ser 1177 (141), y realizando pruebas de western blott encontramos mayor expresión de esta proteína, además nuestros resultados concluyen con los obtenidos por Yeh et al., quienes cuantificaron la expresión de eNOS sobre TiO<sub>2</sub> comparado contra Ti, y encontraron expresión estadísticamente mayor con respecto al control a un tiempo de cultivo de 48h (142). La investigación *in vitro* realizada, revela que la superficie nanoestructurada es capaz de mantener la expresión de eNOS comparado contra

las superficies regulares de titanio. Por lo tanto podría presentarse menor disfunción endotelial sobre los nanotubos de 80 nm.

El factor de crecimiento vasculo-endotelial (VEGF), es un componente clave en las cascadas de señalización para la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros existentes, y puede activar la proliferación, migración y sobrevivencia celular (143). Al analizar VEGFR-2 receptor ampliamente involucrado en la proliferación celular, se encontró mayor expresión en las células cultivadas en TiO<sub>2</sub> a todos los tiempos (P<0.05), y los mayores niveles de expresión fueron a los días 3 y 30 para los nanotubos, sin embargo no se encontró diferencias estadísticas entre cada uno de los tiempos de análisis y al aparecer se mantuvo la expresión relativa. Los datos arrojados por VEGFR-2 indican que el endotelio al poseer mayor expresión del receptor, se promoverá la angiogénesis en los nanotubos con respecto a Ti, y además posiblemente se activara la expresión de eNOS por medio de la vía de ERK/MAPK (129, 144, 145), que también esta fuertemente involucrada en la angiogénesis, información que correlaciona con los datos para la activación de eNOS y brindan mas evidencia a la hipótesis anteriormente mencionada. Por ello, más estudios involucrando las mediciones de VEGFR-2 expuesto a diferentes concentraciones de VEGF serán requeridas para esclarecer las tendencias observadas.

Los procesos como son la angiogénesis requieren de la producción de nuevo tejido, por lo cual demandan altos niveles de ATP. En los tejidos la mayor parte del ATP es producido por la fosforilación oxidativa mitocondrial. Se ha demostrado que VEGF es capaz de promover la biogénesis mitocondrial, activando vías de señalización como son la vía de AKT, Wright et al., en sus

experimentos, en los que ellos silenciaron la Akt3, y encontraron que PGC-1 $\alpha$  se acumulaba en el citoplasma y a la vez se reducían los genes conocidos para PGC-1 $\alpha$ , resultados que sugieren un mecanismo de activación en la biogénesis mitocondrial estimulado por VEGF mediante la vía de Akt (146). En nuestros experimentos se encontró mayor cantidad de masa mitocondrial en los nanotubos a d1 y d3 con respecto a Ti, sin embargo sorpresivamente se observó disminución de la masa mitocondrial al d30 para nanotubos ( $P < 0.05$ ), y también para Ti ( $P < 0.05$ ), posiblemente la disminución se debe a que conforme pasa el tiempo de proliferación cada vez hay menos espacio para el crecimiento celular (confluencia que se acerca al 100%), lo cual es capaz de activar la inhibición por contacto, reduciendo el crecimiento y por lo tanto la necesidad de producción de ATP. Es necesario realizar más estudios sobre biogénesis mitocondrial, así como cuantificaciones de ATP, para explicar las tendencias encontradas.

A 4 h de incubación, se evaluó el mecanismo de adhesión que estimula cada uno de los sustratos. Nuestros datos demuestran que la superficie nanoestructurada promueve el anclaje celular, por medio de la formación de mayor número de filipodios y aparentemente mayor depósito de ECM sobre el sustrato. Esta tendencia posiblemente se presentó por la baja área superficial que presenta el Ti sin tratamiento, lo cual se expresó en la deposición de una ECM menos densa y la formación de puntos de anclaje más tenues y delgados. Claramente las diferencias en la estructura superficial presentan efectos en la respuesta de BACEC entre cada una de las superficies. También los nanotubos promovieron mayor formación de cuerpos celulares, con filipodios más alargados posiblemente para fortalecer su anclaje a los nanotubos. Deben realizarse más pruebas para

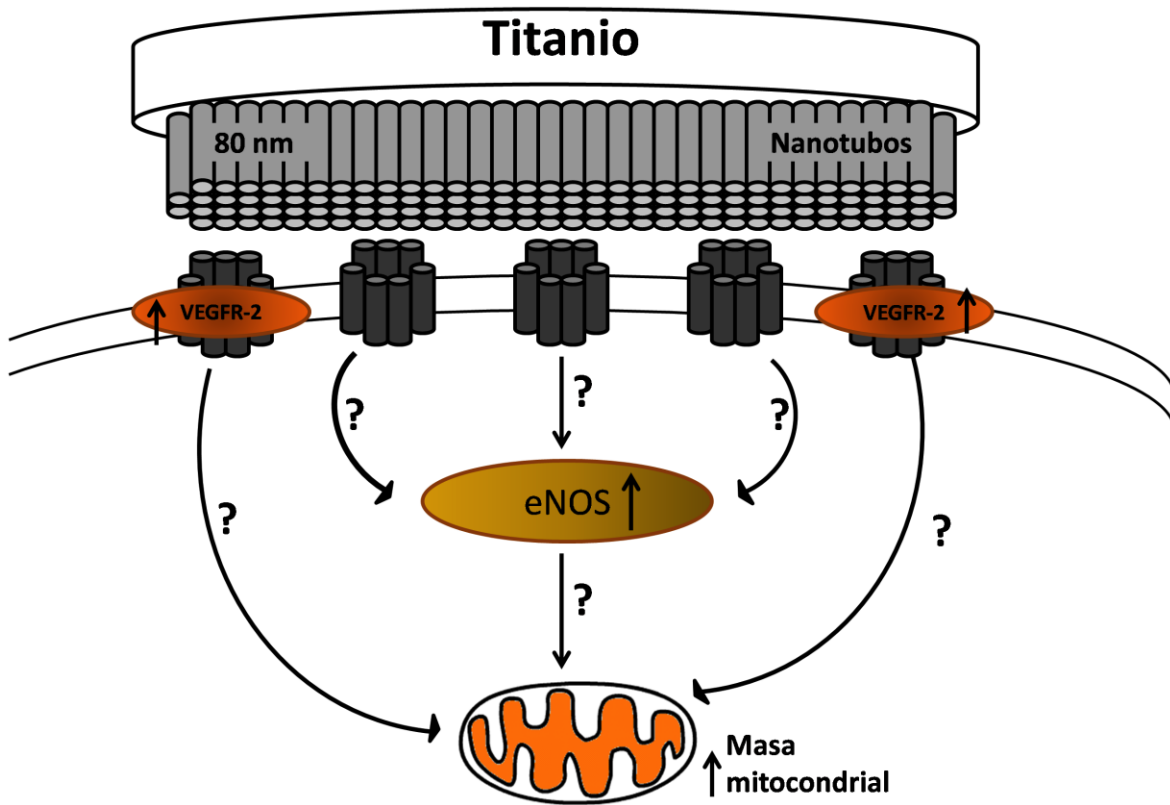
esclarecer los resultados, un ejemplo puede ser la cuantificación de Paxilin, una proteína involucrada en la señalización de la adhesión focal. A las 24 h de crecimiento en SEM, observamos la formación de una monocapa celular anclada a los nanotubos, morfología que el endotelio debe tomar al crecer sobre la superficie de un stent. Estos datos sugieren que la nano-configuración de 80 nm, promueve el estiramiento celular, sin perder la formación de cuerpos celulares, lo cual permite la formación de la monocapa. Un comportamiento similar se observó para condrocitos humanos cultivados sobre nanotubos de carbono alineados verticalmente (95) y sobre nanofibras de  $\text{TiO}_2$  (40). En función a estas tendencias, continuamos caracterizando la morfología y el crecimiento por mayores tiempos de incubación, encontrando que en nanotubos de  $\text{TiO}_2$ , el crecimiento endotelial continua, con la tendencia a la formación la capa celular tan mencionada, así como a la formación de pliegues y cuerpos celulares que se hacen notar conforme avanza el tiempo de crecimiento, la presencia de estos cuerpos es importante por que podemos ver que no tenemos una capa plana, por lo que posiblemente el endotelio no se encuentra en estado de estrés celular, nuestra hipótesis tiene sustento por los resultados publicado por Bruni et al., donde reporto que en aleaciones de  $\text{Ti6Al4V}$  horneado y colocándose en contacto con HUVEC y  $\text{TNF}\alpha$  se presenta menor tasa de apoptosis celular y menor expresión de ICAM-1 (147), será entonces necesario hacer más estudios sobre el estrés celular inducido por estas nanoestructuras para confirmar las tendencias encontradas.

Los resultados para actina mostraron que la morfología de BACEC y la organización del citoesqueleto dependen de la topología de los diferentes sustratos. Se observó que la topografía mantiene el prototipo morfológico

endotelial, datos que nos brindan pistas de que la organización de actina posiblemente promueve la locomoción celular, por lo que los nanotubos posiblemente actúan como iniciadores de la migración celular, mientras que la superficie sin tratamiento, abérrense a la morfología endotelial, tomando una textura circular con muy pocos puntos aparentemente focales, y pocas comunicaciones célula-célula al igual como se observo en los datos de SEM comparados con los nanoestructurados. La morfología tomada por el endotelio en Ti, son parecidos a los reportado en la literatura (148). El análisis morfológico basado en actina indico mayor elongación en las superficies de Ti y menor proporción entre eje menor/mayor datos que sugieren que el endotelio se deforma tomando una textura mas plana pero a su vez mas elongada, posiblemente por que la superficie de Ti no facilita el anclaje celular, lo cual no facilita la formación de pliegues mejor definidos forzando a la célula a estirarse para mantenerse anclada a la superficie. Se requieren análisis con un número de muestras mayor para confirmar la tendencia a la elongación celular. Por ultimo se encontró que la elongación nuclear no se ve alterada por la superficie, sin embargo el esparcimiento nuclear (área) se ve incrementado en las superficies sin tratamiento, una posible explicación es que se sabe que el arreglo de microfilamentos y de actina son capaces de regular la forma nuclear (70) y al haber mayor esparcimiento celular por la necesidad de buscar mas zonas para anclarse a la superficie, esto promueve el esparcimiento nuclear, mientras que los nanotubos regulan una morfología menos alargada, con filamentos de actina menos elongados, lo cual se refleja en un menor esparcimiento nuclear. Estos datos revelan que la superficie no solo es capa de regular la morfología del

citoesqueleto, si no también el esparcimiento nuclear, posiblemente por que promueven la formación de ECM y por lo tanto se forman mayores puntos de unión con las integrinas las cuales también pueden regular la forma del citoesqueleto (70).

