

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



**“Caracterización del proceso de osteogénesis en superficies
de Ti6Al4V nanoestructurado bajo condiciones de diabetes *In
Vitro*”**

TESIS

Para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias

Autor

Sandra Leticia Castillo Uribe

Director

Dr. Ernesto Alonso Beltrán Partida

Co-Director

Dr. Benjamín Valdez Salas

Mexicali, B. C., Enero del 2023

ABSTRACT OF THE DISSERTATION

Characterization of the osteogenesis process on nanostructured Ti6Al4V surfaces under In Vitro diabetic conditions.

Titanium (Ti) and its alloys (Ti6Al4V) are exceptional treatments for replacing or repairing bones and damaged surrounding tissues. Notably, the development of Ti nanostructured surfaces has grown as a promising strategy to improve the bone-functional response. Although Ti-based implants exhibit excellent osteoconductive performance under healthy conditions, the effectiveness and successful clinical achievement are negatively altered under diabetic disorders. Concernedly, diabetes mellitus (DM) contributes to osteoblastic dysfunctionality altering the efficient bone-to-implant integration and subsequent osseointegration. Here, we evaluated the osteoblasts' bone-forming functional properties by anodized TiO₂ nanotubes (NTs) on Ti6Al4V under detrimental diabetic conditions. The results showed that diabetic conditions depressed the initial osteoblasts growing ability, evidenced by altered early cell adhesion and reduced proliferation. Nonetheless, after three days, the diabetic conditions were suppressed by the NTs, enhancing the osteoblast activity. Therefore, the osteogenic markers of bone formation and the differentiation of osteoblasts were reactivated by the nanostructured surfaces. Far more important, the collagen secretion and bone-matrix mineralization were stimulated and conducted to similar levels than those of the control conditions. Our study brings knowledge for the potential application of nanostructured biomaterials to work as an

integrative platform under detrimental metabolic status present in diabetic conditions.

RESUMEN

Caracterización del proceso de osteogénesis en superficies de Ti6Al4V nanoestructurado bajo condiciones de diabetes In Vitro

El titanio (Ti) y sus aleaciones (Ti6Al4V) son tratamientos excepcionales para sustituir o reparar huesos y tejidos circundantes dañados. En particular, el desarrollo de superficies nanoestructuradas de Ti6Al4V se ha convertido en una estrategia prometedora para mejorar la respuesta funcional del hueso. Aunque los implantes basados en el Ti6Al4V presentan un excelente rendimiento osteoconductor en condiciones de salud, la eficacia y el éxito clínico se ven alterados negativamente en los trastornos diabéticos. Es preocupante el grado de disfuncionalidad osteoblástica que contribuye la diabetes mellitus (DM), alterando la eficiente integración hueso-implante y la subsiguiente osteointegración. En este trabajo, se evaluó las propiedades funcionales de formación de hueso de los osteoblastos conducidos por nanotubos de TiO₂ (NTs) anodizados sobre Ti6Al4V bajo perjudiciales condiciones diabéticas. Los resultados mostraron que las condiciones diabéticas deprimieron la capacidad inicial de crecimiento de los osteoblastos, evidenciada por la alteración de la adhesión celular temprana y la reducción de la proliferación. Sin embargo, al cabo de tres días, las condiciones diabéticas fueron suprimidas por los NTs, aumentando la actividad de los osteoblastos. Los marcadores osteogénicos de formación ósea y la diferenciación de los osteoblastos fueron reactivados por las superficies nanoestructuradas. Además, la secreción de

colágeno y la mineralización de la matriz ósea fueron estimuladas y conducidas a niveles similares a los de las condiciones de control. Este estudio aporta conocimientos para la potencial aplicación de biomateriales nanoestructurados como una plataforma integral para su manejo bajo el estado metabólico perjudicial presente en las condiciones diabéticas.

DEDICATORIA

A mi pareja, a mis padres y a Esperanza que jamás olvidaré.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a Dios por su infinita benevolencia, por dotarme de salud, de las actitudes necesarias para llegar hasta aquí, por permitirme concluir con este doctorado y sobre todo por rodearme de las personas indicadas.

A Enrique por todo su apoyo, por acompañarme, orientarme y por siempre alentarme a ser mejor persona. Quien con su amor y paciencia fue un pilar vital para lograr concluir con esta etapa de mi vida. El viaje fue largo y siempre estuviste a mi lado, fuiste la salvación a mi cansado ser.

Al Dr. Ernesto Alonso Beltrán Partida, que fue un gran pilar en la elaboración y trayectoria de este trabajo, asesor le agradezco todo el apoyo y la confianza que recibí de su parte, por compartir su vasta experiencia y sus conocimientos que me llevaron a lograr concluir con este trabajo. Gracias por ser un gran ejemplo para mí y por haberme enseñado el mundo de la investigación. Dr., muchas gracias!

Al Dr. Benjamín Valdez Salas, por todo el apoyo otorgado, por su valiosa y generosa contribución en la realización del presente trabajo. Muchas Gracias!

A mi amigo Oscar por todo su apoyo tanto en lo personal como profesional durante este trayecto, por acompañarme en cada paso que di, Mi infinito agradecimiento.

A mi querida amiga Martha, a pesar de los días grises siempre estuviste presente brindándome sincero apoyo durante este camino. Muchas gracias.

Agradezco a mi institución académica, a mis compañeros y a todo el personal por apoyarme y orientarme cada que lo necesite. Muchas gracias!

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento recibido para la realización de este importante proyecto a través del programa No. A1-S-38368, "Proyecto Apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación" SEP-CONACYT, convocatoria de Investigación Científica Básica CB2017-2018.

Finalmente agradezco al CONACYT por el otorgamiento y financiamiento de una beca (CVU 764606) económica para lograr ejercer mis estudios de Doctorado, Muchas gracias!

EPIGRAFÍA

“Bienaventurado el hombre que halla la sabiduría, y que obtiene la inteligencia; porque su ganancia es mejor que la ganancia de la plata, y sus frutos más que el oro fino”

- Proverbios 3:13-14 -

“Nuestras vidas son demasiado largas para rendirse, cree en ti mismo cuando se está en un laberinto. Una vez que el invierno pase, la primavera vendrá de nuevo”

- BTS, 2018 -

LISTA DE SÍMBOLOS

Ti	Titanio puro (99% pureza).
Ti6Al4V	Aleación de Titanio-Aluminio-Vanadio.
TiO ₂	Óxidos de Titanio.
NTs	Nanotubos de TiO ₂ .
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
ATM	Articulación temporomandibular
DM	Diabetes Mellitus
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
ROS	Subproducción de especies reactivas de oxígeno
IOPA	Imagen periapical intraoral
Cp-Ti	Titanio comercialmente puro
FID	Federación Internacional de Diabetes
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DC	Fuente de alimentación

NH ₄ F	Fluoruro de Amonio.
NaCl	Cloruro de sodio
TA	Temperatura ambiente
FE-SEM	Microscopia electrónica de barrido de emisión de campo
EDX	Espectrometría de rayos X
SD1	Suero de paciente diabético 1
SD2	Suero de paciente diabético 2
SH	Suero humano control
MC3T3-E1	Línea celular de pre osteoblastos de ratón
α-MEM	Siglas en inglés: α-minimum essential medium
SBF	Suero bovino fetal
MTT	Bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio
DMSO	Dimetilsulfóxido.
O.D.	Densidad óptica
ARS	Tinción rojo de alizarina
Rpm	Revoluciones por minuto
OC	Osteocalcina
OPN	Osteopontina

OPG	Osteoprogeterina
BSA	Albumina de suero bovino
DAPI	4',6'-diamidino-2-fenilindol
ANOVA	Análisis de varianza
DE	Desviación estándar
MEC	Matriz extracelular
HAp	Hidroxiapatita
FAK	Quinasa de adhesión focal
PBS	Siglas en inglés: phosphate buffered saline.
SD	Suero diabético

CONTENIDO

ABSTRACT OF THE DISSERTATION.....	2
RESUMEN	4
DEDICATORIA.....	6
AGRADECIMIENTOS	7
EPIGRAFÍA.....	9
LISTA DE SÍMBOLOS	10
CONTENIDO	13
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	16
CAPÍTULO 1	21
INTRODUCCIÓN.....	21
1.1 Introducción	22
1.2 Objetivo general.....	28
1.3 Objetivos específicos	28
CAPÍTULO 2	30
MARCO TEÓRICO.....	30
2.1 Antecedentes de los implantes de titanio	31
2.2 Ti y sus aleaciones en aplicaciones biomédicas	32
2.3 Nanotopografías y osteogénesis.....	34

2.4 Antecedentes de la Diabetes Mellitus	36
2.5 Epidemiología de la enfermedad.....	36
2.6 Manifestación de la enfermedad	38
2.7 Tratamiento de la enfermedad desde el aspecto bucal	40
CAPÍTULO 3	41
MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1 Preparación de superficies de Ti6Al4V	42
3.2 Síntesis de nanotubos de TiO ₂ en Ti6Al4V	43
3.3 Caracterización de la superficie de las muestras experimentales	45
3.4 Criterios de selección de pacientes donantes para el modelo de estudio	45
3.5 Obtención de muestras sanguíneas de los donantes.....	46
3.6 Recolección del suero humano en condiciones diabéticas.	49
3.7 Evaluación biológica	51
3.7.1 Cultivos celulares.....	51
3.7.2 Proliferación y viabilidad celular	55
3.7.3 Caracterización de los osteoblastos por análisis de FE-SEM.....	56
3.7.4 Diferenciación de osteoblastos	56
3.7.5 Evaluación de la mineralización	57
3.7.6 Evaluación de secreción de colágeno	58
3.7.7 Evaluación de la expresión osteogénica por inmunofluorescencia....	59
3.8 Análisis estadístico	61
CAPÍTULO 4	62

ANÁLISIS DE RESULTADOS	62
4.1 Análisis de la superficie	63
4.2 Efecto del suero humano en la viabilidad de los osteoblastos	65
4.3 Adhesión y morfología de las células MC3T3E-1	66
4.4 Diferenciación de los osteoblastos.....	70
4.5 Caracterización FE-SEM de las MC3T3-E1 diferenciadas	74
4.6 Tinción de inmunofluorescencia.....	79
CAPÍTULO 5	88
DISCUSIÓN.....	88
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	101
Conclusiones	102
Recomendaciones	103
TRABAJO FUTURO	104
FINANCIAMIENTO DEL PROYECTO	106
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	107

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1 Edentulismo a) Vista intraoral de un maxilar reabsorbido edéntulo. b) Vista intraoral de una cresta mandibular edéntula reabsorbida y atrófica. [6].....	22
Figura 2 Efecto de la diabetes mellitus en el fracaso de los implantes dentales. (a) Ilustración y una imagen periapical intraoral (IOPA) representativa de un paciente diabético al que se le había colocado un implante. Se tomó inmediatamente después de la colocación quirúrgica de un implante dental. (b) Ilustración y una IOPA de seguimiento que muestra el fracaso del implante dental debido a una infección. [35].	25
Figura 3 a) Ilustración de la estructura ósea, b) Diferentes formas de implantes de ti. [56]......	32
Figura 4 Ilustración del proceso de síntesis de NTs en Ti6Al4V.	35
Figura 5 Criterios de diagnóstico modificados para diabetes [65]......	37
Figura 6 a) Desbaste mecánico de Ti6Al4V siguiendo las indicaciones de la norma ASTM E3-11. b) Muestras en acabado a espejo.	43
Figura 7 a) Celda electroquímica [60]. b) Vista superior de las muestras con nanotubos de TiO ₂ , descritos aquí como NTs.	44
Figura 8 Diseño de estudio.....	45
Tabla 1 Datos de los donadores voluntarios.	46

Figura 9 a) Material para la extracción sanguínea. b) Se muestra el procedimiento de venopunción y la muestra sanguínea obtenida.	48
Figura 10 Diseño de estudio de la recolección de suero humano en condiciones diabéticas.....	49
Figura 11 Se muestra el procedimiento para la recolección de suero en condiciones diabéticas.....	50
Figura 12 Se muestra el diseño de estudio de la evaluación biológica.....	51
Figura 13 Línea celular MC3T3-E1, osteoblastos de calvaria de ratón. a) Pellet celular al fondo de tubo cónico, obtenido de un centrifugado a 1200 rpm por 10 min b) Siembra de células en cajas T-25 (Corning), con 4 mL de medio. c) Osteoblastos sub-confluentes en pasaje 1. d) Cambio de medio cada tercer día por medio suplementado nuevo.....	54
Figura 14 a) Micrografía de la vista superior de los NTs mostrando el diámetro y la distribución del grosor del tubo. b) Vista de la sección transversal de la capa de NTs ilustrando la anchura de la pared y la amplitud de la capa.	64
Figura 15 Ensayo de MTT que muestra la viabilidad de las células MC3T3-E1 bajo los microambientes experimentales después de 1, 3, 5 y 7 días de incubación. Los datos se presentan como media \pm DE (n = 3), p < 0,05. * y ** indican diferencias significativas entre las condiciones del suero	66
Figura 16 Micrografías FE-SEM que ilustran la adhesión de osteoblastos y la morfología celular en los NTs después de 4 h de cultivo.....	68

Figura 17 Micrografías FE-SEM que ilustran la adhesión de osteoblastos y la morfología celular en los NTs después de 24 h de cultivo.....	69
Figura 18 Ensayo de la mineralización de la matriz extracelular tras la inducción osteogénica durante 7, 14 y 21 días. Se muestran nódulos mineralizados en las células teñidos con rojo de alizarina S.	71
Figura 19 Ensayo de la mineralización de la matriz extracelular tras la inducción osteogénica durante 7, 14 y 21 días. Se muestra análisis y resultados cuantitativos de la tinción ARS. Los datos se presentan como media \pm DE (n = 3), p < 0,05. * Indica diferencias significativas entre los 7 y 21 días de cultivo en NTs. ** Representa cambios entre los 14 y 21 días de incubación.....	72
Figura 20 Ensayo de la secreción de colágeno de la matriz extracelular tras la inducción osteogénica durante 14 días. a) Monocapa teñida con picosirius red. b) Resultados cuantitativos de la secreción de colágeno. Los datos se presentan como media \pm DE (n = 3), p < 0,05.....	73
Figura 21 Formación de nódulos de hidroxiapatita después de la inducción osteogénica durante 21 días en las condiciones experimentales. a) Micrografía SEM mostrando abundantes y grandes nódulos óseos en las superficies de los NTs. b) Análisis EDX del nivel atómico del calcio. c) Nivel atómico del fósforo segregado en los NTs. Los datos se presentan como la media \pm DE (n = 3), * p < 0,05 Indica diferencias significativas.	76

Figura 22 Caracterización analítica de los materiales. a) Cuantificación por EDX del contenido elemental de la superficie de FBS y SH. b) Cuantificación por EDX del contenido elemental de los microambientes SD1 y SD2.	77
Figura 23 Caracterización por FE-SEM de los cristales de los osteoblastos mineralizados después de 21 días de inducción osteogénica bajo los sueros experimentales.....	78
Figura 24 Inmunofluorescencia de la expresión de Runx2 en MC3T3-E1 cultivados durante 7 días en las condiciones experimentales.	80
Figura 25 Inmunofluorescencia de la expresión de Runx2 en MC3T3-E1 cultivados durante 7 días en las condiciones experimentales. a) Localización intracelular de Runx2. b) Gráfico que representa la intensidad de fluorescencia expresada para Runx2. Los valores son la media \pm DE, (n = 5).	81
Figura 26 Inmunofluorescencia de la expresión de OC en MC3T3-E1 cultivadas durante 21 días bajo los sueros experimentales.....	82
Figura 27 Inmunofluorescencia de la expresión de OC en MC3T3-E1 cultivadas durante 21 días bajo los sueros experimentales. a) Detección de OC en las superficies de NTs. b) Gráfico que muestra la intensidad de fluorescencia expresada para OC. Los valores son la media \pm DE, (n = 5).	83
Figura 28 Inmunofluorescencia de la expresión de OPN en MC3T3-E1 cultivadas durante 21 días bajo los entornos de suero evaluados.	84
Figura 29 Inmunofluorescencia de la expresión de OPN en MC3T3-E1 cultivadas durante 21 días bajo los entornos de suero evaluados. a) Detección de OPN	

después de cada tratamiento bajo las condiciones experimentales. **b)** Gráfico que representa la fluorescencia de OPN. El * $p < 0,05$ indica diferencias significativas. los valores son la media \pm DE, (n = 5)..... 85

Figura 30 Inmunofluorescencia de la expresión de OPG en osteoblastos cultivados durante 21 días bajo los sueros diabéticos y de control. 86

Figura 31 Inmunofluorescencia de la expresión de OPG en osteoblastos cultivados durante 21 días bajo los sueros diabéticos y de control. **a)** Detección intracelular de OPG. **b)** Gráfico que ilustra la intensidad de fluorescencia expresada para OPG. * $p < 0,05$ denota diferencias significativas entre el tratamiento SD1 versus SD2 y SH. los valores son la media \pm DE, (n = 5)..... 87

Figura 32 Ilustración del modelo de acción de las superficies NTs en condiciones diabéticas..... 89

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

La salud bucodental es un estado que debe mantenerse en equilibrio, siendo complicado en algunos casos, esto debido a conceptos erróneos de estilo de vida del ser humano (dieta e higiene bucal inadecuada), temor a las maniobras dentales [1], así como al acceso restringido a los servicios de salud odontológicos, la falta de cultura de la población en cuanto al cuidado de la boca y los altos costos que la atención odontológica representa, entre otros [2]. Las enfermedades orales son progresivas y acumulativas, secuela que conlleva al edentulismo que se define como la ausencia total o parcial de piezas dentales, las cuales no se sustituirán de forma natural [3] (Fig. 1). En consecuencia, haciéndose más complejas al paso del tiempo, afectando la funcionalidad y estética de la boca. Las dificultades derivadas del edentulismo parcial o completo comprenden la insuficiencia masticatoria, el desequilibrio oclusal, los trastornos de la articulación temporomandibular (ATM) y un mayor deterioro de la cresta ósea [4, 5].

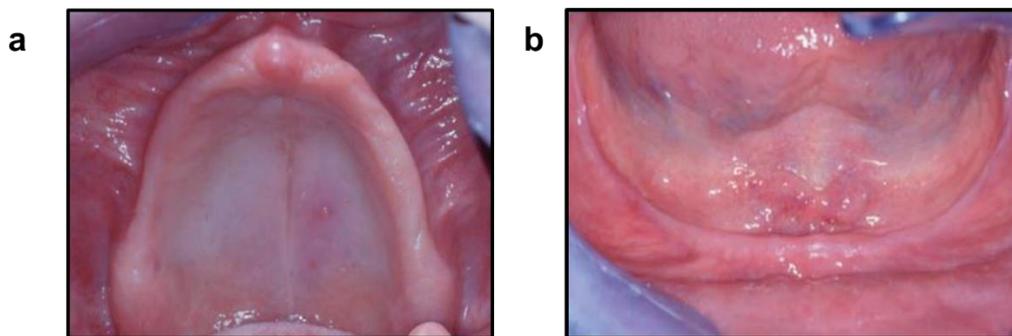


Figura 1 Edentulismo **a)** Vista intraoral de un maxilar reabsorbido edéntulo. **b)** Vista intraoral de una cresta mandibular edéntula reabsorbida y atrófica. [6]

Con el incremento en la problemática en personas que por alguna de las afecciones antes mencionadas se vieron expuestos a la pérdida dental, se ven en la necesidad de buscar una alternativa para solucionar su problema. Se ha visto en las investigaciones recientes que los tratamientos óptimos para ese tipo de casos son los implantes tanto dentales como ortopédicos, es ahí donde sobresale la importancia de contar con un material que cuente con un óptimo rendimiento de biocompatibilidad para inducir la osteogénesis y mantener su efectividad durante un período deseado. Además de las afecciones a la cavidad bucodental, se han identificado factores locales y sistémicos que pueden contribuir al rápido fracaso de los implantes afectando la osteointegración, la cantidad y calidad del hueso, tejidos circundantes y la biomecánica, entre otros [7-10]. Dentro de los factores sistémicos se han estudiado numerosas enfermedades que afectan o alteran los mecanismos de cicatrización y sanado, así como la remodelación ósea, ya que estas enfermedades deben ser tratadas con medicación u otras terapias que podrían afectar los tejidos circundantes a los implantes y el proceso de osteogénesis [8, 11-13], dentro de las que destaca la Diabetes Mellitus (DM), [12, 13].

Hasta ahora, la DM es una de las enfermedades sistémicas más críticas que comprometen negativamente la adecuada integración ósea al implante y la posterior cicatrización necesaria para la restauración efectiva de los tejidos [14, 15]. La DM ha sido descrita como un grupo de trastornos metabólicos caracterizados por la hiperglucemia causada por defectos en la secreción de insulina, en la acción de la insulina o en ambas [12]. Además, la DM tipo 2 se define como un síndrome no insulino dependiente que incluye resistencia celular a la acción de la insulina o

secreción deficiente de la misma [16]. Asimismo, la DM está fuertemente asociada a la periodontitis, al aumento de la movilidad dental, al retraso en la cicatrización de las heridas, a un alto riesgo de infecciones (Periimplantitis) [17-19] y, lo que es más grave, a alteraciones del metabolismo óseo [20-23], ya que un control glucémico deficiente aumenta la liberación de metabolitos tóxicos. Son preocupantes las tendencias actuales que indican que la DM de tipo 2 representa ~ 85-90% de los pacientes diagnosticados que requerirán la aplicación de dispositivos implantables [14, 16, 24]. Sin embargo, la DM compromete la osteointegración de los implantes, lo que resulta en tasas de fracaso mucho más altas que varían del 10% al 20% en pacientes diabéticos con hiperglucemia que la del 1% - 3% en pacientes sanos [13, 16]. Se estima que el mayor número de personas con DM es el del tipo 2 entre los 40 y 60 años de edad [25, 26], por lo que destaca la necesidad actual de biomateriales metálicos innovadores que puedan hacer frente a estos retos de clase mundial.

El Ti y el Ti6Al4V se han utilizado con éxito en la odontología y en la ortopedia durante muchos años. Estos materiales se han convertido en la principal elección para la fabricación de implantes dentales, ya que son la mejor opción para la sustitución a largo plazo de tejidos duros debido a las favorables características fisicoquímicas, mecánicas y de su biocompatibilidad [27].

Varios estudios clínicos y preclínicos han llegado a la conclusión de que el microambiente simulado con suero diabético puede provocar una mala regeneración de los osteoblastos, una disminución de la síntesis de colágeno y una calcificación inadecuada de la matriz extracelular [22, 28, 29]. Es interesante que

las proteínas glicosiladas elevadas, la autoxidación de la glucosa debido a los mayores niveles de O_2^- [30], factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) [21, 31] y la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) caracterizan el entorno oxidativo del suero sanguíneo de los pacientes diabéticos [32]. Del mismo modo, la expresión de citoquinas proinflamatorias y el estrés oxidativo mitocondrial se han perfilado como factores constitutivos de daño celular en condiciones diabéticas que conducen al fracaso del implante, (Fig. 2) [33, 34].

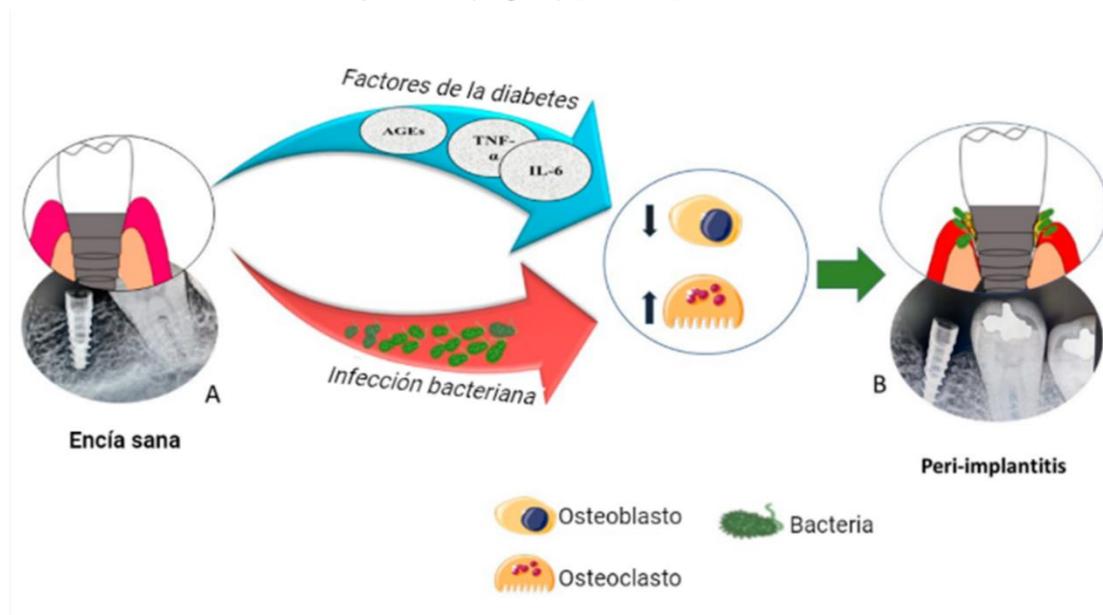


Figura 2 Efecto de la diabetes mellitus en el fracaso de los implantes dentales. **(A)** Ilustración y una imagen periapical intraoral (IOPA) representativa de un paciente diabético al que se le había colocado un implante. Se tomó inmediatamente después de la colocación quirúrgica de un implante dental. **(B)** Ilustración y una IOPA de seguimiento que muestra el fracaso del implante dental debido a una infección [35].

