



Metodología de nanomodificación y caracterización de micro-transportadores de titanio para su aplicación en la medicina regenerativa de huesos.



Universidad de Granada

Universidad de Panamá

INDICASAT AIP

Universidad de Granada

Autor: Lic. Andrés Nieves Portillo

Tutor: Dr. Rolando A. Gittens

República de Panamá

2019

Agradecimientos

Primero que todo, se le agradece a Dios por todas las oportunidades que se me han presentado en la vida.

Agradezco al Dr. Rolando A. Gittens por la oportunidad de realizar esta tesis en el Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT AIP). En este instituto también agradezco al equipo del Dr Marcelino Gutiérrez por darme mi primera oportunidad en el instituto.

También agradezco al Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales (STRI), especialmente al Sr. Jorge Ceballos, encargado del laboratorio de microscopía.

Otro especial agradecimiento es para la Vicerrectoría de la Universidad de Panamá. Especialmente al Dr. Tomás Díez y el Dr. Janzel Villalaz, por otorgar una prórroga para presentar y sustentar esta tesis.

Y finalmente el agradecimiento más especial al de mi familia, los cuales tuvieron que soportar todos los obstáculos que yo tuve que superar, incluyendo problemas de salud, para poder terminar esta tesis y finalizar mis estudios con un diploma de maestría en Biotecnología.

I. ÍNDICE

Agradecimiento.....	3
Resumen.....	5
Objetivos.....	6
Justificación.....	7
Hipótesis de Trabajo.....	9
Antecedentes.....	10
Materiales y Métodos.....	45
Resultados.....	48
Discusión.....	56
Conclusiones.....	72
Proyecciones futuras.....	73
Bibliografía.....	74

II. RESUMEN

El objetivo general del presente estudio es la generación de conocimiento y el desarrollo de nuevas herramientas de biotecnología y ciencia de los materiales para la medicina regenerativa que, a largo plazo, ayude a mejorar el entendimiento y el tratamiento de la osteoporosis en Panamá.

El objetivo específico de este proyecto fue crear nanoestructuras en la superficie de partículas de titanio (microtransportadores) a través de técnicas de tratamiento hidrotermal (e.g., ataque ácido usando ácido nítrico, oxálico y fórmico) a ciertas concentraciones y temperaturas que lograron modificar la superficie de dichas partículas.

Nuestros resultados no lograron ser concluyentes, pero muestran el potencial de nanomodificación superficial de los protocolos desarrollados durante nuestros estudios en partículas de titanio 99.9% puras, y a la vez detallan las metodologías para caracterizar de manera efectiva estos microtransportadores con el uso de herramientas de análisis superficial disponibles en Panamá, como el microscopio electrónico de barrido.

En estudio programados a futuro será posible investigar si células MG63 o células madres mesenquimales son capaces de reconocer estas nanoestructuras para madurar y luego diferenciarse en osteoblastos necesarios para la creación de nuevo hueso de buena calidad y que el tejido óseo crezca de manera eficiente con el apoyo de nuestros microtransportadores nanomodificados.

III. OBJETIVOS

Objetivo General

Contribuir con nuevo conocimiento para el tratamiento de la osteoporosis a través de la nanomodificación de partículas de titanio, utilizadas como micro- transportadores de células madres mesenquimales, para mejorar la calidad el hueso en partes afectadas del esqueleto.

Objetivos Específicos

1. Caracterizar la composición química de los microtransportadores de titanio.
2. Crear nanoestructuras en la superficie de partículas de titanio (microtransportadores) a través de técnicas de tratamiento hidrotermal (e.g., ataque ácido usando ácido nítrico, oxálico y fórmico).
3. Establecer metodologías para caracterizar de manera efectiva los microtransportadores con el uso de herramientas de análisis superficial como el microscopio electrónico de barrido y programas de análisis de imágenes.

IV. Justificación

Panamá ha estado experimentando un desarrollo económico exponencial, que ha visto crecer su producto interno bruto casi 300% en los últimos diez años de (\$21, 300 M en 2007 a \$61,840 M en 2017). (World Bank, The). Este crecimiento económico ha impactado positivamente la calidad de vida de la población panameña y ha ayudado a mejorar varios índices poblacionales como los niveles de pobreza (33.8% en 2008; 22.1% en 2016) y la expectativa de vida promedio (76.1 años en 2006; 78 años en 2016) (World Bank, The)

Sin embargo, el aumento de la expectativa de vida trae consigo la consecuencia negativa del envejecimiento de la población, una tendencia a nivel global, y con esto una mayor incidencia de enfermedades crónicas no transmisibles. Actualmente, las enfermedades crónicas son las principales causas de muerte de la población panameña, entre las que se encuentran las enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes y enfermedades cerebrovasculares. (MINSA). De esta manera, Panamá se encuentra sufriendo las enfermedades de un país desarrollado. (Gittens, 2017)

La osteoporosis, otra enfermedad crónica que afecta a un gran segmento de la población de adultos mayores, no es una prioridad sanitaria del sistema de salud público en Panamá. Las clínicas y hospitales públicos no cuentan con densitómetros óseos, que son equipos especializados para diagnosticar la enfermedad, y solo existen unos pocos en clínicas privadas, por lo tanto, la epidemiología de la enfermedad no cuenta con suficientes datos (Gittens, 2017).

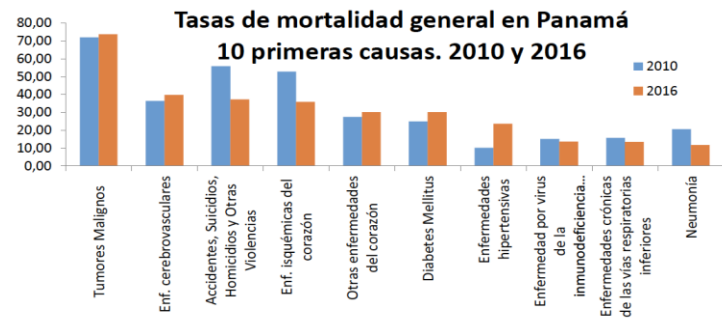
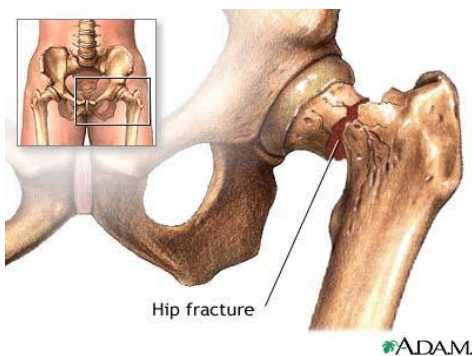
Sin embargo, en países como Estados Unidos se ha documentado que daños músculo-esqueléticos son la condición de salud más reportada en los sistemas de salud, con un elevado costo a la nación (Jacobs *et al.*, 2008). El 25 % de las heridas músculo-esqueléticas envuelven fractura de huesos y requieren algún tipo de tratamiento que promueva la regeneración del hueso (Agrawal *et al.* 2003). Adicionalmente, 1 de cada 2 mujeres (50%) y 1 de cada 4 hombres (25%) mayores de 60 años sufrirá una fractura osteoporótica que conlleva una alta morbilidad y mortalidad (Jacobs *et al.*, 2008). Es notable el aumento de adultos mayores en estos países desarrollados (Agrawal *et al.* 2003). Por esta razón es importante que se realicen estudios de la osteoporosis en Panamá, desde la epidemiología hasta la búsqueda de nuevas terapias que ayuden a tratar o prevenir las fracturas osteoporóticas.

En Panamá no existen muchas investigaciones en el área de la biotecnología y nanotecnología para aplicaciones en biomedicina. Nuestro estudio busca desarrollar técnicas de nanomodificación a baja temperatura para crear nano-estructuras en la superficie de microtransportadores de titanio que sirvan como vehículos de osteoblastos

o células madre para la producción de factores de crecimiento y citoquinas que promuevan la regeneración del hueso.

Nuestro acercamiento está fundamentado en la ingeniería de tejidos, que es una rama de la ciencia y la tecnología que promete reparar y regenerar tejidos humanos como el óseo, al imitar el ambiente extracelular y tomando ventaja de las características naturales de las células (Hing *et al.* 2005).

El titanio es un metal que tiene un balance favorable entre peso, resistencia mecánica y buen rendimiento biológico en huesos en cuanto a su rugosidad, química y humectabilidad (Wall *et al.* 2009). Las células MG63 exhiben un incremento en su maduración osteoblástica cuando están expuestas a superficies que contienen una combinación de nano-estructuras y micro-rugosidades en superficies de Ti (Gittens *et al.* 2012). Por esta razón, nuestro objetivo es generar nanoestructuras en la superficie de microtransportadores de titanio, que combinado a la curvatura microscópica de las partículas, promueva un microambiente favorable para la producción de hueso de buena calidad.



Fuente: Datos de DIPLAN - MINSA

Figura 1. Osteoporosis. Fractura de cadera.

Figura 2. Tasas de mortalidad en Panamá.

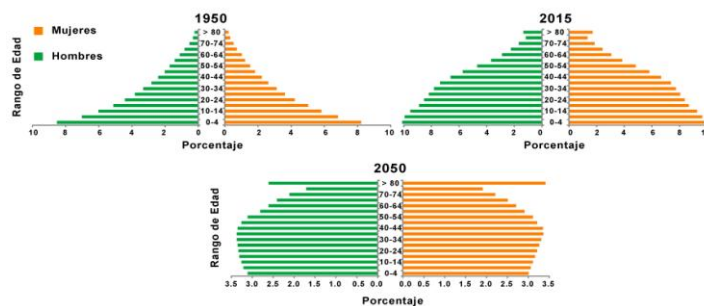


Figura 3. Rango de edades en países desarrollados en los años 1950, 2015 y una estimación de 2050.

V. Hipótesis de Trabajo

Un tratamiento hidrotermal de ataques ácido usando ácido nítrico, oxálicos y fórmico, es capaz de nanomodificar la superficie de micropartículas de titanio que se podrán usar como micro transportadores de células madres mesenquimales, y el microscopio electrónico de barrido (SEM) servirá para observar la nueva nano-topografía superficial.

VI. Antecedentes

LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Introducción:

El microscopio electrónico es un microscopio que usa rayos de electrones desde una fuente de iluminación. La longitud de onda de un electrón puede ser 100,000 veces más pequeña que los fotones de la luz visible y por lo tanto los microscopios electrónicos tienen un poder de resolución mayor que los microscopios de luz.

El microscopio electrónico tiene un sistema de lentes electrónicos que son análogos a los lentes de vidrio del microscopio óptico de luz.

El microscopio electrónico es usado para estudiar una amplia gama de de especímenes biológicos e inorgánico incluyendo microorganismos, células, moléculas grandes, muestras de biopsia, metales y cristales.

Historia del microscopio electrónicos

En 1926, el físico alemán Hans Busch desarrolló los lentes electromagnéticos.

El primer prototipo de microscopio electrónico, capaz de cuatrocientos de poder de magnificación, fue desarrollado en 1931 por el físico Ernst Ruska y por el ingeniero eléctrico Max Knoll. (Mathys).

Ruska leyó un artículo de Busch en el revista académica *Archives Elektrotechnik* donde Busch sugirió que los campos electromagnéticos pueden ser usados para dirigir rayos de electrones de forma análoga a como la luz es refractada en lentes ópticos (Pietzsch, 2013).

Este aparato es considerado la primera demostración de la microscopía electrónica. (Ruska, 1986).

En el mismo año (1931) Reinhold Rudenberg, el director científico de *Siemens-Schuckertwerke* obtuvo una patente por un microscopio electrónico.

In 1932, Ernst Lubcke de *Siemens & Halske*, construyó y obtuvo imágenes de un prototipo de microscopio electrónico, aplicando los conceptos de descritos por la patente de Rudenberg (Rudenberg et Rudenberg, 2010).

En el siguiente año, 1933, Ruska construyó el primer microscopio electrónico que excedió la resolución posible con un microscopio óptico de luz. (Ruska, 1986). Cuatro años después, en 1937, Siemens financió el trabajo de Ernst Ruska y del físico Bodo von Borries, y empleó a Helmut Ruska, médico y biólogo hermano de Ernst, para desarrollar aplicaciones para el microscopio , especialmente con especímenes biológicos.

También en 1937, Manfred von Ardenne, investigador en física aplicada e inventor, fue pionero en la creación del microscopio electrónico de barrido (von Ardenne, 1940). Siemens produjo el primer microscopio electrónico comercial en 1938. (Caltech library, 2002).

Empezando en 1939, los científicos en Japón se reunieron para decidir la mejor manera de construir el microscopio electrónico. Este grupo evolucionó en el *Japan Electron Optics Laboratory* (JEOL) que eventualmente produce mas modelos y variedades de microscopios electrónicos que cualquier otra compañía. Hitachi y Toshiba en Japón también jugaron un rol mayor en el proceso de desarrollo inicial. (Caltech library, 2002).

El proceso inicial en ciencias de los materiales en los años 1940s fue principalmente limitado a estudios de partículas pequeñas, tales como el negro carbón que misteriosamente daba fuerza a las llantas de los automóviles, y el pigmento que fue usado para pinturas y cosméticos.

Por medio del microscopio electrón de transmisión (TEM), se pudo determinar los tamaños, formas, y números pero no revelan la estructura interna de las partículas. En los años 1950s, el análisis de microscopios de láminas pequeñas (descrito por primera vez por Heidenreich en 1949) dominaron la investigación. Estudios de defectos de cristal en estas películas delgadas fueron populares, así como estudios de cambios de fase en muestras sujetas a series de diferentes temperaturas (Caltech library, 2002).

Tipos de microscopios electrónicos

1-Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM, por sus siglas en inglés)

Microscopio que utiliza un rayo de electrones de alto voltaje para iluminar el espécimen y crear una imagen. El rayo de electrones proviene de una pistola de electrones, comúnmente equipado con un cátodo con filamento de tungsteno como la fuente de electrones. El rayo de electrones es acelerado por un ánodo con respecto al cátodo, enfocado por lentes electromagnéticos y electrostáticos.

2-Microscopio Electrónico de reflexión (REM, por sus siglas en inglés)

Este tipo de microscopio, como el TEM, un rayo de electrones incide con la superficie de la muestra, pero en lugar de electrones de transmisión (como en el TEM) o electrones secundarios (SEM) el rayo reflejado de electrones de dispersión elástica (dispersión de partículas en donde la energía cinética se mantiene aunque su dirección de propagación es modificada por la interacción de otras partículas) es detectado.

3-Microscopio Electrónico de Transmisión con unidad de barrido (STEM, por sus siglas en inglés)

Este tipo de microscopio envía una sonda a través de una muestra que (como lo hace el TEM) a sido aplanada para detectar electrones esparcidos a través de de la muestra. La alta resolución del TEM es posible en el STEM.

La acción de enfoque ocurre antes de que el electrón golpee la muestra en el STEM. En el TEM ocurre después.

4-Microscopio Electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés)

En nuestro estudio utilizamos el Microscopio electrónico de barrido, por esta razón nos enfocaremos en este tipo de técnica de microscopía.

Microscopio electrónico de barrido: Principios

Este microscopio produce imágenes exponiendo a la muestra con un rayo de electrones que es escaneado a través de un área rectangular de la muestra (llamado en inglés *raster scanning*). Cuando el rayo de energía interactúa con la muestra pierde energía por una variedad de mecanismos. Esta energía perdida es convertida en formas alternativas como calor, electrones secundarios de baja energía, electrones de alta energía retro disparados,

emisiones de luz (catodoluminiscencia) y emisiones de rayos X.

Todas ellas dan información de las propiedades de la superficie de la muestra, tanto de su composición como la topografía.

Este microscopio puede tener una resolución mejor que un nanómetro.

Las muestras son observadas en alto vacío en SEM convencionales, o con bajo vacío o condiciones de humedad en SEM de presiones variables o SEM ambientales. (Stokes, 2008).

El modo más común de SEM es la detección de electrones secundarios emitidos por átomos excitados por el rayo de electrones. El número de electrones secundarios que pueden ser detectados dependen, entre otras cosas, de la topografía de la muestra. Al escanear las muestras y coleccionar los electrones secundarios que son emitidos usando un detector especial, una imagen desplegando la topografía de la superficie es creada.

Historia del Microscopio Electrónico de barrido

Un documento de los inicios históricos del SEM ha sido presentado por McMullan (McMullan, 1988 y 2006), a pesar de que Max Knoll produjo una foto con un ancho de campo de 50 mm mostrando un contraste de canalización por el uso de un escáner de haz de electrones. (Knoll, 1935).

Fue Manfred von Ardenne quien en 1937 inventó (von Ardenne, 1937) un verdadero microscopio con alta magnificación escaneando un pequeño *raster* con un rayo de electrones des-magnificado y enfocado. Ardenne aplicó principio de escaneo no solo para obtener magnificación sino también para eliminar a propósito la aberración cromática de otra forma inherente en la microscopía electrónica. El discutió varios modos de detección, posibilidades y teorías del SEM (von Ardenne, 1938) junto con la construcción de el primer microscopio de barrido de alta magnificación. (von Ardenne, 1938).

Siguientes trabajos fueron reportados por el grupo de Zworykin's (Zworykin *et al.*, 1942) seguido por el grupo de Cambridge en 1950s y principios de los 1960s (MacMullan *et al.* 1953) (Oatley *et al.*, 1965) (Smith *et al.*, 1953) (Wells *et al.*, 1957) guiados por Charles Oatley, todo esto finalmente llevando haciendo entrar al mercado el instrumento comercial por *Cambridge Scientific Instrument Company* llamado el "Stereoscan" en 1965.

La microscopía electrónico de Barrido (SEM) y la medicina regenerativa

Lincks *et al.* en 1998 es uno de los ejemplos donde se utiliza el microscopio electrónico de barrido como apoyo al estudio de la medicina regenerativa. En ella se puede no sólo ver las rugosidades de la superficies de discos de titanio y aleación de titanio sino también la proliferación y diferenciación de células osteoblásticas MG63.

Qi Liu *et al.* (2017), nos presenta un estudio en donde se puede observar gracias al SEM los cambios morfológicos de las células cultivadas MG63 en superficies de aleación Ti-6Al-4V.