Los resultados obtenidos sugieren que el uso nanotubos podrían regular condiciones anti-tromboticas. Estos resultados revelan que los nanotubos de  $\text{TiO}_2$  brindan mejores propiedades en términos de re-endotelización y expresión de receptores involucrados en la homeostasis endotelial comparado con un stent metálico sin recubrimiento alguno. Un aspecto adicional es que los nanotubos de  $\text{TiO}_2$  formados a partir de Ti o sus aleaciones podrían remplazar los stents con recubrimientos para liberar anti-proliferativos. Ya que estos incrementan el riesgo de trombosis tardía. En la Figura 50 se presenta un esquema que resume los resultados reportados para BACEC.



**Figura 50.** Efecto de los nanotubos de en la expresión de diferentes proteínas endoteliales, así como en la masa mitocondrial.

## **CAPÍTULO 5**

### **5.1 Propiedades antisépticas de los nanotubos de TiO<sub>2</sub>: Inhibición de la adhesión bacteriana.**

Los biomateriales a base de titanio (Ti) son de los más comúnmente utilizados en aplicaciones biomédicas. Sobre la superficie de estos materiales, se forma de manera espontánea una capa estable de óxido de titanio, con un espesor aproximado de 3-10 nm al estar en contacto con el oxígeno, confiriéndole biocompatibilidad a la superficie, mejor resistencia a la corrosión y mejoras en las propiedades mecánicas del material (149, 150). Se han reportado infecciones en estos materiales y en una amplia variedad de dispositivos incluyendo catéteres venosos centrales y las agujas conectoras, tubos endotraqueales, dispositivos intrauterinos, válvulas cardíacas mecánicas, stents cardiovasculares, marcapasos, catéteres peritoneales para diálisis, tubos para timpanostomía, prótesis ortopédicas y dispositivos ortopédicos cutáneos (135, 151, 152). Estas infecciones en el sitio de cirugía ocasionan que se prolongue la estadía hospitalaria de los pacientes en una media de dos semanas por paciente, aproximadamente el doble de tasas de rehospitalización y un incremento en más del 300% en cuidados médicos (153). Como ejemplo, tan sólo las infecciones en uniones protésicas tienen un costo de alrededor de \$50,000 dólares U.S. por episodio, mientras que la tasa de mortalidad se considera mayor al 2.5% (154). Además los pacientes con

infecciones por implantación de dispositivos médicos, sufren de dolor, limitaciones en la función de sus implantes y lo más importante reducción de la calidad de vida. Hay diferentes razones para las infecciones relacionadas a dispositivos médicos, como son faltas de higiene por parte del personal, material esterilizado incorrectamente o alguna infección local o sistémica por parte del paciente. Ya que la bacteria se adhiere a la superficie del implante, comienza a secretar una matriz protectora a base de polisacáridos, que junto con la colonización bacteriana comienza la creación de la biopelícula. Las biopelículas bacterianas son resistentes a los antibióticos y biocidas en un nivel de 500-5000 veces mayor que lo necesario para eliminar bacterias plantónicas de la misma especie (155). Además Walker y colaboradores reportaron que neutrófilos humanos sirven para estimular el desarrollo inicial de biopelículas de *P. aeruginosa* (156). Mientras que de manera similar Chandra y colaboradores mostraron que células mononucleares de sangre periférica permiten la habilidad de la levadura, *Candida albicans*, para formar biopelículas y que la mayor parte de las células mononucleares fueron localizadas en la parte central y basal de la biopelícula (157). Por lo que es de vital importancia evitar la adhesión y crecimiento bacteriano sobre la superficie de implantes biomédicos. En este estudio, se evaluó la susceptibilidad la inhibición de *S. aureus*, sobre superficies de titanio anodizado así como la adhesión, colonización, morfología, viabilidad y la cantidad de proteínas sintetizadas por la cepa bacteriana.

## **5.2 Fase experimental**

### ***Fabricación de nanotubos de TiO<sub>2</sub>.***

Los nanotubos de TiO<sub>2</sub> y los discos de Ti utilizados para esta sección son similares a los descritos en detalle en la sección 2.2 de esta tesis.

### ***Cultivo de Staphylococcus aureus***

Para todos los estudios efectuados en este capítulo que involucren el uso de cepas bacterianas, se empleó la línea celular *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), obtenido de American Type Cell Culture (ATCC 25923), el medio en el que se realizó el cultivo celular fue en caldo soya tripticaseína (TSB; Beckton Dickenson) el cual fue preparado siguiendo las recomendaciones del proveedor, y el agar utilizado para su re-siembra fue agar soya tripticaseína (Beckton Dickenson), también fue preparado siguiendo las recomendaciones del proveedor. Previo a los estudios realizados, se ejecutó una tinción de Gram, para confirmar la coloración característica de los Gram positivos y la esterilidad del cultivo utilizado. Para cada uno de los análisis realizados sobre cada sustrato se utilizaron 100 µL de una suspensión de *S. aureus*-TSB a una densidad óptica (D. O.), de 0.38 y de concentración  $\sim 1.78 \times 10^7$  UFC/mL, correspondiente al inicio de la fase de crecimiento. Para todos los experimentos, un día antes se resembró la sepa bacteriana con la ayuda de un asa de cultivo sobre una caja de Petri con agar soya tripticaseína estéril.

### ***Elaboración de curvas de crecimiento***

Con el fin de identificar el tiempo en el que transcurre cada una de las fases de crecimiento de *S. aureus* y poder determinar la concentración celular en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), se realizó una curva de crecimiento bacteriano por duplicado, realizando mediciones con la ayuda de un espectrofotómetro UV-Vis (Perkin Elmer, Lambda 25), y del cultivo de diluciones para determinar la concentración. El procedimiento empleado se describe a continuación:

- a) Se emplearon dos tubos cónicos de 50 mL, cada uno con 25 mL de TSB. El primero se utilizó para la lectura del blanco, y al segundo se le agregaron aproximadamente 3 colonias de *S. aureus* previamente sembrados en caja de agar soya tripticaseína.
- b) El tubo con el inóculo se agitó rigurosamente para homogenizar la suspensión. Posterior a la lectura del blanco, se colocó 1 mL de la suspensión bacteriana en una celda para su lectura por espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm.
- c) Se repitió la medición del punto b cada 60 minutos por 24 horas.
- d) Paralelo al punto c, con la finalidad de conocer las UFC/mL del inóculo bacteriano, se realizaron siembras de diluciones seriadas de la siguiente manera:

- a. A 10 microviales de 1.5 mL estériles se les agrego 1.0 mL de solución salina al 0.85%.
- b. Después se tomo el inóculo y se le realizaron diluciones seriadas de 1:10 en los 10 microviales.
- c. Luego se sembraron 10  $\mu$ L de cada dilución en cajas de Petri con agar soya tripticaseina.
- d. Se dejaron secar los 10  $\mu$ L en la superficie del agar, y posteriormente se colocaron a incubar a 37°C por aproximadamente 12 horas.
- e. Terminado el tiempo se contaron las UFC/10  $\mu$ L de cada dilución.

### ***Análisis de viabilidad bacteriana***

El análisis de viabilidad sobre cada uno de los sustratos experimentales se realizo al día 1 (d1), día 3(d3) y día 5 (d5) de cultivo *in vitro*. La prueba se llevo acabo de la siguiente manera:

1. Al haberse cumplido cada uno de los tiempos de incubación, se retiro el medio de cultivo de cada uno de los especímenes.
2. Luego se lavaron tres veces (5 minutos cada lavado) con PBS 1X pH 7.2, para remover bacterias no adheridas.
3. A continuación se transfirieron cada uno de los sustratos a un tubo cónico de 50 ml conteniendo 0.5 mL de solución fisiológica estéril.
4. Con la ayuda de una espátula, se procedió a despegar mecánicamente las bacterias adheridas a las respectivas superficies, luego se tomaron 10  $\mu$ L de la suspensión fisiológica y se sembró en cajas de agar soya

tripticaseína, siguiendo el método de diluciones seriadas mencionado en el punto d, del procedimiento para elaboración de curvas de crecimiento.

5. Finalmente se contaron las UFC para cada dilución.

### ***Morfología bacteriana analizada por SEM***

Después de d1, d3 y d5 de incubación, las células se fijaron a cada uno de los sustratos (TiO<sub>2</sub> y Ti) utilizando a detalle el método anteriormente descrito en la sección 2.2.

### **Topografía microbiana caracterizada por AFM**

Transcurridas 24 h de incubación, con el apoyo de un AFM se realizó el análisis topográfico de las células cultivadas sobre nanotubos de TiO<sub>2</sub> y Ti utilizando el procedimiento descrito en la sección 2.2 de esta tesis.

### ***Cuantificación de proteínas totales adsorbidas***

Se cuantifico la cantidad de proteínas adsorbidas para d1, d3 y d5. Se utilizo el siguiente procedimiento:

- a) Se retiro el medio de cultivo a cada uno de los sustratos, y se les realizaron tres lavados (5 minutos cada uno) con PBS 1X pH 7.2, para remover bacterias no adheridas.