Mucho más importante es el impacto negativo de estos componentes bioquímicos y moleculares en el proceso de osteointegración. En consecuencia, perjudican la correcta viabilidad y funcionalidad de los osteoblastos para el rápido restablecimiento y consecutiva sanación del implante [21, 36]. De ahí que sea necesario desarrollar estrategias terapéuticas complementarias, como la introducción de materiales implantables con superficies activas mejoradas. Por lo tanto, esta información esencial plantea la hipótesis de que los NTs pueden estimular la funcionalidad de crecimiento de los osteoblastos en condiciones de diabetes, información que sugiere la importante necesidad de sintetizar y manejar este tipo de superficies.

En un estudio anterior, Jiang et al. sugirieron que las superficies de Ti comercialmente puro (Cp-Ti) arenadas/grabadas con ácido y anodizadas mejoraban la expresión osteogénica y la proliferación de MC3T3-E1 utilizando niveles altos de glucosa (25,5 mM) como condiciones de DM [37]. Sin embargo, estas interesantes investigaciones están limitadas por el uso de la glucosa como estímulo de la DM, a pesar de que el entorno de la DM implica sustancias más complejas y perjudiciales que componen el suero de la DM.

Teniendo en cuenta la información mencionada anteriormente y dada la urgencia de nuevos biomateriales metálicos que respalden la DM, el presente estudio evalúa las propiedades beneficiosas de Ti6Al4V configurado con NTs de ~70 nm en la funcionalidad de crecimiento de osteoblastos utilizando suero de DM humano para simular el entorno de DM. Nuestros actuales resultados brindan el conocimiento en el diseño de superficies regenerativas estimulantes para

aplicaciones de la ingeniería de tejidos en la DM clínica y subrayan parte del mecanismo de las superficies nanoestructuradas.

1.2 Objetivo general

Caracterizar Nanotubos de TiO_2 sintetizados por anodizado en Ti6Al4V para promover propiedades osteogénicas en condiciones diabéticas para aplicaciones en regeneración ósea.

1.3 Objetivos específicos

1. Preparar mecánicamente las muestras de Ti6Al4V para sintetizar y obtener nanotubos de TiO_2 por oxidación anódica.
2. Analizar la adhesión y proliferación de osteoblastos sobre las superficies con nanotubos TiO_2 .
3. Tomar muestras sanguíneas de pacientes diabéticos y cuantificar los niveles de metabolitos en las muestras sanguíneas asociados al diagnóstico de diabetes mellitus.
4. Obtener suero proveniente de pacientes diabéticos y analizar el comportamiento de osteoblastos sembrados con medio de cultivo suplementado con suero diabético.

5. Cultivar osteoblastos con suero en condiciones diabéticas sobre andamios de Ti6Al4V con nanotubos de TiO₂.
6. Caracterizar la morfología celular de osteoblastos utilizando técnicas microscópicas.
7. Evaluar analíticamente la expresión de marcadores óseos por inmunofluorescencia.
8. Determinar analíticamente la funcionalidad osteoblástica.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de los implantes de titanio

En las últimas décadas, la demanda mundial de implantes dentales y ortopédicos ha crecido de forma constante, alcanzando aproximadamente 45.500 millones de dólares de ventas [38]. Brånemark [39] descubrió que el titanio podía incorporarse permanentemente al hueso e introdujo el término "osteointegración", que describe la fijación estable del titanio a los tejidos óseos [40, 41]. Considerando dicho proceso aplicó el primer implante dental de titanio exitosamente en una mandíbula humana en la década de 1960. Desde entonces, se ha continuado el estudio detallado y el desarrollo de los implantes dentales y ortopédicos. El seguimiento a largo plazo de los diferentes tipos de implantes en pacientes ha sido adecuadamente reportado [42-44]. El diseño del implante dental y su topografía son algunos de los factores vitales que influyen en su proceso de osteointegración temprana. Desde la década de 1970, las formas de los implantes dentales se han transformado de conexiones hexagonales a cónicas y suelen diseñarse con superficies de titanio rugosas [42, 45].

2.2 Ti y sus aleaciones en aplicaciones biomédicas

Los implantes ortopédicos y dentales se han utilizado con éxito durante décadas para sustituir o reparar huesos, articulaciones y dientes dañados, devolviendo así la función al paciente tras una enfermedad o lesión [9]. Sin embargo, muchos biomateriales clínicos han mostrado una funcionalidad limitada bajo enfermedades locales y sistémicas [7]. Es importante destacar que se han descrito extensas afecciones clínicas que desafían el rendimiento satisfactorio de los implantes metálicos en términos de osteointegración efectiva, regeneración de la cantidad y calidad del hueso, y la biomecánica [8, 11].

El Cp-Ti y sus aleaciones (por ejemplo, Ti6Al4V) han sido ampliamente seleccionados como la principal opción de dispositivos metálicos implantables para aplicaciones biomédicas, ortopédicas y dentales [27, 46, 47] (Fig. 3).

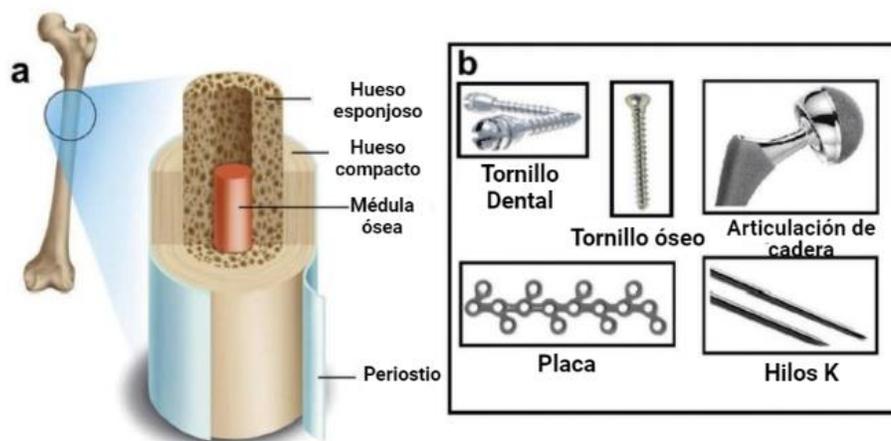


Figura 3 a) Ilustración de la estructura ósea, **b)** diferentes formas de implantes de Ti. [48].

Estos materiales se han convertido en la elección para la fabricación de implantes, ya que son la mejor opción para la sustitución a largo plazo de tejidos duros debido a las favorables características fisicoquímicas y de su biocompatibilidad con el medio bucal [49, 50]. Hablando en concreto se describe al Ti6Al4V como la principal aleación que se utiliza en aplicaciones biomédicas, por sus características fisicoquímicas y biológicas como es la baja densidad, baja elasticidad, alta biocompatibilidad, excelente resistencia a la corrosión, resistencia mecánica, estabilidad química, así como su exitosa integración al hueso circundante es decir, la osteogénesis [46, 49]. En este sentido, la aleación Ti6Al4V ofrece una buena resistencia a la corrosión y a la fatiga, un módulo elástico bajo (cercano a los del hueso) y propiedades mecánicas favorables que el Cp-Ti [51]. Además, el Ti6Al4V ofrece una biocompatibilidad, osteointegración, osteoconductividad, contacto hueso-implante y tasa de éxito a largo plazo aceptables, principalmente en pacientes sin ninguna enfermedad metabólica [52, 53]. Así mismo, la humectabilidad de las superficies de los implantes de titanio afecta al comportamiento celular en la fase inicial de osteointegración [44, 54, 55]. Teniendo en cuenta la interacción de los fluidos, las células y los tejidos del cuerpo humano con la superficie del implante, las superficies hidrofílicas (el ángulo de contacto con el agua oscila entre 40° y 70°) son más adecuadas que las superficies hidrofóbicas [44].

Considerando como un importante modelo de interés por su invaluable requerimiento clínico, surge la necesidad de realizar modificaciones en las superficies de aleaciones como es el caso del Ti6Al4V [49, 56].

2.3 Nanotopografías y osteogénesis

Se ha descrito ampliamente que los parámetros fisicoquímicos de los biomateriales metálicos, como la topografía, la humectabilidad, la química y la morfología de la superficie, representan un papel fundamental en el control de la funcionalidad celular. Las tendencias actuales apuntan a que los materiales nanoestructurados mejoran las propiedades fisicoquímicas, ofreciendo así una plataforma versátil para potenciar el crecimiento celular seguido de la restauración de los tejidos [52].

La nanociencia y la nanotecnología nos han dado la posibilidad de mejorar las propiedades biológicas del Ti mediante la fabricación de nanoestructuras en la superficie. Asimismo, las nanoestructuras han sido de gran tendencia, debido a su elevada relación volumen/superficie y el mayor grado de flexibilidad biológica en comparación con las microestructuras, se ha demostrado que las células reaccionan favorablemente *in vitro* a los cambios en la morfología celular, la orientación, la organización del citoesqueleto, la proliferación, la expresión génica y la señalización [56].

Un método que puede crear nanoestructuras controlables en la superficie del Ti6Al4V es la oxidación anódica. La oxidación anódica es un método electroquímico fácilmente implementado para producir superficies nanoestructuradas uniformes y controlables, además es una técnica económica, simple, versátil y escalable a niveles industriales [57, 58]. Destacando esta interesante técnica de modificación

superficial, se detalla que el método de oxidación anódica se produce a través de un cátodo y ánodo. Que mediante la aplicación de potenciales específicos en el metal o aleación inmerso en soluciones de electrolito conteniendo iones a concentraciones controladas se formará la capa de óxido sobre la superficie del implante (Fig. 4) [59, 60].

El anodizado posibilita la creación de una capa gruesa, espesa y altamente ordenada de óxido de titanio (TiO_2), formada en la superficie de los materiales, y que en función a la composición de los electrolitos y los parámetros electroquímicos que se manejen puede dar origen a los nanotubos de TiO_2 (NTs) [58]. Las superficies nanoestructuradas, como los NTs de 70-100 nm de diámetro, se describen como una estrategia de primera línea para promover una funcionalidad osteoblástica favorable, una proliferación rápida, una expresión osteogénica y una maduración ósea que no brindan las contrapartes no modificadas [52, 61, 62].

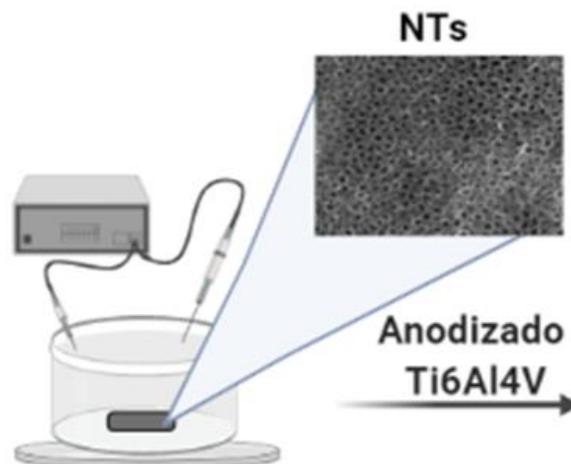


Figura 4 Ilustración del proceso de síntesis de NTs en Ti6Al4V.

2.4 Antecedentes de la Diabetes Mellitus

La palabra <<Diabetes>> proviene del griego diabétes que a su vez se deriva de día- ('a través de') y báino ('andar', 'pasar'...). En patología empezó a usarse en el siglo I d. de C. por Areteo de Capadocia, que emplea <<Diabetes>> en el sentido etimológico de 'tránsito o paso' para referirse a la excesiva eliminación de orina, que a su vez, fue el primer síntoma conocido de la enfermedad. El termino Diabetes Mellitus fue acuñado por el medico inglés Thomas Willis en 1674, y aludía al color amarillento de la orina como miel disuelta en una gran proporción de agua y más o menos dulce al paladar [63, 64].

2.5 Epidemiología de la enfermedad

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico crónico que produce niveles elevados de glucosa en plasma debido a un defecto en la secreción de insulina, en la acción de la insulina o en ambos [12]. La insulina es una hormona indispensable que se produce en el páncreas. Permite que la glucosa del torrente circulatorio ingrese en las células del cuerpo, donde se convierte en energía. Además, es fundamental para el metabolismo de las proteínas y las grasas. La falta de insulina o la incapacidad de las células para responder a ella deriva en altos niveles de

glucosa en sangre (hiperglucemia), el cual es un indicador clínico de la diabetes (Fig. 5) [65, 66].

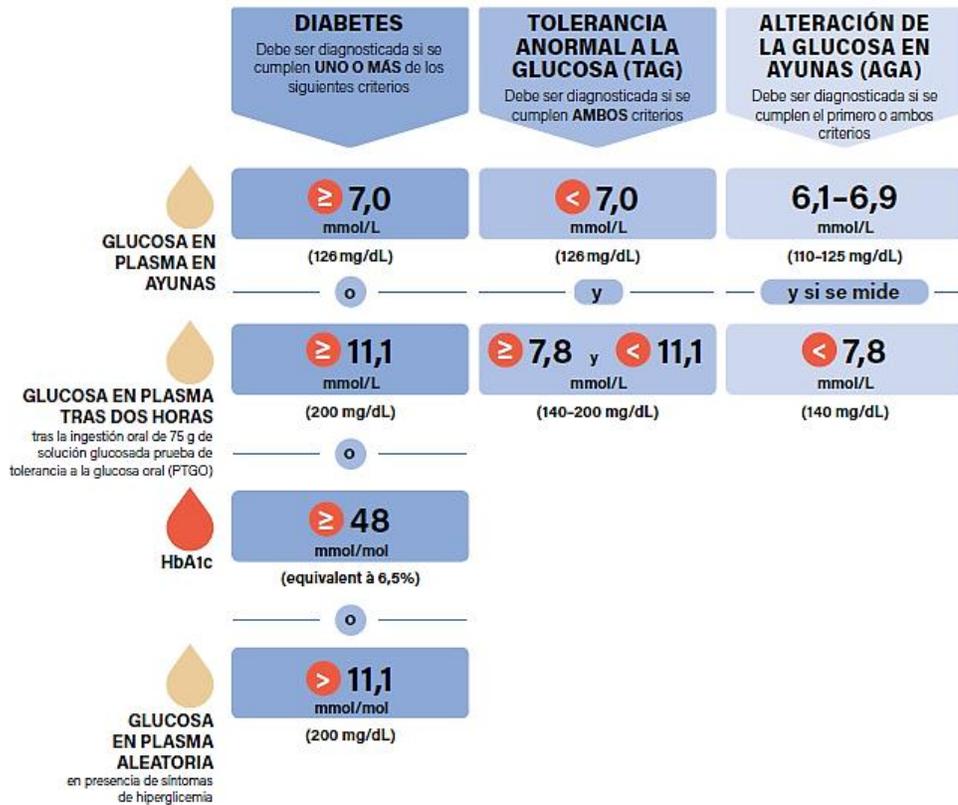


Figura 5 Criterios de diagnóstico modificados para diabetes [65].

La DM es una enfermedad pandémica con una tasa de crecimiento alarmante [67]. En las estadísticas publicadas recientemente (2019) sobre la carga planetaria de la DM por la Federación Internacional de Diabetes (FID), hay unos 463 millones de adultos que viven con diabetes, y se estima que esta cifra aumentará a 700

millones en 2045 [65]. Estas cifras crecientes se traducen en un aumento de la tasa de mortalidad, una disminución de la calidad de vida y una enorme carga económica para el individuo [66].

La mayoría de los casos se pueden categorizar ampliamente en dos grupos:

- ✓ *Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)* surge debido a la destrucción de las células de los islotes en el páncreas (a menudo por una condición autoinmune) que resulta en una deficiencia absoluta de secreción de insulina.
- ✓ *Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)* se caracteriza por la hiperinsulinemia como mecanismo compensatorio del aumento de la resistencia tisular a la insulina. La sobreactivación de las células de los islotes puede provocar una insuficiencia pancreática, como se observa en la etapa tardía de la DM2 [16].

2.6 Manifestación de la enfermedad

Se considera que la hiperglucemia es su principal manifestación debido a la insuficiencia completa en la producción o incapacidad funcional de la insulina [68]. Los niveles de glucemia mal gestionados y crónicamente aumentados potencian numerosas complicaciones vasculares que afectan a los vasos sanguíneos

pequeños y grandes, los cuales suelen denominarse complicaciones microvasculares y macrovasculares [69]. La DM está relacionada con factores de riesgo variables por la persona, tales como: Obesidad o sobrepeso, inactividad física, malos hábitos de higiene bucal y regímenes alimentarios hipercalóricos de bajo valor nutricional [26].

Los síntomas clásicos son polidipsia, poliuria y polifagia, los cuales a menudo están acompañados por fatiga crónica y pérdida de peso. Las complicaciones de la diabetes mellitus incluyen retinopatía, nefropatía, neuropatía y enfermedades cardiovasculares [16, 70]. La cavidad oral también puede verse comprometida bajo la influencia de la DM. Entre las diversas manifestaciones, la periodontitis se ha establecido como la sexta complicación más común de la DM [71] lo que finalmente conduce a la pérdida de dientes. Dentro de las alteraciones bucodentales más relevantes de la diabetes, se perciben signos como la xerostomía, candidiasis oral por hongos de tipo crónica o intensa, ardor de la lengua, caries extensas, abscesos múltiples y recurrentes, gingivitis, periodontitis de progresión rápida, aftas, glositis romboidal media, aumento de glándulas salivales, úlceras orales persistentes, liquen plano, alveolitis seca postextracción, cicatrización retardada o cirugía [72].

2.7 Tratamiento de la enfermedad desde el aspecto bucal

El papel del odontólogo es fundamental para detectar a pacientes con diabetes no diagnosticada o mal controlada. Una vez reconocida la enfermedad con base en el interrogatorio, la observación de signos, síntomas y en una prueba de detección de glucosa sanguínea, el odontólogo debe remitir al paciente a un médico [73]. Se considera crucial un buen control glucémico para iniciarse el tratamiento. Es de suma importancia educar al paciente sobre la severidad de la afección DM y adoptar e incorporar un estricto hábito para sensibilizar al paciente del autocuidado de la higiene bucodental, misma que repercutirá en su salud en general.

A continuación se enlistan recomendaciones de tratamiento:

- ✓ Fase higiénica: instrucciones del método correcto de higiene bucal, tratamiento periodontal eficaz para tener éxito y mantener la salud de los tejidos periimplantarios [74].
- ✓ Rehabilitación prostodóntica.
- ✓ Visitas de control periódico cada 3 a 6 meses [73].
- ✓ Para mejorar la eficacia del tratamiento y reducir las complicaciones posoperatorias, se recomienda una terapia de apoyo que consiste en antibióticos profilácticos y enjuague bucal con clorhexidina [17].

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Preparación de superficies de Ti6Al4V

Para la experimentación se utilizaron discos de la aleación Ti6Al4V (ASTM F-136, Supra Alloys Inc., Camarillo, CA, EE.UU.) de 12 mm de diámetro y 2 mm de grosor los cuales siguiendo un procedimiento metalográfico (ASTM E3-11), se desbastaron mecánicamente comenzando por la superficie de un disco de Ti6Al4V en una sola dirección bajo un flujo de agua constante e iniciando con una hoja de papel esmeril SiC (grano 100-2000) (Figura 6 a).

Posteriormente, se procedió a pulir con alúmina de 0.05- μm hasta obtener un acabado a espejo, (Figura 6 b). Una vez que el proceso de pulido mecánico fue completado, de acuerdo al estándar ASTM G1-81, los especímenes fueron lavados en un baño ultrasónico (Modelo Branson Mo, EE.UU) con acetona, etanol y posteriormente con agua destilada durante 20 minutos a 200 W, con el objetivo de eliminar cualquier residuo de suciedad, partículas orgánicas o grasas que pudieran contaminar la superficie del espécimen.

Finalmente, se dejaron secar los discos en desecador a temperatura ambiente durante 12 h.

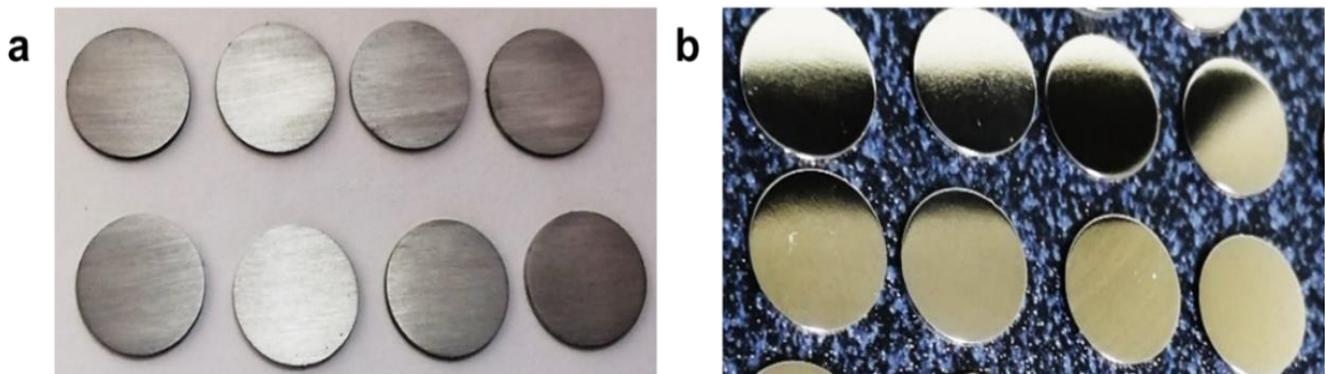


Figura 6 a) Desbaste mecánico de Ti6Al4V siguiendo las indicaciones de la norma ASTM E3-11. **b)** Muestras en acabado a espejo.

3.2 Síntesis de nanotubos de TiO_2 en Ti6Al4V

Para la fabricación de NTs homogéneos y reproducibles de 80 nm de diámetro, utilizamos un protocolo previamente establecido [60, 61]. A continuación, una vez que los especímenes de Ti6Al4V están preparados y pulidos, el espécimen es colocado en el interior de una celda electroquímica especial de 125 mL (Figura 7 a) sobre la placa de aluminio que actúa como soporte la cual se conecta a la terminal positiva de la fuente de alimentación DC (ánodo) y la terminal negativa a la malla de platino como contraelectrodo. A continuación, se anodizaron utilizando una solución electrolítica preparada con Microdacyn 60 (Oculus Technologies, Guadalajara, JAL, MEX), complementada con 10 mg/L de NH_4F (Sigma-Aldrich, USA) y 100 mg/L de NaCl (Sigma-Aldrich, USA) a pH 6.8. Se aplicó un potencial de 20 V por 5 minutos a temperatura ambiente (TA), (Figura 7 b). Finalmente las

muestras anodizadas se limpiaron durante 20 min bajo sonicación con agua destilada para eliminar residuos de sales de flúor, se enjuagaron con alcohol isopropílico y se secaron en un desecador por 12 h. Es importante destacar que todas las muestras experimentales se esterilizaron mediante irradiación UV (fuente de luz UV de 285 nm) durante 30 min por cada lado dentro de una cabina de bioseguridad de clase II.