BREVE HISTORIA DE LA MEDICINA REGENERATIVA Y LA INGENIERÍA DE TEJIDOS

La ingeniería de tejidos representa la confluencia de líneas de trabajo preexistentes de 3 diferentes dominios: los mundos de la medicina clínica, la ingeniería y la ciencia. (The National Science Foundation , 2003).

Los médicos e investigadores no-clínicos llegaron al estado de incorporar células vivientes en soluciones pioneras o prototipos de ingeniería de tejido mucho antes de la emergencia generalizada del concepto. Algunos ejemplos de esto son:

Injertos Vasculares: Las primeras exploraciones por los cirujanos de la posibilidad de trasplantar vasos sanguíneos tomó lugar hace más de un siglo atrás; el renombrado investigador cirujano Alexis Carrel fue galardonado con el premio Nobel de fisiología o medicina en 1912 por la demostración de técnicas exitosas de anastomosis de vasos sanguíneos y por la extensión de esa técnica desde el trasplante de vasos al trasplante de órganos sólidos enteros. En las siguientes décadas , el uso experimental de vidrio rígido y tubos de metal como injertos vasculares produjo resultados decepcionantes.

A principios de 1950s, Voorhees demostró el primer uso de tubos de fabricación sintética como prótesis arterial. Con el uso expandido de varios injertos sintéticos en la práctica clínica y la investigación en marcha de las características de materiales alternativos, cirujanos e investigadores de biomateriales ganaron gran conocimiento de la trombogénesis y otros problemas resultantes de la interacción entre los materiales sintéticos y la sangre e injertos que rodean el tejido con el que tienen contacto. El concepto de injerto vascular reabsorbible fue introducido en los años 1960s, y el primer injerto completamente reabsorbible fue reportado en 1979. Mejoras en el proceso de curación de injerto vascular Dacron vía pre-sembrado con células endoteliales fue reportado en 1978. Finalmente, el primer intento de crear una estructura vascular enteramente in vitro, usando colágeno y células vasculares cultivadas, fue reportado en 1982. (The National Science Foundation, 2003).

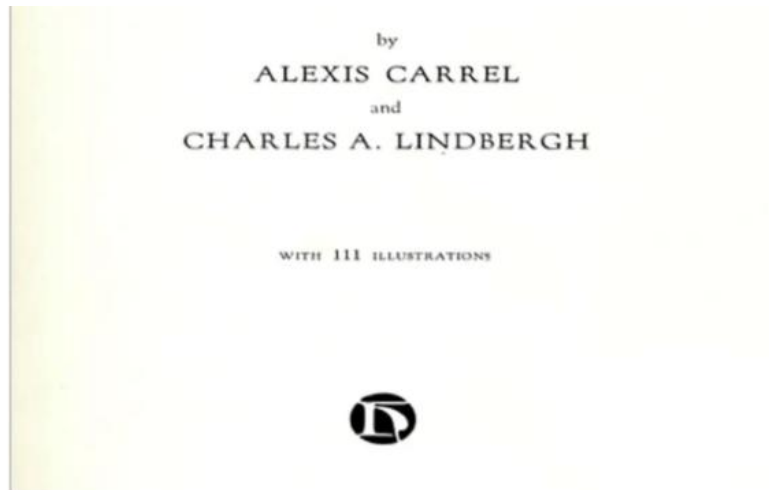


Figura 4. Portada del libro “The culture of organs” de los científicos Alexis Carrell y Charles Lindbergh, pioneros de la ingeniería de tejido.

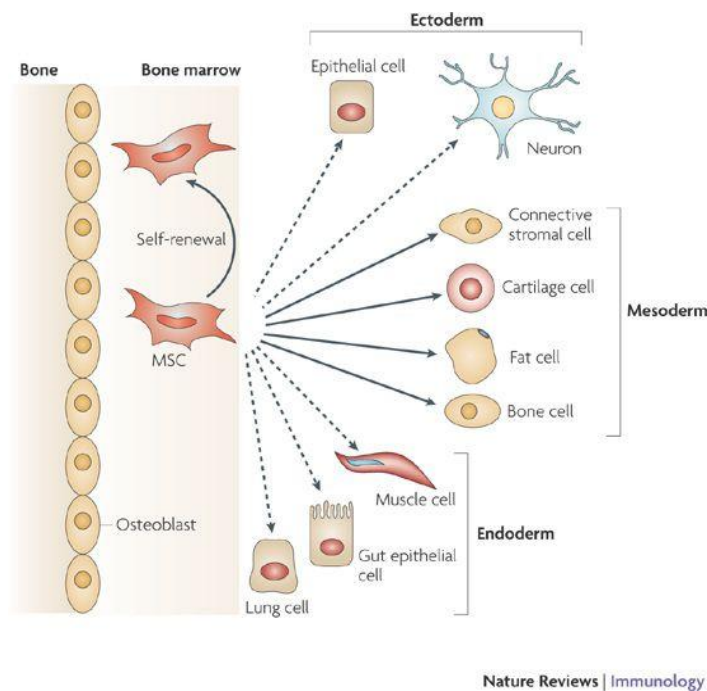


Figura 5. Las células madres son un tipo de células que pueden diferenciarse en otros tipos de células. Uno de los tipos de células madres más utilizados son las mesenquimales (MSC por sus siglas en inglés) .

Más adelante en los antecedentes (página28)hablaremos con más detalle de la ingeniería tisular en huesos.

Campos de investigación científica que han contribuido a la Ingeniería de tejidos

Tabla 1: Campos de investigación y subcampos que han contribuido en la Ingeniería de Tejidos

Biología Celular y Biología del desarrollo

Diferenciación celular , morfogénesis y *tissue assembly*
Interacciones Célula-célula y célula-matriz
Factores de crecimiento
Aislamiento y selección de células
Cultivo celular
Angiogénesis
Células madres

Ciencia veterinaria y Medicina básica

Anatomía
Citología
Fisiología y patofisiología

Ciencia de los Trasplantes

Inmunología aplicada -inmunosupresión , inmunomodulación e immunoaislamiento
Preservación de Órganos

Biomateriales

Polímeros Naturales y sintéticos, biodegradables y no-biodegradables
Química de Polímeros
Cerámicas
Interacciones de Células con biomateriales
Liberación de controlada de moléculas bioactivas
Microencapsulación
Técnicas de Microfabricación
Técnicas de fabricación 3D
Química de superficies

Biofísica y biomecánica

Transporte Molecular y celular
Dinámica de Micro- macro circulación

Mecánica Celular y tisular

Ingeniería Biomédica

Bioreactores

Membranas y filtración

Ingeniería de articulaciones Músculo-esquelética

Sensores Biomédicos

Procesamiento de señales Biomédicas , feedback y control

Ingeniería Mecánica y Eléctrica de sistemas bio híbridos

Diseño de Ingeniería y Análisis de sistemas

Caracterización Cuantitativa de tejidos

Biosensores y bioelectrónica

(The National Science Foundation , 2003).

Diversos mecanismos de regeneración endógena y reparación de órganos en Mamíferos

Plasticidad en la regeneración

Los tejidos difieren mucho en su habilidad para regenerarse:

La piel y el tracto gastrointestinal se reparan muy efectivamente.

El tejido del cerebro se repara de forma muy ineficiente. (Ito *et al.* 2007 ; Rognoni *et al.*, 2016).

La plasticidad es la habilidad de las células diferenciadas de convertirse en células madre o de Interconversión entre distintas poblaciones de células madre. (Merrell *et al.*, 2016)

Este concepto de plasticidad contradice el clásico concepto de “diferenciación terminal” (e irreversible) donde las células madre resultan en células post mitosis. Ahora hay muchos ejemplos donde células comprometidas con una línea celular pueden re-entrar a ser células madre después de una lesión. (Rajagopal *et al.*, 2016; Donati *et al.*, 2017).

Wells y Watts en su artículo de 2018, nos menciona 6 mecanismos de plasticidad:

1-Mecanismos de Plasticidad intrínseca de celular

La plasticidad de tejido adulto puede lograrse con de- diferenciación o trans- diferenciación desde un tipo de célula a otra.

La plasticidad está relacionada a lesiones la mayor parte del tiempo, pero esto no tiene que ser obligatorio. Existen casos como el de la activación de la *B cadenina* que en epidermis no dañada puede cambiar las células madre entre poblaciones de linajes diferentes. Esto puede deberse a que la *B cadenina* puede reprogramar el tejido conectivo, la dermis, a un estado neonatal al secretar moléculas señal como *hedgehog*. (Lichtenberger *et al.*, 2016.).

Existen numerosos ejemplos del uso de *factores de transcripción* que inducen a la plasticidad por medio de la *expresión autónoma de genes*. Un ejemplo es el del páncreas el cual, a pesar de tener una muy limitada capacidad de regeneración en condiciones homeostáticas, posee células multipotentes que pueden ser activadas.

2-Plasticidad inducida por lesiones

La inducción de pluripotencia debido a la expresión de factores de transcripción han demostrado que la plasticidad puede ser inducida en casi todas las células somáticas.

Sin embargo, en la naturaleza, la regeneración es asociada con lesiones y daño. Por ejemplo, en el intestino la ablación de células madre mediada por el receptor de toxina de la difteria produce progenitores que adquieren propiedades similares a las de células madres contribuyendo a su regeneración. (Stange *et al.*, 2013).

Otro ejemplo es el de la presencia de la bacteria *Helicobacter pylori*, la cual produce un daño crónico y puede directamente amplificar la respuesta regenerativa y causar cambios epiteliales (Mills *et al.*, 2015).

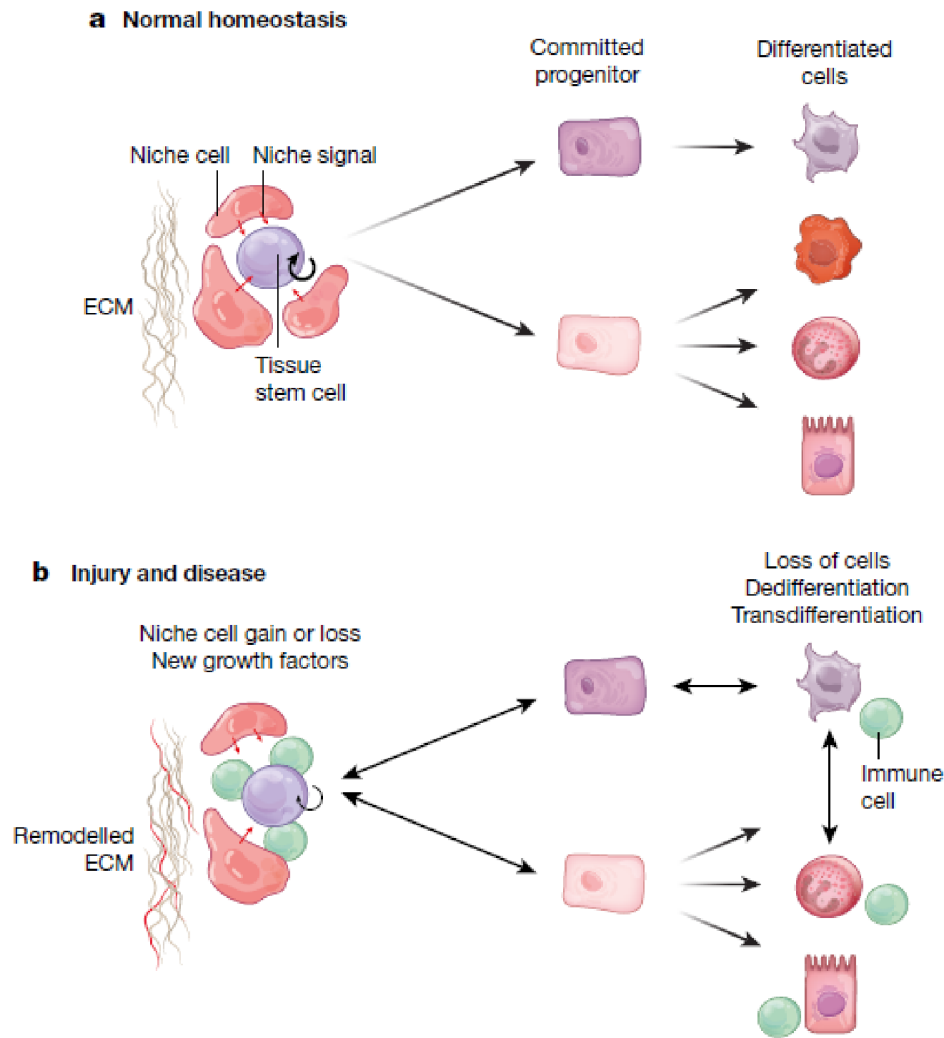


Figura 6. Mecanismo general de la plasticidad. (a) Bajo una condición homeostática normal, las células madres se auto renuevan y generan linajes diferenciados en una vía unidireccional vía progenitores comprometidos. El destino de las células madres, ya sea la auto renovación o la generación de células diferenciadas, es influenciado por señales desde el nicho , incluyendo señales provenientes de tipos de células específicas, señales solubles y matriz extracelular (ECM). (b) En el contexto de la lesión tisular o enfermedad, células madres o células progenitoras y sus progenie diferenciada exhiben plasticidad, incluyendo de diferenciación y trans-diferenciación. Esto es llevado, en parte, por señales de nichos alterados, incluyendo nuevas interacciones con las células del sistema inmunológico y el remodelaje de ECM. (Well *et* Watts, 2018).

3-Plasticidad inducida por inflamación e infección

El sistema inmunológico media las respuestas inflamatorias inducidas por microbios y lesiones, produciendo mediadores de citoquinas y señales proinflamatorias. Las células residentes sienten estas señales y responden migrando, proliferando y regenerando tejidos. (Michael, *et al.*, 2016).

En términos de *modulación de la inmunidad de células madre* parece ser inversamente relacionado con la habilidad de regenerar tejido dañado. (Aurora *et al.*, 2014).

Existen numerosos estudios donde se demuestra que sistema inmune puede facilitar la reparación endógena. (Aurora *et al.*, 2014; Shook *et al.*, 2016; Ali *et al.*, 2017; Patel *et al.*, 2013).

La inflamación también facilita la reparación proteínas reguladoras de células madre como la *Lgr5*, la cual es directamente regulada por mediadores inflamatorios. (Cosin-Roger *et al.*, 2017; Jia *et al.*, 2016).

Estudios sugieren que la inflamación puede activar memoria epigenética de lesiones y vías de señalización inmune que tienen un role en la *reprogramación nuclear* (*transflammation*, en inglés), por ejemplo, la vía de las especies de oxígenos reactivos. Si la piel inflamada recibe una herida, es curada. Si vuelve a ser herida, se cura más rápidamente que la primera vez. (Naik *et al.*, 2017; Meng *et al.*, 2017). Este mecanismo se puede llevar a cabo porque las células epidérmicas mantienen una accesibilidad cromosómica a los *genes de respuesta al estrés* que son activadas por el estímulo inflamatorio original (Ori *et al.*, 2017).

4-Matriz extracelular y adhesión célula- célula

Las lesiones no sólo inducen inflamación, sino que también cambios en las interactivas adhesivas entre células y su ambiente. El daño epitelial puede llevar a una pérdida de proteínas membranales y deposición de una nueva matriz extracelular con una composición de proteínas. Este tipo de lesiones también pueden llevar a pérdida de células vecinas y la interacción con otras nuevas, uniéndose, como por ejemplo a la migración celular. (Donati *et al.*, 2017).

Recientes estudios han demostrado que los factores físicos son una parte importante en la determinación de la arquitectura de los tejidos. Uno de los integradores importantes en la posición celular y el destino celular es la actividad *YAP*. *YAP* integra diversas señales, incluyendo *Notch*, *Wnt* y ECM y la adición intercelular. (Wells *et Watts*, 2018)

Uno de los mecanismos por los cuales las lesiones pueden inducir plasticidad es por la modulación del citoesqueleto. Por ejemplo la inhibición de *Rho-kinasa* lleva a expansión de células madres epiteliales en cultivos. La inhibición de la señal *SMAD* lleva a la expansión de células basales en varios tipos de células epiteliales, *in vivo* e *in vitro*. (Wells et Watts, 2018).

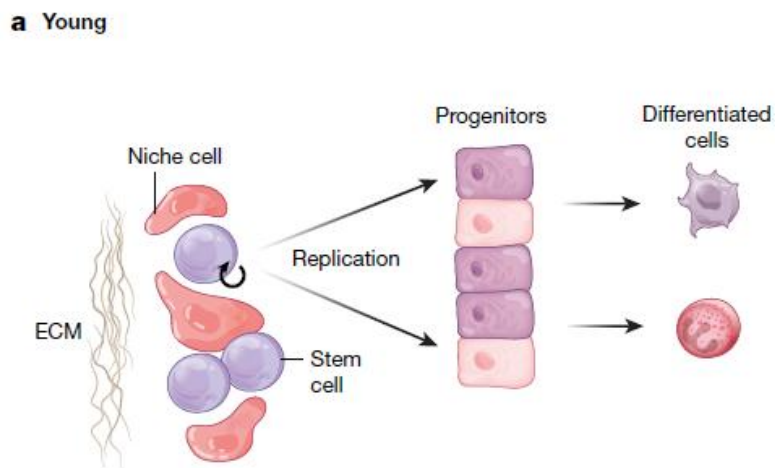
5-Envejecimiento y regeneración

La integridad celular, la función de los órganos y la capacidad regenerativa toda decae con la edad. (Wells et Watts, 2018)

Los mecanismos celulares intrínsecos que llevan a un envejecimiento de las células madres son la pérdida de telómeros, cambios epigenéticos, decline de la función mitocondrial y la acumulación de mutaciones en el ADN. (Wells et Watts, 2018)

La parabiosis es una técnica en donde se hace un enlace quirúrgico en el sistema circulatorio entre animales viejos y nuevos. Experimentos con este proceso parece una posibilidad terapéutica para rejuvenecer órganos envejecidos. (Wells et Watts, 2018)

Existen estudios como los realizados por Lapasset *et al.* (2011), endonde mediante la reprogramación del estado pluripotente de las células humanas centenarias se puede combatir el envejecimiento celular. (Wells et Watts, 2018).