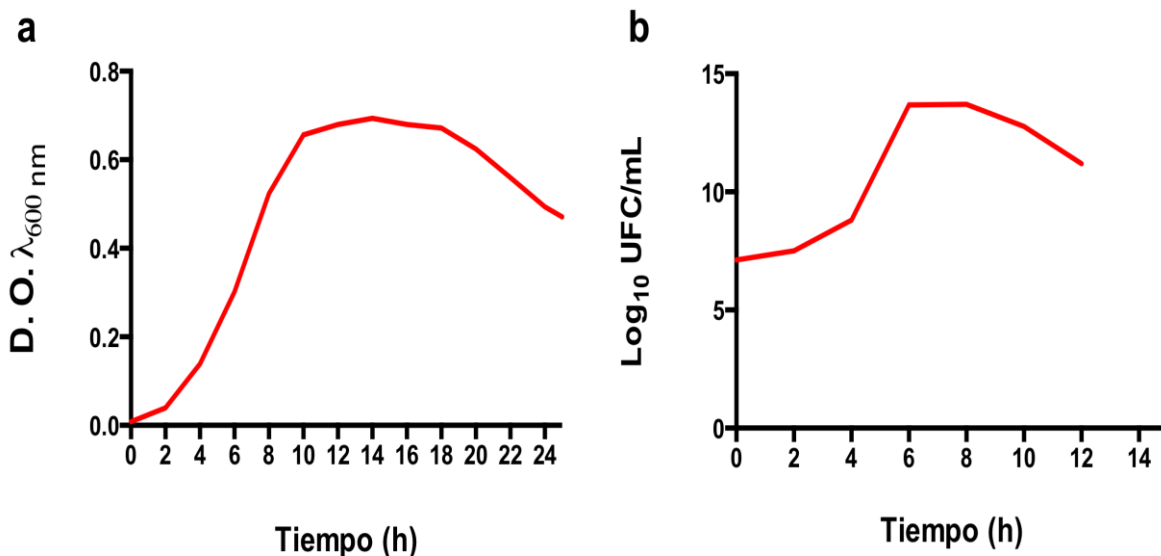
- b) A continuación se transfirieron los especímenes a una caja de 24 pozos estéril sobre un baño de hielo y se les colocó 500  $\mu$ L de PBS 1X pH 7.2 directamente sobre las superficies de cada placa.
- c) Con la ayuda de una espátula estéril, se realizó pulido mecánico para remover todas las sustancias adheridas a la superficie. A continuación se transfirió la mezcla de PBS a un microvial de 1.5 mL y se colocó a sonicar en un baño de agua con hielo por 15 minutos.
- d) Después se centrifugó por 30 minutos a 6000 rpm y finalizado el tiempo se transfirió el sobrenadante a otro microvial de 1.5 mL.
- e) A continuación se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el día de su cuantificación.
- f) Finalmente se realizó la cuantificación de proteínas utilizando el método de Bradford de la siguiente manera:
  - a. Se mezcló 5 mL del reactivo de Bradford (Quick Start, BioRad) en un tubo cónico de 50 mL conteniendo 20 mL de agua destilada y se mezcló suavemente.
  - b. Después en un microvial de 1.5 mL se colocaron 1000  $\mu$ L de la dilución del reactivo de Bradford y se mezcló con 20  $\mu$ L de la muestra experimental y se dejó reposar por 5 minutos en lugar oscuro.
  - c. Luego se colocó la mezcla en una celda para espectrofotómetro y se procedió a realizar la lectura a 595 nm.
  - d. Finalmente se realizó la determinación de la concentración de proteínas utilizando una curva de calibración de albumina de suero bovina (BSA) previamente elaborada.

## **Análisis estadístico y gráficas con barras de error**

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron tres veces. Los datos fueron evaluados por medio del software Prism 6 (2013), siguiendo los parámetros estadísticos utilizados en la sección 2.2.

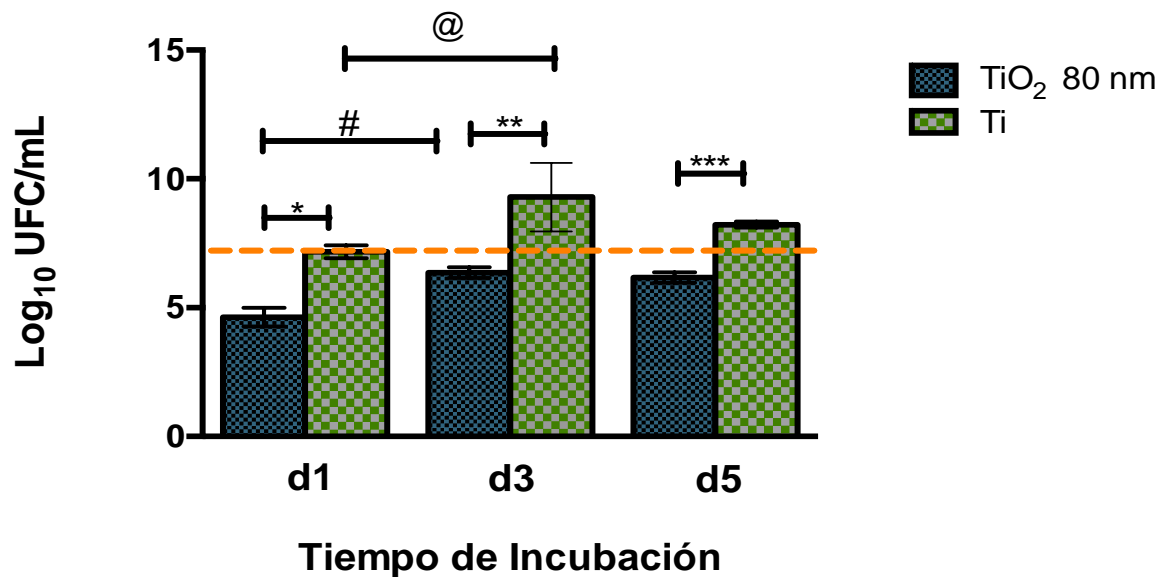
### **5.3 Resultados**

En función de conocer la viabilidad y forma de crecimiento de la cepa utilizada para estos estudios, se realizaron dos curvas de crecimiento que se presentan en la Figura 51, observándose claramente cada una de las fases del crecimiento microbiano.



**Figura 51.** Curvas de crecimiento de *S. aureus* en medio TSB. a) D.O.  $\lambda_{600}$  nm vs tiempo (h). b)  $\text{Log}_{10}$  vs tiempo (h).

Después de conocer la biología de crecimiento de *S. aureus*, se cultivo la cepa sobre cada uno de los especímenes experimentales, con la finalidad de conocer la tasa de viabilidad inducida por cada sustrato a los tiempos previamente establecidos de incubación. Datos representados en la Figura 52.



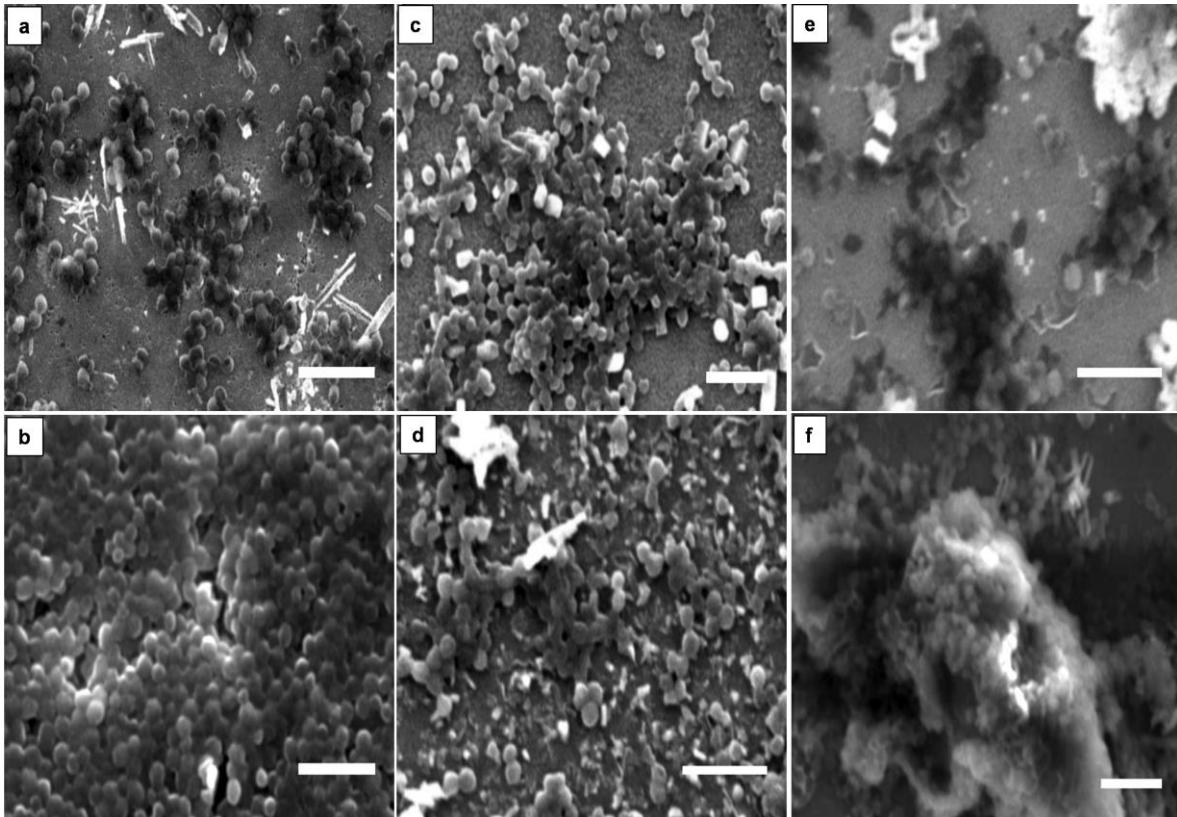
**Figura 52.** Log<sub>10</sub> UFC/mL vs tiempo de incubación para cada uno de los sustratos experimentales. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de  $\pm$  la desviación estándar. El valor P se obtuvo realizando un análisis de varianzas de una vía seguido un análisis de Tukey: \* indica diferencia estadística entre TiO<sub>2</sub> vs Ti d1 P<0.05, \*\* indica diferencia estadística entre TiO<sub>2</sub> vs Ti a d3 P<0.05, \*\*\* indica significancia entre TiO<sub>2</sub> vs Ti a d5 P<0.05, # muestra la diferencia estadística entre TiO<sub>2</sub> d1 vs TiO<sub>2</sub> d3 P<0.05, @ señala cambios significativos entre Ti d1 vs Ti d3 P<0.05.