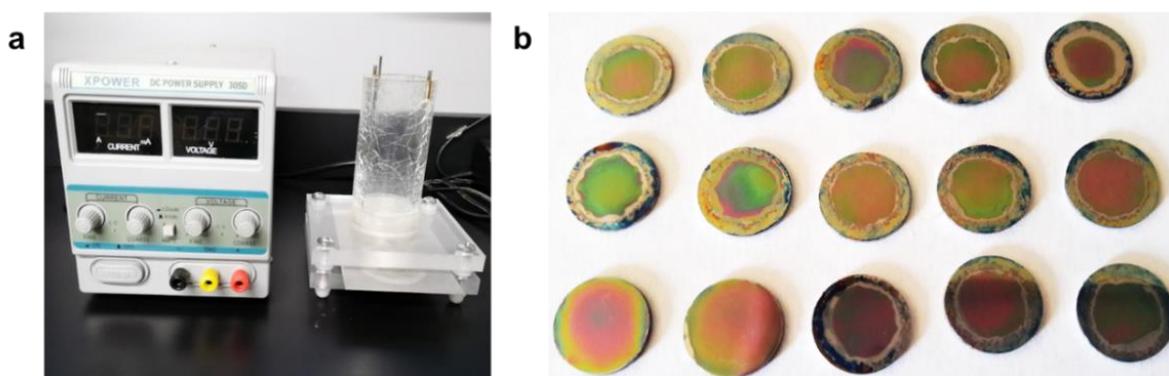


Figura 7 a) Celda electroquímica [60]. **b)** Vista superior de las muestras con nanotubos de TiO_2 , descritos aquí como NTs.

3.3 Caracterización de la superficie de las muestras experimentales

La superficie y la morfología transversal de las muestras experimentales se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM; Tescan LYRA 3, Brno, República Checa), tomando imágenes a un voltaje de aceleración de 20 kV, y el diámetro de los tubos se midió utilizando los análisis de vista superior [75]. La composición química de las superficies del material se evaluó mediante espectroscopia de rayos X por dispersión de energía (EDX) (Tescan LYRA 3, Brno, República Checa) utilizando un detector acoplado al FE-SEM.

3.4 Criterios de selección de pacientes donantes para el modelo de estudio



Figura 8 Diseño de estudio.

Se seleccionaron tres donantes voluntarios previo consentimiento informado oral y escrito, de los cuales se eligieron dos mujeres diagnosticadas con Diabetes Mellitus tipo 2 descritos aquí como (SD1, y SD2) y un hombre sano sin evidencia de DM descrito aquí como (SH). Se estableció la cantidad de 25 mL de muestra sanguínea por cada donador, correspondiente a 5 tubos de serología, sin anticoagulante con gel separador. Los donantes cumplieron con las siguientes condiciones: rango de edad de 40 a 60 años, análisis bioquímicos previos, ayuno de 12 horas (Tabla 1).

Tabla 1 Datos de los donadores voluntarios.

Paciente	Sexo	Edad	Padecimiento	Glucosa	Colesterol	Triglicéridos	Presión Arterial
SD1	F	40 años	Diabetes Mellitus tipo 2	143 mg/dl	209.10 mg/dl	184 mg/dl	130/80 mmHg
SD2	F	60 años	Diabetes Mellitus tipo 2	134 mg/dl	207 mg/dl	170.2 mg/dl	110/70 mmHg
SH	M	55 años	Sano	96.4 mg/dl	134.8 mg/dl	183.7 mg/dl	140/80 mmHg

3.5 Obtención de muestras sanguíneas de los donantes

Con anterioridad a la venopunción se realizó la preparación del material para la extracción sanguínea. Se preparó el siguiente material: Sistema de extracción

VACUETTE: consta de aguja multimuestro para extracción, así como porta tubos y tubos de extracción de serología, sin anticoagulante con gel separador, guantes estériles y desechables, algodón estéril, solución desinfectante o alcohol, apósitos, torniquete, contenedor de desecho y etiqueta identificativa del paciente con los datos de código y fecha de la extracción (Figura 9 a).

A continuación se le pidió al paciente se colocara en posición estable (sentado) 15 min antes de la extracción. Posteriormente se le colocó el torniquete de goma algunos centímetros por encima del lugar de la punción. Se le pidió al paciente que apriete el puño durante 1 min lo que provoco un éxtasis venoso. Se eligió una vena apropiada para la punción. Con el dedo índice de la mano izquierda, se palpo el brazo del donador hasta encontrar la mejor vena. Enseguida se desinfectó la zona de punción con alcohol al 70 % y no se volvió a tocar dicha zona. Se colocó la aguja de manera tal en que apuntaba en la misma dirección que la vena. La sangre comenzó a penetrar en el tubo. Tan pronto la aguja entro en la vena se aflojo el torniquete y se retiró la aguja. Posteriormente se colocó una torunda de algodón sobre el sitio de la punción y se le pidió al donador se comprimiera con los dedos de la otra mano o se flexionara el codo, (Figura 9 b).

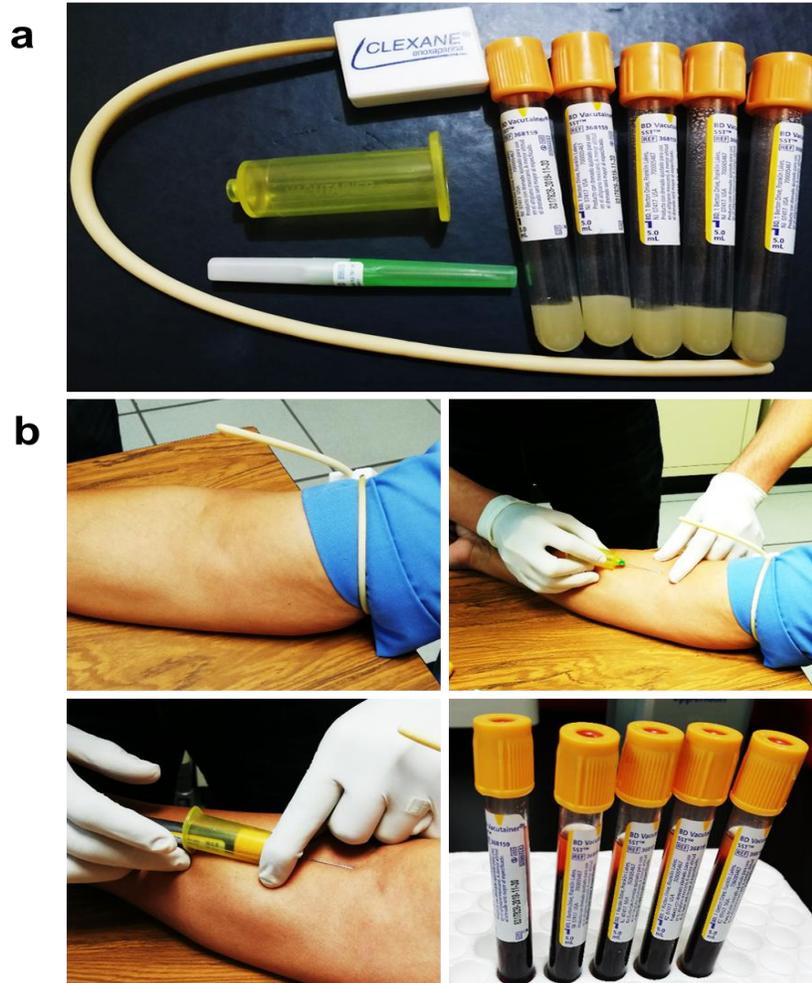


Figura 9 a) Material para la extracción sanguínea. **b)** Se muestra el procedimiento de venopunción y la muestra sanguínea obtenida.

3.6 Recolección del suero humano en condiciones diabéticas.

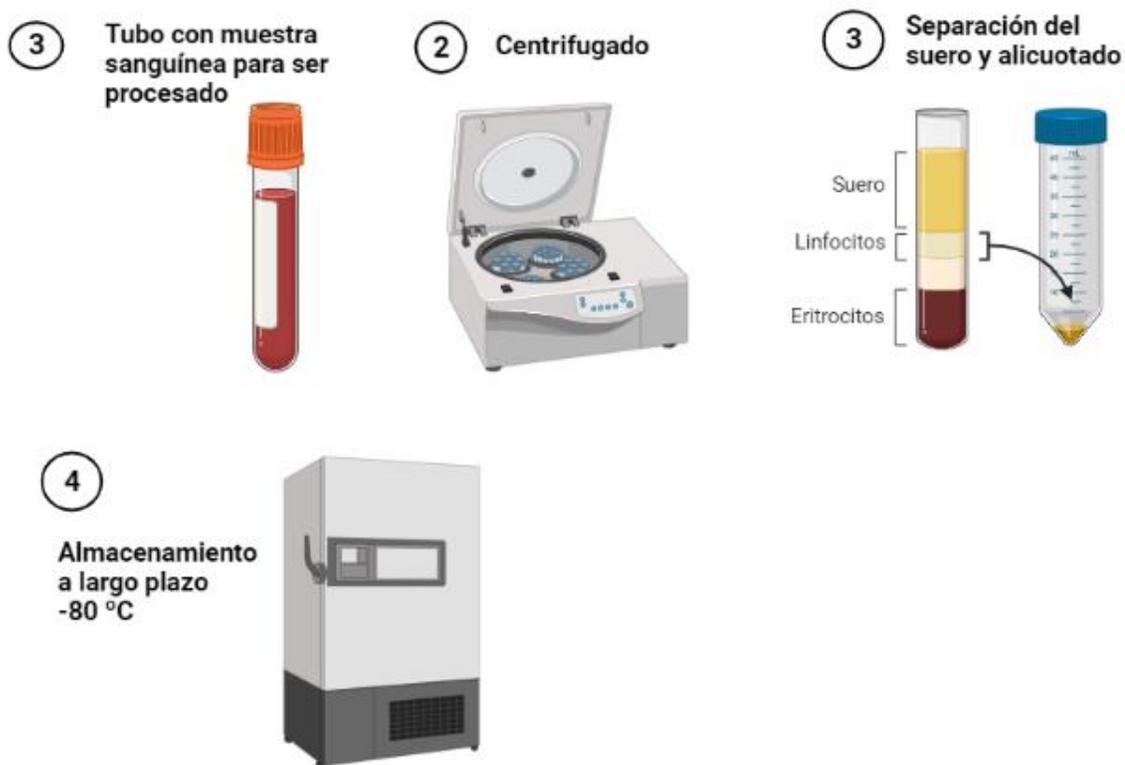


Figura 10 Diseño de estudio de la recolección de suero humano en condiciones diabéticas.

Prosiguiendo inmediatamente tras la extracción de la muestra sanguínea, dichas muestras fueron colocadas en un contenedor de transporte a una temperatura de 4 °C evitando la exposición directa a la luz solar esto con el fin de garantizar el transporte seguro. Enseguida estando en el laboratorio se procesó la muestra en un tiempo no superior a 45 min, permitiendo que la sangre se coagulara

a temperatura ambiente. Posteriormente los tubos conteniendo la muestra sanguínea fueron centrifugados a 3000 g durante 15 min a 4 °C, esta velocidad, tiempo y temperatura de centrifugación reduce la contaminación con plaquetas. Posterior a la centrifugación, se procesó la muestra en campana de bioseguridad de clase II estéril en la cual se aspiró cuidadosamente el sobrenadante (suero sanguíneo) contenido en la parte superior del tubo centrifugado, con ayuda de una pipeta serológica estéril. Dicho suero fue alicuotado y colocado en un tubo de punta cónica Eppendorf de 15 mL debidamente etiquetado e identificado (Figura 11). Seguidamente se almaceno en un congelador de -80 °C (almacenamiento a largo plazo).



Figura 11 Se muestra el procedimiento para la recolección de suero en condiciones diabéticas.

3.7 Evaluación biológica

3.7.1 Cultivos celulares

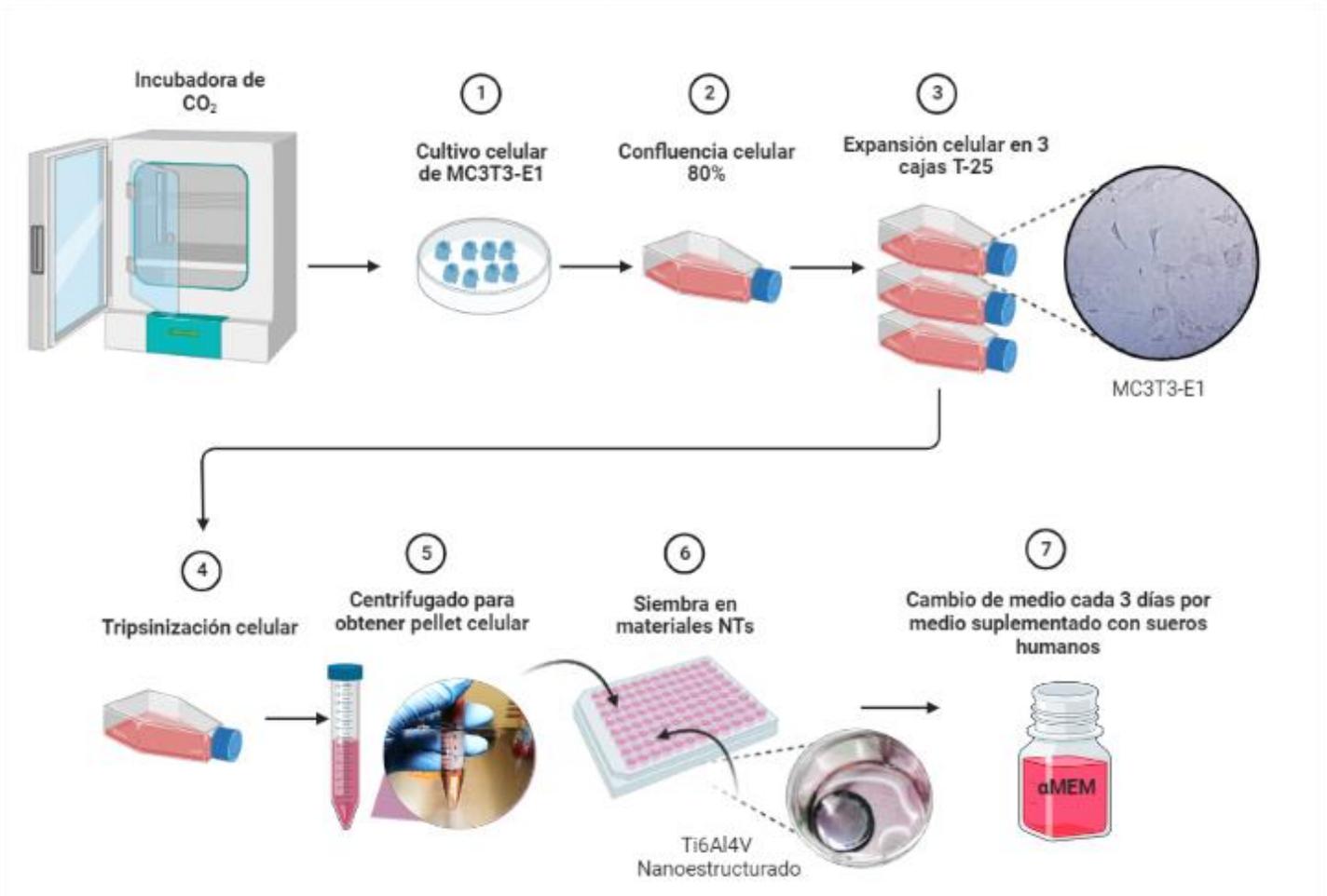


Figura 12 Se muestra el diseño de estudio de la evaluación biológica.

Para la realización de este estudio, se utilizó como modelo celular para la evaluación de los materiales la línea celular de preosteoblastos MC3T3-E1, osteoblastos de calvaria de ratón (C57BL/6, Sigma-Aldrich, USA), la cual se cultivó en medio α -minimum essential medium (α MEM; Gibco-Invitrogen), suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF; Gibco-Invitrogen) y 1 % de penicilina-estreptomicina (Gibco-Invitrogen). Las células se cultivaron a 37 °C en una atmosfera humidificada al 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 80%, el medio se cambió cada 2-3 días por medio de cultivo suplementado nuevo.

Una vez alcanzada la confluencia, se expandieron los osteoblastos MC3T3-E1, se despegaron las células y se sembraron 100,000 células/mL en tres cajas T-25 (Corning, Tewksbury MA, USA), conforme al siguiente procedimiento (Fig. 13):

- ✓ Se retiró el medio de cultivo de las células con ayuda de un pipeteador automático y pipeta serológica.

- ✓ Se realizaron 2 lavados agregando 3 mL de PBS 1X pH 7.3 durante 5 min cada uno, enseguida se retiró el PBS con ayuda de pipeta serológica.

- ✓ Se añadieron 2 mL de tripsina/EDTA 0.25 % (Gibco-Invitrogen, USA) y se incubó a 37°C durante 5 min para despegar las células adherentes del sustrato de cultivo.

- ✓ Con la ayuda de una pipeta serológica se agregaron 4 mL de medio α MEM (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA), y se retiró la solución para transferirse a un tubo de fondo cónico de 15 mL.

- ✓ Se centrifugo a 1200 rpm durante 10 min para formar un pellet celular al fondo del tubo cónico.

- ✓ Con ayuda de un pipeteador automático y una pipeta serológica se retiró el sobrenadante del tubo de fondo cónico, teniendo cuidado de no tocar el pellet celular. Este pellet celular se resuspendió con 4 mL de medio α MEM, suplementado con SBF al 10% y con 1 % de penicilina-estreptomicina.

El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días por medio de cultivo suplementado nuevo.

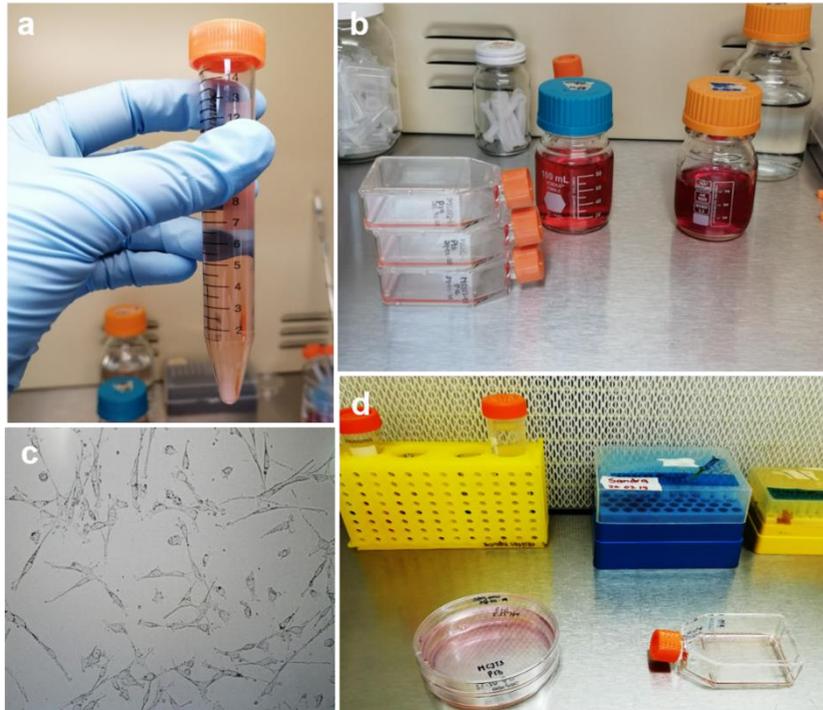


Figura 13 Línea celular MC3T3-E1, osteoblastos de calvaria de ratón. **a)** Pellet celular al fondo de tubo cónico, obtenido de un centrifugado a 1200 rpm por 10 min **b)** Siembra de células en cajas T-25 (Corning), con 4 mL de medio. **c)** Osteoblastos subconfluentes en pasaje 1. **d)** Cambio de medio cada tercer día por medio suplementado nuevo.

Para evaluar la proliferación celular, la citotoxicidad y la morfología, cada muestra experimental se colocó en un pozo individual de una caja de poliestireno de 12 pozos (Corning, NY, EE.UU.). A continuación, las células se tripsinizaron y se sembraron en las muestras utilizando 1 mL de medio con una concentración de 1×10^4 células/cm² durante 24 h. Después, se cambió el medio por otro medio suplementado con 5% de SH (como control humano), 5% de SD de cada paciente

con DM o 5% de SBF como control positivo de crecimiento osteoblástico. Finalmente, el medio se cambió cada 3 días o después de completar los ensayos requeridos.

3.7.2 Proliferación y viabilidad celular

La actividad metabólica de las células se evaluó con el ensayo de bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio (MTT). Al cumplirse cada uno de los tiempos de incubación 1, 3, 5 y 7 días, se les retiró el medio de cultivo a los pozos, se enjuagaron tres veces con PBS 1x y se transfirieron las muestras a analizarse a una caja nueva de 12 pocillos. Se añadió 1 mL de MTT (Sigma-Aldrich, EE.UU.) en α -MEM (5 mg/mL) en cada pocillo y se incubó a 37 °C en una incubadora humidificada al 5% de CO₂ durante 3 h. Al término de este tiempo se removió el medio que contenía MTT, a continuación la placa de 12 pocillos se transfirió a un agitador orbital a 200 rpm, 37 °C con 500 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich, EE.UU.) durante 20 min para disolver los cristales de formazan resultantes. Después, se depositaron 100 μ l de los cristales disueltos en una placa de poliestireno de 96 pocillos (Corning, EE.UU.), y se midió la densidad óptica (O.D) a 490 nm utilizando un lector de microplacas (Thermoskan, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). Este procedimiento se realizó tres veces por triplicado.

3.7.3 Caracterización de los osteoblastos por análisis de FE-SEM

Para evaluar los cambios morfológicos de las células MC3T3-E1 sembradas en los materiales experimentales, se llevó a cabo un análisis de FE-SEM según lo descrito por otros autores [76]. Después de 4 h, 24 h y 21 días de incubación, las células cultivadas en las muestras fueron enjuagadas tres veces con PBS 1x durante 5 min y se fijaron en glutaraldehído al 2,5% p/v (Sigma-Adrich, EE.UU.) combinado con cacodilato de sodio 0,1 M (Sigma-Adrich, EE.UU.) a 4 °C durante toda la noche. Enseguida se lavaron tres veces durante 5 min en tampón de cacodilato de sodio 0,1 M y se posfijaron con glutaraldehído al 2,5% durante 2 h a TA. Las células se deshidrataron con soluciones seriadas de etanol (25%, 50%, 70% y 100%) durante 15 min en cada concentración. Por último, las muestras se recubrieron con oro (capa de oro de 10 nm) durante 8 s y se observaron a una tensión de aceleración de 5 kV utilizando el FE-SEM.

3.7.4 Diferenciación de osteoblastos

En el ensayo de diferenciación de osteoblastos, las células MC3T3-E1 se sembraron en las muestras a una densidad de 1×10^4 células/cm² y se cultivaron

durante 5 días en el medio de cultivo completo. Posteriormente, en el día 5, el medio se cambió por un medio osteogénico (α -MEM con 5 mmol/L de β -glicerofosfato, 1 nmol/L de dexametasona y 100 μ g/mL de ácido ascórbico, Sigma-Adrich, EE.UU.) complementado en alícuotas separadas con SBF, SD1, SD2 y SH. Cada condición de cultivo se mantuvo cambiando el medio correspondiente dos veces por semana, hasta llegar a cada periodo de evaluación.

3.7.5 Evaluación de la mineralización

La mineralización de la matriz ósea se determinó mediante el ensayo de tinción con Rojo de Alizarina S (ARS, Sigma-Adrich, EE.UU.) para detectar las deposiciones de nódulos de calcio de los osteoblastos cultivados en las superficies. A continuación, posterior a la inducción osteogénica durante 7, 14 y 21 días, las muestras se lavaron tres veces con PBS 1x, se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 30 min a TA, se enjuagaron tres veces con PBS 1x y se tiñeron con una solución de ARS 40 mM (pH 4,2) durante 20 min a TA. Enseguida, las muestras se lavaron con agua destilada hasta que se eliminó por completo la tinción no adherida. Las muestras se secaron en un desecador durante 12 h y se tomaron imágenes con una cámara digital profesional (Nikon D750, NY, EE.UU.). Empleando un método sensible para la recuperación y cuantificación de ARS, la tinción se disolvió de la matriz celular incubando en ácido acético al 10% a TA por 30 min. A continuación,

se recogieron las células en un tubo de microcentrífuga y se calentaron exactamente a 85 °C durante 10 min. Los tubos se incubaron brevemente en hielo durante 5 min y se centrifugó la suspensión durante 15 min a 10.000 rpm. Después de la centrifugación, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, se le añadió hidróxido de amonio para neutralizar el ácido y se midió la D.O. a 405 nm en un lector de microplacas [77].