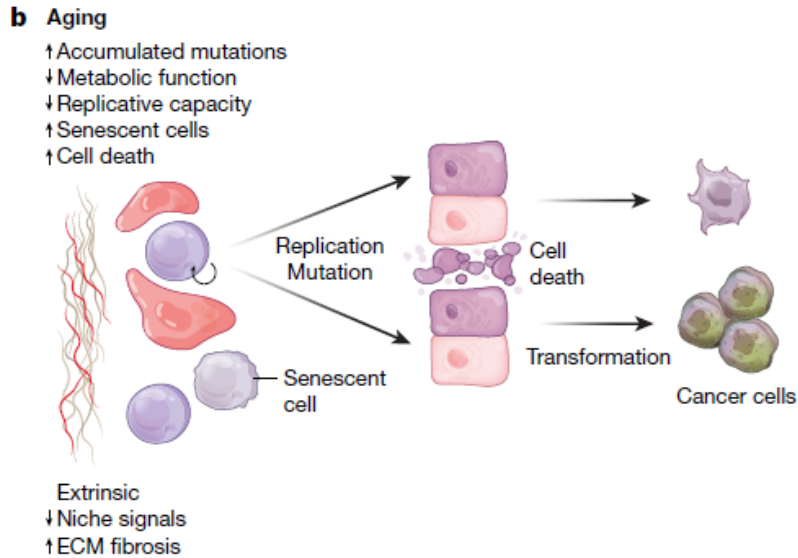


Figura 7. Mecanismo general de envejecimiento. El balance entre la renovación de células madres, la diferenciación y la interacción entre las células madres y el nicho (a) alterado por el envejecimiento, (b) cambios asociados al envejecimiento son intrínsecamente celulares, como los son la acumulación de mutaciones y cambios asociados al nicho, como lo son las matriz extracelular (ECM) fibrótica.

(Wells *et Watts*, 2018).

6-Plasticidad y cáncer

Wells y Watts, en su *review* del 2018 nos siguen contando que una desventaja de inducir la plasticidad para rejuvenecer tejidos es el riesgo de cáncer.

Ellos, (Well y Watts, 2018), también nos informan que existen “mecanismos salvavidas” contra el cáncer, como lo son la muerte celular programada, la senescencia y la diferenciación, las cuales pueden ser responsables de la reducción del número de células madres y su actividad a medida que envejecemos. Prosiguen diciendo que Brown *et al.* (2017) encontró que células *wild type* contiguas tenían la habilidad de corregir comportamientos aberrantes epidermales si contaban con mutaciones de la *Beta catenina*.

7-Prospectos terapéuticos

Well y Watts, 2018 nos informan que análisis computacionales de los estados de transición de las células indican que podría ser posible, por medio de fármacos, estabilizar estados celulares particulares, como los son las células madres, células comprometidas o células diferenciadoras.

Ejemplos de Terapias celulares y genéticas:

Hoy en día se realizan éste tipos de terapias en Instituciones como el *Wake Forest Institute for regenerative Medicine*.

Este instituto menciona en su página que hay casos donde es mejor curar un tejido dañado que reemplazarlo. Es allí cuando el uso de terapia celular entra en juego. En esta terapia se usan células vivas para promover la curación del tejido. Hoy en día se usa para la reconstrucción de de huesos, cartílagos y problemas de respuesta inmune e inflamatoria.

Estas terapias podrían servir en el futuro en enfermedades del hígado, diabetes, desórdenes neuronales, fallas renales y otras condiciones crónicas.

Estrategias para acelerar las terapias en células madres

Madl *et al.*, en el 2018 nos presentan un *review* diversos mecanismos por los cuales podrían acelerarse las terapias en las células madres.

Aquí sólo los mencionaremos:

1-Expandir las células madres

2-Alterar el estado de la célula

3-Mejorar el *cell delivery*

4-Mejorar los modelos cultivo celular humano

Mecanismo de Regeneración en el anfibio *Axolote*

El fenómeno de la regeneración de las extremidades de la salamandra *Axolote* a sido el tema de estudio de algunos investigadores debido al contraste entre la limitada capacidad regenerativa del ser humano (por ejemplo en el hígado) y la alta capacidad regenerativa de este anfibio. Indudablemente podría dar mucha información en el campo de la medicina regenerativa e ingeniería de tejidos.

Algunos de los científicos que investigan este animal son Bryant y su equipo (2017). Ellos mencionan que el proceso de reemplazar una extremidad amputada en esta salamandra requiere varios pasos (rápido sellado de la herida por un *blood clot*, sellado del plano de amputación de la herida por la llamada *wound epidermis*, inervación de la *wound epidermis/epithelium* y la proliferación del blastema) y diferentes tipos de tejido.

Ellos, (Bryant et al.,2017), observaron que amputaciones repetitivas disminuían la capacidad de regeneración del miembro. Sin embargo se dieron cuenta que amputaciones en planos seriados permitía una mejor regeneración que amputaciones en el mismo plano.

Bryant *et al.*, también se percataron de que hay genes que se sub-expresan y otros que se sobre-expresan cuando hay una amputación repetidas en una extremidad del *Axolote*. Ellos se centraron en el gen *amphiregulin* (*areg*) y encontraron que la sobre expresión disminuye la regeneración del miembro del *Axolote*, ya que retrasa la formación del blastema. Sin embargo la no expresión de *Amphiregulin* promueve engrosamiento epitelial y disminuye la proliferación interna durante la regeneración de la extremidad.

Sin embargo, también encontraron que la hiperactivación de la vía mTOR promueven la curación de las heridas epiteliales sugiriendo que ésta vía regula la expresión de *amphiregulin* en heridas en la epidermis durante la regeneración de extremidades. (Bryant et al.,2017).

Finalmente pude observar en éste artículo que la expresión de *areg* es una señal inicial de curación de heridas pero si la presencia de esta molécula se prolonga demasiado impide las próximas etapas de curación de la extremidad. La *amphiregilina* ha sido encontrada en el hígado de mamíferos. (Bryant et al.,2017).

Algunos compuestos que podrían ayudar a la medicina regenerativa

Glucosa

La glucosa es un hidrocarburo. Es la fuente central de energía para todas las células. (Li *et al.* 2007).

La sinergia entre la glucosa y la proteína RUNX2 orquestan la diferenciación osteoblástica y la diferenciación de los huesos. (Wei *et al.*, 2015).

En trabajos como los de Moya *et al.* (2017) se ha determinado que el agotamiento de glucosa como fuente de energía y el posterior uso de reservas intracelulares de energía a través de la glucólisis explica la poca supervivencia de las células después de su implantación.

Estudios como los de Deschepper *et al.*, (2013) han medido la capacidad citoprotectora del hidrocarburo glucosa en células madres mesenquimales humanas (hMSC).

Qué propiedades citoprotectoras nos indica el artículo?: Según los resultados se demostraba mayor protección a las células a condiciones de hipoxia y a condiciones cercanas a anoxia *in Vivo*. Esto se puede deber a la sobre expresión de *Hf-1 alpha*, un factor de transcripción importante en la respuesta de la célula a hipoxia ya que activa una gran cantidad de genes envueltos en la angiogénesis. (Deschepper *et al.*, 2013).

Li *et al.* (2007), nos informa que la glucosa tiene un efecto en la regulación, proliferación, diferenciación, apoptosis y senescencia de las células. En MSC de ratas, la reducción de la glucosa estimula la proliferación celular pero una gran cantidad de glucosa aumenta la apoptosis. Li y sus colegas concluyeron altas cantidades de glucosa estimulan Txnip (*glucose-responsive gene thioredoxin-interacting protein*) en MSC y crean situaciones pro-apoptóticas, que en teoría ayudan a reducir la funcionalidad y capacidad regenerativa de las MSC bajo exposición crónica. Por esto es importante tener en cuenta cantidad adecuada para que la glucosa ayude a la regeneración en MSC.

Trehalosa

La trehalosa es un disacárido compuesto por dos moléculas de glucosa unidas por un enlace alpha, alpha-1, 1. Este disacárido no cuenta con poder reductor. (Higashiyama *et al.*,2002).

Existen estudios como los de Albein *et al.*(2003) y Higashiyama *et al.* (2002) donde mencionan que la molécula de trehalosa es una molécula multifuncional.

Existen estudios (Guo *et al.*,2000)en donde la trehalosa confiere tolerancia a la desecación en células humanas. En el estudio de Guo se logró expresar los genes *otsA* y *otsB* de la bacteria *Escherichia coli*,(los cuales codifican las enzimas biosintéticas de la trehalosa), en fibroblasto primario humano usando un vector de adenovirus recombinante. Estos fibroblastos fueron capaces de ser dejados en condiciones de desecación más de cinco días. Este estudio demostró que las células de mamíferos pueden ser modificadas para retener viabilidad en ausencia de agua.

Otros estudios como los de Kandrór *et al.* (2002) prosiguen la investigación con las genes *otsA* y *otsB*. Sus resultados sugieren que la acumulación de la trehalosa es vital en la viabilidad de la bacteria *E. coli* en bajas temperaturas. También los resultados sugieren que para inducir dichos genes se necesita el factor sigma relacionado al estrés *RpoS*. También existe una adaptación post-transcripcional de los genes *otsA* y *otsB* al ser inducidos a temperaturas de 16° C. Así mismo, hicieron avances en cómo la trehalosa protege a las células en contra de baja temperaturas.

Higashiyama *et al.* mencionan en su estudio que encontraron un mecanismo de estabilización de ácidos grasos no saturados por medio de trehalosa.

Es interesante mencionar que incluso varios grupos de jóvenes científicos en el concurso internacional de Biología Sintética iGEM (igem.org), han logrado crear *biobricks* capaces de sintetizar moléculas de trehalosa. (iGem team, Japan, 2014; iGem team China, 2017), demostrando que hay interés y aplicabilidad potencial para esta molécula.

BREVE HISTORIA DE LA INGENIERÍA TISULAR ÓSEA.

Una variedad de materiales generalmente percibidos como inertes, como varios metales y aleaciones, han sido usados por varios años para reemplazar huesos dañados o para promover soporte para sanar huesos. Con experiencia, sin embargo, se a vuelto claro que materiales no biológicos no permanecen biológicamente inertes en el ambiente del cuerpo humano, al contrario, provocan reacciones cuya intensidad es relacionada a una variedad de factores como la sitios de implantación, el tipo de trauma al momento de la cirugía, y el material preciso en uso. Empezado en los 1970's, los materiales bioactivos, tales como los vidrios porosos y las cerámicas hidroxiapatita, fueron examinados como alternativas, como las que demostraron la formación de tejido normal sobre las superficies. (The National Science Foundation , 2003).

Además del desarrollo de nuevos biomateriales, el crecimiento y capacidades regenerativas inherentes del hueso han sido también el tópico de estudios clínicos y científicos por décadas. En una publicación de 1945 en *Nature*, Lacroix hipotetizó que la *osteogenina*, una sustancia en los huesos, era responsable de su crecimiento. Veinte años después, en 1965, Marshall Urist probó que eso era, de hecho, una sustancia o combinación de sustancias presente en diferentes huesos, los cuales cuando fueron trasplantados, podían inducir el crecimiento de nuevos huesos. Los descubrimientos de Urist envalentonó a varios científicos a investigar los factores precisos que propiciaban la inducción de huesos. Durante la década de 1970s y 80s, los investigadores demostraron que el proceso es mediado por una categoría de factores de crecimiento, llamados proteínas morfogénicas de huesos (*bone morphogenetic proteins* or BMPs), los cuales actúan como una cascada de múltiples pasos que hace reminiscencia a la morfogénesis de huesos de embriones. Reddi y colegas desarrollaron técnicas para aislar estas proteínas de la matriz extracelular de los huesos. Los resultados son prometedores, también, por la inducción de cartílago, ya que los BMPs inicialmente inducen a una cascada de condrogénesis y puede ser llamada fácilmente proteínas morfogénicas de cartílago. El trabajo de aislamiento, purificación y proliferación de BMPs continuó a lo largo de la década de 1980s. (The National Science Foundation , 2003).

Componentes estructurales de los huesos

Los componentes estructurales del hueso son los osteoblastos, osteoclastos y osteocitos. Los osteoblastos ayudan a la formación y mineralización del hueso. Los osteoclastos ayudan a la reabsorción de los minerales del hueso. Los osteocitos son osteoblastos maduros y son formados a partir de éstos. (Figura 8) (Redlich *et al.* 2012)

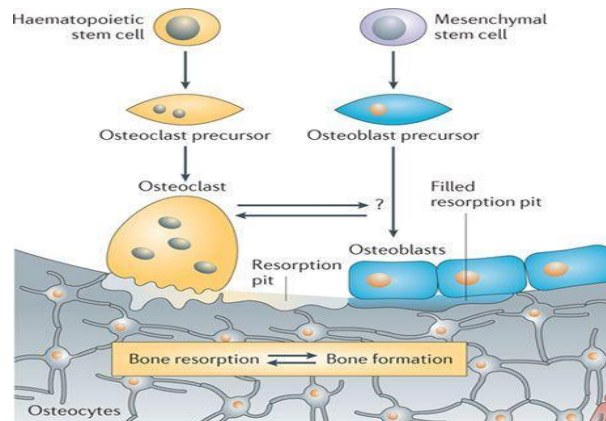


Figura 8. Componentes estructurales del hueso.

Vías de señalización de la osteo-diferenciación

El fenotipo osteoblástico se caracteriza por la producción de *osteocalcina* y *osteoprotegerina (OPG)*, esta producción aumenta cuando la célula se hace crecer en sustratos de Ti hidrofílicos con topografía compleja a escala micrométrica, sub micrométrica y nanométrica (Gittens, 2012).

Los osteoblastos cultivados en superficies nanoestructuradas exhibieron mayor producción de factores que regulan osteogénesis. Ejemplo: prostaglandina E2 (*PGE2*), *OPG*, factor de crecimiento transformante beta-1 (*TGF-B1*) y *BMP-2* (Ong JL *et al.*, 1999). Se atribuye esta producción de factores en estas superficies de Ti a la activación del receptor de *integrina $\alpha 2 B 1$* (Olivares-Navarrete *et al.*, 2008).

Las moléculas Ciclooxygenasas (*Cox-1* y *Cox-2*), parecen tener un efecto estimulador en la diferenciación osteoblástica en superficies micro rugosas. Inhibir estas moléculas con, por ejemplo, la indometacina, afecta dicho proceso (Sisk *et al.*, 2001).

Los osteoblastos producen más *TGF- β 1* latente cuando se cultivan en sustratos microestructurados de Ti. También producen más factor de crecimiento activo. (Boyan *et al.* 2003). *TGF- β 1* aumenta la diferenciación de osteoblastos con respecto a la actividad de fosfatasa alcalina de vesículas de matriz y la producción de colágeno tipo I. (Boyan *et al.* 2004; Bonewald, 1990).

Obstruyendo el receptor de *TGF- β 1* reduce la capacidad de diferenciación de osteoblastos y la producción de OPG, en particular en sustratos microestructurados de Ti. (Schwartz *et al.*, 2009).

El Ligando *RANK* se une al receptor señuelo OPG en la superficie de los osteoblastos, lo que impide la activación dependiente de contacto de *RANK* en el osteoclasto, reduciendo la osteoclastogénesis.

El crecimiento de osteoblastos en sustratos microestructurados de titanio genera un entorno anabólico neto, con aumento de la liberación de factores que estimulan la diferenciación de osteoblastos y regulan negativamente la osteoclastogénesis.

Un paso crítico en la diferenciación de osteoblastos es la activación de la *vía Wnt*. Hay moléculas que regulan ésta vía de señalización, como por ejemplo *Dkk1* y *Dkk2*. Inhibiendo estas moléculas afectan la diferenciación osteoblástica. (Olivares-Navarrete *et al.*, 2010).

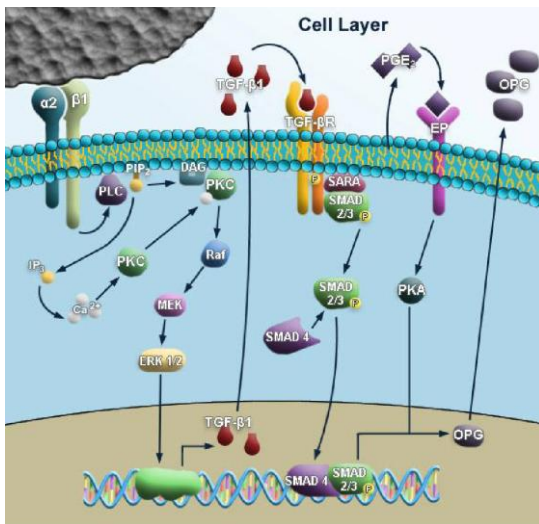


Figura 9. Esquemático mostrando cómo la señalización a través de la integrina $\alpha 2 \beta 1$ puede modular la diferenciación osteoblástica en una superficie de Ti a través de factores autocrinos.

La Osteoporosis

El desarrollo económico de Panamá ha permitido mejorar la esperanza de vida de la población, pero a su vez ha permitido que se manifiesten algunas enfermedades propias de los países más desarrollados como por ejemplo enfermedades crónicas. Un ejemplo es la osteoporosis.

La osteoporosis es una enfermedad músculo-esquelética caracterizada por la baja densidad de los huesos y causa un incremento del riesgo de deterioro de su estructura aumentando la posibilidad de fracturas (Fig. 1). En Panamá se cuenta con poca información epidemiológica sobre osteoporosis (Zanchetta *et* MacDonald, 2012).

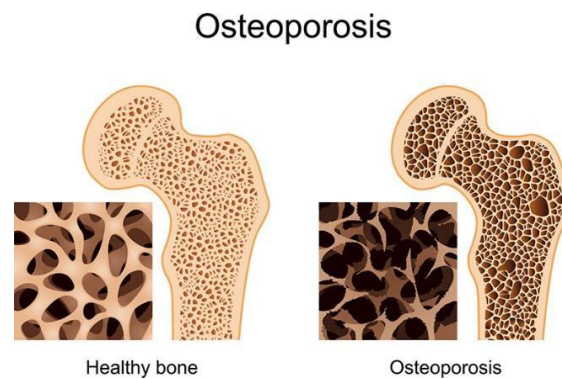


Figura 10. Diferencias estructurales entre un hueso sano y uno aquejado por la osteoporosis.