En el análisis de viabilidad se observó mayor cantidad de bacterias vivas en el sustrato para Ti sin tratamiento comparado con los nanotubos al d1, datos que nos indicaron que en los sustratos con nanotubos hubo aproximadamente un

35.4% de inhibición bacteriana con respecto a Ti. Después al tercer día de crecimiento se encontró que en las superficies de Ti hubo un aumento estadísticamente significativo de la viabilidad de aproximadamente 29.5%, sin embargo sorpresivamente encontramos que en la superficie con nanotubos hubo un incremento significativo de aproximadamente 37.3% con respecto a la muestra de TiO<sub>2</sub> d1, en contraste los sustratos de Ti incrementaron la susceptibilidad al crecimiento bacteriano en un 31.5% más que los nanotubos a d3, diferencias estadísticamente significantes. Finalmente al d5, se encontró disminución en la viabilidad bacteriana para ambos sustratos con respecto a d3, y en Ti a d5 se inhibió aproximadamente 11.6% vs Ti d3, sin embargo la inhibición no fue estadísticamente significativa. Por otra parte en los nanotubos el porcentaje de inhibición fue del 3% con respecto a TiO<sub>2</sub> d3, lo que indicó que posiblemente los nanotubos fueron capaces de dificultar la proliferación bacteriana, manteniéndose el número de UFC similares a los del d3 y menores que los encontrados en Ti d1. Los nanotubos fueron capaces de inhibir aproximadamente un 25% el crecimiento bacteriano con respecto a Ti d5.

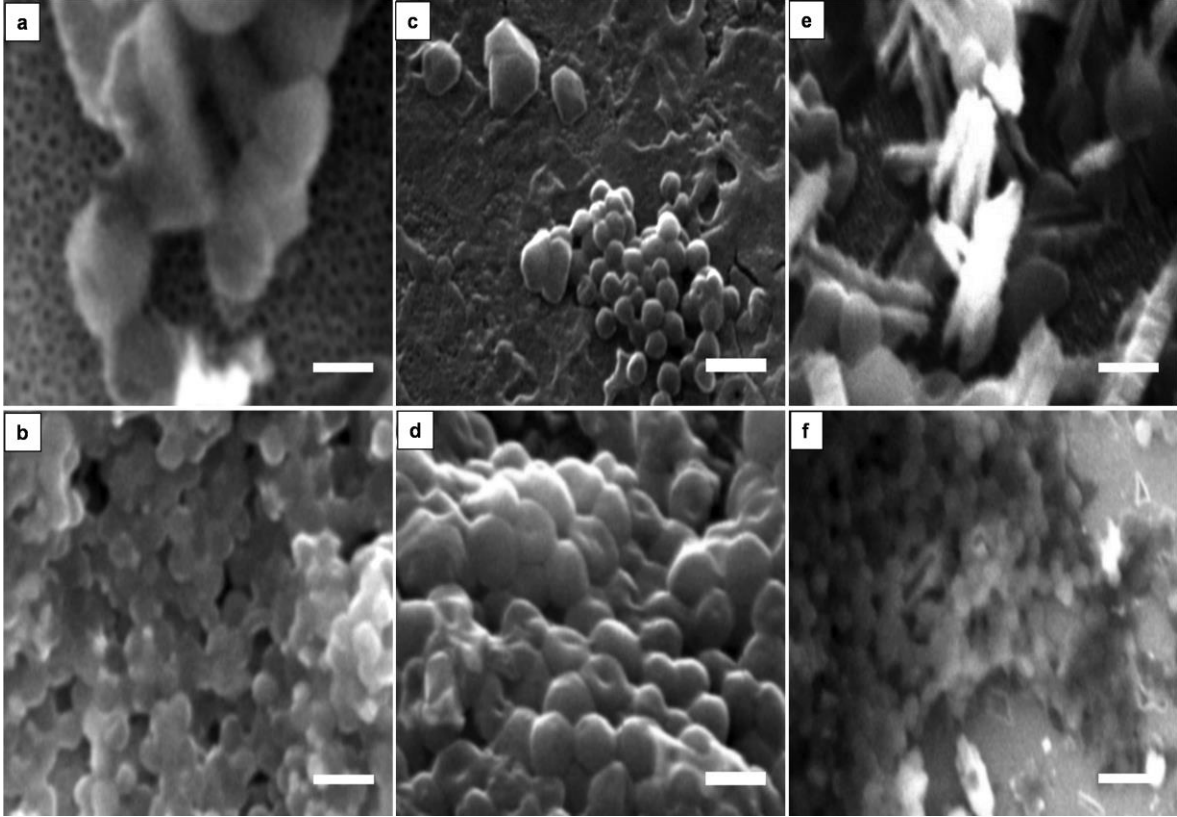
Es importante conocer la tasa de viabilidad bacteriana, pero también es vital evaluar la morfología del crecimiento por análisis microscópico (Figura 53). El análisis a bajo aumento demostró que la cantidad de bacterias adheridas en cada uno de los sustratos siguen la tendencia observada en el análisis de viabilidad, además nos permitió conocer la morfología que adoptaron las células sobre cada uno de los sustratos, sin observarse cambios significativos entre cada uno de

ellos, excepto al día 5 donde se observó la formación de películas de mayor tamaño sobre el sustrato de Ti.



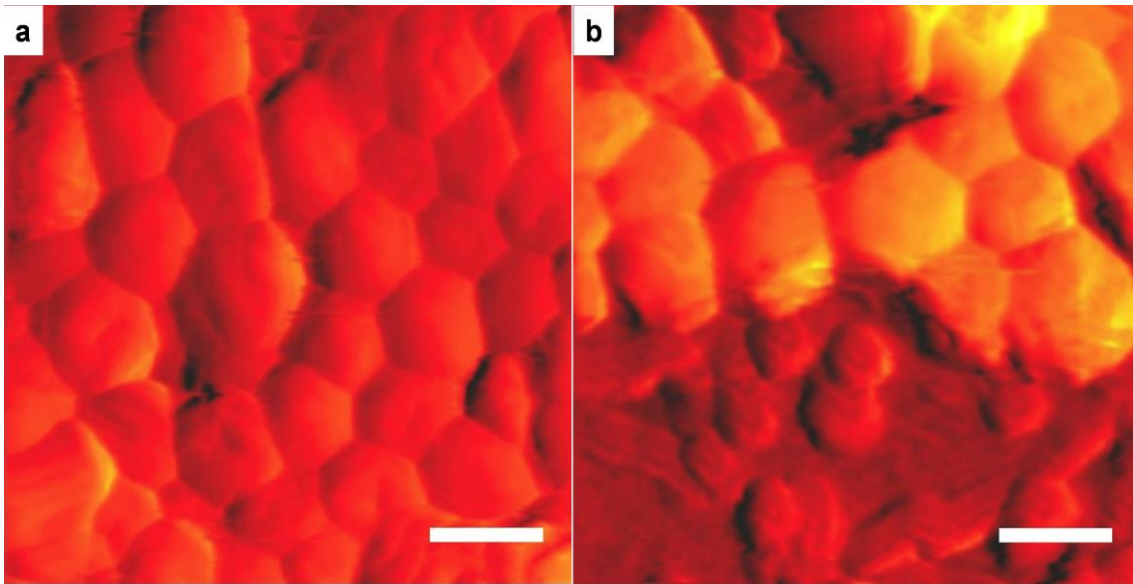
**Figura 53.** Micrografías de SEM para *S. aureus* sobre cada uno de los sustratos a bajo aumento. a) TiO<sub>2</sub> d1. b) Ti d1. c) TiO<sub>2</sub> d3. d) Ti d3. e) TiO<sub>2</sub> d5. f) Ti d5. La barra de escala para todas las imágenes es de 5  $\mu$ m.

Sorpresivamente encontramos que la morfología en Ti d5 fue diferente con respecto a las demás, por lo que se procedió a caracterizar las películas adheridas tomando micrografías a mayores aumentos (Figura 54). Se observó una morfología de mayor tamaño en las muestras de TiO<sub>2</sub> con respecto a las de Ti sin tratamiento. Además la película que se formó sobre cada uno de las muestras de TiO<sub>2</sub> fue más delgada que en Ti.



**Figura 54.** Micrografías de SEM para *S. aureus* sobre cada uno de los sustratos a alto aumento. a) TiO<sub>2</sub> d1. b) Ti d1. c) TiO<sub>2</sub> d3. d) Ti d3. e) TiO<sub>2</sub> d5. f) Ti d5. La barra de escala para todas las imágenes es de 500 nm.