3.7.6 Evaluación de secreción de colágeno

La deposición de matriz de colágeno de las muestras en respuesta a las células MC3T3-E1 se evaluó y cuantificó mediante un ensayo colorimétrico basado en la tinción con Sirius Red [78]. Posteriormente a la inducción osteogénica durante 14 días, las muestras se lavaron tres veces con PBS 1x, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 45 min, se volvieron a lavar tres veces con PBS 1x y se tiñeron con una solución al 0,1% de Direct Red 80 (Sigma-Aldrich, EE.UU.) en ácido pícrico acuoso saturado durante 18 h a TA. Después, para eliminar totalmente la tinción no adherida, las muestras se enjuagaron con ácido acético (0.1 M) y se secaron en un desecador durante 12 h. Las muestras se fotografiaron utilizando una cámara digital profesional (Nikon D750, NY, EE.UU.). Enseguida, las muestras teñidas se eluyeron en 1 mL de la solución decolorante (NaOH 0,2 M/metanol 1:1),

durante 10 min, y se midió la absorbancia a 570 nm utilizando un lector de microplacas.

3.7.7 Evaluación de la expresión osteogénica por inmunofluorescencia

A continuación, posterior a la inducción osteogénica durante 7 días para Runx2, y 21 días para la osteocalcina (OC), osteopontina (OPN) y osteoprotegerina (OPG), las muestras experimentales se lavaron tres veces con PBS 1x tibio y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 45 minutos a TA. Una vez fijadas, las células se lavaron tres veces con PBS 1x y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 30 min. Enseguida, las muestras se lavaron tres veces, y se incubaron durante 2 h a TA en una solución de bloqueo de albúmina de suero bovino (BSA) (1% BSA/1 × PBS). Se volvieron a lavar tres veces con PBS 1x. Después, las células se incubaron durante 2 h en los anticuerpos primarios OC dilución 1:80 (Abcam, Cambridge, MA, EE.UU.), OPN dilución 1:1000 (Abcam, Cambridge, MA, EE.UU.), RUNX2 dilución 1:1000 (Abcam, Cambridge, MA, EE.UU.) y OPG dilución 1:200 (Abcam, Cambridge, MA, EE.UU.) en solución de bloqueo a 4 °C, durante toda la noche. A continuación, se utilizaron anticuerpos secundarios marcados con anticonejo Alexa Fluor 488, dilución 1:1000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), y

antiratón marcado con Alexa Fluor 594, dilución 1:1000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) con reactividad contra ratón, cada uno de ellos en solución de bloqueo, para OC, OPN, Runxs y OPG respectivamente. Se incubaron durante 2 h a TA y lavados tres veces con PBS por 5 min cada uno [61]. Los núcleos celulares se contratiñeron utilizando 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) en PBS, se incubaron durante 20 min a TA y se lavaron tres veces con PBS [61]. Por último, las superficies se invirtieron en cubreobjetos con medio de montaje de fluorescencia (Fluoroshield, Sigma-Aldrich, EE.UU.), se examinaron y se fotografiaron utilizando un filtro verde (OPN, Runxs y OPG), rojo (OC) y azul (DAPI) empleando un microscopio de fluorescencia con aumentos similares. Para medir la intensidad de la fluorescencia, se tomaron de 5 a 10 micrografías de cada muestra en el período de cultivo correspondiente utilizando el mismo tiempo de exposición. La intensidad media se midió con el software Image J (1.48v, NIH, USA) a partir de cinco células al azar en cada superficie.

3.8 Análisis estadístico

Se realizaron al menos tres experimentos independientes, cada uno por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni's para las comparaciones de grupos múltiples, utilizando el software GraphPad Prism 6 (Graph Pad, CA, EE.UU.). Una $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (DE).

CAPÍTULO 4

ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Análisis de la superficie

La Fig. 14 muestra la morfología estructural de la superficie de los materiales experimentales, caracterizada mediante FE-SEM. El proceso de anodización da lugar a la formación de una capa de TiO_2 más rugosa y altamente ordenada, con una anchura de pared de 83 ± 13 nm y un espesor de capa de $1,18 \pm 0,01$ μm (vista en sección transversal) formada en toda la superficie de las muestras de Ti6Al4V. Esto apoya la presencia de NTs homogéneos, bien alineados y uniformemente distribuidos sobre la muestra anodizada. Por otro lado, se estimó que los NTs tenían un diámetro de tubo de 70 ± 18 nm y un grosor de boca de 15 ± 5 nm (vista superior), el cual cumple con las condiciones establecidas por los objetivos de este estudio.

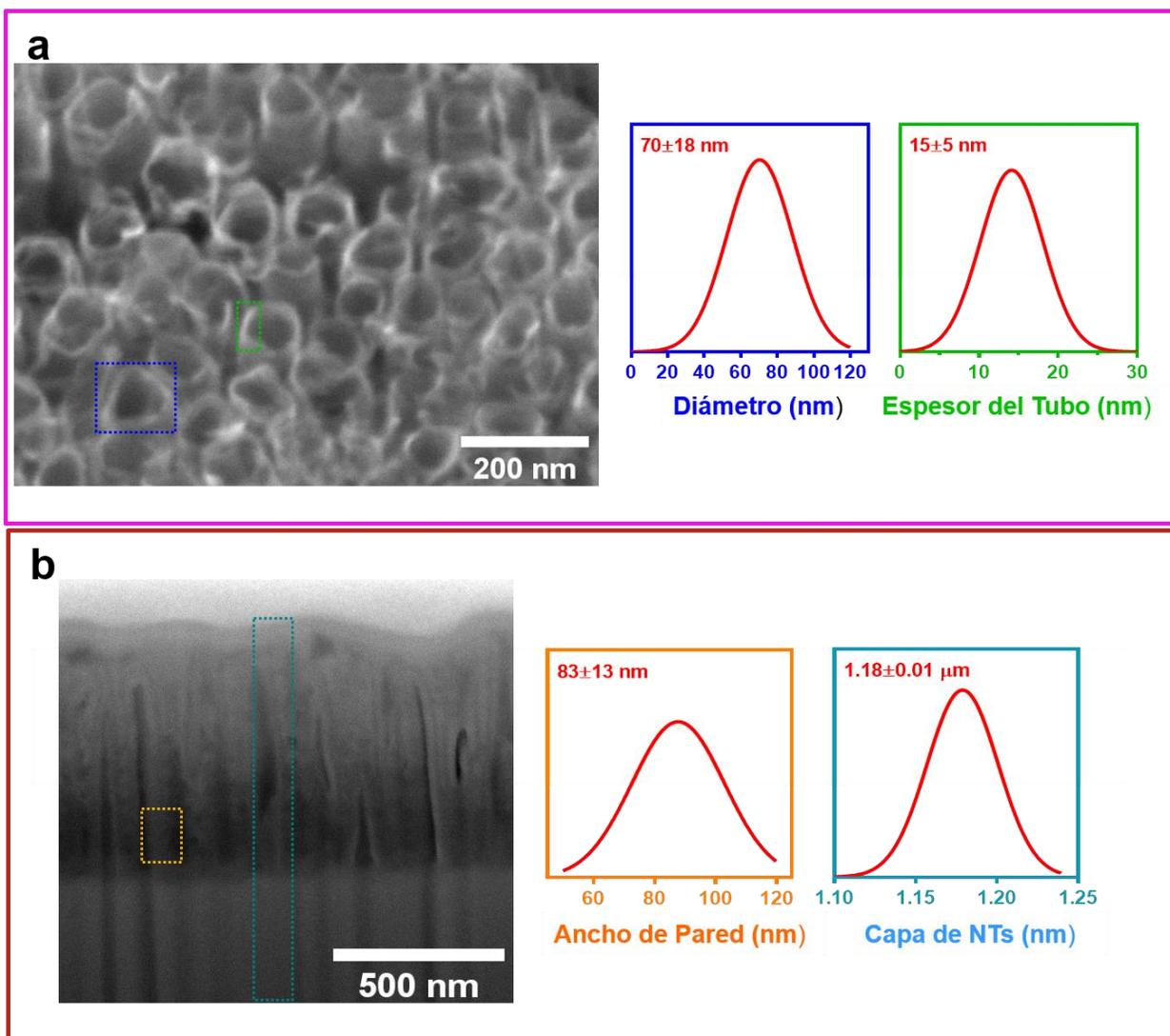


Figura 14 a) Micrografía de la vista superior de los NTs mostrando el diámetro y la distribución del grosor del tubo. **b)** Vista de la sección transversal de la capa de NTs ilustrando la anchura de la pared y la amplitud de la capa.

4.2 Efecto del suero humano en la viabilidad de los osteoblastos

El impacto de los distintos microambientes utilizando suero humano sobre la biocompatibilidad, viabilidad y la proliferación de las células MC3T3-E1 sobre las superficies con NTs se evaluaron con el ensayo de MTT (Fig. 15). El MTT indica las diferencias entre la tasa de proliferación celular en las superficies nanoestructuradas bajo las condiciones de SD, suero humano y SBF. Los resultados obtenidos al día 1 de incubación destacan que la viabilidad celular inicial mostro un comportamiento similar entre las condiciones experimentales. Sin embargo, al día 3 de incubación se observó una mayor proliferación en las condiciones experimentales y un destacado crecimiento celular en SBF con respecto del primer día, este comportamiento continuó similar tras 5 días de incubación. Además, a los 7 días se detectó que los materiales nanoestructurados son capaces de mantener una actividad tardía de los osteoblastos, enfatizando que las condiciones de DM fueron disminuidas por la presencia de células proliferantes.

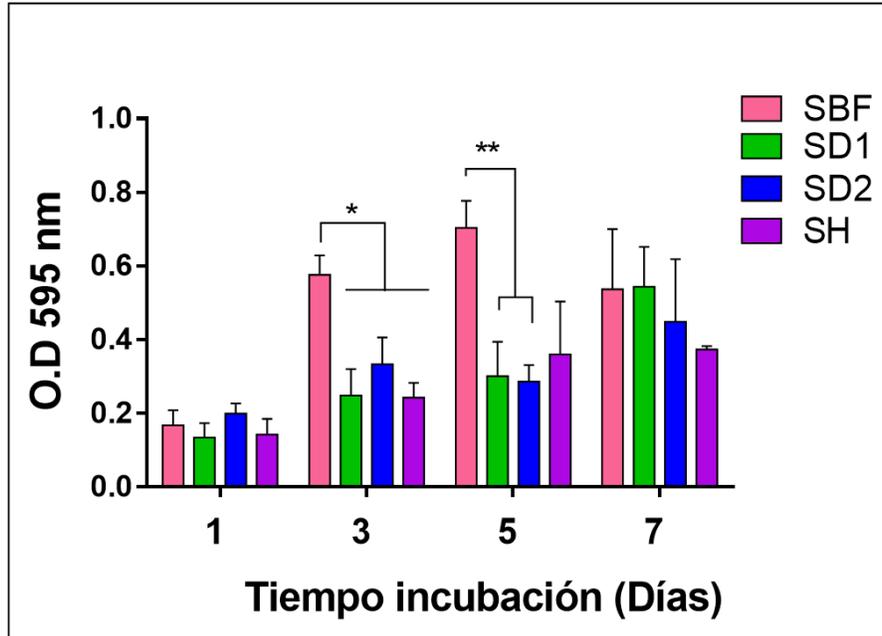


Figura 15 Ensayo de MTT que muestra la viabilidad de las células MC3T3-E1 bajo los microambientes experimentales después de 1, 3, 5 y 7 días de incubación. Los datos se presentan como media \pm DE ($n = 3$), $p < 0,05$. * y ** indican diferencias significativas entre las condiciones del suero

4.3 Adhesión y morfología de las células MC3T3E-1

Para estudiar la morfología celular conducida por las muestras y los entornos bioquímicos, realizamos análisis de FE-SEM. Inicialmente, la Fig. 16 muestra la morfología de las células MC3T3-E1 adherida a los NTs durante 4 h. Las

micrografías de bajo aumento mostraron que los controles estimularon una propagación celular promovida tal como se esperaba, donde las células se diseminaron mejor que en las condiciones SD1 y SD2. Por otra parte, las superficies con NTs promovieron una distribución celular evidente, mostrando una forma osteoblástica típica con una MEC densa; se detectaron prolongaciones citoplasmáticas y filopodios bien definidos entre las distintas condiciones bioquímicas. Por consiguiente, los NTs albergan y permiten la unión con otras células. Las imágenes ampliadas mostraron en todas las superficies de los materiales experimentales bajo las condiciones bioquímicas, estimularon un fenotipo bien definido con la formación de lamelopodios y filopodios. Asimismo, la abundante, prologada y pronunciada protuberancia fibrilar en forma de dedo que se extiende desde el cuerpo celular abrazando e interactuando con la nanotopografía acentuando una fuerte adhesión celular, incrementada por los NTs.

Después de 24 h de incubación (Fig.17), la diseminación celular fue más evidente, la cual se propago de forma más homogénea sobre todas las superficies con NTs bajo los microambientes experimentales, mostrando abundantes prolongaciones citoplasmáticas manteniendo y promoviendo la unión celular, una MEC más densa, los cuerpos celulares claros y la extensión de la monocapa ósea. Las imágenes ampliadas muestran unos filopodios notables anclados de manera eficiente adaptando, fomentando y convalidando la adhesión y proliferación de los osteoblastos.

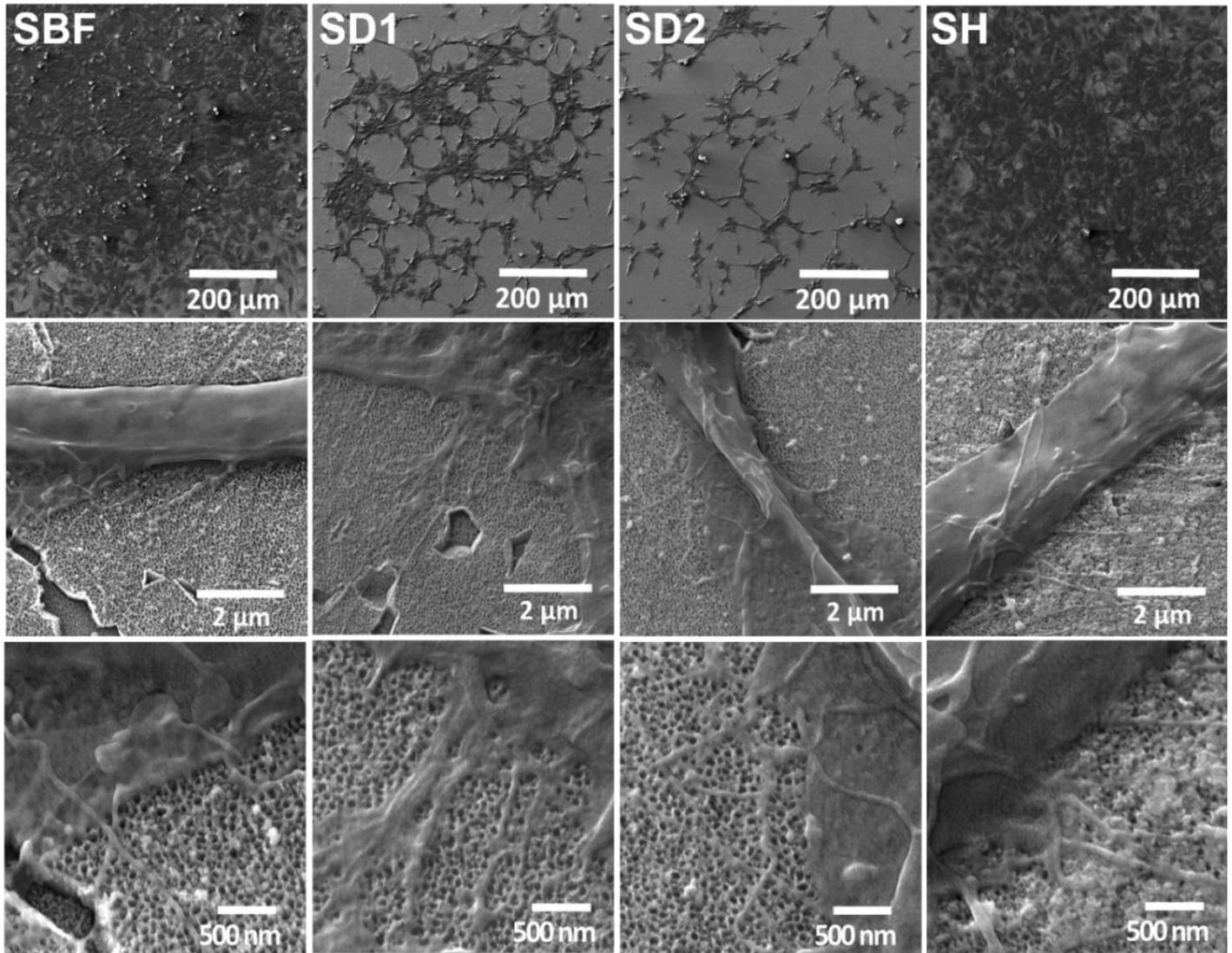


Figura 16 Micrografías FE-SEM que ilustran la adhesión de osteoblastos y la morfología celular en los NTs después de 4 h de cultivo.

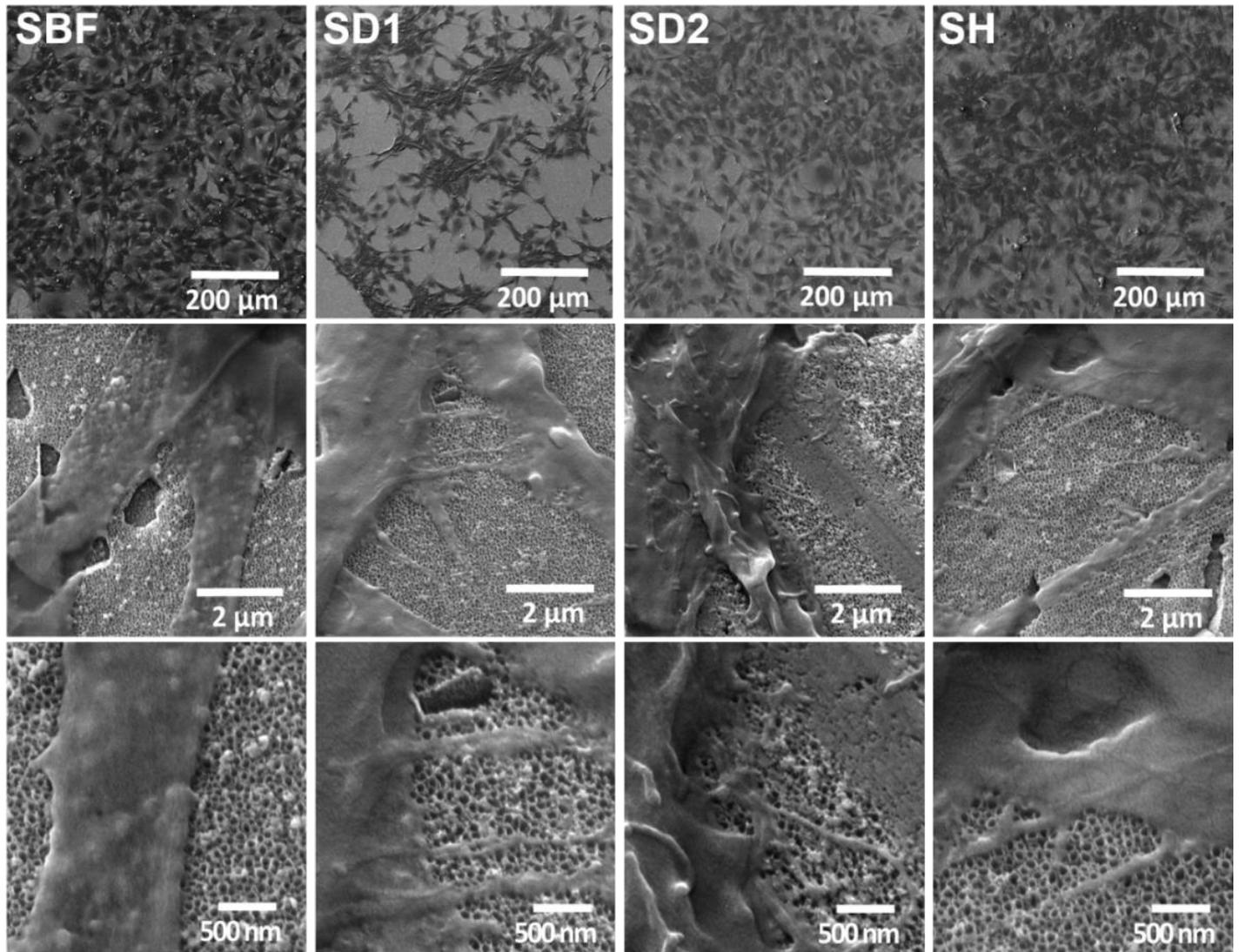


Figura 17 Micrografías FE-SEM que ilustran la adhesión de osteoblastos y la morfología celular en los NTs después de 24 h de cultivo.

4.4 Diferenciación de los osteoblastos

Los osteoblastos dan lugar a la formación de hueso a través de un proceso de proliferación celular, diferenciación y mineralización de la matriz extracelular. A partir de los osteoblastos en crecimiento se evaluó la maduración y deposición de calcio (Ca) de forma cuantitativa mediante el ensayo de tinción ARS y el ensayo de secreción de colágeno. En las Fig. 18 y 19 se ilustran los resultados del análisis ARS de las células MC3T3-E1 cultivadas en los NTs (SBF, SD1, SD2, SH) posterior a la inducción osteogénica durante 7, 14 y 21 días. En la Fig. 18, se observa la superficie de los materiales experimentales con una tonalidad de color rojo la cual aumenta en intensidad y uniformidad a partir de los 7 días, después a los 14 días y posteriormente a los 21 días de diferenciación. Además, se detectó la formación de nódulos calcificados sobre todas las superficies con NTs los cuales se observaron a los 7 días de incubación y fue continuamente estimulado por los NTs en las diferentes condiciones bioquímicas; destacando así un comportamiento similar de la mineralización. Los resultados obtenidos de la cuantificación de ARS muestran una tendencia notablemente semejante desde la fase inicial hasta la fase media de maduración entre los diferentes medios suplementados con los sueros experimentales (Fig. 19). No obstante, se apreció una cantidad significativamente elevada de ARS en la fase de diferenciación osteoblástica tardía (21 días), indicando una mayor y evidente formación de nódulos para los microambientes simulados.

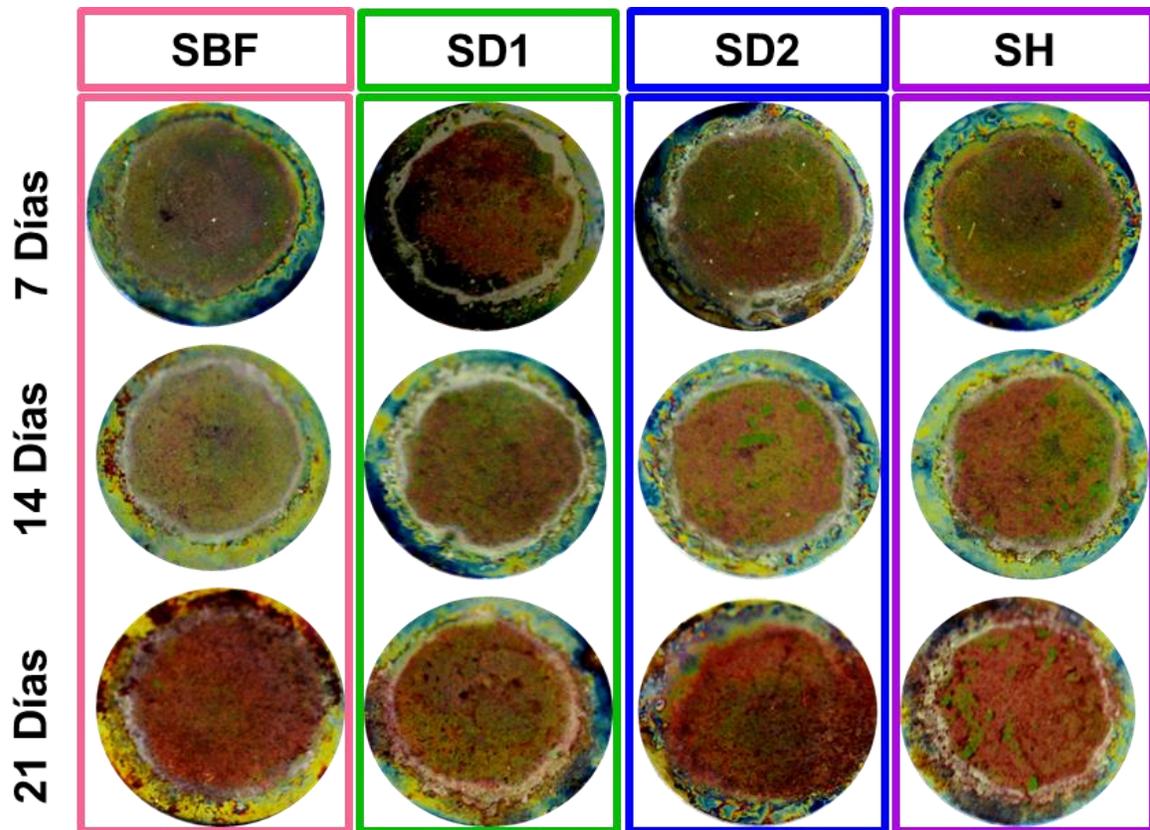


Figura 18 Ensayo de la mineralización de la matriz extracelular tras la inducción osteogénica durante 7, 14 y 21 días. Se muestran nódulos mineralizados en las células teñidos con rojo de Alizarina S.