Diferentes estudios indican que los osteoblastos cultivados en superficies microestructuradas de titanio pudieran servir como el mejor medicamento contra la osteoporosis, ya que promueven la formación de hueso por las dos vías: promoviendo la formación de hueso a través de la activación de osteoblastos e inhibiendo la actividad de resorción del hueso por los osteoclastos. (Gittens, 2017).

Células MG63

La línea celular MG63 proviene del osteosarcoma humano. Expresan características fenotípicas similares a osteoblastos inmaduros. Gracias a esto son utilizadas para evaluar el rol de distintas propiedades superficiales del titanio ya que este metal tiene la capacidad de diferenciar las células hacia osteoblastos maduros. (Gittens *et al.* 2012).

En etapas futuras de este proyecto se espera utilizar esta línea celular para poder ver su capacidad de adherirse a las partículas/microtransportadores de titanio y diferenciarse a osteoblastos.

Ya en 1998, Lincks *et al.* Las células MG63 tienen varias características:

- a) Son obtenidas del osteosarcoma humano
- b) Han sido bien caracterizadas
- c) Tienen unas características típicas de osteoblastos inmaduros: Estimulación de actividad alcalina fosfatasa y síntesis de osteocalcina. Inhibición de de la proliferación en respuesta de tratamientos con $1\alpha, 25-(OH)_2 D3$.
- d) Son buenas para examinar etapas iniciales de diferenciación osteoblásticas.

Sin embargo, Lincks también nos menciona que en esa fecha (1998), las células MG63 presentaban ciertas desventajas:

- a) Las condiciones de cultivo donde la matriz de las células MG63 se mineralizan no se definido así que la diferenciación terminal no puede ser estudiado en estas células aún.

Uso de Titanio en la medicina regenerativa de huesos

El titanio es un metal que tiene un radio favorable entre peso y fuerza y buen rendimiento biológico en huesos en cuanto a su rugosidad y química. (Wall *et al.* 2009).

Ya anteriormente ha habido diversos estudios donde se utiliza el titanio como microtransportador de células en la medicina regenerativa, como por ejemplo: en el trabajo de Schwartz *et al.* (2009) donde él utilizaba superficies de titanio microestructurado para hacer crecer osteoblastos. Incluso se afirma que estas superficies aumentan la osteointegración al producir factores que regulan la formación y remodelación del hueso.

Otro estudio (Qui Liu *et al.*, 2017) nos describe la respuesta que tienen las células osteoblásticas MG63 al estar sobre sustratos de aleación Titanio-Aluminio-Vanadio (Ti6-Al-4V), modificadas por láser con una superficies de 10 mm x10 mm x 1 mm.

En las diferentes etapas de este estudio se utilizaron discos de titanio, discos de aleación de titanio Ti6Al4V, microtransportadores de aleación de titanio (Ti90Al6V4) y microtransportadores de Ti 99.9%. Todas estas variantes del metal titanio se hizo con el fin de probar con qué tipo de micro y nano modificaciones las células madres podrían ser más compatibles. Se sabe que el Vanadio puede tener ciertos niveles de citotoxicidad, pero al estar unido en una aleación con los otros metales es bastante estable.

En esta tesis nos centraremos en los resultados del trabajo en partículas Ti 99.9%.



Figura 11. Propiedades del titanio.

Figura 12. Ejemplo de implante de titanio.

Utilización de discos de Titanio

Gittens et al (2011, 2012) en sus estudios nano-modificaron superficies de titanio. La metodología de nanomodificación puede resumirse en la siguiente imagen:

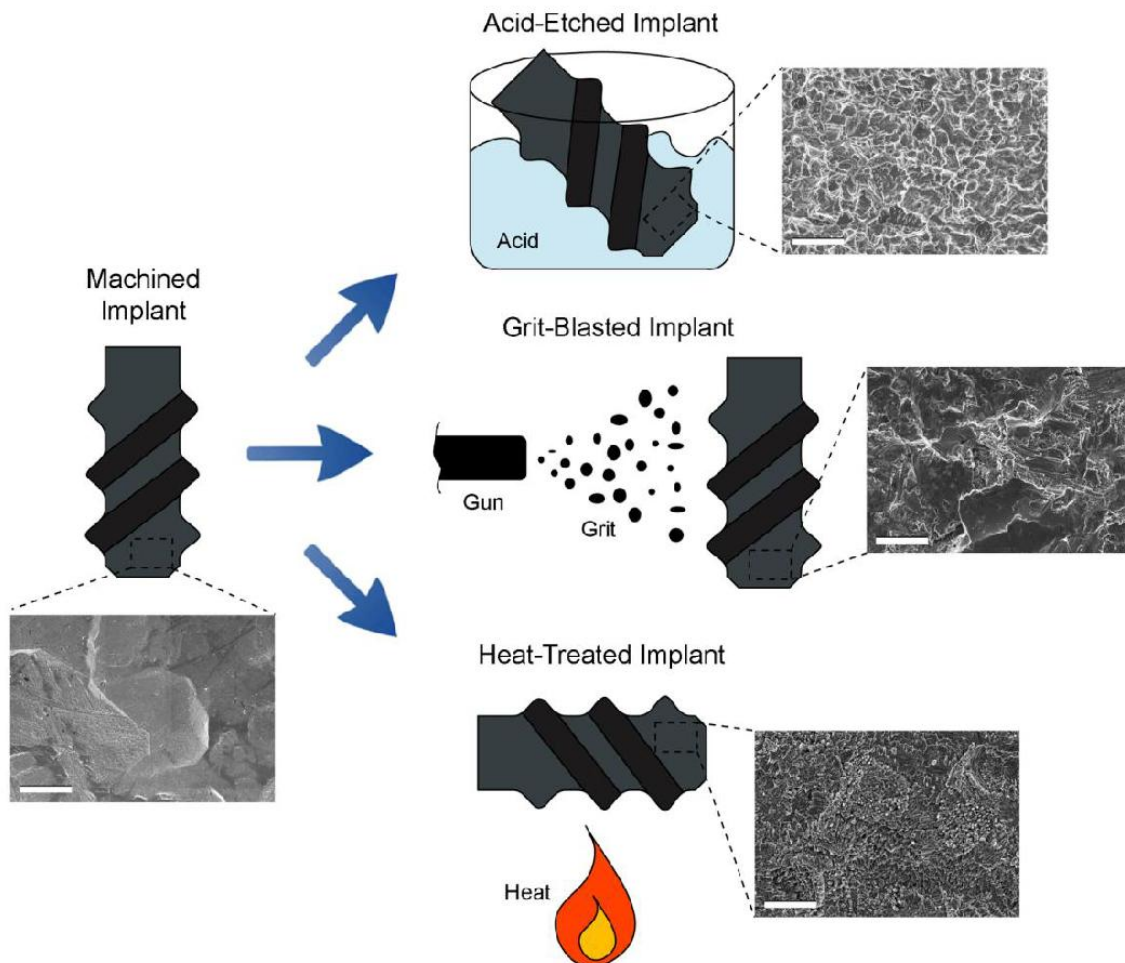


Figura 13. Esquema de métodos y resultados (con imágenes SEM) en discos de titanio. Las modificaciones incluyen proceso de acidificación (acid etching), chorreado abrasivo (grit blasting) y tratamiento de calor.

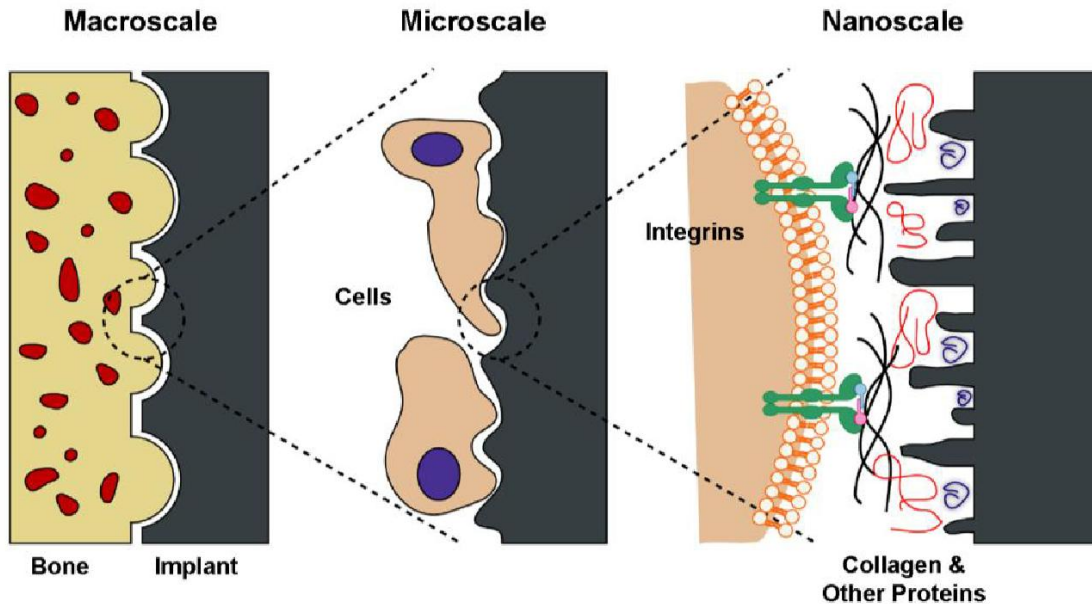


Figura 14. Interacciones entre hueso y la superficie del implante a diferentes escalas.

En la macro-escala , el implante debe proveer buena fijación mecánica con el hueso. Las características a micro-escala presentadas en la superficie, de similar tamaño que los osteoblastos y las células madres mesenquimales, pueden constreñir físicamente la morfología celular. En la nano-escala, los receptores de membrana celular, tales como las integrinas, pueden reconocer proteínas absorbidas en la superficie, las cuales a su vez son moduladas por nanoestructuras en la superficie.



Figura 15. Esquemático de la relación directa e indirecta entre las propiedades superficiales del titanio y los procesos biológicos y celulares que se necesitan para la osteointegración.

En el estudio realizado por Gittens *et al.* (2012) capítulo 3: “*The effects of combined micro/sub-microscale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation*”, utilizaron discos de titanio de 15 mm y se obtuvieron a partir de hojas de 1 mm de espesor de Ti sin alea de grado 2 (Ti ASTM F67 sin alea, para aplicaciones de implantes quirúrgicos).

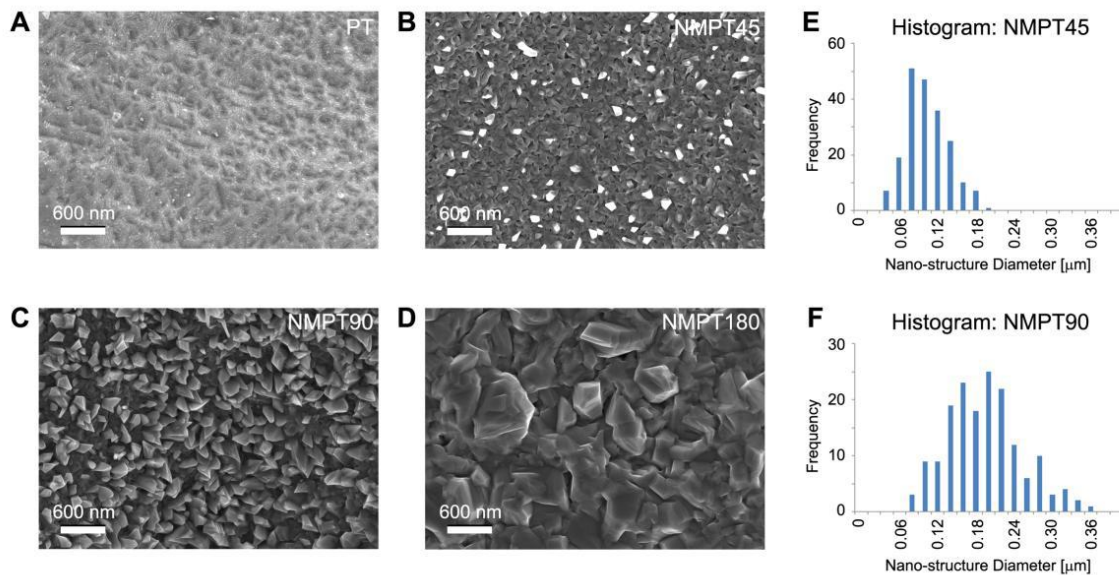


Figura 16. Evaluación morfológica de la evolución de la nanoestructura con el tiempo. Tratamiento a nano escala (NM-treatment) de (A) Superficies pre-tratadas (PT surfaces) vía oxidación con flujo de aire sintético (21 % O₂, 79 % N₂) a 740 °C por estos tiempos: (B) 45 minutos; (C) 90 minutos; (D) 180 minutos.

El proceso de modificación obtenidas: (B) protuberancias a nanoescala con pequeñas coberturas de superficie después de 45 minutos; (C) una relativamente alta densidad de nanoestructuras después de 90 minutos; y (D) estructura gruesa después de 180 minutos.

Estas imágenes SEM son representativas de la superficie de los discos pretratados de titanio. (E, F) Análisis de imágenes SEM revelando la distribución de los diámetros de las estructuras de las nanoescalas formadas después de 45 minutos y 90 minutos, respectivamente.

Etapa de la utilización de células MG63 en discos de Titanio

En esta etapa del estudio (Gittens *et al.*2012, capítulo 3) se ha comprobado que las células MG63 (osteoblastos inmaduros) responden a nano-estructuras en micro- rugosidades de titanio (Ti) y que hay un incremento en la cantidad de osteocalcina (marcador de diferenciación osteogénica) y de proteínas osteogénicas sin necesidad de factores solubles, indicando que estas células inmaduras se diferencian a células óseas en los implantes de titanio. Figura 17. (Gittens *et al.*2012).

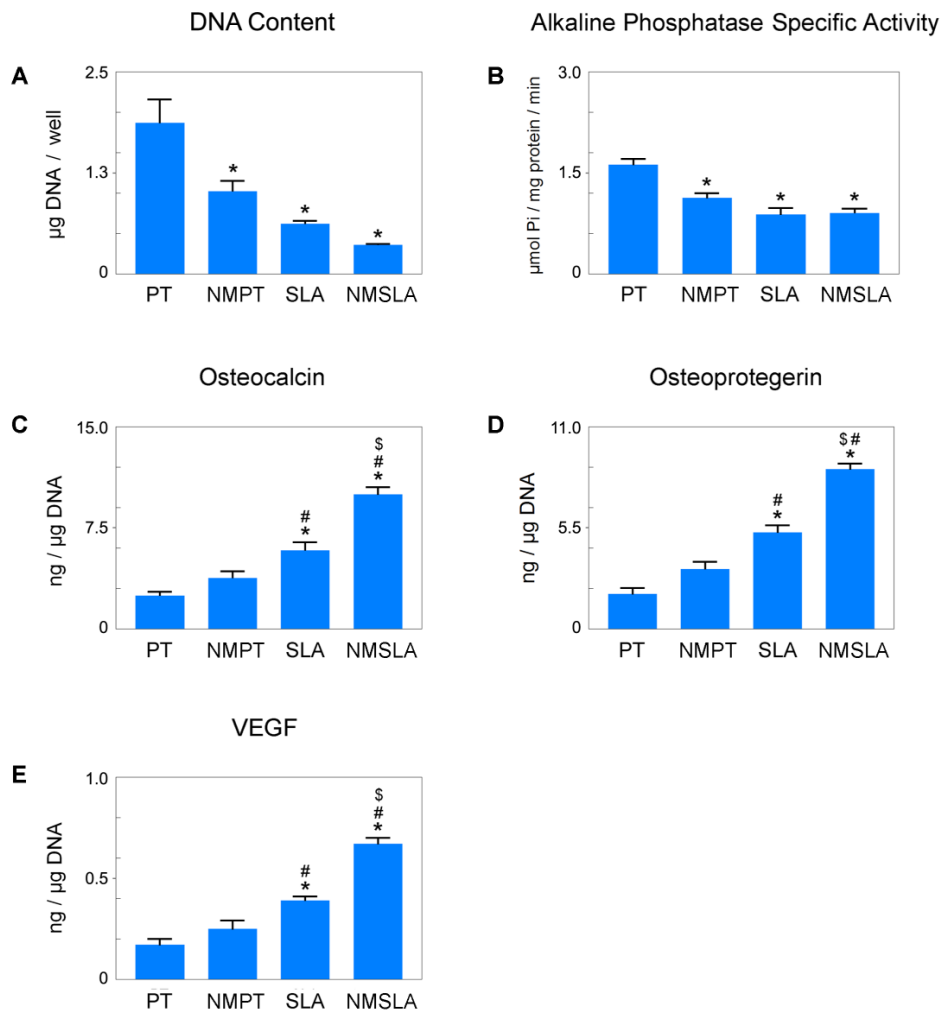


Figura 17.

Etapa de la caracterización de discos de aleación Titanio-Aluminio-Vanadio (Ti6Al4V).

Gittens nos informa que antes de poder utilizar las micropartículas de titanio para su nanomodificación, es necesario realizar la caracterización de las mismas para confirmar que cumplen con los valores nominales del fabricante. Las micropartículas fueron evaluadas por microscopía electrónica de barrido para evaluar su topografía superficial (Fig. 14).

Evaluaciones topográficas de la superficie utilizando microscopía de fuerza atómica y microscopía de láser confocal confirmaron que la rugosidad a la nanoescala aumentó significativamente en las superficies nanomodificadas sin afectar considerablemente la microestructura de las mismas. (Gittens, 2017).

Etapa de la utilización de discos de aleación Titanio-Aluminio-Vanadio (Ti6Al4V).

En la etapa del proyecto, la nanomodificación se pudo aplicar a superficies lisas (pre-tratadas, PT) y microestructuradas (micro-tratadas, MT) de Ti6Al4V. (Fig. 16). (Gittens, *et al.* 2012).