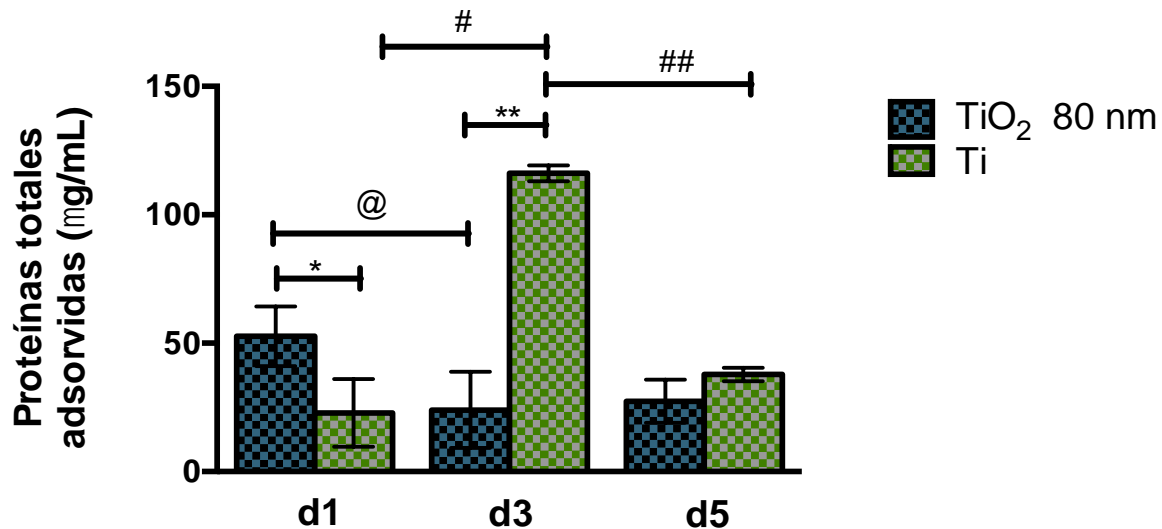
Se evaluó la topografía de la película formada a 24 h de incubación sobre los especímenes. Se observó claramente que en Ti hay una mayor proliferación, siguiendo un crecimiento ordenado, mientras que en TiO<sub>2</sub>, se observó menor cantidad de cocos distribuidos de manera desordenada, datos que apoyan a la evidencia presentada en SEM y AFM (Figura 55).



**Figura 55.** Micrográficas de AFM para *S. aureus* a 24h. a) Ti. b)  $\text{TiO}_2$ . La barra de escala es de 5  $\mu\text{m}$ .

Para la adhesión y proliferación bacteriana, es necesaria la síntesis y adsorción de proteínas a la superficie, por lo que medimos la cantidad de proteínas totales microbianas en cada uno de los sustratos a los tiempos establecidos (Figura 56). Encontramos que al d1 hubo mayor cantidad de proteínas sobre la superficie de nanotubos con respecto a Ti, pero al d3 la cantidad de proteínas depositadas sobre Ti supero significativamente a los nanotubos, inclusive disminuyo considerablemente la cantidad de proteínas en  $\text{TiO}_2$  al d3 con respecto a  $\text{TiO}_2$  d1 ( $P < 0.05$ ). Pero al d5 sorpresivamente se encontró que la cantidad de proteínas presentes en Ti habían disminuido con respecto a d3 ( $P < 0.05$ ), llegando a niveles ligeramente mayores a los de d1 ( $P > 0.05$ ), por otra parte la cantidad de proteínas en  $\text{TiO}_2$  se mantuvo igual que a día 3 ( $P > 0.05$ ), finalmente descubrimos que los niveles de proteína presentes en

Ti fueron mayores que los de TiO<sub>2</sub> a d5, sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significantes.



**Figura 56.** Proteínas totales adsorbidas vs tiempo. La gráfica de barras muestra las barras de error como la media de  $\pm$  la desviación estándar. El valor P se obtuvo realizando un análisis de varianzas de una vía seguido un análisis de Tukey: \* indica significancia estadística entre Ti vs TiO<sub>2</sub> d1  $P < 0.05$ , \*\* diferencia estadística entre Ti vs TiO<sub>2</sub> d3  $P < 0.05$ , @ muestra las diferencias entre TiO<sub>2</sub> d1 vs TiO<sub>2</sub> d3  $P < 0.05$ , # diferencias entre Ti d1 vs Ti d3  $P < 0.05$ , ## diferencia significativa entre Ti d3 vs Ti d5  $P < 0.05$ .

## 5.4 Discusión

Las infecciones son una significativa carga para los implantes dentales y ortopédicos ocasionando la falla temprana del dispositivo previniendo la apropiada integración entre el tejido y el implante. Por lo tanto el objetivo de este capítulo fue el comparar la superficie de nanotubos de TiO<sub>2</sub> ~ 80 nm de diámetro y la superficie

de Ti sin tratamiento para averiguar cual fue la superficie mas resistente a *S. aureus* en términos de adhesión, colonización, viabilidad y síntesis de proteínas totales.

Antes de llevar acabo cada uno de los experimentos, se elaboro una curva de crecimiento con la finalidad de confirmar el patrón de crecimiento para *S. aureus* con respeto a lo que esta publicado en la literatura. Se encontró que su biología de crecimiento esta en acuerdo con lo reportado (158), y a la par se construyo una grafica de UFC/mL para identificar el numero de células vivas que se producen en función del tiempo.

Los resultados de nuestro estudio indicaron que la superficie con nanotubos es capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus*, llegando a promover hasta un 35% de inhibición bacteriana para las primeras 24 h, nuestros resultados están en acuerdo con lo reportados por Concepción et al., donde ellos evaluaron la susceptibilidad de adhesión para *S. aureus* en nanotubos de 20 y 100 nm fabricados por oxidación anódica (159). Posiblemente esta inhibición bacteriana se deba a que nuestros nanotubos se fabricaron utilizando electrolitos a base de flúor, elemento que se sabe tiene propiedades antisépticas (160), lo cual fue capaz de inhibir el crecimiento comparado contra Ti que estaba libre de F (Ver tabla 1), nuestra hipótesis en conjunto con nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Puckett et al., ellos fabricaron nanoestructura por oxidación anódica, y compararon dos grupos; uno electro evaporación seguido del anodizado, y otro sin evaporización ni tratamientos térmicos. En sus resultados de EDS reportan

6.03% de F para nanotubos sin tratamiento térmico y 0% para los eletro-evaporados, reportando que los nanotubos sin tratamiento térmico fueron capaces de inhibir significativamente la adhesión bacteriana con respecto al resto de los grupos (63). Datos similares fueron reportados por Ercan et al., donde comparo las propiedades anti-biocidas de nanotubos reportando que la presencia de flúor posiblemente disminuye la adhesión bacteriana (161) datos que concuerdan con los nuestros.

Los análisis microscópicos de SEM, indicaron evidente deposición y colonización microbiana sobre los sustratos de Ti, observándose incremento en la proliferación en función del tiempo, datos que respaldan las graficas arrojadas del conteo de células vivas. Por otro lado, los nanotubos dificultaron la adhesión y colonización, tal como se observo en los análisis de SEM, corroborando los datos anteriores. Estudios recientes indican que aplicaciones de bajos volates en metales para restauración dental, son capaces de alterar la morfología celular e inclusive de destruir la integridad de *S. aureus* (162), lo que nos sugirió que posiblemente los nanotubos al poseer propiedades antisépticas promuvenga la alteración de la morfología bacteriana a largo plazo posiblemente por estrés celular inducido por la presencia de fluoruros en la superficie.

Finalmente las gráficas de cuantificación de proteínas nos indicaron sorpresivamente que al d1 fue mayor la cantidad de proteínas presentes sobre la superficie, sin embargo disminuyo significativamente la cantidad al d3 en TiO<sub>2</sub>, mientras que en Ti se incremento ( $P < 0.05$ ). Posiblemente este comportamiento se debe a que al inicio la superficie con nanotubos poseen una mayor área superficial

que Ti, facilita el anclaje de proteínas, sin embargo las propiedades anti-sépticas no permitieron la proliferación microbiana, por lo que se redujo la cantidad de proteínas totales mientras que en Ti se incrementaron, al igual como se averiguo en las graficas de viabilidad. Finalmente al d5, se encontró disminución significativa en Ti, llegando a niveles ligeramente mayores que en TiO<sub>2</sub>, pero sin ser estadísticamente significantes.

## **CAPITULO 6**

### **6.1 CONCLUSIONES, APORTACIONES Y RECOMENDACIONES**

#### **6.2 Conclusión general**

En este trabajo de investigación, se evaluaron de manera sistemática sustratos con estructuras superficiales definidas, con el fin de conocer el papel de la topografía en la fisiología celular. La topografía de la superficie influye profundamente en el comportamiento celular. Utilizando este concepto, el comportamiento celular puede ser controlado en función a la topografía superficial, e inclusive realizando modificaciones topográficas a nanoescala se puede regular de manera impactante la interacción tejido – material, y así estos materiales pueden ser utilizados para revolucionar la ingeniería de implante y potenciar la bioactividad.

#### **6.3 Aportaciones de esta investigación a la biomedicina**

Recientemente la investigación en nano-estructuras a sido de gran interés debido al alto grado en la tasa volumen – superficie y a la elevada plasticidad biológica que se induce comparado contra las micro-estructuras.

En esta investigación se obtuvieron bastantes contribuciones a la investigación en el área de innovación de los biomateriales y ensayo experimental para nuevas evaluaciones en términos biológicos de materiales.

- I. *Biomateriales en ortopedia y odontología* --- La manipulación de las superficie con nanotubos de  $\text{TiO}_2$  con diámetro de 80 nm, promueven significativamente la adhesión de osteoblastos, su proliferación, superior tasa de viabilidad, promueve la morfología proliferativa así como una topografía celular de mayor impacto que en las estructura micrométricas, y estimulan mayor actividad celular con respecto a las estructuras-micrométricas.
- II. *Aportaciones en artroscopia para regeneración osteocondral* --- La capa de  $\text{TiO}_2$  sintetizada electroquímicamente en ordenes nanométricos, puede ser una opción para la regeneración del tejido cartilaginoso (condrocitos) y así como promover la interacción tejido – hueso – cartílago. En este estudio se encontraron más evidencias para los nanotubos de  $\text{TiO}_2$  como una fuerte opción para aplicaciones osteocondrales, basados en los estudios de viabilidad, adhesión, proliferación, así como conservación del fenotipo condrocítico presentados en este trabajo.
- III. *Implicación, uso y evaluación de nanotubos de  $\text{TiO}_2$  como innovación tecnológica en el diseño y elaboración de stents cardiovasculares* --- Esta investigación aporta significantes evidencias para el uso de nanotubos de  $\text{TiO}_2$  para el diseño y fabricación de stents, estimulando significativamente la re-endotelización, así como la expresión de marcadores endoteliales con la finalidad de disminuir el proceso de restenosis intra-stent y la reducción de la trombosis tardía que es ocasionada por los actuales stents incorporados a un sistema liberador

de anti-proliferativos. Siendo nosotros los primeros en demostrar el aumento en la proliferación endotelial en hasta 30 días de crecimiento, evidenciando la capacidad de los nanotubos de  $\text{TiO}_2$  con 80 nm de diámetro, para sostener la renovación y funcionalidad endotelial.