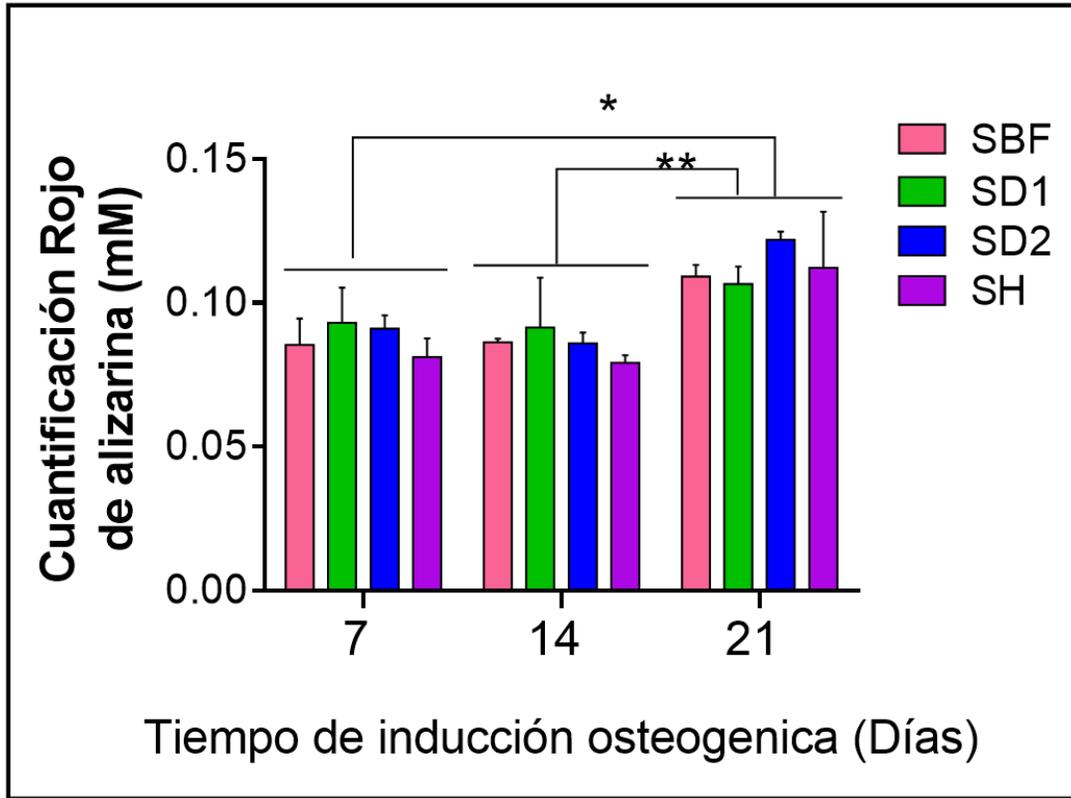


Figura 19 Ensayo de la mineralización de la matriz extracelular tras la inducción osteogénica durante 7, 14 y 21 días. Se muestra análisis y resultados cuantitativos de la tinción ARS. Los datos se presentan como media \pm DE ($n = 3$), $p < 0,05$. * Indica diferencias significativas entre los 7 y 21 días de cultivo en NTs. ** Representa cambios entre los 14 y 21 días de incubación.

La Fig. 20a, muestra la cantidad de secreción de colágeno de las células MC3T3-E1 inducidas por las superficies nanoestructuras durante 14 días de incubación. Específicamente, se observó una monocapa de células teñidas por Picrosirius Red. La síntesis de colágeno mostro un interesante comportamiento similar en los microambientes simulados con DM y los controles de suero. No obstante, se detectó una ligera disminución en la presencia de colágeno en las muestras bajo condiciones de SD (Fig. 20b), sin embargo, no se observan diferencias significativas. Por consiguiente, los resultados de la mineralización de la matriz extracelular son notablemente similares a los de la secreción del colágeno.

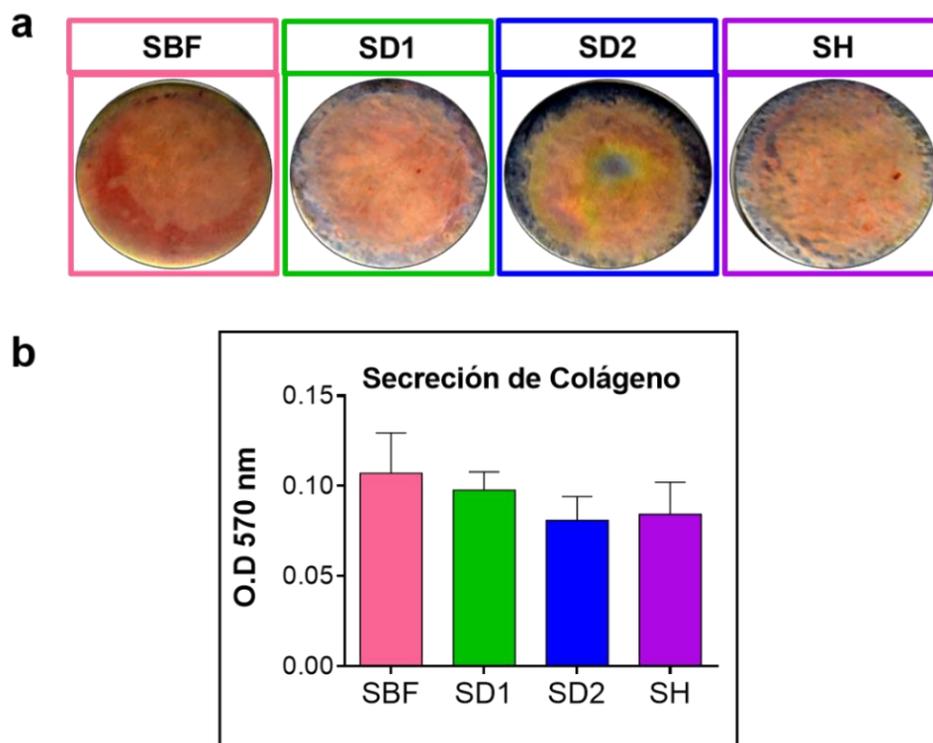


Figura 20 Ensayo de la secreción de colágeno de la matriz extracelular tras la inducción osteogénica durante 14 días. **a)** Monocapa teñida con Picrosirius red. **b)**

Resultados cuantitativos de la secreción de colágeno. Los datos se presentan como media \pm DE (n = 3), p < 0,05.

4.5 Caracterización FE-SEM de las MC3T3-E1 diferenciadas

Fig. 21a, muestra las micrografías FE-SEM de las células MC3T3-E1 cultivadas sobre las superficies con NTs después de la inducción osteogénica durante 21 días de incubación. Las imágenes de menor magnificación muestran la capacidad de las células de extenderse de forma más homogénea y en mayor cantidad en los NTs bajo los sueros experimentales (SBF, SH, SD1 y SD2). Además, se puede identificar que la superficie nanoestructurada promovió la secreción de cristales de hidroxapatita (HAp) bien definidos en la superficie celular. Una interesante formación de cristales se detectó principalmente sobre los cuerpos celulares y en el espacio circundante, apoyando aún más los resultados de la cuantificación del ARS (Fig. 19). Las imágenes de mayor magnificación revelaron la presencia de abundantes y grandes nódulos óseos guiados por las células MC3T3-E1 sobre los NTs que fueron inducidas aun en condiciones dañinas de DM (SD). Estos datos se relacionan con los resultados obtenidos en el ensayo de ARS, convalidando que las superficies con NTs fomentan e inducen la mineralización de la MEC, aumentan la acumulación de Ca e incrementan la formación de nódulos aun en condiciones diabéticas perjudiciales.

Por otra parte, se realizaron análisis EDX en SEM, para evaluar la composición química de la MEC de las células diferenciadas sembradas en las superficies NTs (Fig. 22), así como para estimar el nivel y porcentaje atómico de Ca y P en las condiciones experimentales. La Fig. 21b muestra el porcentaje de Ca secretado por los osteoblastos maduros. Los resultados sugieren que el control positivo SBF promovió la deposición de calcio que el estímulo bioquímico perjudicial DM. Además, la cantidad de P encontrada fue muy similar en todos los sueros experimentales, sin embargo en las condiciones de SD fue ligeramente menor, no obstante tales diferencias no fueron significativas (Fig. 21c). Es importante destacar que estos resultados ponen en evidencia que la formación de nódulos óseos fue inducida por los NTs en las distintas condiciones experimentales. El control positivo SBF mostro una ligera promoción de la deposición de minerales de la matriz ósea, como se esperaba.

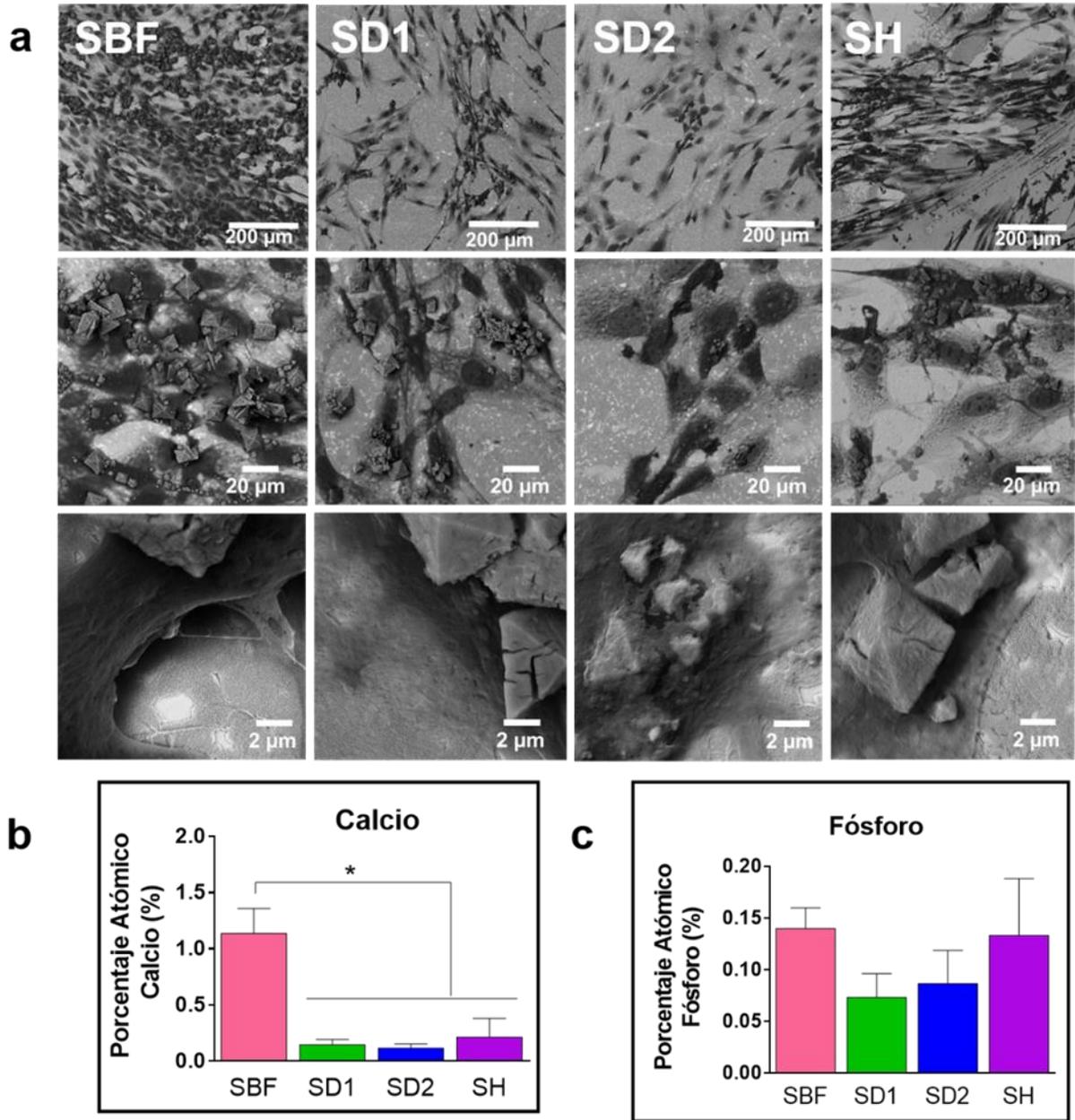


Figura 21 Formación de nódulos de hidroxiapatita después de la inducción osteogénica durante 21 días en las condiciones experimentales. **a)** Micrografía SEM mostrando abundantes y grandes nódulos óseos en las superficies de los NTs. **b)** Análisis EDX del nivel atómico del calcio. **c)** Nivel atómico del fósforo segregado en los NTs. Los datos se presentan como la media \pm DE ($n = 3$), * $p < 0,05$ indica diferencias significativas.

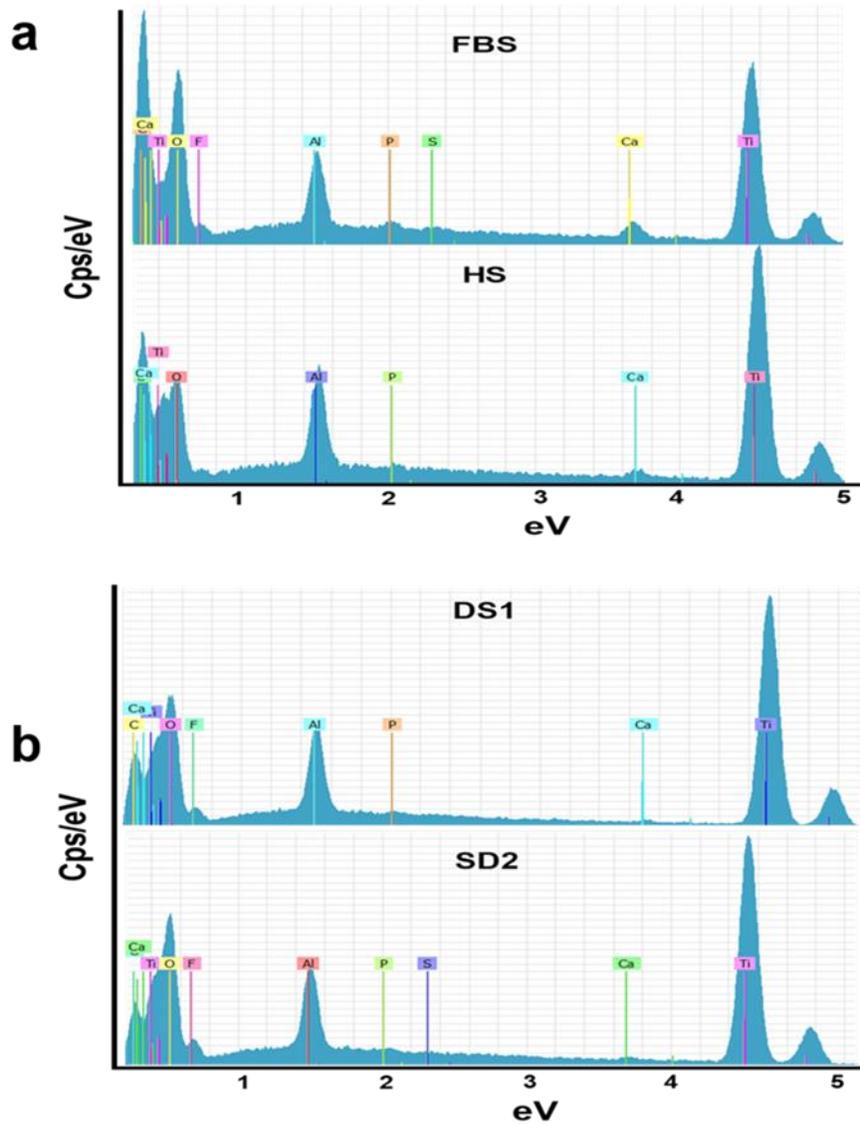


Figura 22 Caracterización analítica de los materiales. **a)** Cuantificación por EDX del contenido elemental de la superficie de FBS y SH. **b)** Cuantificación por EDX del contenido elemental de los microambientes SD1 y SD2.

Adicionalmente, las micrografías FE-SEM de la Fig. 23 apoyan la formación de cristales de HAp bien definidos que crecen desde los cuerpos celulares en las diferentes condiciones bioquímicas de cultivo. Así, los resultados prueban el concepto de una formación consistente del HAp bajo las condiciones de la DM. La HAp es un biocristal, formado por átomos de calcio, fósforo, e hidrógeno, de acuerdo con la fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, presenta una estructura hexagonal, con el grupo espacial P63/m [79].

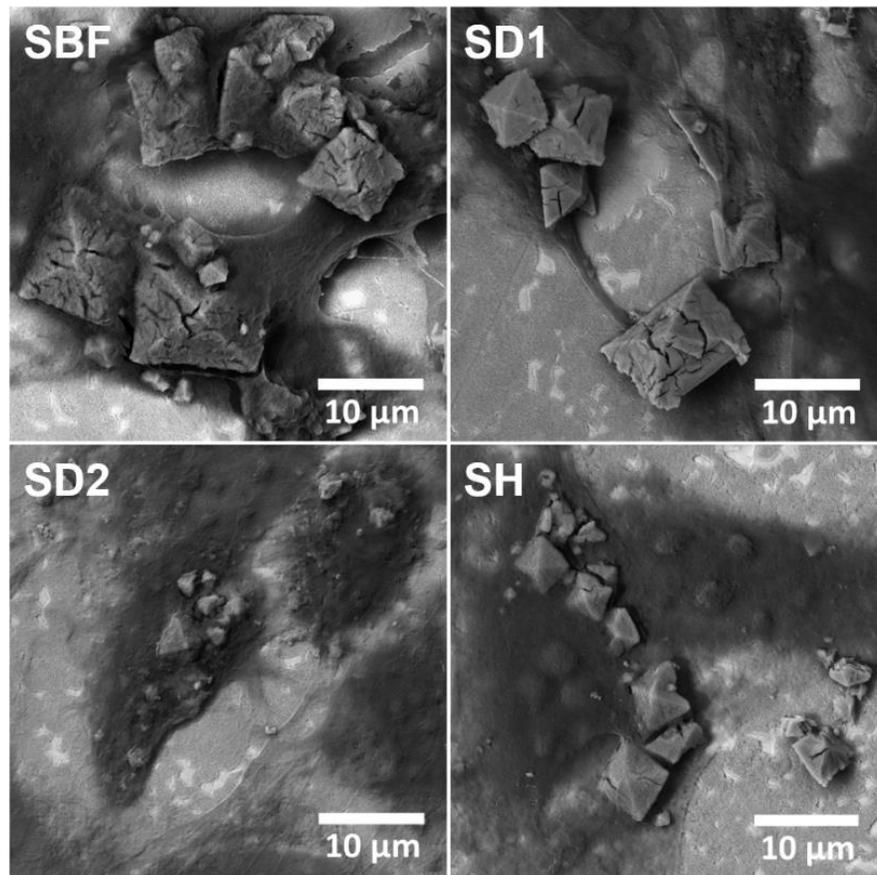


Figura 23 Caracterización por FE-SEM de los cristales de los osteoblastos mineralizados después de 21 días de inducción osteogénica bajo los sueros experimentales.

4.6 Tinción de inmunofluorescencia

Para determinar si las condiciones bioquímicas SBF, SD1, SD2 y SH estimulan la expresión osteogénica, se evaluaron los marcadores clave de diferenciación de osteoblastos, Runxs2, OC, OPN, OPG a los 7 y 21 días de inducción.

Se estudió la activación de Runxs2 en las superficies de NTs a los 7 días de inducción. Tal como lo representan las micrografías de fluorescencia de baja magnificación (Fig. 24), se puede detectar que la morfología celular llevada a cabo por los tratamientos con suero fue similar. Además, la Runx2 se detectó principalmente alrededor del núcleo para todos los entornos experimentales (Fig. 25 a). Para evaluar y comparar con precisión cualquier diferencia significativa entre los estímulos bioquímicos, se muestra un gráfico representativo de la expresión de Runxs (Fig. 25 b). Se detectó un ligero aumento en la expresión de SD1 en comparación con los sueros analizados, sin embargo las diferencias no resultaron significativas. Estos datos sugieren que la expresión del marcador Runx2 puede ser sustentada en la fase temprana de la diferenciación osteoblástica aún bajo las condiciones nocivas de SD.

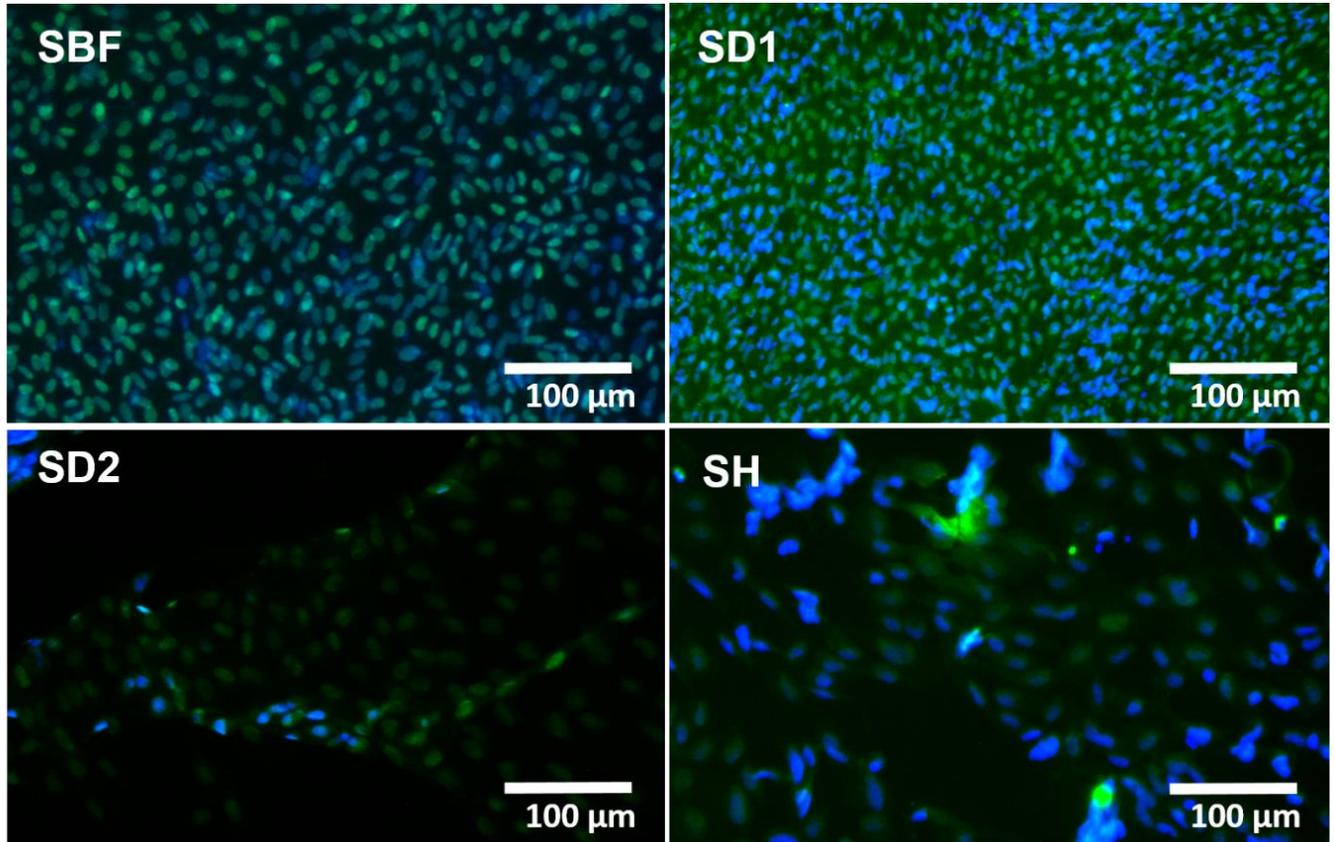


Figura 24 Inmunofluorescencia de la expresión de Runx2 en MC3T3-E1 cultivados durante 7 días en las condiciones experimentales.