La nanomodificación se realizó a 740 °C utilizando aire sintético (21% O₂, 79% N₂) como entorno gaseoso. El tiempo de modificación fue 45 min, aunque las muestras de Ti6Al4V fueron más robustas a la duración del tratamiento que en el caso de Ti comercialmente puro.

En los resultados de la modificación de las superficies de titanio descrita en la metodología pudimos observar que presentaron micro y nanomodificaciones. Los diámetros de estas nanomodificaciones incluso fueron medidos y se les hizo un histograma. (Figura 18-E y D).

El análisis por microscopía electrónica de transmisión reveló que la rugosidad de la nanoescala aumentó considerablemente y la capa de óxido que se había creado sobre la superficie había aumentado a un espesor 1600 nm, a pesar de que la microestructuras habían permanecido relativamente iguales.

“Differential responses of osteoblast lineage cells to nanopographically-modified, micro-roughened Titanium-Aluminium-Vanadium alloy surfaces”.

En este estudio, Gittens *et al.*(2012) buscaron ver la respuesta de líneas celulares osteoblásticas a superficies con micro rugosidades de titanio-aluminio-vanadio.

Cilindros de aleación de titanio (ASTM F136 forjado en aleación Ti6Al4V ELI para aplicaciones de implantes quirúrgicos) de 15 mm en diámetros fueron cortados en discos de 1.5 mm de grosor y diseñadas para crear superficies relativamente lisa (el control es llamado “sTiAlV”), o doble grabado de ácidos para producir superficies de microrugosidad (designados como muestras “rTiAlV”). (Gittens *et al.*2012).

Esas muestras “sTiAlV” y “rTiAlV” fueron procesados usando un tratamiento simple de oxidación para super-imponer nanoestructuras en la superficie, para producir muestras nanomodificadas en superficies micro-lisas (microsmooth , NMSTiAl), o micro-rugosas (NMrTiAlV). Este tratamiento de oxidación consisten en exponer la muestras a aire sintético (21 % O₂, 79 % N₂) a 1 atmósfera y 740 °C en un tiempo relativamente corto. La oxidación fue conducida por una duración de 45, 90, 180 minutos en todos los especímenes. (Gittens *et al.*2012).

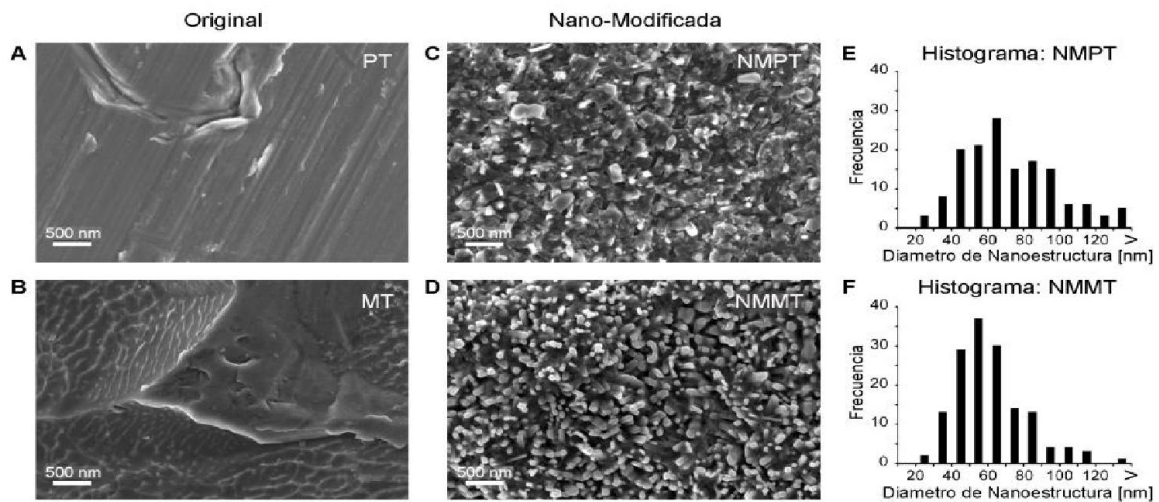


Figura 18. Microscopía electrónica de superficies de **Ti6Al4V** originales (A y B) y nanomodificadas (C y D). Análisis de imagen para el cálculo del diámetro de las nanoestructuras en la superficie (E y D).

Utilización de discos de aleación Titanio-Aluminio-Vanadio con hOB y MSCs humanos.

Caracterización de los discos de la aleación TiAlV

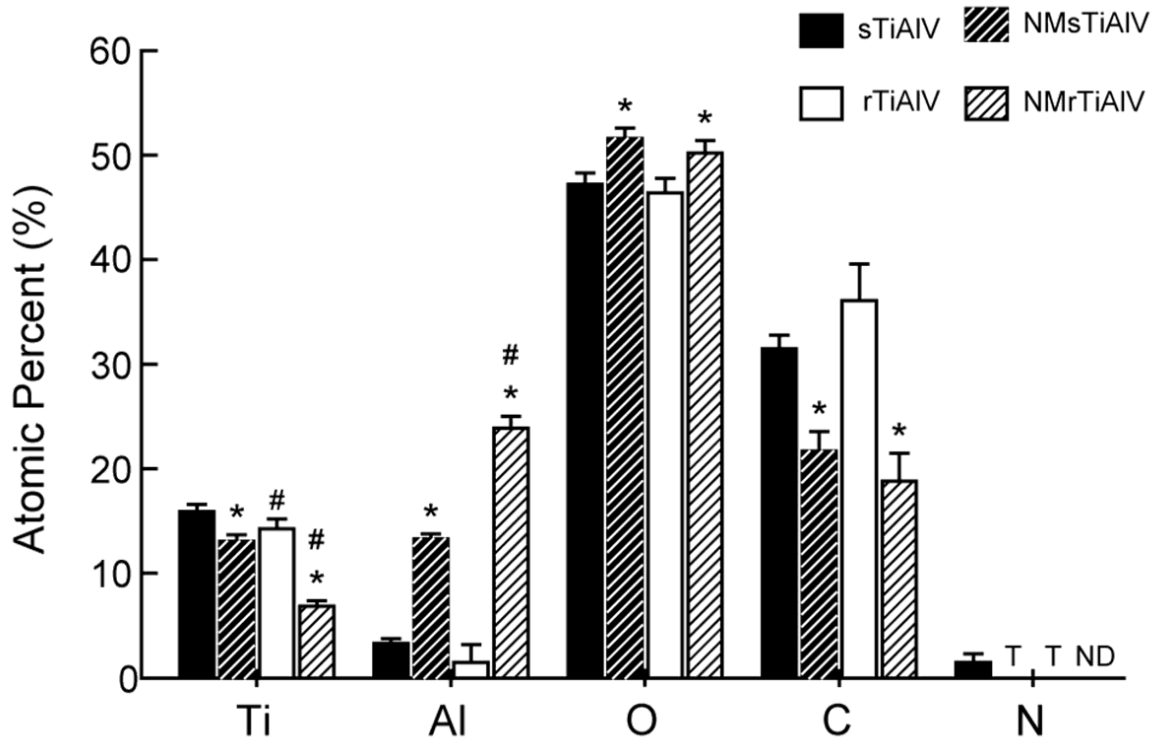


Figura 19. Composición elemental de las aleaciones TiAlV, NMSTiAlV, rTiAlV and NMrTiAlV medidas por XPS. Todas las muestras estaban compuestas principalmente de Ti, Al, y O, con C también presente en la superficie. N también estuvo presente a bajos niveles en las superficies de sTiAlV, mientras que superficies de NMSTiAlV y rTiAlV solo tuvieron trazas (T) y en la superficie de NMrTiAlV no fue detectable (ND).

“Osteoblast Lineage Cell Response to Nanomodified Surfaces” (Gittens et al.2012).

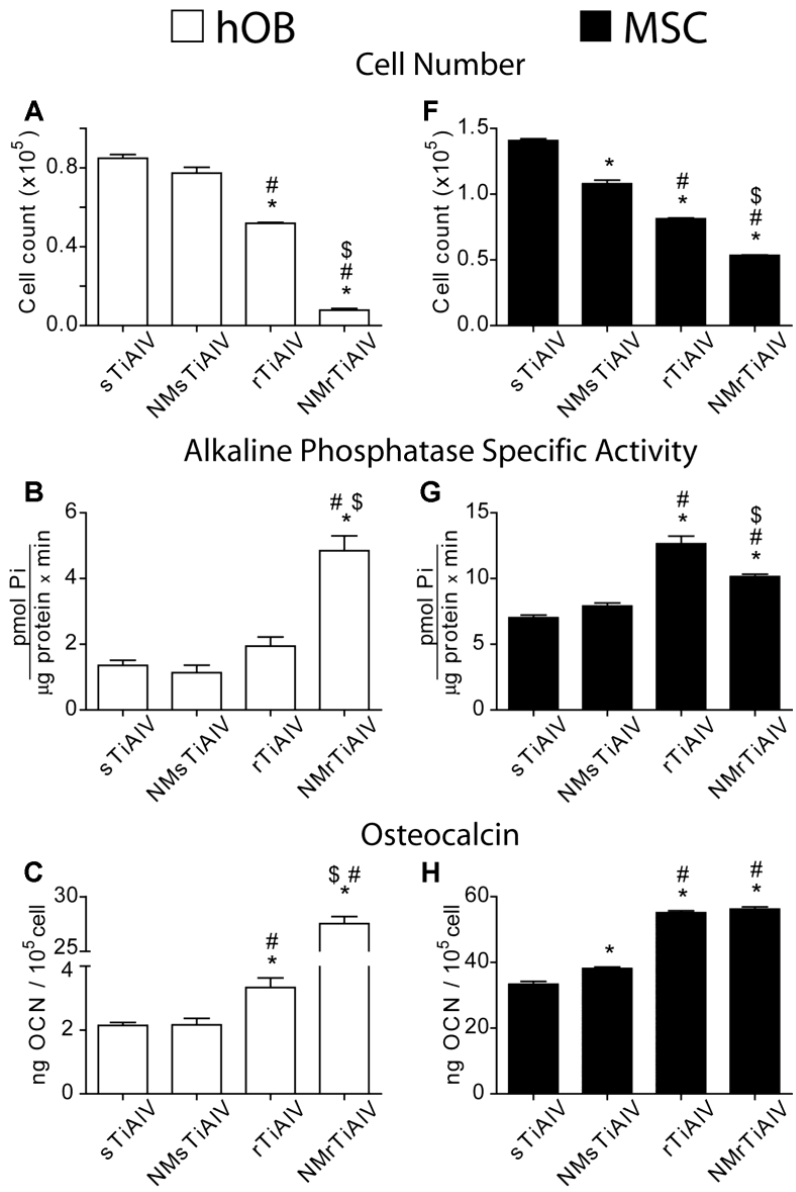


Figura 20.

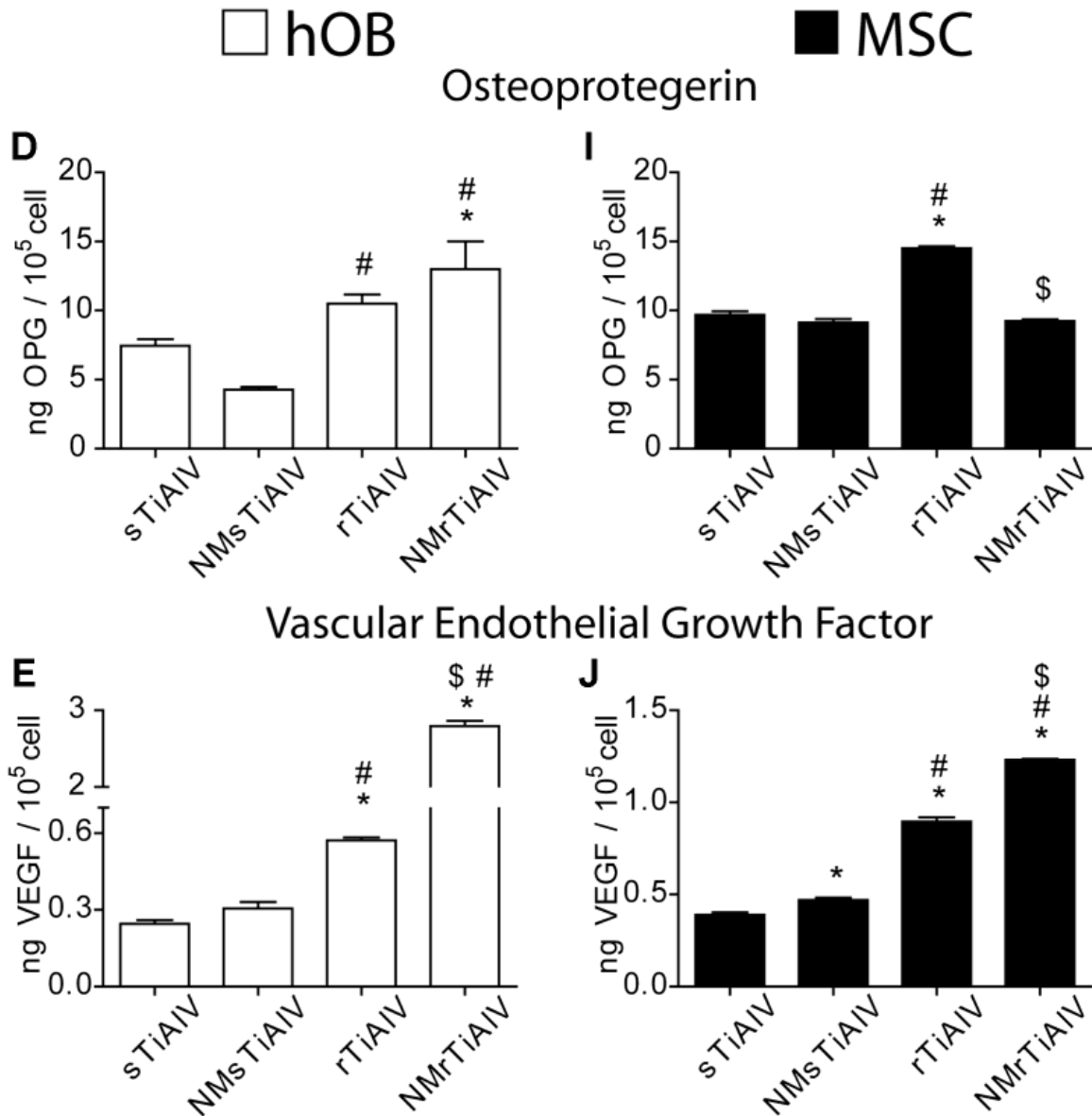


Figura 20. (Continuación) Efecto de modificaciones en la superficie a micro- y nano escala en osteoblastos primarios humanos (hOB) (A-E) y MSCs humanos (F-J). Osteoblastos y MSCs fueron depositados en superficies de sTiAlV, NMSTiAlV, rTiAlV y NMRTiAlV y dejados crecer hasta alcanzar la confluencia. La nanomodificación envuelve oxidación de superficies por flujo de aire sintético por 45 minutos a 740 C. Los niveles de confluencia, (A, F) número de células, (B, G) actividad específica de la fosfatasa alcalina, (C, H) OCN, (D, I) OPG, y (E, J) VEGF.

Partículas de Titanio

Existen varios ejemplos de estudios donde se utiliza partículas de titanio para observar su efecto en células osteoblásticas o en células madres. Podemos mencionar a Wang *et al*, 2002; J. Wu *et al*, 2011; Lee *et al*, 2011; Hou *et al*. 2013, Jiang *et al*. 2013, Ping *et al*. 2017, Gu *et al*, 2017; Zhu *et al*, 2018 y Lian *et al*, 2018.

Etapa de caracterización de partículas de aleación Titanio-Aluminio-Vanadio (Ti90Al6V4).

Antes de poder utilizar las micropartículas de titanio para su nanomodificación, es necesario realizar la caracterización de las mismas para confirmar que cumplen con los valores nominales del fabricante. Las micropartículas fueron evaluadas por microscopía electrónica de barrido para evaluar su topografía superficial (figura 21). (Gittens, 2017)

La caracterización de las partículas de Ti90Al6V4 se realizaron antes de ser nanomodificadas. Las micropartículas de aleación de titanio presentan una forma esférica con circularidad de casi perfecta, y con una superficie relativamente lisa sin características geométricas descriptibles. (figura 21-A).

Las micrografías electrónicas muestran de manera evidente que el rango de tamaños de los especímenes es amplio e incluye lo que parece ser residuo de partículas de pequeño tamaño. Con un programa de análisis de imágenes generamos un histograma del rango de diámetros de las micropartículas (figura 21-B).

La cuantificación muestra que el rango de diámetros tiene un comportamiento bimodal, con un pico dentro del rango nominal esperado de 25 a 45 μm , y otro pico por debajo de 5 a 10 μm , lo que confirma la presencia de residuo de partículas probablemente remanente del proceso de manufactura.

Adicional a la caracterización morfológica por microscopía electrónica, también realizamos espectroscopía de rayos-x por energía dispersiva (EDX) para determinar la composición atómica cercana a la superficie. Los resultados se pueden observar en la figura 22. (Gittens, 2017).

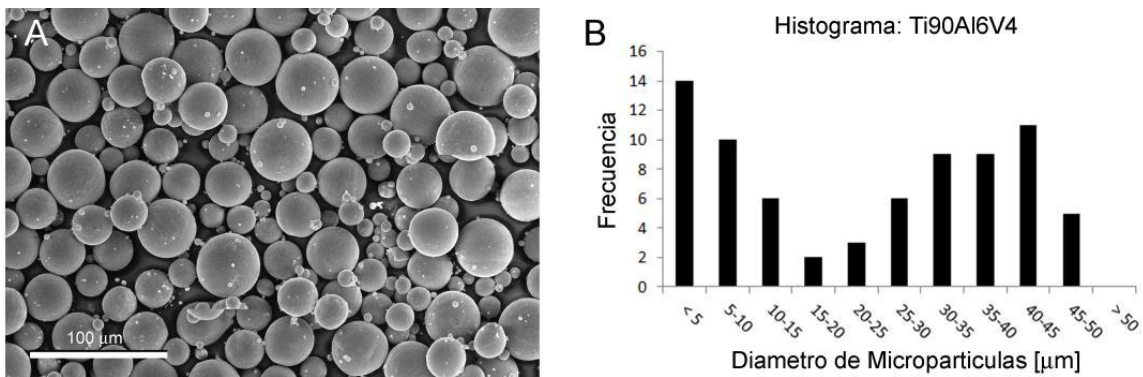


Figura 21. Evaluación morfológica de micropartículas de aleación de titanio. (A) Micrografía electrónica muestra una alta circularidad. (B) Histograma de los diámetros de las micropartículas.