- IV. *Estimulación de la inhibición bacteriana inducida por nanotubos de  $\text{TiO}_2$*   
-- Se presentan evidencias sobre la capacidad de los nanotubos de  $\text{TiO}_2$  contruidos por oxidación anódica en términos de disminución de la colonización bacteriana, considerándolo una fuerte opción como material resistente a las infecciones asociadas a dispositivos médicos.

## **6.4 Recomendaciones**

Se recomienda la construcción de estrategias experimentales para realizar futuros estudios *in vivo*, con la finalidad de evaluar profundamente el efecto de los nanotubos de  $\text{TiO}_2$  en la regeneración y biología tisular, por ejemplo, estudios preliminares elaborados por nosotros (datos no publicados), sugieren que el uso de nanotubos de  $\text{TiO}_2$  prometen potenciar la regeneración oseocraneal promoviendo la oseointegración y la aceleran el proceso de sanación. Como se puede observar a lo largo de las discusiones realizadas en el texto de esta tesis, fue muy concurrente el hacer hincapié en la necesidad de dar continuidad a los estudios a fin de aplicar otras técnicas, procedimientos y métodos, que nos lleven a resultados para fortalecer la comprobación de algunas de las hipótesis planteadas durante el análisis de los resultados experimentales.

## Referencias

1. Morrow KJ, Jr., Bawa R, Wei C. Recent advances in basic and clinical nanomedicine. *The Medical clinics of North America*. 2007;91(5):805-43.
2. RP F. "There's plenty of room at the bottom". *Eng Sci (Caltech)*. 1960;23:14.
3. K ED. *Nanosystems: molecular machinery, manufacturing, and computation*. New York: John Wiley & Sons; 1992. 576 p.
4. Patrick Boisseau BL. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus Physique*. 2011;12:620-36.
5. Leslie P. Gartner JLH. *Texto Atlas de Histología*: McGraw-Hill/Interamericana de Mexico; 2008. 592 p.
6. Bruce Alberts DB, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, James Watson. *Molecular Biology of The Cell*. New York: Garland; 1994.
7. Buddy D. Ratner ASH, Frederick J. Schoen, Jack E. Lemons. *Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine*. 2th ed. Elsevier, editor: Academic Press; 2004. 864 p.

8. Sue BK. Controlled nanostructures for enhanced biological responses and release of incorporated biomolecules. San Diego: University of California San Diego; 2011.
9. Symens N, Soenen SJ, Rejman J, Braeckmans K, De Smedt SC, Remaut K. Intracellular partitioning of cell organelles and extraneous nanoparticles during mitosis. *Advanced drug delivery reviews*. 2012;64(1):78-94.
10. Harvey Lodish AB, Paul Matsudaira, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Matthew P. Scott, S. Lawrence Zipursky, James Darnell. *Molecular Cell Biology*. 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company; 2003. 973 p.
11. R. S. Cotran VK, T. Collins. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 6th ed. Philadelphia: Sanders; 1999.
12. Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regenerative medicine*. 2008;3(1):1-5.
13. Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA. Hydrogels in regenerative medicine. *Advanced materials*. 2009;21(32-33):3307-29.
14. Chen H, Zeng Y, Liu W, Zhao S, Wu J, Du Y. Multifaceted applications of nanomaterials in cell engineering and therapy. *Biotechnology advances*. 2013;31(5):638-53.

15. Andrew C. A. JYY. Nanomaterials for in situ cell delivery and tissue regeneration. *Advanced drug delivery reviews*. 2010;62:731-40.
16. Webber MJ TJ, Renault MA, Roncalli JG, Losordo DW, Stupp SI. Development of bio- active peptide amphiphiles for therapeutic cell delivery. *Acta Biomater*. 2010;6:3-11.
17. Berthiaume F, Moghe PV, Toner M, Yarmush ML. Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function, and physiological responsiveness: hepatocytes cultured in a sandwich configuration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1996;10(13):1471-84.
18. Han D GP. Electrospun bioscaffolds that mimic the topology of extracellular matrix. *Nanomedicine*. 2006;2(1):37-41.
19. Nie S. iomedical nanotechnology for molecular imaging, diagnostics, and targeted therapy. . *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2009;2009:4578-9.
20. Verma S, Domb AJ, Kumar N. Nanomaterials for regenerative medicine. *Nanomedicine (Lond)*. 2011;6(1):157-81.

21. Nakamura T, Ohmori K, Kanemaru S. Tissue-engineered airway and "in situ tissue engineering". *General thoracic and cardiovascular surgery*. 2011;59(2):91-7.
22. Atala A. Regenerative medicine strategies. *Journal of pediatric surgery*. 2012;47(1):17-28.
23. Chun SY, Lim GJ, Kwon TG, Kwak EK, Kim BW, Atala A, et al. Identification and characterization of bioactive factors in bladder submucosa matrix. *Biomaterials*. 2007;28(29):4251-6.
24. Sharon JL, Puleo DA. The use of N-terminal immobilization of PTH(1-34) on PLGA to enhance bioactivity. *Biomaterials*. 2008;29(21):3137-42.
25. Kim BS, Baez CE, Atala A. Biomaterials for tissue engineering. *World journal of urology*. 2000;18(1):2-9.
26. Tabata Y. Current status of regenerative medical therapy based on drug delivery technology. *Reproductive biomedicine online*. 2008;16(1):70-80.
27. Lijie Zhang TJW. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *NanoToday*. 2009;4:66-80.

28. J.W. Freeman LDW, C.T. Laurencin, S. Bhattacharyya. Biomedical Nanostructures. K.E. Gonsalves CRH, C.T. Laurencin, L.S. Nair, editor. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2008.
29. Fahlman BD. Materials Chemistry. 1st ed. The Netherlands: Springer; 2007. 485 p.
30. Williams D. Consensus and definitions in biomaterials. *Advances in Biomaterials*. 1988;8:11-6.
31. von Wilmsowky C, Moest T, Nkenke E, Stelzle F, Schlegel KA. Implants in bone: Part I. A current overview about tissue response, surface modifications and future perspectives. *Oral and maxillofacial surgery*. 2013.
32. Lin Z, Lee IS, Choi YJ, Noh IS, Chung SM. Characterizations of the TiO<sub>2-x</sub> films synthesized by e-beam evaporation for endovascular applications. *Biomedical materials* (Bristol, England). 2009;4(1):015013.
33. Barreiro MM, Grana DR, Kokubu GA, Luppò MI, Mintzer S, Vigna G. Titanium compacts produced by the pulvimetallurgical hydride-dehydride method for biomedical applications. *Biomedical materials* (Bristol, England). 2010;5(2):25010.

34. Yu WQ, Qiu J, Xu L, Zhang FQ. Corrosion behaviors of TiO<sub>2</sub> nanotube layers on titanium in Hank's solution. *Biomedical materials* (Bristol, England). 2009;4(6):065012.
35. Yu WQ, Zhang YL, Jiang XQ, Zhang FQ. In vitro behavior of MC3T3-E1 preosteoblast with different annealing temperature titania nanotubes. *Oral diseases*. 2010;16(7):624-30.
36. Das K, Bose S, Bandyopadhyay A. TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti: Influence of nanoscale morphology on bone cell-materials interaction. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2009;90(1):225-37.
37. Chen ZX, Takao Y, Wang WX, Matsubara T, Ren LM. Surface characteristics and in vitro biocompatibility of titanium anodized in a phosphoric acid solution at different voltages. *Biomedical materials* (Bristol, England). 2009;4(6):065003.
38. Chen GJ, Wang Z, Bai H, Li JM, Cai H. A preliminary study on investigating the attachment of soft tissue onto micro-arc oxidized titanium alloy implants. *Biomedical materials* (Bristol, England). 2009;4(1):015017.
39. Kim H, Choi SH, Ryu JJ, Koh SY, Park JH, Lee IS. The biocompatibility of SLA-treated titanium implants. *Biomedical materials* (Bristol, England). 2008;3(2):025011.

40. A.W. Tan BP-M, R. Ahmad, S.A. Akbar Review of titania nanotubes: Fabrication and cellular response. *Ceramics International*. 2012;38:4421-35.
41. Brammer KS, Frandsen CJ, Jin S. TiO<sub>2</sub> nanotubes for bone regeneration. *Trends in biotechnology*. 2012;30(6):315-22.
42. Brammer KS, Oh S, Cobb CJ, Bjursten LM, van der Heyde H, Jin S. Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO<sub>2</sub> nanotube surface. *Acta Biomater*. 2009;5(8):3215-23.
43. Oh S, Daraio C, Chen LH, Pisanic TR, Finones RR, Jin S. Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO<sub>2</sub> nanotubes. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2006;78(1):97-103.
44. Popat KC, Daniels RH, Dubrow RS, Hardev V, Desai TA. Nanostructured surfaces for bone biotemplating applications. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2006;24(4):619-27.
45. Popat KC, Leoni L, Grimes CA, Desai TA. Influence of engineered titania nanotubular surfaces on bone cells. *Biomaterials*. 2007;28(21):3188-97.
46. Swan EE, Popat KC, Grimes CA, Desai TA. Fabrication and evaluation of nanoporous alumina membranes for osteoblast culture. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2005;72(3):288-95.