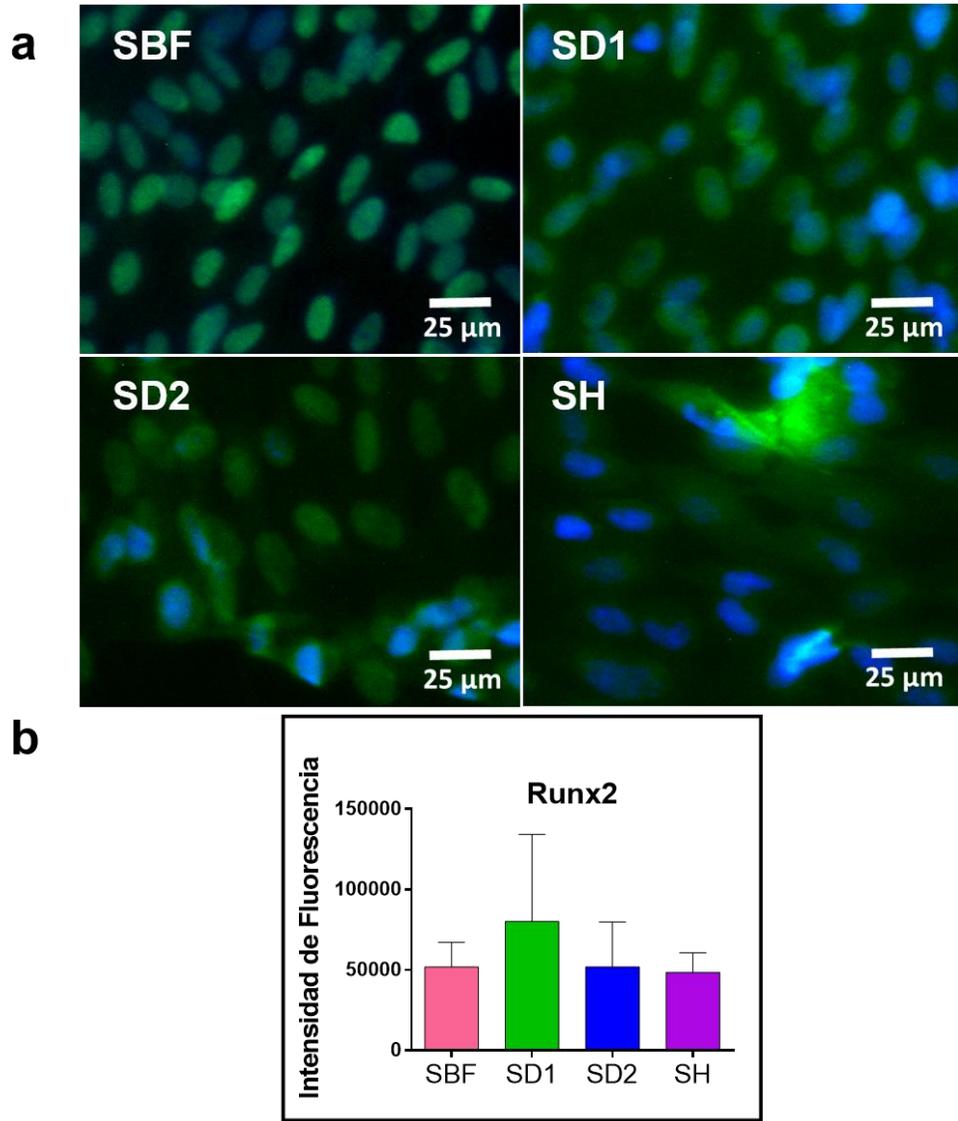


Figura 25 Inmunofluorescencia de la expresión de Runx2 en MC3T3-E1 cultivados durante 7 días en las condiciones experimentales. **a)** Localización intracelular de Runx2. **b)** Gráfico que representa la intensidad de fluorescencia expresada para Runx2. Los valores son la media \pm DE, (n = 5).

Asimismo, se analizó y evaluó en las superficies de NTs a los 21 días de inducción la presencia de una proteína clave involucrada en estos procesos, la OC (Fig. 26). En la Fig. 27 a, ilustra la expresión por medio de la tinción de OC, la cual sugiere que la OC se localiza intracelularmente, principalmente en el espacio citoplasmático. La Fig. 27 b muestra la cuantificación de la inmunofluorescencia, la cual indica que la diferenciación osteogénica tardía mantuvo un comportamiento de diferenciación similar en todas las condiciones experimentales (SBF, SD1, SD2 y SH), pero sin diferencias significativas entre ellas.

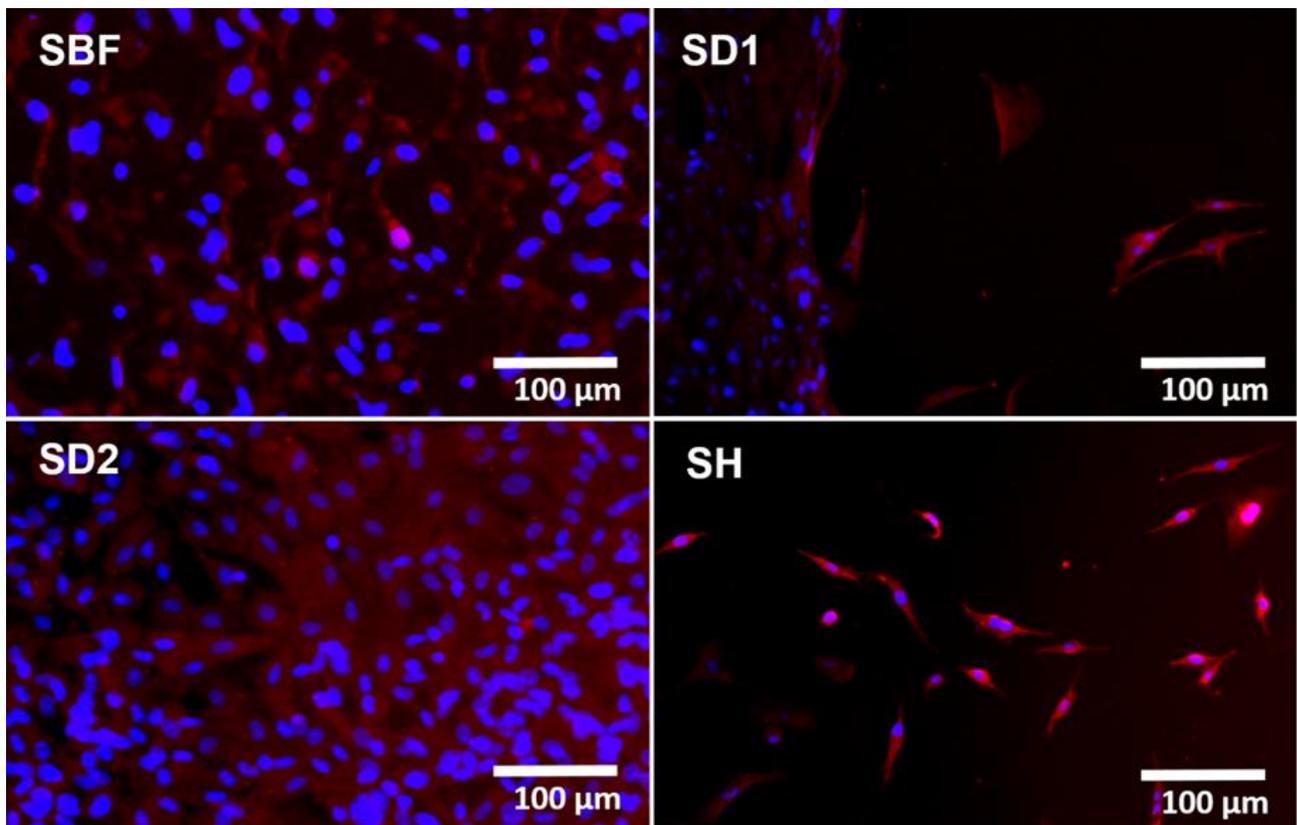


Figura 26 Inmunofluorescencia de la expresión de OC en MC3T3-E1 cultivadas durante 21 días bajo los sueros experimentales.

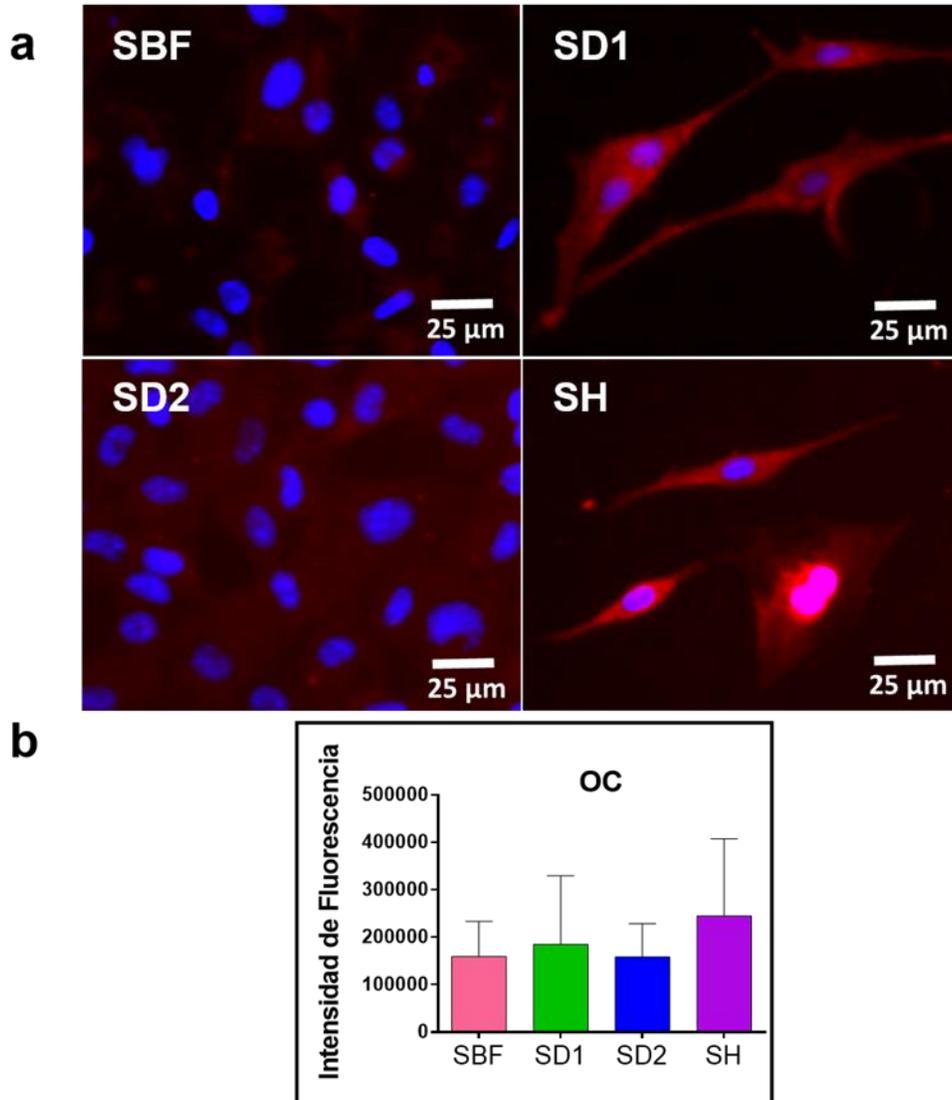


Figura 27 Inmunofluorescencia de la expresión de OC en MC3T3-E1 cultivadas durante 21 días bajo los sueros experimentales. **a)** Detección de OCN en las superficies de NTs. **b)** Gráfico que muestra la intensidad de fluorescencia expresada para OC. Los valores son la media \pm DE, (n = 5).

En la Fig. 28, se muestra la tinción de la expresión de OPN sobre las superficies NTs. La OPN funciona como un marcador tardío de diferenciación

osteogénica el cual se evaluó a los 21 días de inducción (Fig. 29 a). En la Fig.29b, se muestra una ilustración grafica de la cuantificación de intensidad de fluorescencia donde los resultados muestran que los NTs con SH pueden aumentar significativamente la expresión de OPN en comparación al control positivo SBF.

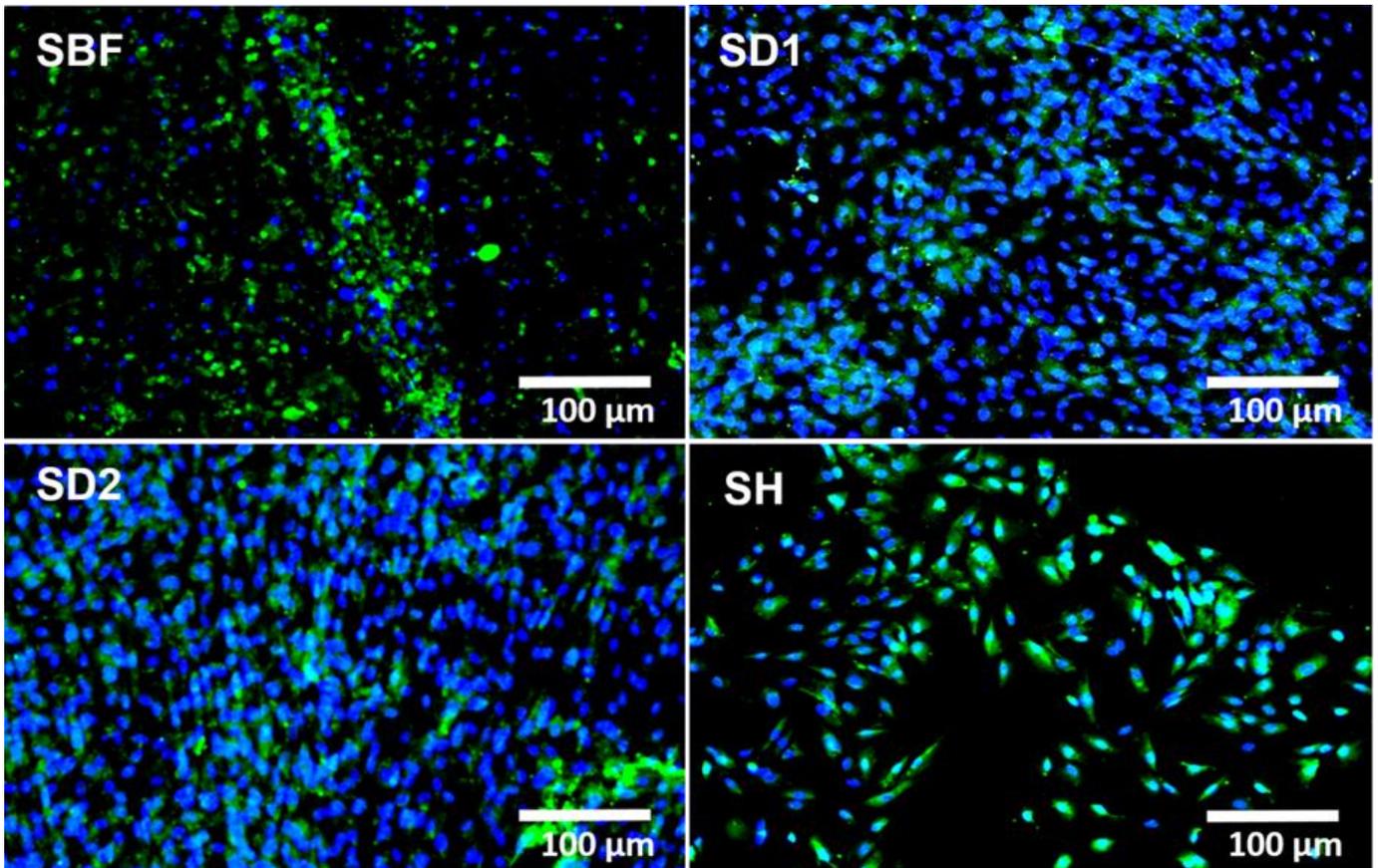


Figura 28 Inmunofluorescencia de la expresión de OPN en MC3T3-E1 cultivadas durante 21 días bajo los entornos de suero evaluados.

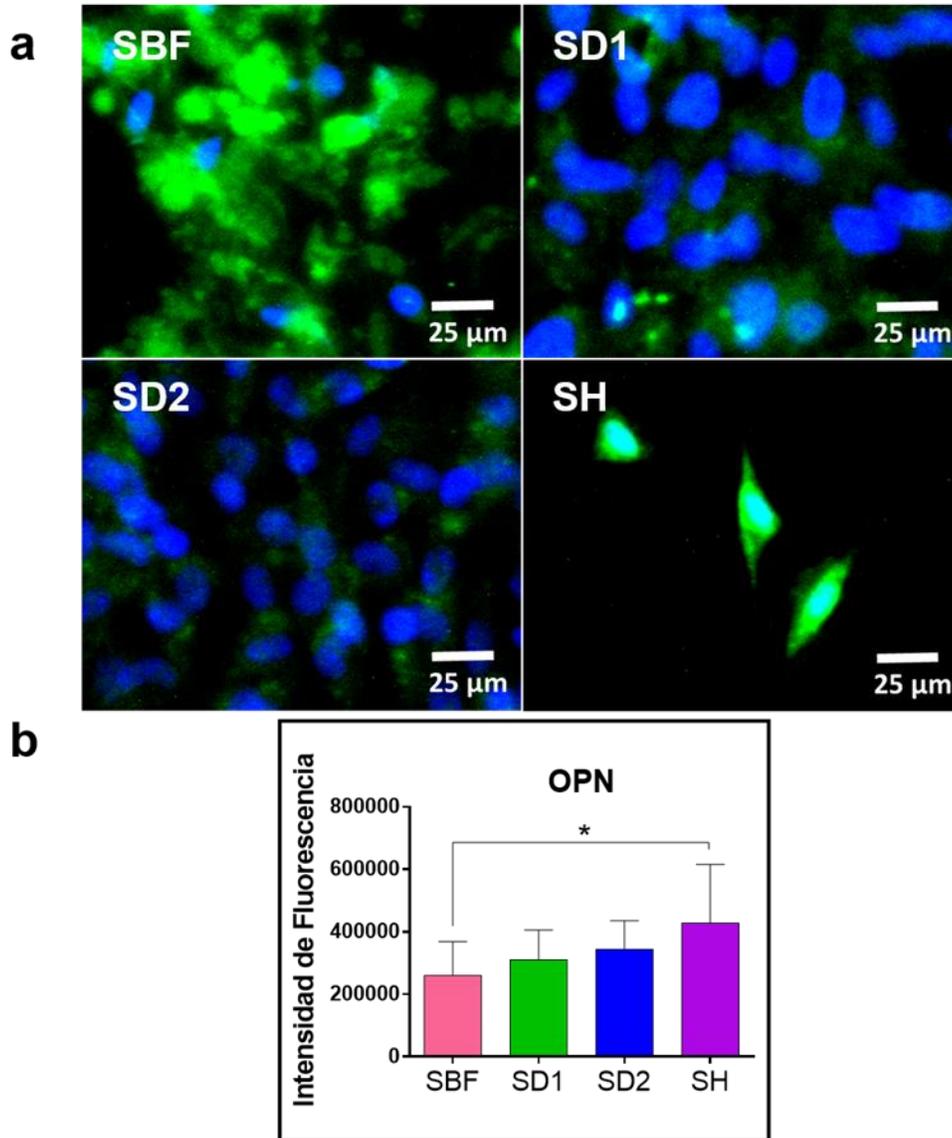


Figura 29 Inmunofluorescencia de la expresión de OPN en MC3T3-E1 cultivadas durante 21 días bajo los entornos de suero evaluados. **a)** Detección de OPN después de cada tratamiento bajo las condiciones experimentales. **b)** Gráfico que representa la fluorescencia de OPN. El * $p < 0,05$ indica diferencias significativas. Los valores son la media \pm DE, (n = 5).

Por otra parte se realizó la tinción de inmunofluorescencia de OPG (Fig. 30), un regulador negativo de la osteoclastogénesis, que se expresó intracelularmente evidenciando un comportamiento de localización similar para todas las condiciones experimentales. La Fig. 31 a ilustra resultados similares de los niveles de OPG entre el control SBF y los microambientes de suero experimentales. Sin embargo, los microambientes SD2 y el SH mostraron ligeras diferencias reducidas en la expresión en comparación con el SD1 (Fig. 31 b).

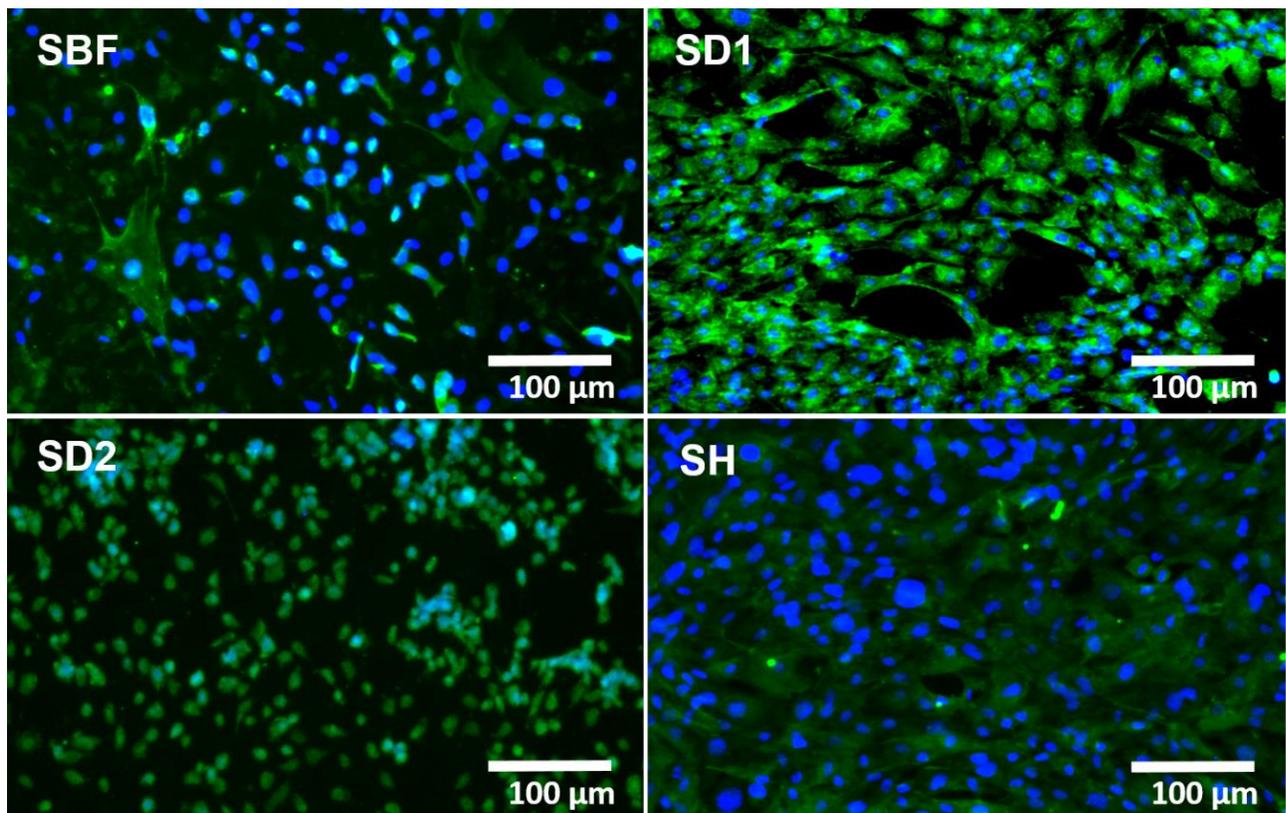


Figura 30 Inmunofluorescencia de la expresión de OPG en osteoblastos cultivados durante 21 días bajo los sueros diabéticos y de control.