Tabla 1. Espectroscopía de rayos-x por dispersión de energía

Element	Atomic Number	Series	Concentration [wt.% normalized]	Atomic Concentration [wt.% normalized]	Concentration Error 1σ [wt.% normalized]
C	6	K-series	13.72	34.25	2.48
N	7	K-series	6.15	13.16	1.44
Al	13	K-series	5.13	5.7	0.3
Ti	22	K-series	72.6	45.47	2.07
V	23	K-series	2.4	1.41	0.1
Total:			100	100	

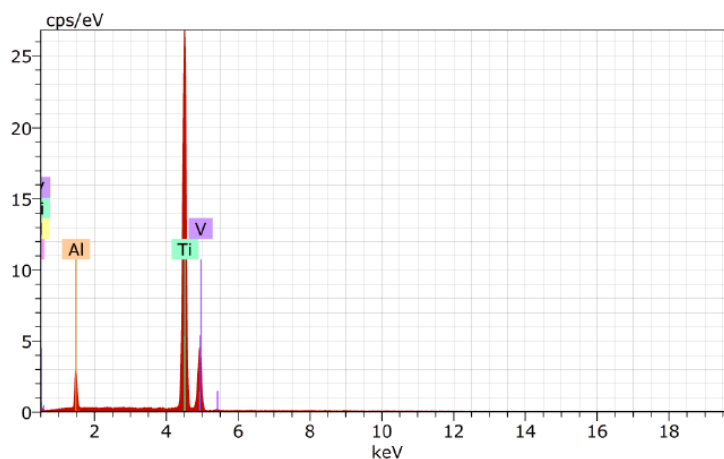


Figura 22. Espectro de dispersión de energía de micropartículas de aleación de titanio. Líneas de serie-K muestran la presencia de concentraciones atómicas de Ti, Al, V, C y Ni.

VII. Materiales y Métodos

Etapa de la preparación de partículas de Titanio 99.9%

Filtración de partículas de titanio mayores a 40 μm

- 1-Tomamos tubos Eppendorf.
- 2- Pesar los Eppendorf. En cada uno agregar partículas de titanio. Volver a pesar los tubos.
- 3- Resuspender agua a cada tubo con una cantidad estándar, por ejemplo 500 μl . Cada uno de los tubos debe tener 2 réplicas. Una será para depositar posteriormente partículas menores a 40 μm y la otra para depositar las partículas mayores de 40 μm .
- 4-Sonicar los Eppendorf por 20 minutos.
- 5- Procedemos a filtrar las partículas.
- 6- Secar los tubos con un liofilizador. Agregar a las partículas alcohol o acetona para facilitar su secado después de liofilizar las partículas.



Figura 23. Filtración de las partículas/microtransportadores de titanio.

Etapa de nanomodificación de partículas de Titanio 99.9%

En términos generales la metodología de nanomodificación de las partículas de titanio es similar a la realizada para los discos de titanio. Podemos ver esta metodología en la figura 24

Protocolo de nanomodificación aleación de titanio

Objetivo: Establecer un protocolo para incorporar nanoestructuras en la superficie de las micropartículas (uPart) de aleación de titanio y que pueden ser usada para el cultivo celular.

Diseño Experimental (grupos y tratamientos):

1. uPart with no treatment
2. uPart + 10% F&O acid 45 min
3. uPart + 10% F&O acid 90 min
4. uPart + 20% F&O acid 45 min
5. uPart + 20% F&O acid 90 min

Protocolo:

- Sonicar por 30 minutos in Liquinox soap (Alconox)
- Sonicar muestras (2 x) 5 minutos en agua destilada a 25°C.
- Sumergir las partículas en NaOH (20 g/L) y peróxido de hidrógeno (20 g/L) a 80°C por 30 minutos.
- Sonicar muestras por 5 minutos en agua destilada a 25°C.
- Sumergir las partículas en 65% ácido nítrico líquido a 100 °C por 30 min.
- Sonicar muestras por 5 minutos en agua destilada a 25°C.
- Dejar las muestras secando al menos 24 horas para asegurar la estabilidad de la capa de óxido.
- El bañando en ácido es realizado en diferentes concentraciones y por diferentes tiempos a 80°C:
 - Ácido Fórmico y Ácido oxálico a un rango de 50% cada una por 45 minutos a concentraciones de 10% and 20% w/v.
 - Ácido Fórmico y Ácido oxálico a un rango de 50% cada una por 90 minutos a concentraciones de 10% and 20% w/v.
- Sonicar muestras por 5 minutos en agua destilada a 25°C.
- Sumergir las partículas en 65% ácido nítrico líquido a 100 °C por 30 min.
- Sonicar muestras por 5 minutos en agua destilada a 25°C.
- Dejar las muestras secando al menos 24 horas para asegurar la estabilidad de la capa de óxido.

Repetimos este experimento esta vez con los tiempos cambiados en la etapa de la aplicación de los ácidos oxálicos y fórmico: 75 y 120 minutos.



Figura 24.

Observación y medición de partículas de titanio

- Microscopio Electrónico Evo 40 (STRI, Panamá)



Figura 25.- Fiji (ImageJ) para análisis de imágenes

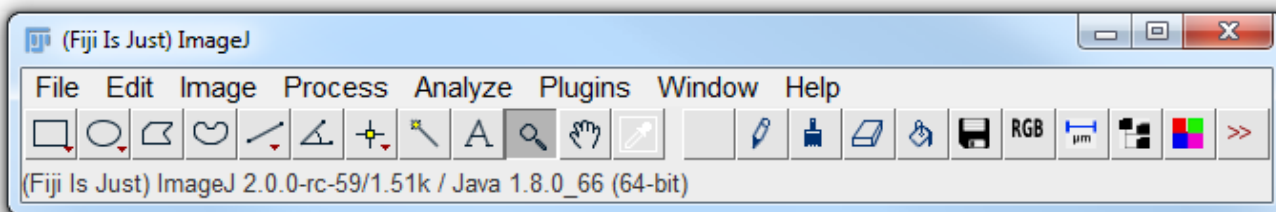


Figura 21.Figura 26. Menú del programa Image J.

VIII. Resultados

Etapa de caracterización de partículas de Titanio 99.9%

Caracterización del tamaño de las partículas de Titanio

Según las especificaciones de los fabricantes, las partículas utilizadas son 99.9% puras (Titanium powder, spherical, 150 mesh, 99.9%). Como ya se mencionó anteriormente debemos caracterizar a las mismas para confirmar que cumplen con los valores nominales del fabricante.

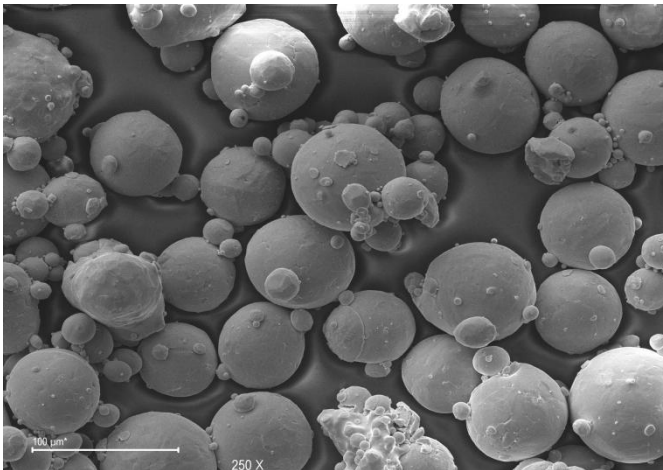
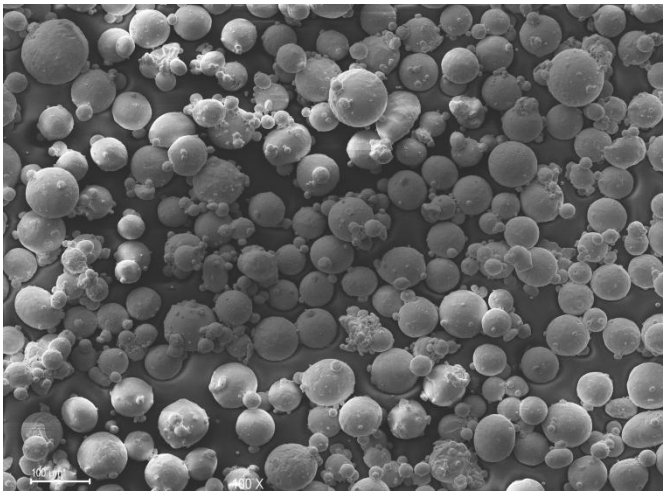


Figura 27. Partículas de titanio no modificadas, pero si filtradas con filtros de membrana de nylon.

Las partículas fueron filtradas con filtros de membranas de nylon de 40 micrómetros. Como se puede observar la mayor cantidad de partículas se encuentran en el rango entre 7.28 y 48.28 micrómetros de diámetro. Partículas de diámetros mayores de 130 micrómetros virtualmente fueron inexistentes. La presencia de partículas de menos de 40 micrómetros se puede deber a partículas pequeñas adheridas a otras mucho más grandes y por ello no pasaron el filtro.



Figura 28. Histograma de diámetros de partículas.

Caracterización de la composición química de las partículas de titanio 99.9% puras

Utilizando la tecnología del microscopio electrónico de barrido pudimos determinar el porcentaje de pureza de las partículas filtradas y nanomodificadas.

Muestra 1: Ácido fórmico y Ácido oxálico al 10%, 75 minutos

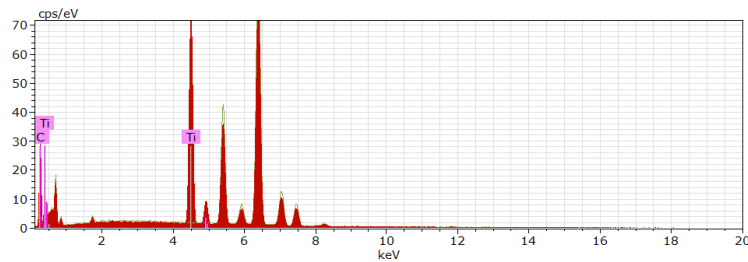


Figura 29.Espectro de dispersión de energía de micropartículas de titanio.

Element	AN	series	[wt.%]	[norm. wt.%]	[norm. at.%]
Carbono	6	K-series	5.1983349	5.0231403026	17.41202543
Titán	22	K-series	98.289415	94.976859697	82.58797457
		Sum:	103.48775	100	100

Muestra 2: Ácido fórmico y Ácido oxálico al 10%, 120 minutos

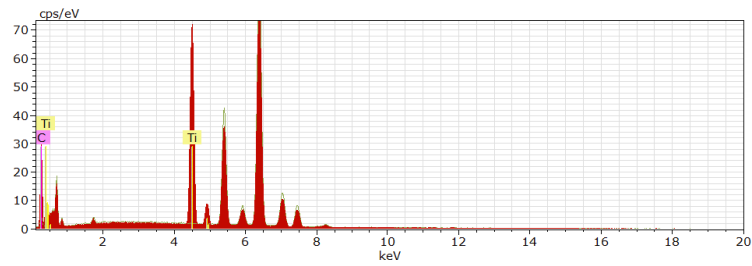


Figura 30. Espectro de dispersión de energía de micropartículas de titanio.

Element	AN	series	[wt. %]	[norm. wt. %]	[norm. at. %]
Carbono	6	K-series	4.778184	3.8074790733	13.62832644
Titán	22	K-series	120.7165	96.192520927	86.37167356
		Sum:	125.4947	100	100

Muestra 3: Ácido fórmico y ácido oxálico al 20%, 75 minutos

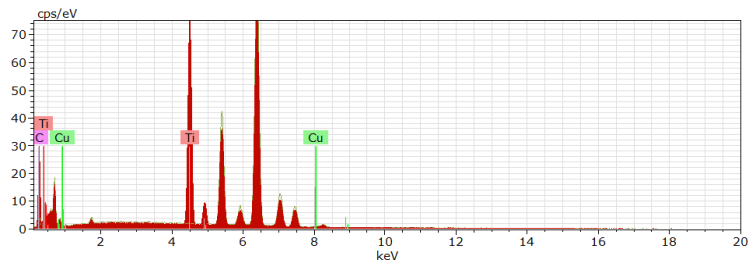


Figura 31. Espectro de dispersión de energía de micropartículas de titanio.

Element	AN	series	[wt. %]	[norm. wt. %]	[norm. at. %]
Carbono	6	K-series	4.5444507	3.3152526185	12.045059381
Titán	22	K-series	131.52461	95.949401072	87.449959448
Cobre	29	K-series	1.0079911	0.7353463093	0.5049811704
		Sum:	137.07706	100	100

Muestra 4: Ácido fórmico y ácido oxálico al 20% 120 minutos

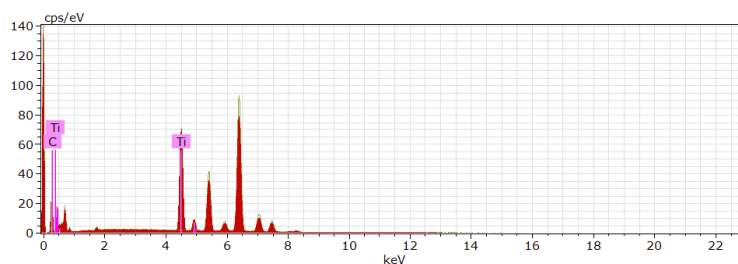


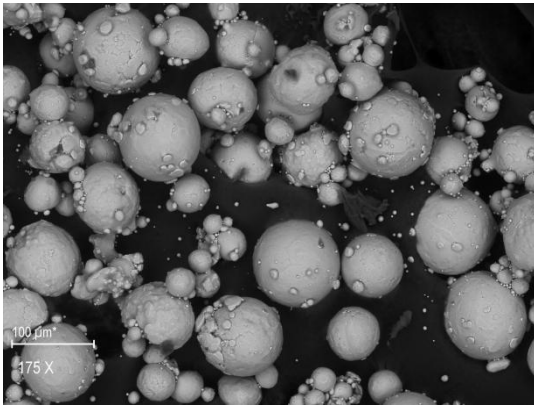
Figura 32. Espectro de dispersión de energía de micropartículas de titanio.

Element	AN	series	[wt.%]	[norm. wt.%]	[norm. at.%]
Carbono	6	K-series	4.2274292	3.1447532562	11.45984342
Titán	22	K-series	130.20058	96.855246744	88.54015658
		Sum:	134.42801	100	100

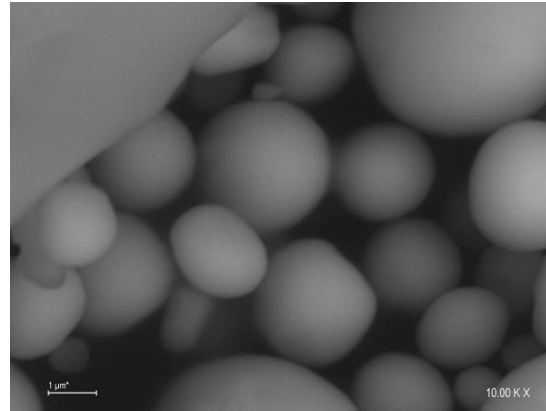
Con estos resultados podemos comprobar que las partículas de titanio están al menos a un 94% de pureza.

El paso siguiente es el de demostrar si es posible crear nanomodificaciones a las partículas de titanio con semejante pureza.

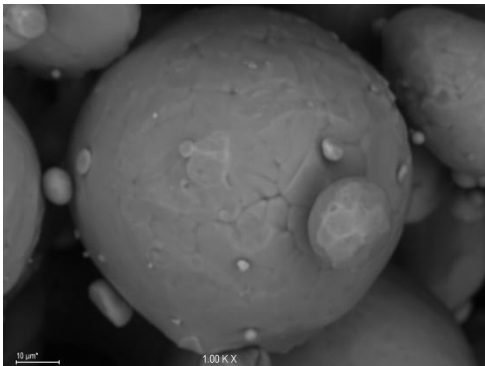
Nanomodificación de partículas de Titanio 99.9% puras



A) nieves 5 de julio 18 40A.F.4

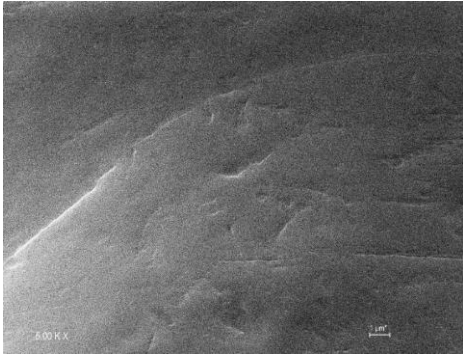


B) nieves 17 jul 18-40 710kx



C) nieves 17 julio 18 +40 5 1kx

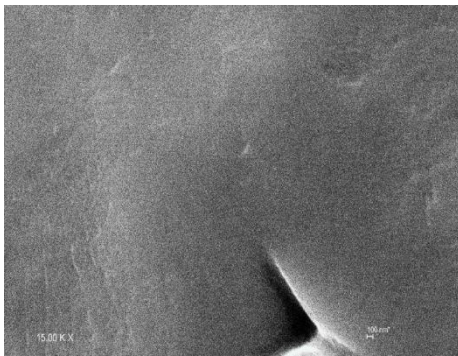
Figura 33. Partículas de titanio no nano-modificadas.