47. M Rauner NS, LC Hofbauer. Basics of Bone Biology. In: P P, editor. Principles of Osteoimmunology. New York: Springer; 2012. p. 1-26.
48. H Yoshikawa NT, A Myoui. Bone Biology: Development and Regeneration Mechanisms in Physiological and Pathological Conditions. In: Santin M, editor. Strategies in Regenerative Medicine. New York: Springer; 2009. p. 1-18.
49. FF Safadi MB, SM Abdelmagid, MC Rico, RA Asward. Bone Structure, Development and Bone Biology. In: Khurana J, editor. Bone Pathology. New York: Springer; 2009. p. 1-50.
50. Alghamdi HS, Cuijpers VM, Wolke JG, van den Beucken JJ, Jansen JA. Calcium-phosphate-coated oral implants promote osseointegration in osteoporosis. Journal of dental research. 2013;92(11):982-8.
51. Kim D, Choi B, Song J, Kim S, Oh S, Jin EH, et al. TiO<sub>2</sub> nanotube stimulate chondrogenic differentiation of limb mesenchymal cells by modulating focal activity. Experimental & molecular medicine. 2011;43(8):455-61.
52. Satsangi A, Satsangi N, Glover R, Satsangi RK, Ong JL. Osteoblast response to phospholipid modified titanium surface. Biomaterials. 2003;24(25):4585-9.

53. Salata O. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of nanobiotechnology*. 2004;2(1):3.
54. Shirkhazadeh M. Bioactive calcium phosphate coating prepared by electrodeposition. *J Mat Sci Lett*. 1991;10:1415-7.
55. Weng W, Baptista JL. Sol-gel derived porous hydroxyapatite coatings. *Journal of materials science Materials in medicine*. 1998;9(3):159-63.
56. Kinov P, Leithner A, Radl R, Bodo K, Khoschsorur GA, Schauenstein K, et al. Role of free radicals in aseptic loosening of hip arthroplasty. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2006;24(1):55-62.
57. Soballe K, Overgaard S, Hansen ES, Brokstedt-Rasmussen H, Lind M, Bunger C. A review of ceramic coatings for implant fixation. *Journal of long-term effects of medical implants*. 1999;9(1-2):131-51.
58. Yang CY, Wang BC, Lee TM, Chang E, Chang GL. Intramedullary implant of plasma-sprayed hydroxyapatite coating: an interface study. *Journal of biomedical materials research*. 1997;36(1):39-48.

59. Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials*. 2000;21(17):1803-10.
60. Webster TJ, Schadler LS, Siegel RW, Bizios R. Mechanisms of enhanced osteoblast adhesion on nanophase alumina involve vitronectin. *Tissue engineering*. 2001;7(3):291-301.
61. Li B, Li Y, Li J, Fu X, Li H, Wang H, et al. Influence of nanostructures on the biological properties of Ti implants after anodic oxidation. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2014;25(1):199-205.
62. JM Macak HT, A Ghicov, K Yasuda, R Hahn, S Bauer, P Schmuki. TiO<sub>2</sub> nanotubes: self-organized electrochemical formation, properties and applications. *Curr Opin Solid State Mater Sci*. 2007;11:3-18.
63. Puckett SD, Taylor E, Raimondo T, Webster TJ. The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. *Biomaterials*. 2010;31(4):706-13.
64. Hayashi M, Jimbo R, Lindh L, Sotres J, Sawase T, Mustafa K, et al. In vitro characterization and osteoblast responses to nanostructured photocatalytic TiO<sub>2</sub> coated surfaces. *Acta Biomater*. 2012;8(6):2411-6.

65. Twine NA, Chen L, Pang CN, Wilkins MR, Kassem M. Identification of Differentiation-Stage Specific Markers that Define the Ex vivo Osteoblastic Phenotype. *Bone*. 2014.
66. Portan DV, Kroustalli AA, Deligianni DD, Papanicolaou GC. On the biocompatibility between TiO<sub>2</sub> nanotubes layer and human osteoblasts. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2012;100(10):2546-53.
67. YQ Hao SL, YL Hao, YK Zhao, HJ Ai. Effect of nanotube diameters on bioactivity of a multifunctional titanium alloy. *Applied Surface Science*. 2013;268:44-51.
68. Cao X, Yu WQ, Qiu J, Zhao YF, Zhang YL, Zhang FQ. RGD peptide immobilized on TiO<sub>2</sub> nanotubes for increased bone marrow stromal cells adhesion and osteogenic gene expression. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2012;23(2):527-36.
69. Vandrovcova M, Jirka I, Novotna K, Lisa V, Frank O, Kolska Z, et al. Interaction of Human Osteoblast-Like Saos-2 and MG-63 Cells with Thermally Oxidized Surfaces of a Titanium-Niobium Alloy. *PloS one*. 2014;9(6):e100475.
70. Maniotis AJ, Chen CS, Ingber DE. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that

stabilize nuclear structure. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997;94(3):849-54.

71. Kim K, Yoon DM, Mikos A, Kasper FK. Harnessing cell-biomaterial interactions for osteochondral tissue regeneration. Advances in biochemical engineering/biotechnology. 2012;126:67-104.

72. Tan A, Hung C. Engineering Functional Cartilage Grafts. In: Bernstein HS, editor. Tissue Engineering in Regenerative Medicine. Stem Cell Biology and Regenerative Medicine: Humana Press; 2011. p. 237-50.

73. Mow VC, Lai M. Biorheology of swelling tissue. Biorheology. 1990;27(1):110-9.

74. Eyre DR. Collagen: molecular diversity in the body's protein scaffold. Science. 1980;207(4437):1315-22.

75. Clarke IC. Articular cartilage: a review and scanning electron microscope study. 1. The interterritorial fibrillar architecture. The Journal of bone and joint surgery British volume. 1971;53(4):732-50.

76. Muir H, Bullough P, Maroudas A. The distribution of collagen in human articular cartilage with some of its physiological implications. The Journal of bone and joint surgery British volume. 1970;52(3):554-63.

77. Lipshitz H, Etheredge R, 3rd, Glimcher MJ. Changes in the hexosamine content and swelling ratio of articular cartilage as functions of depth from the surface. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1976;58(8):1149-53.
78. Ulrich-Vinther M, Maloney MD, Schwarz EM, Rosier R, O'Keefe RJ. Articular cartilage biology. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2003;11(6):421-30.
79. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instructional course lectures*. 1998;47:477-86.
80. Umlauf D, Frank S, Pap T, Bertrand J. Cartilage biology, pathology, and repair. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2010;67(24):4197-211.
81. Mankin HJ. Alterations in the structure, chemistry, and metabolism of the articular cartilage in osteoarthritis of the human hip. *The Hip*. 1982:126-45.
82. Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM, et al. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Annals of internal medicine*. 2000;133(8):635-46.

83. Ahsan T, Lottman LM, Harwood F, Amiel D, Sah RL. Integrative cartilage repair: inhibition by beta-aminopropionitrile. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society.* 1999;17(6):850-7.
84. Harper MC. Viscous isoamyl 2-cyanoacrylate as an osseous adhesive in the repair of osteochondral osteotomies in rabbits. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society.* 1988;6(2):287-92.
85. Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM. Principles of cartilage repair and regeneration. *Clinical orthopaedics and related research.* 1997(342):254-69.
86. Zuger BJ, Ott B, Mainil-Varlet P, Schaffner T, Clemence JF, Weber HP, et al. Laser solder welding of articular cartilage: tensile strength and chondrocyte viability. *Lasers in surgery and medicine.* 2001;28(5):427-34.
87. Wood JJ, Malek MA, Frassica FJ, Polder JA, Mohan AK, Bloom ET, et al. Autologous cultured chondrocytes: adverse events reported to the United States Food and Drug Administration. *The Journal of bone and joint surgery American volume.* 2006;88(3):503-7.
88. Brammer KS, Oh S, Frandsen CJ, Varghese S, Jin S. Nanotube surface triggers increased chondrocyte extracellular matrix production. *Materials Science and Engineering: C.* 2010;30(4):518-25.

89. Burns K, Yao C, Webster TJ. Increased chondrocyte adhesion on nanotubular anodized titanium. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2009;88(3):561-8.
90. Mor GK, Varghese OK, Paulose M, Mukherjee N, Grimes CA. Fabrication of tapered, conical-shaped titania nanotubes. *Journal of Materials Research*. 2003;18(11):2588-93.
91. Ohara PT, Buck RC. Contact guidance in vitro. A light, transmission, and scanning electron microscopic study. *Experimental cell research*. 1979;121(2):235-49.
92. Solursh M. Cartilage stem cells: regulation of differentiation. *Connective tissue research*. 1989;20(1-4):81-9.
93. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*. 1982;30(1):215-24.
94. Zanetti NC, Solursh M. Induction of chondrogenesis in limb mesenchymal cultures by disruption of the actin cytoskeleton. *The Journal of cell biology*. 1984;99(1 Pt 1):115-23.

95. Antonioli E, Lobo AO, Ferretti M, Cohen M, Marciano FR, Corat EJ, et al. An evaluation of chondrocyte morphology and gene expression on superhydrophilic vertically-aligned multi-walled carbon nanotube films. *Materials Science and Engineering: C*. 2013;33(2):641-7.
96. Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, Andar A, Riehle MO, Herzyk P, et al. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nature materials*. 2007;6(12):997-1003.
97. Mascetti G, Carrara S, Vergani L. Relationship between chromatin compactness and dye uptake for in situ chromatin stained with DAPI. *Cytometry*. 2001;44(2):113-9.
98. Macallan DC, Fullerton CA, Neese RA, Haddock K, Park SS, Hellerstein MK. Measurement of cell proliferation by labeling of DNA with stable isotope-labeled glucose: studies in vitro, in animals, and in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(2):708-13.
99. Shie MY, Ding SJ. Integrin binding and MAPK signal pathways in primary cell responses to surface chemistry of calcium silicate cements. *Biomaterials*. 2013;34(28):6589-606.
100. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*. 1995;268(5208):233-9.

101. Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2004;5(4):261-70.
102. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2002;34(12):1508-12.
103. Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. *Human Pathology*. 1987;18(3):234-9.
104. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007;115(10):1285-95.
105. Razakandrainibe R, Combes V, Grau GE, Jambou R. Crossing the wall: the opening of endothelial cell junctions during infectious diseases. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2013;45(7):1165-73.
106. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
107. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. 2006;113(13):1708-14.

108. Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends in pharmacological sciences*. 2002;23(8):374-80.
109. Palmefors H, DuttaRoy S, Rundqvist B, Borjesson M. The effect of physical activity or exercise on key biomarkers in atherosclerosis--a systematic review. *Atherosclerosis*. 2014;235(1):150-61.
110. Wang W, Lee Y, Lee CH. Review: the physiological and computational approaches for atherosclerosis treatment. *International journal of cardiology*. 2013;167(5):1664-76.
111. Guilford T, Morris D, Gray D, Venketaraman V. Atherosclerosis: pathogenesis and increased occurrence in individuals with HIV and Mycobacterium tuberculosis infection. *HIV/AIDS (Auckland, NZ)*. 2010;2:211-8.
112. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233-41.
113. Yutani C, Imakita M, Ishibashi-Ueda H, Tsukamoto Y, Nishida N, Ikeda Y. Coronary atherosclerosis and interventions: pathological sequences and restenosis. *Pathology international*. 1999;49(4):273-90.
114. Gallino A, Stuber M, Crea F, Falk E, Corti R, Lekakis J, et al. "In vivo" imaging of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012;224(1):25-36.

115. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868-74.
116. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;47(8 Suppl):C7-12.
117. MedlinePlus. Angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP) Estados Unidos: NIH; 2012 [updated 12/9/2012].
118. Mani G, Feldman MD, Patel D, Agrawal CM. Coronary stents: A materials perspective. *Biomaterials*. 2007;28(9):1689-710.
119. Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie K, Go A, Greenlund K, et al. Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2007;115(5):e69-171.
120. Mazumder MM, De S, Trigwell S, Ali N, Mazumder MK, Mehta JL. Corrosion resistance of polyurethane-coated nitinol cardiovascular stents. *Journal of biomaterials science Polymer edition*. 2003;14(12):1351-62.
121. Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, et al. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *The New England journal of medicine*. 1994;331(8):496-501.

122. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, et al. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. The New England journal of medicine. 1994;331(8):489-95.
123. Gottsauner-Wolf M, Moliterno DJ, Lincoff AM, Topol EJ. Restenosis--an open file. Clinical cardiology. 1996;19(5):347-56.
124. Zilberman M, Eberhart RC. Drug-eluting bioresorbable stents for various applications. Annual review of biomedical engineering. 2006;8:153-80.
125. Eisenberg MJ, Konnyu KJ. Review of Randomized Clinical Trials of Drug-Eluting Stents for the Prevention of In-Stent Restenosis. The American Journal of Cardiology. 2006;98(3):375-82.
126. Colombo A, Drzewiecki J, Banning A, Grube E, Hauptmann K, Silber S, et al. Randomized study to assess the effectiveness of slow- and moderate-release polymer-based paclitaxel-eluting stents for coronary artery lesions. Circulation. 2003;108(7):788-94.
127. Yang Z, Tu Q, Wang J, Huang N. The role of heparin binding surfaces in the direction of endothelial and smooth muscle cell fate and re-endothelialization. Biomaterials. 2012;33(28):6615-25.

128. Peng L, Eltgroth ML, LaTempa TJ, Grimes CA, Desai TA. The effect of TiO<sub>2</sub> nanotubes on endothelial function and smooth muscle proliferation. *Biomaterials*. 2009;30(7):1268-72.
129. Cai J, Jiang WG, Ahmed A, Boulton M. Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell proliferation is regulated by interaction between VEGFR-2, SH-PTP1 and eNOS. *Microvascular Research*. 2006;71(1):20-31.
130. Stevens T, Garcia JG, Shasby DM, Bhattacharya J, Malik AB. Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2000;279(3):L419-22.
131. Brammer KS, Oh S, Gallagher JO, Jin S. Enhanced cellular mobility guided by TiO<sub>2</sub> nanotube surfaces. *Nano letters*. 2008;8(3):786-93.
132. Alagem-Shafir M, Kivovich E, Tzchori I, Lanir N, Falah M, Flugelman MY, et al. The formation of an anti-restenotic/anti-thrombotic surface by immobilization of nitric oxide synthase on a metallic carrier. *Acta Biomater*. 2014;10(5):2304-12.
133. Zhong S, Luo R, Wang X, Tang L, Wu J, Wang J, et al. Effects of polydopamine functionalized titanium dioxide nanotubes on endothelial cell and smooth muscle cell. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014;116(0):553-60.

134. Loya MC, Brammer KS, Choi C, Chen LH, Jin S. Plasma-induced nanopillars on bare metal coronary stent surface for enhanced endothelialization. *Acta Biomater.* 2010;6(12):4589-95.
135. Choudhary S, Haberstroh KM, Webster TJ. Enhanced functions of vascular cells on nanostructured Ti for improved stent applications. *Tissue engineering.* 2007;13(7):1421-30.
136. Park J, Bauer S, Schmuki P, von der Mark K. Narrow window in nanoscale dependent activation of endothelial cell growth and differentiation on TiO<sub>2</sub> nanotube surfaces. *Nano letters.* 2009;9(9):3157-64.
137. Jaalouk DE, Lammerding J. Mechanotransduction gone awry. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2009;10(1):63-73.
138. Chrestensen CA, McMurry JL, Salerno JC. MAP kinases bind endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Open Bio.* 2012;2(0):51-5.
139. Bernier SG, Haldar S, Michel T. Bradykinin-regulated interactions of the mitogen-activated protein kinase pathway with the endothelial nitric-oxide synthase. *The Journal of biological chemistry.* 2000;275(39):30707-15.

140. Peng L, Barczak AJ, Barbeau RA, Xiao Y, LaTempa TJ, Grimes CA, et al. Whole genome expression analysis reveals differential effects of TiO<sub>2</sub> nanotubes on vascular cells. *Nano letters*. 2010;10(1):143-8.
141. Dudzinski DM, Michel T. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovascular research*. 2007;75(2):247-60.
142. Yeh HI, Lu SK, Tian TY, Hong RC, Lee WH, Tsai CH. Comparison of endothelial cells grown on different stent materials. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2006;76(4):835-41.
143. Anderson SM, Chen TT, Iruela-Arispe ML, Segura T. The phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) by engineered surfaces with electrostatically or covalently immobilized VEGF. *Biomaterials*. 2009;30(27):4618-28.
144. Cho CH, Lee CS, Chang M, Jang IH, Kim SJ, Hwang I, et al. Localization of VEGFR-2 and PLD2 in endothelial caveolae is involved in VEGF-induced phosphorylation of MEK and ERK. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2004;286(5):H1881-8.
145. Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, et al. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *The EMBO journal*. 1991;10(4):885-92.

146. Wright GL, Maroulakou IG, Eldridge J, Liby TL, Sridharan V, Tsihchlis PN, et al. VEGF stimulation of mitochondrial biogenesis: requirement of AKT3 kinase. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2008;22(9):3264-75.
147. Bruni S, Martinesi M, Stio M, Treves C, Bacci T, Borgioli F. Effects of surface treatment of Ti-6Al-4V titanium alloy on biocompatibility in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Acta Biomater*. 2005;1(2):223-34.
148. Fine E, Zhang L, Fenniri H, Webster TJ. Enhanced endothelial cell functions on rosette nanotube-coated titanium vascular stents. *International journal of nanomedicine*. 2009;4:91-7.
149. Raikar GN, Gregory JC, Ong JL, Lucas LC, Lemons JE, Kawahara D, et al. Surface characterization of titanium implants. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*. 1995;13(5):2633-7.
150. Sul YT, Johansson CB, Petronis S, Krozer A, Jeong Y, Wennerberg A, et al. Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition. *Biomaterials*. 2002;23(2):491-501.

151. Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerging infectious diseases*. 2001;7(2):277-81.
152. von Recum AF, Park JB. Permanent percutaneous devices. *Critical reviews in bioengineering*. 1981;5(1):37-77.
153. Whitehouse JD, Friedman ND, Kirkland KB, Richardson WJ, Sexton DJ. The impact of surgical-site infections following orthopedic surgery at a community hospital and a university hospital: adverse quality of life, excess length of stay, and extra cost. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2002;23(4):183-9.
154. Lentino JR. Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2003;36(9):1157-61.
155. Costerton JW, Ellis B, Lam K, Johnson F, Khoury AE. Mechanism of electrical enhancement of efficacy of antibiotics in killing biofilm bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1994;38(12):2803-9.
156. Walker TS, Tomlin KL, Worthen GS, Poch KR, Lieber JG, Saavedra MT, et al. Enhanced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development mediated by human neutrophils. *Infection and immunity*. 2005;73(6):3693-701.

157. Chandra J, McCormick TS, Imamura Y, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Interaction of *Candida albicans* with adherent human peripheral blood mononuclear cells increases *C. albicans* biofilm formation and results in differential expression of pro- and anti-inflammatory cytokines. *Infection and immunity*. 2007;75(5):2612-20.
158. Harris LG, Foster SJ, Richards RG. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *European cells & materials*. 2002;4:39-60.
159. Pérez-Jorge C, Conde A, Arenas MA, Pérez-Tanoira R, Matykina E, de Damborenea JJ, et al. In vitro assessment of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* adhesion on TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti-6Al-4V alloy. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2012;100A(7):1696-705.
160. Marquis RE. Antimicrobial actions of fluoride for oral bacteria. *Canadian journal of microbiology*. 1995;41(11):955-64.
161. Ercan B, Taylor E, Alpaslan E, Webster TJ. Diameter of titanium nanotubes influences anti-bacterial efficacy. *Nanotechnology*. 2011;22(29):295102.

162. Zituni D, Schutt-Gerowitt H, Kopp M, Kronke M, Addicks K, Hoffmann C, et al. The growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in low-direct current electric fields. *International journal of oral science*. 2014;6(1):7-14.