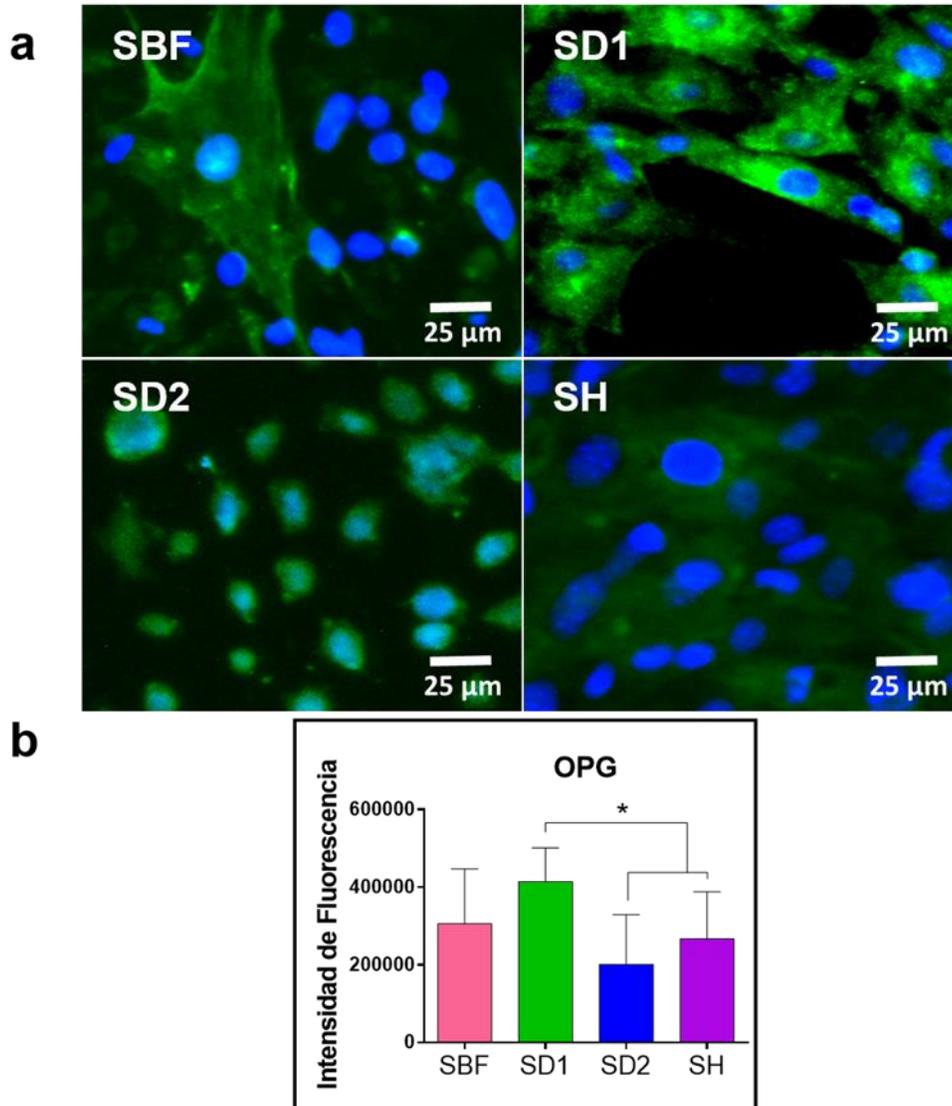


Figura 31 Inmunofluorescencia de la expresión de OPG en osteoblastos cultivados durante 21 días bajo los sueros diabéticos y de control. **a)** Detección intracelular de OPG. **b)** Gráfico que ilustra la intensidad de fluorescencia expresada para OPG. * $p < 0,05$ Denota diferencias significativas entre el tratamiento SD1 versus SD2 y SH. Los valores son la media \pm DE, (n = 5).

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

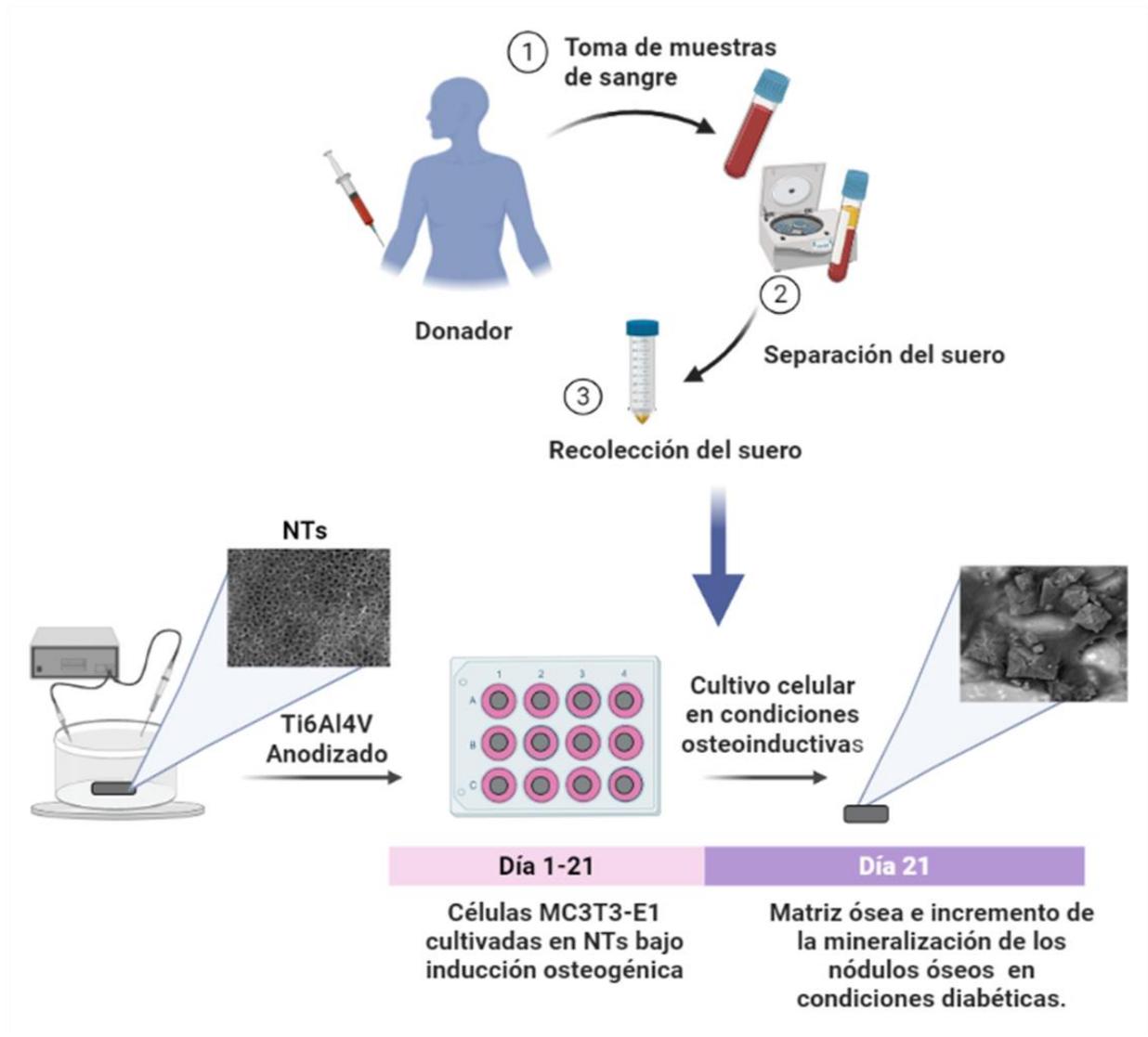


Figura 32 Ilustración del modelo de acción de las superficies NTs en condiciones diabéticas.

Para el éxito del implante ortopédico o dental, es necesario que el material cuente con propiedades fisicoquímicas y biológicas benéficas para el paciente al que le será implantado. Esas interesantes características son la baja elasticidad, baja densidad, excelente resistencia a la corrosión, resistencia mecánica, estabilidad química, la alta biocompatibilidad [49] y, lo que es más importante su exitosa integración en relación al contacto directo entre el hueso adyacente, por ejemplo la osteointegración y el implante [50]. El proceso de osteointegración demanda una adhesión eficiente de los osteoblastos, su proliferación, la secreción de proteínas de la MEC y la mineralización sobre la superficie de los materiales [27, 58]. Se ha descrito en términos de efectos nanotopográficos sobre el comportamiento de los osteoblastos (células óseas), que el Ti6Al4V anodizado con NTs manifiesta efectos mejorados sobre la tasa de crecimiento, la funcionabilidad y la capacidad de formación de hueso en comparación con las contrapartes no modificadas [51, 62, 80]. Además, nuestro grupo informó que los NTs mejoran la respuesta angiogénica respecto a las superficies planas no modificadas de Ti6Al4V, Cp-Ti y las superficies ásperas de Ti6Al4V grabadas con ácido en condiciones de cultivo estándar [61]. Sin embargo, el requerimiento de implantes metálicos por parte de poblaciones de edad avanzada y con compromiso metabólico sigue aumentando día a día [81, 82].

Se han identificado factores locales y sistémicos que pueden afectar o alterar los mecanismos de cicatrización y sanado, así como la remodelación ósea, ya que estas enfermedades deben ser tratadas con medicación u otras terapias que podrían afectar los tejidos circundantes a los implantes y el proceso de osteogénesis

[9, 10], dentro de las que destaca la Diabetes Mellitus (DM), [12, 13]. Chambrone et al. indicaron que los pacientes con DM son más propensos a desarrollar periimplantitis y pérdida ósea periimplantaria. Además, es probable que la gravedad de los resultados clínicos periimplantarios esté influida por la hiperglucemia [83]. Numerosas pruebas indican que la enfermedad crónica de la DM deteriora la funcionalidad celular de los osteoblastos (por ejemplo, la proliferación, la diferenciación, la mineralización, etc.) [14, 28]. La dependencia crítica del metabolismo óseo para la supervivencia de los implantes puede aumentar en pacientes con diabetes [12]. Por lo tanto, lo más preocupante es que la DM suprime la tasa de aposición mineral ósea, el contacto hueso-implante, la osteointegración y la formación ósea periimplantaria [22, 84]. Por otra parte, es imperativo desarrollar y estudiar nuevas superficies nanoestructuradas que cumplan con las expectativas de biocompatibilidad, que puedan apoyar y estimular la formación de hueso nuevo en condiciones difíciles, como el entorno de la DM. Por consiguiente, este estudio se centra en la caracterización de la capacidad de formación ósea de los osteoblastos mediante los NTs de Ti6Al4V de 70 nm en el entorno de crecimiento perjudicial estimulado por la DM.

El proceso de anodización es una técnica electroquímica que se ha evidenciado como un método exitoso para sintetizar NTs con el fin de mejorar la funcionalidad físico-química y de crecimiento de los osteoblastos de los implantes metálicos a base de Ti [51]. En las micrografías FE-SEM se muestra nuestra actual estrategia para modificación de superficies, la cual dio como resultado la formación de NTs homogéneos, alineados y distribuidos de manera uniforme sobre toda la

superficie de la muestra, destacando un espesor de recubrimiento de 1,18 μm (Fig. 14). Es importante destacar que los recubrimientos de óxido nanoestructurados de mayor grosor pueden mejorar la resistencia a la corrosión y la durabilidad de los materiales basados en el Ti [85-88]. Además, la fabricación de estructuras nanoconfiguradas controladas puede regular y mejorar las propiedades biológicas de las superficies de los implantes, la proliferación de los osteoblastos aumenta significativamente en comparación con sus homologas convencionales, ya que las nanoestructuras imitan las dimensiones de los componentes de los huesos naturales, proponiendo hasta ahora que la actividad celular de los osteoblastos puede realizarse incluso en condiciones metabólicas adversas [15, 88-90].

Por otra parte, se evaluó el comportamiento de los distintos microambientes utilizando suero humano sobre la actividad osteoblástica a través de la viabilidad y acción mitocondrial con el ensayo de MTT [60]. El presente estudio indica que el rendimiento de crecimiento de los osteoblastos tempranos (días 3 y 5) está alterado en condiciones de suero diabético. Sin embargo, después de siete días, la actividad proliferativa alcanza resultados similares para las condiciones estudiadas. Estos resultados sugieren que el SD potencia una actividad inicial perjudicial; no obstante, los NTs pueden desarrollar un microambiente beneficioso que mejore los efectos del SD, tras la adaptación ósea y la posterior regeneración celular tardía (Fig. 15). Curiosamente, Jiang et al. informaron de la actividad de proliferación de las células MC3T3-E1 sobre superficies de SLA y SLA anodizados cultivadas con suero normal y SD [37]. Los autores detectaron que, aunque las modificaciones de SLA aumentan drásticamente la rugosidad de la superficie, se alcanzó una tasa de proliferación de

osteoblastos similar a la observada en nuestro actual trabajo. Estas interesantes tendencias sugieren que los parámetros de nanoconfiguración pueden desempeñar un papel fundamental en comparación con una alta rugosidad, para promover la proliferación ósea en condiciones de DM. Además, en parte, podemos explicar que los NTs son redes de interconexión con una alta área de superficie, una alta hidrofilia, alineadas entre sí, orquestando un microambiente sostenible debido al fácil transporte de nutrientes, factores de crecimiento y señales bioquímicas para la proliferación y maduración ósea [58, 62, 91].

El proceso de adhesión ósea inicial exige la deposición, la guía y el anclaje de la MEC conducida por la superficie del implante. Por lo tanto, es importante destacar que esto es vital para llevar a cabo las interacciones de contacto hueso-superficie y la posterior regeneración ósea para lograr el éxito de los implantes [92, 93]. Con base a esta información, se realizaron análisis de FE-SEM para estudiar la morfología celular después de la fase de adhesión inicial (4 h) y la adhesión tardía continua (24 h) sobre los NTs en estudio (Figura 16 y 17). El presente trabajo revela datos interesantes, ya que los NTs promovieron un llamativo anclaje de filopodios en condiciones de SD, ya que los análisis ilustraron que las células se distribuyeron uniformemente mostrando una forma osteoblástica típica con una MEC densa, se detectaron la presencia de prolongaciones citoplasmáticas, redes gruesas que extienden la protuberancia celular tras las estructuras de la boca de los NTs permitiendo la unión con otras células hecho que es fundamental para coordinar el comportamiento celular [94]. Además, las proyecciones celulares alargadas generaron monocapas formadoras de hueso que recubren los NTs, con una

continua interacción célula-célula que se extiende entre la superficie. A las 24 h de incubación (Fig. 17), las células se diseminaron de forma más homogénea sobre todas las superficies con NTs, mostrando abundantes prolongaciones citoplasmáticas promoviendo la unión celular, una MEC más densa, filopodios protuberantes que se extienden desde el cuerpo celular abrazando e interactuando con la nanotopografía, anclados eficientemente validando la proliferación y una fuerte adhesión de la monocapa sobre todos los NTs. Estas modificaciones citológicas producen un osteoblasto diferenciado el cual secreta fibras de colágenos (tipo 1), sialoproteínas óseas, marcadores óseos como la osteocalcina, osteopontina entre otros reguladores del crecimiento óseo. Lo cual sugiere la presencia de los componentes de la matriz ósea [51, 95-97]. Un estudio anterior informó que los osteoblastos que crecían con SD mostraban una morfología celular alterada y un metabolismo estresado tras 24 h de incubación [98, 99]. Por otra parte, los autores demostraron que el aislamiento de Ti con un recubrimiento de compuesto de hidroxapatita (HA)/chitosán podía disminuir la configuración celular aberrante llevada a cabo por el SD [98]. Además, Li et al. sugirieron que los osteoblastos cultivados bajo SD en superficies porosas de Ti siguen una morfología celular perjudicial, plana, poco alargada y con protuberancias reducidas, acompañada de una disminución de la unión entre filopodios [100]. Sin embargo, la aplicación de un recubrimiento de quitosano alivió la morfología aberrante observada en el Ti microporoso tras ocho días de incubación. Esta información sugiere que nuestra superficie nanoestructurada, puede potenciar el comportamiento de adhesión de los osteoblastos sin necesidad de utilizar costosas técnicas de modificación. De particular importancia, el presente estudio señala

además que las condiciones de suero diabético pueden promover el daño de los osteoblastos y reducir la adhesión celular temprana.

La mineralización de la MEC es un proceso crítico exigido durante la regeneración ósea y la maduración del hueso en el implante. Sin embargo, varios estudios han llegado a la conclusión de que las condiciones diabéticas pueden perjudicar, o en el peor de los casos, evitar el éxito de la mineralización ósea [84, 101]. Dada la importancia de promover la funcionalidad de los osteoblastos, se comprobó la diferenciación y, lo que es más importante, la mineralización de la matriz ósea llevada a cabo por los NTs en condiciones de SD (Fig. 18). Nuestro estudio demuestra que la superficie de los NTs puede apoyar la funcionalidad de formación ósea de los osteoblastos con resultados similares a los del uso de SBF (Fig. 19), siguiendo una formación sustancial de elementos Ca/P y secreción de colágeno (Fig. 20). El colágeno es la principal proteína abundante encontrada en la fase orgánica de la matriz extracelular ósea, que se expresa en la etapa temprana de proliferación, forma la matriz extracelular la cual es crucial para el desarrollo del fenotipo osteoblástico [102-104]. Esta proteína actúa como sustrato para la precipitación de cristales de hidroxiapatita, se considera un componente esencial que proporciona estabilidad mecánica al hueso [44, 105]. Por otro lado, los NTs potencializan la mineralización de la MEC [106-108], aumentan la acumulación de Ca e incrementan la formación y disposición de nódulos aun en condiciones diabéticas (Fig. 21 y 22). En nuestros resultados se demuestra que el microambiente SD da lugar inicialmente a una proliferación celular perjudicial; sin embargo, los NTs pueden desarrollar un andamio versátil que alberga un entorno osteogénico

beneficioso. Varios trabajos han demostrado que los NTs de 70-100 nm pueden aumentar de forma prominente el rendimiento de la mineralización ósea [27, 51, 57]. Además, la aplicación de superficies a nanoescala puede mejorar la vía de señalización de la quinasa de adhesión focal (FAK), lo que da lugar a una mejor adhesión celular y a la subsiguiente mineralización de los osteoblastos e incluso al comportamiento angiogénico [109]. Ma et al. sugirieron que la reactivación de la fosforilación de FAK con la sucesiva expresión de las subunidades de integrina $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 3$ mediante un recubrimiento de nanoHA-Ti revirtió consecuentemente la supresión de la vía BMP-2/Smad bajo SD [110]. Los resultados reportados indicaron que se recuperó la expresión osteogénica, acompañada de una mejor adhesión y proliferación celular. Además, se informó que los osteoblastos cultivados en SD sobre Ti6Al4V recubierto de quitosano, promovían la activación del sistema de señalización PI3K/AKT [100]. Los autores utilizaron inhibidores específicos para proponer que el recubrimiento depositado ejercía una acción antioxidante, reduciendo inmediatamente la sobreproducción de ROS. Asimismo, un trabajo reciente sobre materiales porosos de Ti6Al4V recubiertos con fibroína de seda ilustró que la tasa de mineralización de los osteoblastos resiste el efecto adverso de la SD después de 14 días de incubación de la SD [110]. Curiosamente, los autores defendieron que la promoción de ROS asociada a la SD inhibía la activación de la vía NF- κ B, lo que conducía a una prolongada funcionalidad perjudicial de los osteoblastos y al aumento de la apoptosis celular. Sin embargo, estos trabajos han requerido la aplicación de diferentes materiales compuestos para disminuir los estragos celulares producidos por la SD.

Mientras tanto, nuestros NTs han demostrado resultados similares de funcionalidad protectora de los osteoblastos bajo el entorno diabético, probablemente promoviendo la acumulación y amplificación de iones y biomoléculas mejorando así la capacidad de las células osteoblásticas para formar una matriz extracelular madura (que se ha relacionado con la alta regulación de la deposición de calcio) (Fig. 23), así como la activación de integrinas debido al aumento de la tasa de superficie de área a volumen [88, 108]. Por otra parte, Yang y colaboradores informaron de que los NTs de 80 nm alivian el comportamiento de los osteoblastos bajo la peligrosa condición diabética de la DM simulada mediante niveles de alta glucosa (22 mM) [111]. Por lo tanto, a pesar de que estos resultados coinciden con nuestro estudio actual, es importante destacar que no es equivalente a simular la DM utilizando alta glucosa en lugar de SD. Los autores consideran que las propiedades perjudiciales sobreexpresadas de la DM resultan de la acción sinérgica entre la alta glucosa, las proteínas relacionadas con la SD y las citoquinas inflamatorias [32, 110].

Para determinar los efectos del suero humano en la diferenciación de osteoblastos, se evaluó la expresión relativa de los marcadores osteogénicos clave de diferenciación, Runxs2, OC, OPN, OPG, en las superficies experimentales con células MC3T3-E1. Interesantemente, Runx2 es un factor de transcripción esencial para el inicio de la osteogénesis. Se considera un gen maestro inicial de varias vías de expresión genética en las primeras etapas de la diferenciación de osteoblastos y de la elevada regulación de la OC, el principal componente estructural de la matriz ósea [105, 112-116]. En esta investigación, se realizó la tinción de

inmunofluorescencia de la expresión de Runx2, sobre las superficies de los materiales experimentales a los siete días de inducción (Fig. 24). Los resultados indicaron que los NTs toleran los efectos perjudiciales del SD, llevando a cabo un comportamiento de osteogénesis similar al observado en las condiciones de control (Fig. 25). La OC es la proteína no colágena de matriz ósea más abundante que tiene una participación crucial en la etapa inicial de mineralización de la matriz ósea y comúnmente se considera como un marcador tardío de la diferenciación osteoblástica [117, 118], la cual se expresa en la última etapa de diferenciación osteogénica, por lo tanto OC revela parte del mecanismo de crecimiento osteoblástico [118, 119]. Por esa razón, se evaluó la expresión de OC a los 21 días de inducción (Fig. 26), bajo estas desafiantes condiciones metabólicas. Además, la OC mostró resultados similares de expresión intracelular, apoyando aún más que los NTs estimulan la tasa de diferenciación osteogénica (Fig. 27). La OPN desempeña un papel vital durante la fase de biomineralización; incluido el aumento de la adherencia de las células óseas al concentrarse en la matriz de colágeno mineralizado durante la formación del tejido óseo [120] y la modulación de la mineralización de la matriz. La OPN es una proteína de matriz no colágena que funciona como un marcador tardío de diferenciación osteogénica [121], (Fig. 28). La Fig. 29, se muestran los resultados donde los NTs con SH pueden aumentar significativamente la expresión de OPN en comparación al control SBF. Asimismo, se evaluó la expresión de la OPG, que tiene un efecto inhibitorio sobre la familia de receptores TNF, junto con el receptor activador del factor NF- κ B, y suprimiendo la vía RANK, que modula los efectos nocivos del entorno de las ROS, la activación de los osteoclastos y la posterior resorción ósea (RANK) [122, 123]. La OPG, secretada

por los osteoblastos, se une al ligando RANK como receptor señuelo y evita que el ligando RANK se una a RANK en los osteoclastos, lo que da como resultado la supresión de la resorción ósea osteoclástica [124-126]. Por lo tanto, medimos la expresión de OPG por los osteoblastos (Fig. 30 y 31), distinguiendo que las NTs regulaban un microambiente protector maduro promoviendo niveles similares de OPG incluso bajo la condición de DM. Así, la expresión moduladora de OPG puede ser el último determinante de la resorción y remodelación ósea [123, 126, 127]. Considerando los marcadores osteogénicos de la formación ósea temprana y tardía con la actuación de la OPG organizada por los NTs, los autores denotan que la aplicación de superficies nanoestructuradas puede aliviar el estrés celular inducido por las condiciones peligrosas del SD.