A) M2 5kx



B) M3 10kx

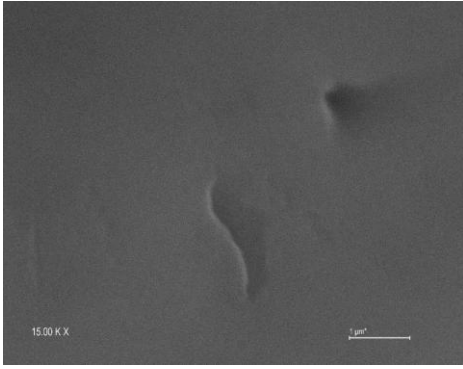


C) M4 15kx

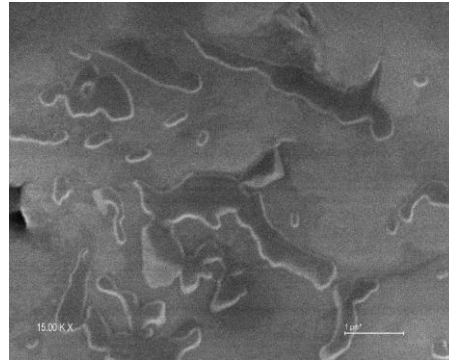


D) M5 5kx

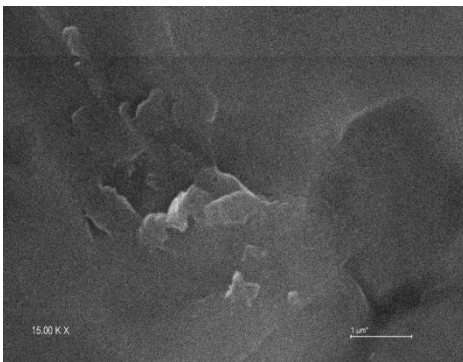
Figura 34. Partículas de titanio nanomodificadas a base de ácido fórmico y ácido oxálico al (A) 10% por 45 minutos, (B) 10% por 90 minutos (C) 20% por 45 minutos y (D) 20% por 90 minutos.



A) M1 -15kx



B) M2 15kx



A) M3 15kxD) M4 1kx

Figura 35. Partículas de titanio nanomodificadas a base de ácido fórmico y ácido oxálico al A) 10% por 75 minutos, (B) 10% por 120 minutos, (C) 20% por 75 minutos y (D) 20% por 120 minutos.

Los resultados sugieren que es posible modificar la superficie de las partículas de titanio a base de calor y de ácidos (nítrico, fórmico y oxálico).

Cierto tipo de marcas o surcos fueron halladas en las partículas con los ácidos al 10% por 90 minutos (figura 34-B) que no fueron halladas en partículas con otros tiempos y concentraciones de ácidos sugiriendo que quizá la nanomodificación trabaja mejor en concentraciones más bajas (10%) que en concentraciones más altas de ácidos (20%).

IX. Discusión

La microscopía electrónica, específicamente la microscopía electrónica de barrido, SEM, es una herramienta muy útil para caracterizar diferentes tipos de muestras, incluyendo las micro y nanomodificaciones en microtransportadores de titanio destinados a la medicina regenerativa.

A lo largo de este estudio se ha podido evidenciar que el SEM es útil para observar tanto superficies de discos de titanio, superficies de discos de aleaciones de Titanio-Aluminio-Vanadio (Ti6Al4V), partículas de Titanio-Aluminio-Vanadio (Ti90Al6V4) y partículas de Titanio 99.9% puras. (Figuras 16, 18, 21, 27, 33, 34, 35) .

También ha sido muy útil a la hora de dilucidar la composición química tanto de las partículas de Ti90Al6V4 como las de titanio 99.9% gracias a la espectrometría de rayos x por energía dispersiva (EDX) para determinar la composición atómica cercana a la superficie. (Figuras 22, 29, 30, 31 y32).

También podemos afirmar que el uso del titanio para hacer crecer, en futuros estudios, células madres con capacidad osteo-diferenciadoras como las MG63 está bien fundamentado ya que hay numerosos estudios que lo avalan.

Para éste trabajo se realizó una búsqueda de investigaciones que utilizan partículas de titanio para aplicarlos en la medicina regenerativa. De ésta búsqueda se extrae que existen casi ningún estudio con éstas características. La mayoría de los estudios usan superficies (o aleaciones) de titanio como en los estudios de Gittens *et al.*, 2012.

Como ya se mencionó en la introducción, existen varios ejemplos de estudios donde se utiliza partículas de titanio para observar su efecto en células osteoblásticas o en células madres. A continuación veremos alguno de ellos y su metodología para nanomodificar las partículas de titanio, si es que la realizan.

Para empezar haremos una definición, *wear debris*: Partículas microscópicas producidas por la fricción entre superficies en un reemplazo total de una articulación. Las partículas pueden ser de metal, polietileno u otras sustancias y pueden inducir a osteólisis o rompimiento del hueso. (The free dictionary, medical dictionary).

Wang et al, Titanium particles suppress expression of osteoblastic phenotype in human mesenchymal stem cells. 2002.

En éste estudio se trata a las partículas como *debris* generados por el uso continuo de prótesis y que pueden disminuir la asepsia de implantes. Wang *et al*, tuvieron la hipótesis de que las partículas afectarían la diferenciación osteoblásticas de las hMSC.

- **Uso de técnica de microscopía:** Utilizaron un microscopio electrónico de barrido (SEM) para caracterizar las partículas.
- **Características de las partículas:** En el estudio se utilizó titanio comercialmente puro (cp Ti) y Oxido de Zirconio (ZrO₂) con partículas con una dimensión por debajo del micrón.
- **Ácidos utilizados:** Ácido nítrico. El posible objetivo de usar ácidos fue por cuestiones de asepsia.
- **Concentración de los ácidos:** Las partículas fueron tratadas con ácido nítrico 25% a 70° C.
- **Tiempo de exposición de las partículas a los ácidos:** Una hora.
- **Otras condiciones que se usaron en el tratamiento:** Después del tratamiento con ácido nítrico las partículas fueron lavados con buffer de fosfato salino. Después fueron re-suspendidas con medio DMEM/F12 y almacenadas en suspensión a 4°C. Determinaron que las esferas
- **Reacción o efecto de las células osteoblásticas a las partículas de titanio:** Las células hMSC fueron aisladas de la médula ósea. Éstas células fueron cultivadas en medio osteogénico.

En cuanto al número de células viables encontraron que los cultivos tratados con partículas tenían menos células que los cultivos no tratados. También encontraron que las muestras tratadas con ZrO₂ incluso tenían mayor numero de células que las tratadas con cpTi.

Con respecto a la osteo-diferenciación de hMSC *in vitro*, el incremento de partículas de cpTi dentro de los cultivos provocó el decrecimiento de BSP (bone sialo-protein) cuando las partículas estaban a alta concentración (5000 partículas por célula). Además también disminuye la cantidad de la proteína de colágeno tipo I provocando la supresión de la habilidad de las células hMSC de diferenciarse a fenotipo osteoblástico funcional. Las partículas de ZrO₂ afectan mucho menos la

diferenciación osteoblástica.

La proliferación y la mineralización de la matriz extracelular también son afectada por partículas cpTi. Se entiende que estas partículas de cpTi tienen una citotoxicidad de la que la hMSC son muy sensibles.

Observamos que los autores consideran las partículas de titanio solo *debris* mientras que nosotros los consideramos para usarlo como superficie para que las células madres produzcan hueso.

Comparando este experimento con el nuestro, rápidamente sale a la vista que el tamaño de las partículas de ellos es mucho menor (<1 micrón) que las nuestras (mayores a 40 micrómetros). Debemos considerar que los osteocitos tienen un tamaño aproximado de 7 μm de ancho y 15 μm de largo. (Sugawara *et al.* 2005).

Otro tema es que ellos utilizaron un ácido, el ácido nítrico, posiblemente con fines de asepsia, mientras que nosotros utilizamos 3 ácidos para nanomodificar las partículas.

Jiang Wu *et al.*, Effect of Titanium Particle Size on Osteogenic Differentiation of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells, 2011

En éste estudio se busca ver si las partículas de titanio, dependiendo del tamaño y el tiempo de exposición pueden afectar células madres mesenquimales derivadas de médula de hueso. Porqué el titanio? Pues, como explican los autores, el titanio es uno de los *debris* más comunes de los tejidos peri próstéticos.

- **Uso de técnica de microscopía:** No es mencionado el uso de microscopios.
- **Características de las partículas:** El tamaño de las partículas de titanio fueron 0.9 μm , 2.7 μm , 6.9 μm .
- **Ácidos utilizados:** En éste estudio no se utilizó ácidos de ninguna clase ni para modificar las partículas ni para lavarlas.
- **Concentración de los ácidos:** No aplica.
- **Tiempo de exposición de las partículas a los ácidos:** No aplica.
- **Reacción o efecto de las células osteoblásticas a las partículas de titanio:** La evaluación de la síntesis de las proteínas de la matriz de huesos mostraron que los

3 grupos de tamaños distintos de partículas de titanio pueden suprimir marcadores iniciales, medios y finales del linaje osteogénico, por ejemplo: actividad fosfatasa alcalina, pro-colageno tipo I C-terminal y la secreción de osteocalcina respectivamente, en una manera dependiente a la dosis y al tiempo.

Las partículas que menos daño causaron es la de 0.9µm, lo cual los autores consideran que es razonable pues son las más susceptibles a fagocitosis debido a su pequeño tamaño. Los autores consideraron que los *debris* que causan respuesta biológica agresiva son los menores de 5µm de diámetro. La mayor parte de las partículas de *debris* de tejidos peri-prostéticos es menor a 1 µm.

Lee et al, The effect of TNF α secreted from macrophages activated by titanium particles on osteogenic activity regulated by WNT/BMP signaling in osteoprogenitor cells. 2011.

Las partículas de titanio son la causa mayor de osteólisis asociada a reemplazo de articulaciones. Durante éste proceso, los macrófagos median los procesos inflamatorios para incrementar osteoclastogénesis llevando al aumento de la re-absorción del hueso. Se piensa que osteoprogenitores, los cuales están presentes junto con los macrófagos, juegan un importante rol en la regeneración de huesos y la osteointegración.

- **Uso de técnica de microscopía:** La única vez que se menciona el microscopio es al observar células teñidas con Alizarin Red y Sirius Red Staining, las cuales servían para ver el efecto de las partículas de titanio en la síntesis de colágeno y en la deposición de matriz mineralizada, respectivamente.
- **Características de las partículas:** Partículas comercialmente puras de titanio. Según los fabricantes el 86% de las partículas tienen un diámetro menor a 10 µm.

Las partículas fueron esterilizadas a 180°C por 6 horas seguidas con un tratamiento etanol al 70% por 48h.

- **Ácidos utilizados:** Nuevamente no se utilizó ningún ácido en el estudio (salvo el ácido ascórbico que es un componente del medio osteogénico), y menos para nanomodificar las partículas.
- **Concentración de los ácidos:** No aplica.
- **Tiempo de exposición de las partículas a los ácidos:** No aplica.

- **Reacción o efecto de las células osteoblásticas a las partículas de titanio:** El estudio muestra que 1) Los macrófagos en respuesta de partículas de titanio contribuyen a la supresión de actividad formadora de huesos de los osteoprogenitores, visto en la osteólisis inflamatoria, 2) $TNF\alpha$ juega un papel importante en la actividad osteogénica dañada de los osteoprogenitores regulando las vías de señalización de WNT y BMP 3) El titanio Ti CM induce a la expresión de esclerostina (SOST). La inducción autocrina de SOST y $TNF\alpha$ daña la osteodiferenciación osteoblástica anulando la señalización de WNT y BMP.

Los autores indican que su estudio proponen un mecanismo regulador de los defectos del hueso que son identificados por osteolisis periprotésica.

Nuevamente podemos observar que no se utilizó ácidos en un estudio que implica partículas de titanio y osteoblastos.

Las partículas de titanio nuevamente son de interés al ser un tipo de *debris* bastante común en el reemplazo de articulaciones.

Nuevamente los resultados parecen demostrar que las partículas de titanio son perjudiciales para los procesos osteoblásticos. Debemos tomar en cuenta que esto se da a pesar de que las partículas contaban con diámetros mayores al micrómetro (tamaños que se han utilizado en los estudios anteriormente mencionados como Jiang Wu *et al.*, cuyas partículas de $0.9\mu m$ fueron las más letales para las células, y Wang *et al.*, con partículas < 1 micrón).

Hou *et al.*, Effects of titanium nanoparticles on adhesion, migration, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells. 2013.

Como los mismo autores señalan, el objetivo de éste estudio es el de investigar la influencia de partículas de *debris* producto de implantes de titanio o aleación de titanio en la integración de huesos. Estos *debrirs* se pueden producir por corrosión, pérdida de asepsia y fricción de prótesis.

Quieren ver el efecto de éstas partículas en diferentes procesos que llevan a cabo las células mesenquimales (MSC).

- **Uso de técnica de microscopía:** Utilizaron el microscopio electrónico de barrido para sintetizar y el microscopio electrónico de transmisión para caracterizar las partículas. El microscopio confocal láser de barrido fue utilizado para investigar el efecto de las partículas de titanio internalizado en la adhesión, proliferación y

morfología de la MSC.

- **Características de las partículas:** Ellos no utilizan titanio comercialmente puro como en otros estudios, sino que utilizaron dióxido de titanio TiO₂.

Las partículas fueron sintetizadas con medios hidrotermales. Los microscopios electrónicos de barrido y de transmisión demostraron que las partículas tenían una morfología relativamente uniforme.

Los tamaños de las partículas son 14µm, 108µm, y 196µm.

- **Ácidos utilizados:** No se utilizan ácidos para nanomodificar las partículas, sino para otros objetivos.
- **Concentración de los ácidos:** No aplica.
- **Tiempo de exposición de las partículas a los ácidos:** No aplica.
- **Reacción o efecto de las células osteoblásticas a las partículas de titanio:** Las nanopartículas de titanio TiO₂ tienen un efecto negativo en la viabilidad celular, proliferación y el ciclo de vida de las MSC en una manera dependiente a la dosis y el tamaño.

En estudios anteriores ellos determinaron que partículas grandes de TiO₂ (74 nm y 196 nm) eran tomadas por los osteoblastos por vías diferentes a la de partículas más pequeñas (14 nm). Al parecer la acumulación de TiO₂ depende del tamaño de las partículas. La acumulación de partículas grandes (196 nm) lleva a la citotoxicidad. Las partículas más pequeñas se acumulan menos porque pueden escapar de las vesículas endocíticas.

También se dieron cuenta que la integridad de la membrana celular, el citoesqueleto, y la vinculina (proteína en las placas de adhesión focal para detectar partículas de TiO₂ dentro de la célula en la adhesión celular) fueron afectadas por las partículas de TiO₂.

La medición de fosfatasa alcalina, la expresión genética de la osteocalcina (OC) y la osteopontina (OPN) y la mineralización indican que el tamaño de las partículas de TiO₂ afecta negativamente la diferenciación osteogénica de las MSC.

Estos resultados se pueden interpretar debido a el estrés oxidativo y especies de oxígenos reactivos que llevan a la muerte celular.

Los autores también interpretan que el efecto negativo sobre el crecimiento y la división de MSC se debe a acidez intracelular, lo cual inhibe la proliferación celular.

Nos podemos percatar que el uso de microscopía electrónica es vital para el estudio de partículas de titanio.

Podemos observar que el uso de la microscopía electrónica de diferentes tipos es esencial para ver la localización y efecto de las partículas de TiO₂ en las células.

En cuanto a las partículas ellos utilizaron TiO₂ en vez de las partículas puras que nosotros utilizamos en nuestro experimento. Ellos sintetizaron éstas partículas por métodos hidrotermales. Nosotros utilizamos métodos hidrotermales con ácidos para nanomodificar las partículas de titanio.

También le pusieron especial énfasis al tamaño de las partículas. Podemos ver que utilizaron partículas con dimensiones mucho más grandes que las nuestras. Al contrario de otros estudios, ellos determinaron que las partículas más grandes causaban mayor acumulación en las células y por ende una mayor posibilidad citotóxica.

En cuanto al efecto de estas partículas en general, sucedió lo mismo que en otros estudios, existe un efecto negativo (citotoxicidad) de las partículas de titanio sobre las células, efecto que también dependió de la dosis (concentración) y el tamaño de las partículas de TiO₂.

Jiang *et al.* Titanium Particle-Challenged Osteoblasts Promote Osteoclastogenesis and Osteolysis in a Murine Model of Periprosthetic Osteolysis. 2013.

Este estudio investiga la interacción entre la osteoblastos provenientes de médula ósea afectados por aleación de titanio (Bone marrow stem cells o BMSCs) y líneas celulares de macrófagos en un modelo de prótesis de rodilla con fallas en roedores.

- **Uso de técnica de microscopía:** Se utilizó el microscopio electrónico de barrido (scanning electron microscopy , SEM).
- **Características de las partículas:** Se utilizó la aleación de titanio Ti-6Al-4V, tamaño medio de las partículas : 0.67µm, rango 0.1 – 7.19µm. Las concentraciones que se le suministraron a los BMSCs en medio de inducción completa fueron de 1, 3, o 5mg/ml titanio.
- **Ácidos utilizados:** No se utilizaron ácidos para nanomodificar las partículas. Los ácidos usados fueron el ácido ascórbico (antes mencionado en otros estudios) y la

tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), para identificar osteoclastogenesis de PBMCs.

- **Concentración de los ácidos:** No aplica.
- **Tiempo de exposición de las partículas a los ácidos:** No aplica.
- **Reacción o efecto de las células osteoblásticas a las partículas de titanio:** Las partículas de titanio estimularon significativamente las células osteoblásticas derivadas de BMSCs tanto en bajas como altas concentraciones sin una marcada diferencia entre ambas dosis. Evidencia también sugiere que osteoblastos afectados por partículas de titanio contribuyen a la osteólisis peri-prostética.

En conclusión, las partículas de aleación de titanio demuestran interferir en el crecimiento, maduración y función de los osteoblastos de la médula osea. Osteoblastos afectados por las partículas parecen expresar mediadores que regulan osteoclastogénesis y osteólisis periprostética.