En general, los hallazgos atestiguados en este trabajo de investigación mostraron que los NTs en condiciones cruciales de diabetes mellitus *in vitro* pueden mantener la capacidad de adhesión celular de los osteoblastos, la proliferación, la diferenciación y la mineralización de la matriz, lo que se relacionó positivamente con las deposiciones de Ca. Por otra parte, los NTs aumentaron significativamente la expresión de los marcadores osteogénicos reguladores relacionados con Runx2, OC, OPN y OPG en diferentes etapas de maduración. La asunción de que las superficies nanoestructuradas tienen la propiedad de inducir la formación de hidroxiapatita y la subsiguiente funcionalidad de los osteoblastos en condiciones perjudiciales para la enfermedad apoya la hipótesis donde se propone que en NTs de TiO₂ se podrá promover las propiedades osteogénicas sobre superficies de Ti6Al4V nanoestructurado en condiciones diabéticas *In Vitro*, lo cual abre una puerta

prometedora para la futura aplicación de los NTs de Ti6Al4V en condiciones de diabetes.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

En este trabajo de investigación se demostró el rendimiento de la funcionalidad de formación ósea de los osteoblastos regulada por NTs de 70 nm en condiciones de DM. Se aporta una visión del mecanismo asociado al contacto superficial a nanoescala para mejorar los efectos ambientales nocivos de la SD. Mucho más importante nuestros resultados muestran el sorprendente grado de diferenciación y mineralización organizado por los NTs, así como la óptima regulación osteogénica adaptada en condiciones de cultivo a largo plazo. Estos resultados positivos de la formación ósea arrojan datos importantes sobre los materiales de implantes metálicos configurados con nanotubos para aminorar la disfunción ósea inducida por la DM para su aplicación clínica en pacientes metabólicamente comprometidos.

Recomendaciones

Los resultados actuales apuntan hacia la potencial y prometedora aplicación de las superficies nanoestructuradas para superar la funcionalidad de formación de osteoblastos en condiciones metabólicas perjudiciales y el diseño de superficies regenerativas para aplicaciones de ingeniería de tejidos en la DM clínica. Sin embargo, se recomienda la aplicación de estrategias experimentales utilizando modelos *in vivo* y/o realizando estudios clínicos en humanos para respaldar nuestros resultados.

Se hace énfasis en la necesidad de complementar los resultados generados en este trabajo, a través de la implementación de otras técnicas, análisis, procedimientos y métodos, que fortalezcan los resultados benéficos en el proceso de regeneración ósea en condiciones metabólicas perjudiciales.

TRABAJO FUTURO

Durante el desarrollo de este trabajo han surgido algunas líneas futuras que se han dejado abiertas y que se espera abordar en un futuro; algunas de ellas están directamente relacionadas con este trabajo de tesis y son el resultado de aspectos que han surgido durante la realización de la misma, que por exceder el alcance de este trabajo, no han podido ser tratados con la suficiente profundidad. Otras son líneas generales, no objeto de esta tesis; pueden retomarse como trabajos futuros.

A continuación se presentan algunos trabajos futuros que pueden desarrollarse:

- ✓ Realizar el desarrollo de un implante ortopédico y/o dental con la tecnología evidenciada que sugiere la aplicación de los NTs para superar la funcionalidad de formación de osteoblastos y el diseño de superficies regenerativas en condiciones metabólicas perjudiciales.
- ✓ Implementación del implante nanoestructurado en aplicación clínica en un estudio *in vivo* en adultos metabólicamente comprometidos y en sujetos control.
- ✓ Replicar el modelo de implementación de sueros humanos en condiciones diabéticas en NTs, siguiendo la metodología utilizada con otro tipo de línea celular como lo son los macrófagos. Para evaluar la activación de citoquinas en el proceso de inflamación.

- ✓ Se propone replicar el modelo de implementación de sueros humanos en condiciones diabéticas y de control en superficies de NTs con el modelo de liberación sostenida de Epicatequina.

FINANCIAMIENTO DEL PROYECTO

Deseo agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento y financiamiento de una beca (CVU 764606) económica.

Se agradece al CONACYT por el financiamiento recibido para la realización de este importante proyecto a través del programa No. A1-S-38368, "Proyecto Apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación" SEP-CONACYT, convocatoria de Investigación Científica Básica CB2017-2018.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Castellanos, G.L., et al., *Salud bucal, salud bucal percibida y calidad de vida en adultos mayores*. 2015. **14**(2): p. 6-11.
2. Murguiondo, M.S., et al., *Salud bucal en pacientes adultos mayores y su asociación con la calidad de vida*. 2011. **16**(2): p. 110-115.
3. Barrancos, P. and J.B. Mooney, *Operatoria dental: avances clínicos, restauraciones y estética*. 2015: Editorial Médica Panamericana.
4. Rohani, B.J.W.J.o.D., *Oral manifestations in patients with diabetes mellitus*. 2019. **10**(9): p. 485.
5. Sghaireen, M.G., et al., *Comparative evaluation of dental implant failure among healthy and well-controlled diabetic patients—a 3-year retrospective study*. 2020. **17**(14): p. 5253.
6. Polzer, I., et al., *Edentulism as part of the general health problems of elderly adults*. 2010. **60**(3): p. 143-155.
7. Facklam, A.L., L.R. Volpatti, and D.G.J.A.m. Anderson, *Biomaterials for personalized cell therapy*. 2020. **32**(13): p. 1902005.
8. Peppas, N.A. and J.R.J.R.b. Clegg, *The challenge to improve the response of biomaterials to the physiological environment*. 2016. **3**(2): p. 67-71.
9. Hu, X.-F., et al., *Angiogenesis impairment by the NADPH oxidase-triggered oxidative stress at the bone-implant interface: critical mechanisms and therapeutic targets for implant failure under hyperglycemic conditions in diabetes*. 2018. **73**: p. 470-487.

10. Tobin, E.J.J.A.D.D.R., *Recent coating developments for combination devices in orthopedic and dental applications: a literature review*. 2017. **112**: p. 88-100.
11. Aguado, B.A., et al., *Engineering precision biomaterials for personalized medicine*. 2018. **10**(424): p. eaam8645.
12. Oates, T.W., et al., *A critical review of diabetes, glycemic control, and dental implant therapy*. 2013. **24**(2): p. 117-127.
13. Annibaldi, S., et al., *Survival analysis of implant in patients with diabetes mellitus: a systematic review*. 2016. **25**(5): p. 663-674.
14. Wagner, J., et al., *Systematic review on diabetes mellitus and dental implants: an update*. 2022. **8**(1): p. 1-21.
15. Ajami, E., et al., *Bone healing and the effect of implant surface topography on osteoconduction in hyperglycemia*. 2014. **10**(1): p. 394-405.
16. Moraschini, V., et al., *The impact of diabetes on dental implant failure: a systematic review and meta-analysis*. 2016. **45**(10): p. 1237-1245.
17. Naujokat, H., B. Kunzendorf, and J.J.I.j.o.i.d. Wiltfang, *Dental implants and diabetes mellitus—a systematic review*. 2016. **2**(1): p. 1-10.
18. Alberti, A., et al., *Influence of diabetes on implant failure and peri-implant diseases: a retrospective study*. 2020. **8**(3): p. 70.
19. Lorusso, F., et al., *The impact of diabetes in implant oral rehabilitations: A bibliometric study and literature review*. 2020. **36**: p. 3333.
20. Khader, Y.S., et al., *Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics: a meta-analysis*. 2006. **20**(1): p. 59-68.
21. Jiao, H., E. Xiao, and D.T.J.C.o.r. Graves, *Diabetes and its effect on bone and fracture healing*. 2015. **13**(5): p. 327-335.

22. Ko, K.I., A. Sculean, and D.T.J.T.R. Graves, *Diabetic wound healing in soft and hard oral tissues*. 2021. **236**: p. 72-86.
23. Lindhe, J., T. Karring, and N.P. Lang, *Periodontologia clinica e implantologia odontologica/Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 2009: Ed. Médica Panamericana.
24. Duda-Sobczak, A., D. Zozulinska-Ziolkiewicz, and M.J.C.t. Wyganowska-Swiatkowska, *Type 1 diabetes and periodontal health*. 2018. **40**(6): p. 823-827.
25. DeFronzo, R.A., *Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. 2018.
26. Hupfeld, C.J., et al., *Type 2 diabetes mellitus: etiology, pathogenesis, and natural history*. 2013: p. 223-245.
27. Brammer, K.S., C.J. Frandsen, and S.J.T.i.b. Jin, *TiO2 nanotubes for bone regeneration*. 2012. **30**(6): p. 315-322.
28. Spanheimer, R.G.J.M., *Direct inhibition of collagen production in vitro by diabetic rat serum*. 1988. **37**(5): p. 479-485.
29. Deng, X., et al., *Effects of type 2 diabetic serum on proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells*. 2018. **2018**.
30. Ceriello, A., et al., *Metabolic control may influence the increased superoxide generation in diabetic serum*. 1991. **8**(6): p. 540-542.
31. Dhawan, U., et al., *An ossifying landscape: materials and growth factor strategies for osteogenic signalling and bone regeneration*. 2022. **73**: p. 355-363.
32. Pelik, T., L.J.M.-C. Kazdov, and Experimental, *Serum phospholipid fatty acid composition and insulin action in type 2 diabetic patients*. 2001. **50**(12): p. 1472-1478.

33. Blake, R. and I.A.J.B.e.B.A.-G.S. Trounce, *Mitochondrial dysfunction and complications associated with diabetes*. 2014. **1840**(4): p. 1404-1412.
34. Forbes, J.M. and D.R.J.N.R.N. Thorburn, *Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease*. 2018. **14**(5): p. 291-312.
35. Vijay, R., et al., *Carbon nanomaterials modified biomimetic dental implants for diabetic patients*. 2021. **11**(11): p. 2977.
36. de Oliveira, P.G.F.P., et al., *Obesity/metabolic syndrome and diabetes mellitus on peri-implantitis*. 2020. **31**(8): p. 596-610.
37. Jiang, H., et al., *The effects of hierarchical micro/nano-structured titanium surface on osteoblast proliferation and differentiation under diabetic conditions*. 2017. **26**(2): p. 263-269.
38. Spriano, S., et al., *A critical review of multifunctional titanium surfaces: New frontiers for improving osseointegration and host response, avoiding bacteria contamination*. 2018. **79**: p. 1-22.
39. Brånemark, P.-I., et al., *Intra-osseous anchorage of dental prostheses: I. Experimental studies*. 1969. **3**(2): p. 81-100.
40. Brånemark, R., et al., *Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation*. 2001. **38**(2): p. 1-4.
41. Kaluđerović, M.R., et al., *Titanium dental implant surfaces obtained by anodic spark deposition—from the past to the future*. 2016. **69**: p. 1429-1441.
42. Chrcanovic, B.R., et al., *A retrospective study on clinical and radiological outcomes of oral implants in patients followed up for a minimum of 20 years*. 2018. **20**(2): p. 199-207.
43. Nack, C., et al., *Rehabilitation of irradiated patients with chemically modified and conventional SLA implants: five-year follow-up*. 2015. **42**(1): p. 57-64.

44. Wang, Q., et al., *Multi-scale surface treatments of titanium implants for rapid osseointegration: a review*. 2020. **10**(6): p. 1244.
45. Souza, J.C., et al., *Nano-scale modification of titanium implant surfaces to enhance osseointegration*. 2019. **94**: p. 112-131.
46. Valdez-Salas, B., et al., *Controlled antifungal behavior on Ti6Al4V nanostructured by chemical nanopatterning*. 2019. **96**: p. 677-683.
47. Alipal, J., et al., *Evolution of anodised titanium for implant applications*. 2021. **7**(7): p. e07408.
48. Maher, S., et al., *Engineered titanium implants for localized drug delivery: recent advances and perspectives of Titania nanotubes arrays*. 2018. **15**(10): p. 1021-1037.
49. Minagar, S., et al., *A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces*. 2012. **8**(8): p. 2875-2888.
50. Prasad, S., et al., *Biomaterial properties of titanium in dentistry*. 2015. **57**(4): p. 192-199.
51. Beltrán-Partida, E., et al., *Improved osteoblast and chondrocyte adhesion and viability by surface-modified Ti6Al4V alloy with anodized TiO₂ nanotubes using a super-oxidative solution*. 2015. **8**(3): p. 867-883.
52. Gulati, K., et al., *Research to Clinics: Clinical Translation Considerations for Anodized Nano-Engineered Titanium Implants*. 2021.
53. Civantos, A., et al., *Titanium coatings and surface modifications: toward clinically useful bioactive implants*. 2017. **3**(7): p. 1245-1261.
54. Gittens, R.A., et al., *A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects*. 2014. **10**(7): p. 2907-2918.

55. Zhang, C., et al., *Electrochemical and in vitro behavior of the nanosized composites of Ti-6Al-4V and TiO₂ fabricated by friction stir process*. 2017. **423**: p. 331-339.
56. Peng, L., et al., *Long-term small molecule and protein elution from TiO₂ nanotubes*. 2009. **9**(5): p. 1932-1936.
57. Minagar, S., et al., *Cell response of anodized nanotubes on titanium and titanium alloys*. 2013. **101**(9): p. 2726-2739.
58. Li, B., et al., *Influence of nanostructures on the biological properties of Ti implants after anodic oxidation*. 2014. **25**(1): p. 199-205.
59. Valdez-Salas, B., et al., *Crystallographic pattern mediates fungal nanoadhesion bond formation on titanium nanotubes*. 2021. **6**(24): p. 15625-15636.
60. Beltrán-Partida, E., et al., *Enhanced antifungal activity by disinfected titanium dioxide nanotubes via reduced nano-adhesion bonds*. 2017. **76**: p. 59-65.
61. Beltrán-Partida, E., et al., *Improved in vitro angiogenic behavior on anodized titanium dioxide nanotubes*. 2017. **15**(1): p. 1-21.
62. Brammer, K.S., et al., *Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO₂ nanotube surface*. 2009. **5**(8): p. 3215-3223.
63. Jara Albarrán, A.J.E.M.P., *Endocrinología*. 2001: p. 131-138.
64. Cuéllar, A.Y.D., C.M. Sibaja, and A.U. Aguirre, *Endocrinología clínica de Dorantes y Martínez*. 2016: Editorial El Manual Moderno.
65. Sun, H., et al., *IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045*. 2022. **183**: p. 109119.

66. Magliano, D.J., et al., *Trends in incidence of total or type 2 diabetes: systematic review*. 2019. **366**.
67. care, A.D.A.J.D., *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. 2014. **37**(Supplement_1): p. S81-S90.
68. Care, D.J.D.C., *Professional Practice Committee*. 2015. **38**(1): p. S1-S2.
69. care, A.D.A.J.D., *2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes—2019*. 2019. **42**(Supplement_1): p. S13-S28.
70. Scanlon, P.H., S.J. Aldington, and I.M.J.M.E.A.j.o.o. Stratton, *Epidemiological issues in diabetic retinopathy*. 2013. **20**(4): p. 293.
71. Rajiv, S., S. Santosh, and S. RS, *Periodontal disease: the sixth complication of diabetes*. 2011.
72. Torres, F.M., W.U. Mazzini, and T.M.J.R.o.m. Campuzano, *Factores predisponentes que afectan la salud bucodental en pacientes con diabetes mellitus*. 2017. **21**(2): p. 103-108.
73. Braz de Oliveira, R., et al., *Full Mouth Reconstruction in a Diabetes Mellitus Type I-A Case Report with 5 Years Follow-Up*. 2019. **6**(2): p. 6.
74. Yu, S.-H. and T.-J. Oh, *Diabetes mellitus—Dental implants and periodontal disease*, in *Diabetes Mellitus*. 2020, Elsevier. p. 139-158.
75. Valdez-Salas, B., et al., *In vitro assessment of early bacterial activity on micro/nanostructured Ti6Al4V surfaces*. 2017. **22**(5): p. 832.
76. Jenkins, J., et al., *Antibacterial effects of nanopillar surfaces are mediated by cell impedance, penetration and induction of oxidative stress*. 2020. **11**(1): p. 1-14.

77. Gregory, C.A., et al., *An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction*. 2004. **329**(1): p. 77-84.
78. Zhang, X., et al., *Effects of copper nanoparticles in porous TiO₂ coatings on bacterial resistance and cytocompatibility of osteoblasts and endothelial cells*. 2018. **82**: p. 110-120.
79. Lin, K. and J. Chang, *Structure and properties of hydroxyapatite for biomedical applications*, in *Hydroxyapatite (HAp) for biomedical applications*. 2015, Elsevier. p. 3-19.
80. Voltrova, B., et al., *Different diameters of titanium dioxide nanotubes modulate Saos-2 osteoblast-like cell adhesion and osteogenic differentiation and nanomechanical properties of the surface*. 2019. **9**(20): p. 11341-11355.
81. Lewis, S.R., et al., *Surgical interventions for treating extracapsular hip fractures in older adults: a network meta-analysis*. 2022(2).
82. Curtis, D.A., et al., *Treatment planning considerations in the older adult with periodontal disease*. 2021. **87**(1): p. 157-165.
83. Chambrone, L., L.F.J.C.O.i.E. Palma, Diabetes, and Obesity, *Current status of dental implants survival and peri-implant bone loss in patients with uncontrolled type-2 diabetes mellitus*. 2019. **26**(4): p. 219-222.
84. Insua, A., et al., *Basis of bone metabolism around dental implants during osseointegration and peri-implant bone loss*. 2017. **105**(7): p. 2075-2089.
85. Gao, A., et al., *The effects of titania nanotubes with embedded silver oxide nanoparticles on bacteria and osteoblasts*. 2014. **35**(13): p. 4223-4235.
86. Mazare, A., et al., *Corrosion, antibacterial activity and haemocompatibility of TiO₂ nanotubes as a function of their annealing temperature*. 2016. **103**: p. 215-222.

87. Wang, Z., et al., *NanoZnO-modified titanium implants for enhanced anti-bacterial activity, osteogenesis and corrosion resistance*. 2021. **19**(1): p. 1-23.
88. Yu, Y., et al., *Osteogenesis potential of different titania nanotubes in oxidative stress microenvironment*. 2018. **167**: p. 44-57.
89. Zeng, Q., et al. *Surface modification of titanium implant and in vitro biocompatibility evaluation*. in *Key Engineering Materials*. 2005. Trans Tech Publ.
90. Mo, R., et al., *Emerging micro-and nanotechnology based synthetic approaches for insulin delivery*. 2014. **43**(10): p. 3595-3629.
91. Hu, Y., et al., *Regulation of the differentiation of mesenchymal stem cells in vitro and osteogenesis in vivo by microenvironmental modification of titanium alloy surfaces*. 2012. **33**(13): p. 3515-3528.
92. Ding, T., et al., *An in situ tissue engineering scaffold with growth factors combining angiogenesis and osteoimmunomodulatory functions for advanced periodontal bone regeneration*. 2021. **19**(1): p. 1-16.
93. Mata, A., et al., *Bone regeneration mediated by biomimetic mineralization of a nanofiber matrix*. 2010. **31**(23): p. 6004-6012.
94. Civitelli, R.J.A.o.b. and biophysics, *Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage*. 2008. **473**(2): p. 188-192.
95. Popat, K.C., et al., *Decreased Staphylococcus epidermis adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes*. 2007. **28**(32): p. 4880-4888.
96. Hao, Y., et al., *Effect of nanotube diameters on bioactivity of a multifunctional titanium alloy*. 2013. **268**: p. 44-51.

97. Frandsen, C.J., et al., *Tantalum coating on TiO₂ nanotubes induces superior rate of matrix mineralization and osteofunctionality in human osteoblasts*. 2014. **37**: p. 332-341.
98. Ma, X.-Y., et al., *The promotion of osteointegration under diabetic conditions using chitosan/hydroxyapatite composite coating on porous titanium surfaces*. 2014. **35**(26): p. 7259-7270.
99. Li, Y., et al., *Impact of diabetes mellitus simulations on bone cell behavior through in vitro models*. 2020. **38**(5): p. 607-619.
100. Li, X., et al., *Osseointegration of chitosan coated porous titanium alloy implant by reactive oxygen species-mediated activation of the PI3K/AKT pathway under diabetic conditions*. 2015. **36**: p. 44-54.
101. Hofbauer, L.C., et al., *Bone fragility in diabetes: Novel concepts and clinical implications*. 2022.
102. Jafary, F., P. Hanachi, and K.J.I.j.o.o.t.m. Gorjipour, *Osteoblast differentiation on collagen scaffold with immobilized alkaline phosphatase*. 2017. **8**(4): p. 195.
103. Yan, Y.-x., et al., *Mechanical strain regulates osteoblast proliferation through integrin-mediated ERK activation*. 2012. **7**(4): p. e35709.
104. Gaur, T., et al., *Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression*. 2005. **280**(39): p. 33132-33140.
105. Komori, T.J.I.j.o.m.s., *Regulation of proliferation, differentiation and functions of osteoblasts by Runx2*. 2019. **20**(7): p. 1694.
106. Li, D., et al., *Small molecules modified biomimetic gelatin/hydroxyapatite nanofibers constructing an ideal osteogenic microenvironment with significantly enhanced cranial bone formation*. 2018. **13**: p. 7167.

107. Gough, J.E., J.R. Jones, and L.L.J.B. Hench, *Nodule formation and mineralisation of human primary osteoblasts cultured on a porous bioactive glass scaffold*. 2004. **25**(11): p. 2039-2046.
108. Kokubo, T., H.-M. Kim, and M.J.B. Kawashita, *Novel bioactive materials with different mechanical properties*. 2003. **24**(13): p. 2161-2175.
109. Zhang, H., et al., *Titanium nanotubes induce osteogenic differentiation through the FAK/RhoA/YAP cascade*. 2016. **6**(50): p. 44062-44069.
110. Ma, X.-Y., et al., *Involvement of FAK-mediated BMP-2/Smad pathway in mediating osteoblast adhesion and differentiation on nano-HA/chitosan composite coated titanium implant under diabetic conditions*. 2018. **6**(1): p. 225-238.
111. Yang, J., et al., *TiO₂ nanotubes alleviate diabetes-induced osteogenic inhibition*. 2020. **15**: p. 3523.
112. Lai, M., et al., *The effect of calcitonin gene-related peptide functionalized TiO₂ nanotubes on osteoblast and osteoclast differentiation in vitro*. 2020. **600**: p. 124899.
113. Komori, T., *Regulation of osteoblast differentiation by Runx2*, in *Osteoimmunology*. 2009, Springer. p. 43-49.
114. Kawane, T., et al., *Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3*. 2018. **8**(1): p. 1-17.
115. Teplyuk, N.M., et al., *Runx2 regulates G protein-coupled signaling pathways to control growth of osteoblast progenitors*. 2008. **283**(41): p. 27585-27597.
116. Li, Y., et al., *Biomechanical stimulation of osteoblast gene expression requires phosphorylation of the RUNX2 transcription factor*. 2012. **27**(6): p. 1263-1274.

117. Pang, Y., et al., *Nobiletin promotes osteogenic differentiation of human osteoblastic cell line (MG-63) through activating the BMP-2/RUNX-2 signaling pathway*. 2021. **28**(9): p. 4916-4920.
118. Yao, H., et al., *TGF β 1 induces bone formation from BMP9-activated Bone Mesenchymal Stem Cells, with possible involvement of non-canonical pathways*. 2020. **17**(12): p. 1692.
119. Huang, H., et al., *Two mTOR inhibitors, rapamycin and Torin 1, differentially regulate iron-induced generation of mitochondrial ROS*. 2017. **30**(6): p. 975-980.
120. Icer, M.A. and M.J.C.b. Gezmen-Karadag, *The multiple functions and mechanisms of osteopontin*. 2018. **59**: p. 17-24.
121. Zurick, K.M., C. Qin, and M.T.J.J.o.b.m.r.P.A. Bernards, *Mineralization induction effects of osteopontin, bone sialoprotein, and dentin phosphoprotein on a biomimetic collagen substrate*. 2013. **101**(6): p. 1571-1581.
122. Tantikanlayaporn, D., et al., *Andrographolide modulates OPG/RANKL axis to promote osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells and protects bone loss during estrogen deficiency in rats*. 2020. **131**: p. 110763.
123. Valentini, A., et al., *Osteoprotegerin in diabetic osteopathy*. 2020. **30**(1): p. 49-55.
124. Yamamoto, N., et al., *Regulation by resveratrol of prostaglandin E2-stimulated osteoprotegerin synthesis in osteoblasts*. 2014. **34**(5): p. 1439-1445.
125. Ateeq, H., et al., *Effect of inflammation on bones in diabetic patients with periodontitis via RANKL/OPG system-A review*. 2022: p. 1-7.
126. Walsh, M.C. and Y.J.F.i.i. Choi, *Biology of the RANKL–RANK–OPG system in immunity, bone, and beyond*. 2014. **5**: p. 511.

127. Udagawa, N., et al., *Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function*. 2000. **141**(9): p. 3478-3484.