Una vez más nos podemos percatar que el uso de microscopía electrónica es clave para el estudio de partículas de titanio.

Seguimos el patrón de que las funciones celulares de los osteoblastos son afectadas por las partículas de titanio. Lo particular de este estudio es que el tamaño de las partículas no cambió significativamente el efecto negativo (osteoclastogénesis y osteólisis periprostética) que todas las partículas ejercieron sobre las células al contrario de otros artículos donde el tamaño de las partículas sí importa (por ejemplo Hou *et al.* 2013). Tal vez porque a pesar de usar diferentes tamaños, estas eran bastante más pequeñas (0.67 μ m, rango 0.1 – 7.19 μ m) que las de estudios como los de Hou *et al.*

Ping *et al.* Melatonin attenuates titanium particle-induced osteolysis via activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway.2017.

En éste estudio se investiga el efecto de la melatonina en la osteólisis estimulada por partículas de titanio en sistemas de cultivo de 2 modelos de roedores.

- **Uso de técnica de microscopía:** No se menciona ninguna técnica de microscopía.
- **Características de las partículas:** Las partículas tenían $3.25 \pm 2.18\mu$ m en diámetro, de los cuales el 95% fueron menos de 4 μ m.

Las partículas fueron inmersas en etanol 75%, lavadas 4 veces con agua ultra pura

y puestas en 180°C por 6 horas.

Después de eso se le aplicó el ensayo de *Limulus* para asegurar que las partículas estuvieran sin endotoxinas.

Finalmente las partículas fueron inmersas en PBS (phosphate-buffered saline) y almacenadas a 4°C hasta ser usadas.

- **Ácidos utilizados:** Se utilizaron diferentes ácidos, algunos de ellos ya utilizados y mencionados en la discusión en otros estudios. Ninguno fue usado para nanomodificar las partículas de titanio.
- **Concentración de los ácidos:** No aplica.
- **Tiempo de exposición de las partículas a los ácidos:** No aplica.
- **Reacción o efecto de las células osteoblásticas a las partículas de titanio:** La melatonina inhibe la osteólisis inducida por partículas e incrementa la formación de huesos en los sitios osteolíticos.

Como la melatonina tiene éste efecto?, pues, al parecer, la melatonina activa las vías *Wnt/β-catenin*, incrementando la expresión de *catenin* y disminuyendo el nivel de la molécula *axin-2*.

La melatonina modula el balance entre RANKL y OPG. RANKL es un modulador de la re-absorción de huesos, que promueve la activación osteoclástica y diferenciación a través de su unión con RANK. OGL actúa como un receptor señuelo bloqueando RANKL para que no se una a RANK, y por lo tanto suprimiendo la formación osteoclástica y la lisis de los huesos. De esta forma la tasa de RANKL/OPG es necesario para modular el remodelaje de huesos entorpeciendo la activación de osteoclastos.

El número de osteoclastos (células encargadas de re-absorber hueso) aumenta en presencia de partículas de titanio y disminuye drásticamente al aplicar tratamiento de melatonina, evitando que el hueso se re-absorba en sitios osteolítico.

Podemos observar que la característica más interesante de éste estudio es el uso de la melatonina para disminuir la osteólisis.

Al igual que en el estudio de Lee *et al.*, aquí se vuelven a mencionar las vías de señalización *Wnt/β-catenin*. Estas vías está vinculada a la osteo-diferenciación. Podemos hipotetizar que la melatonina podría ser un gran aliado en futuras etapas de éste proyecto cuando sembremos células madres sobre partículas de 40µm aproximadamente, ya que la melatonina activara las vías antes mencionadas.

También podemos destacar los varios procesos que se le aplicaron a las partículas para evitar que no estuvieran en estado de asepsia o que tuvieran endotoxinas, sin duda información que debemos tener en cuenta en etapas futuras de ésta investigación.

Gu et al, Titanium particle-induced osteogenic inhibition and bone destruction are mediated by the GSK-3 β / β -catenin signal pathway. 2017.

En éste estudio nuevamente se observa la inhibición osteogénica y la destrucción de huesos inducida por *debris* son críticas en la osteólisis peri-prostética, mecanismo que los autores aclaran es muy poco conocido.

En éste estudio se investiga la vía de señalización GSK-3 β / β -catenin, la cuál es importante para la formación de huesos en la osteólisis peri-prostética.

- **Uso de técnica de microscopía:** El microscopio solo fue utilizado para ver células teñidas de solución ARS para cuantificar la mineralización de las células en la formación de los huesos.
- **Características de las partículas:** No dan información de las dimensiones de las partículas de titanio.

Los autores mencionan que las partículas fueron preparadas como en otros estudios. Posteriormente se les sometió a 180°C por 12 horas y luego puestas en etanol al 75% por 2 días. Finalmente les midieron el nivel de endotoxinas.

- **Ácidos utilizados:** Nuevamente se mencionan ácidos que ya aparecen en otros estudios vistos en ésta discusión (ácido ascrobico, TRAP) y nuevamente no son utilizados para nanomodificar las partículas de titanio.
- **Concentración de los ácidos:** No aplica.
- **Tiempo de exposición de las partículas a los ácidos:** No aplica.
- **Reacción o efecto de las células osteoblásticas a las partículas de titanio:** Encontraron que las partículas de titanio reducen la diferenciación osteoblástica inducido por expresión de genes relacionados a osteogénesis, la actividad fosfatasa alcalina y la mineralización de la matriz, así como la expresión pSer9-GSK-3 β y la actividad de la señal β -catenin.

La regulación negativa (downregulation) de la actividad de GSK-3 β atenuó la inhibición osteogénica producida por las partículas de titanio, mientras que el inhibidor de la β -catenin revirtió el efecto protector.

Sobretudo, la vía de señalización de GSK-3 β / β -catenin medio la regulación positiva de RANKL (un modulador de la re-absorción de huesos, como menciona Ping *et al.*) y reguló negativamente la de OPG en células MC3T3-E1 estresadas con partículas de Ti.

Los autores también señalan que sus resultados *in vivo* mostraron que las partículas de Ti inducían pérdida de huesos via regulación de señales de GSK-3 β y β -catenin. Ellos concluyen que, basados en los resultados, la señal GSK-3 β / β media el efecto adverso de las partículas de Ti en la diferenciación de osteoblastos y la destrucción de hueso, y puede ser usado como un potencial target terapéutico para el tratamiento de osteólisis peri-prostética.

Lo primero que podemos notar es que éste estudio es bastante reciente al año de publicación de ésta tesis (2019), por lo tanto la información presentada está bastante vigente.

Podemos observar que al contrario de otros estudios como los de Ping *et al.*, donde se centran en las vías de señalización Wnt/ β -catenin, en éste estudio se centran en la vía GSK-3 β / β -catenin. Ésta vía también está relacionada con la formación de huesos y la osteo-diferenciación. En éste caso parece que ésta al disminuir la expresión de GSK-3 β disminuye también la inhibición de la diferenciación osteogénica producida por las partículas de titanio.

Nuevamente el titanio fue tratado como un factor que afecta negativamente la formación de hueso.

Igual que con el estudio de Ping *et al.*, lo interesante es que podremos utilizar sus conocimientos para saber qué vías de señalización estimular cuando en el futuro usemos partículas de titanio de unos 40 μ m.

Zhu et al, Aucubin suppresses Titanium particles-mediated apoptosis of MC3T3-E1 cells and facilitates osteogenesis by affecting the BMP2/Smads/RunX2 signaling pathway . 2018 .

La aucubina es un glucósido extraído de múltiples hierbas chinas, el cuál a demostrado poseer numerosas actividades farmacológicas. En el presente estudio, el objetivo fue investigar el rol y mecanismos de la aucubina en la supresión de la apoptosis de las células osteoblásticas de ratón MC3T3-E1 inducida por partículas de titanio, además el rol de la aucubina en la promoción de la formación de hueso.

Zhu *et al.*, nos dan un repaso mencionando que los osteoblastos son las células funcionales principales de la osteogénesis responsable de la síntesis, secreción y mineralización de la matriz del hueso. Existen varios genes específicos de osteoblastos como el colágeno tipo I (COL I), la fosfatasa alcalina (ALP), y la osteonectina (OPN), las cuales se expresan en diferentes periodos de la diferenciación osteoblástica, la cual produce las proteínas correspondientes y las secreta a la matriz extracelular de ésta forma completando la osteogénesis. La osteocalcina (OCN) y la osterix también sirven como importantes factores en el desarrollo de los procesos de osteogénesis.

Las partículas de titanio han sido probadas que inhiben la expresión del fenotipo osteoblástico MSCs, la expresión de la sialo proteína de hueso(BSP), la proliferación celular, la mineralización de la matriz y la producción de colágeno tipo I.

El BMP2 (Bone morphogenetic protein 2) es un tipo de factor de crecimiento que puede inducir a MSC no diferenciado a transformarse en cartílago o hueso.

El factor de transcripción Runt (RunX2 o Runt related transcription factor 2/Smads) representa uno de los mayores vías de transducción de BMPs para transmitir señales a las células.

Para poder promover la diferenciación celular hacia la osteogénesis, las BMPs se unen a la región promotora correspondiente a ALP (alkaline phosphatase) y OPN (osteonectin) a través de la regulación negativa de factores de transcripción como RunX2 y Osterix. Los estudios de Zhu *et al.* han encontrado que RunX2 fue regulado por BMPs gracias a la vía señalizadora Smads , y RunX2 puede regular positivamente la expresión de proteínas de matriz de hueso, incluyendo OPN y OCN.

- **Uso de técnica de microscopía:** El único microscopio mencionado es el microscopio invertido para ver el crecimiento y la morfología de las células osteoblásticas de ratones MC3T3-E1.

- **Características de las partículas:** Las partículas de titanio ($\leq 5 \mu\text{m}$, 0.1 wt%) fueron disueltas en buffer PBS y esterilizados al ser autoclavados. Después fueron agregadas a las células.
- **Ácidos utilizados:** No se utilizó ácidos para nanomodificar partículas de titanio.
- **Concentración de los ácidos:** No aplica.
- **Tiempo de exposición de las partículas a los ácidos:** No aplica.
- **Reacción o efecto de las células osteoblásticas a las partículas de titanio:** Los autores nos informan que los resultados revelaron que la aucubina aumentó la actividad de las células MC3T3-E1 tratadas con partículas de titanio. La aucubina suprime la apoptosis celular inducida por las partículas de titanio y facilita la osteogénesis afectando la *B-cell lymphoma-2 (Bcl-2)*, *Bcl-2 associated X protein*, *ALP* y la expresión de factores osteogénicos asociados. La aucubina reduce el estrés oxidativo en células inducidas por titanio. Adicionalmente, la aucubina reguló positivamente la vía BMP2/Smads/RunX2 en células MC3T3-E1 inducidas por partículas de titanio.

En conclusión, los autores confirman que la aucubina suprime la apoptosis mediada por partículas de titanio en células MC3T3-E1 y facilita la osteogénesis afectando la vía de señalización BMP2/Smads/RunX2.

Lo primero que haremos énfasis es de que el año de publicación de éste estudio (2018) es apenas un año antes del año de publicación de ésta tesis, demostrando que las partículas de titanio aún son vistas como *debris* y elementos a evitar para cualquier tipo de líneas celulares.

Nuevamente tenemos un compuesto (en éste caso aucubina) para promover la osteodiferenciación a través de la activación de vías de señalización. Esto nos podría ser útil al proseguir en etapas futuras de ésta investigación.

Lian et al, Icariin attenuates titanium particle-induced inhibition of osteogenic differentiation and matrix mineralization via miR-21-5p. 2018.

En este estudio se busca entender el efecto de la icarrin en la osteodiferenciación, proliferación celular, la apoptosis y la mineralización de la matriz en un modelo *in vitro* de osteólisis inducida por partículas de titanio en osteoblastos. La icariin es un glucósido.

Repasando, los autores nos dicen que BMP2 regula la expresión del factor de transcripción Runx2 y osteo-diferenciación al unirse e interaccionar con sus receptores. Runx2 por su parte regula la expresión de los marcadores osteoblásticos, incluyendo ALP, OCN and osteopontin (OPN).

La miR-21-5p es un tipo de MicroRNAs (small non-coding RNA molecules).

- **Uso de técnica de microscopía:** El único microscopio mencionado es el microscopio invertido para fotografiar células teñidas con Alizarin red.
- **Características de las partículas:** Interesante mencionar que las células fueron puestas en un incubador a 37°C a 5% CO₂ por 24 horas. Luego las células son incubadas con Icariin y/o partículas de titanio al llegar a 70% de confluencia.
- **Ácidos utilizados:** Ningún ácido fue utilizado para nanomodificar las partículas de titanio.
- **Concentración de los ácidos:** No aplica.
- **Tiempo de exposición de las partículas a los ácidos:** No aplica.
- **Reacción o efecto de las células osteoblásticas a las partículas de titanio:** Lian *et al.*, encontraron que la icarrin promueve la proliferación celular e inhibe la apoptosis en las células MC3T3-E1 estimuladas por partículas de titanio. Encontraron que estas partículas promueven la apoptosis celular.

Cómo logra esto la icariin?. Los autores encontraron que la actividad ALP (fosfatasa alcalina, expresada por osteoblastos, indicador crucial de la mineralización de huesos), la mineralización de la matriz, y los niveles de los marcadores osteoblásticos (BMP2, Runx2, y OCN) fueron aumentados significativamente por la icarrin, pero decrecieron con las partículas de titanio.

También encontraron que la icarrin regula positivamente los niveles de miR-21-5p en células MC3T3-E1 estimuladas por partículas de titanio. Algún estudios has demostrado que miR-21-5p es un mediador de la icariin regulando la diferenciación osteogénica y la mineralización. Estudios más profundos mostraron

que el knockdown del gen miR-21-5p abolió la promoción de icariin en la diferenciación osteoblástica y la mineralización de la matriz en titanio en células MC3T3-E1 estimuladas por titanio. miR-21-5p puede tener un potencial regulador sobre la icariin, la cual puede proteger en contra de la inhibición de la diferenciación osteogénica y la mineralización producida por las partículas de titanio a través de la regulación positiva de miR-21-5p .

Este estudio trata a la Icariin de la misma manera que trata a la aucubina: una molécula que ayuda a la osteodiferenciación, proliferación celular y la mineralización de la matriz en un modelo *in vitro* de osteólisis inducida por partículas de titanio en osteoblastos. Moléculas como éstas debemos tenerlas en mente como posibles estimulantes de la osteodiferenciación en futuras etapas de éste estudio.

Interesante mencionar que la icariin es un glucósido, igual que la glucosa, como se mencionó en el artículo de Deschepper que también parece tener efectos beneficiosos en la preservación de las células (en aquel caso en las condiciones de anoxia). Ver la sección de Antecedentes: Algunos compuestos que podrían ayudar a la medicina regenerativa.

Nuevamente se hace énfasis en marcadores osteoblásticos como BMP2, Runx2, y OCN, moléculas que debemos tomar en cuenta si queremos medir la capacidad de osteodiferenciación en nuestras células al sembrarlas en partículas de titanio en futuros proyectos.

Conclusiones de la discusión entre los diferentes estudios:

Salvo en estudios mencionados en la sección Antecedentes, como los de Gittens, donde el titanio es utilizado en discos como superficies donde son sembrados las células madres, prácticamente en ningún otro estudio se utiliza ácidos con el objetivo de nanomodificar partículas de titanio.

Prácticamente en todos los artículos el titanio era visto como un *debris*, incluso en artículos más recientes, dando fe del carácter innovador de nuestra investigación al querer utilizar las partículas de titanio como superficies (no planas y por lo tanto más bio compatibles con las formas del hueso) para el crecimiento de células osteoblásticas.

El tamaño de las partículas fue tomado en cuenta en varios artículos aquí analizados, la mayoría decía que partículas menores o similares al micrón eran las más peligrosas, mientras que otros estudios mencionaban lo citotóxicas de partículas mucho más grandes que el micrón. Nosotros deberemos comprobar si el tamaño de aproximadamente 40µm es adecuado para nuestros objetivos.

Observando en los artículos hay moléculas que estimulan la osteo-diferenciación como la icariin o la aucubina, algunas veces estimulando las vías de señalización. Esta información debe tomarse en cuenta para etapas futuras de investigación en caso de que al utilizar partículas de titanio, las células madres se diferencien células óseas.

X. Conclusiones

1-Los **parámetros del tratamiento de nano-modificación** deben ser **optimizados y estandarizados** para obtener mayor nanoestructuración de la superficie.

2-Los resultados sugieren que los **ácidos nítrico, fórmicos y oxálico** pueden crear modificaciones en superficies y en partículas de aleaciones de titanio y en titanio con una gran pureza de un tamaño aproximado a **los 40 μm** .

3-El **Microscopio electrónico de barrido** es útil para la caracterización de posibles **modificaciones** en partículas de titanio.

4-El **Microscopio electrónico de barrido** es útil para la caracterización del **porcentaje de pureza química** de las partículas de titanio.

XI. Proyecciones futuras

Tratamiento de Calor

En un futuro estudio se debe utilizar un aparato microondas para tratar con mayores temperaturas las partículas de titanio y así crear nanomodificaciones que asemejen más a las vistas en los huesos.

Utilización de células MG63

En un futuro es deseable el poder cultivar células madres MG63, las cuales se encuentran crio-preservadas.

Una vez realizado el cultivo deberemos determinar la cantidad de partículas de titanio adecuada para agregar por cada pozo del plato de cultivo con células MG63.

Posteriormente comprobaremos si las partículas de titanio puedan ser adheridas a ellas y si pueden osteo-diferenciarse a osteoblastos.

Otros posibles estudios en medicina regenerativa

Como ya se mencionó antes, existen estudios en donde se ha demostrado que la glucosa tiene propiedades citoprotectoras. También existen estudios en donde la trehalosa parece estar relacionada con el fenómeno de la *Criptobiosis* en ciertos animales como las tardígradas expuestos a ambientes extremos (Weronika et al, 2017), tales como la desecación o temperaturas extremas. En el futuro se podrían realizar estudios en donde tanto la glucosa como la trehalosa podrían ser usadas como moléculas citoprotector para preservación *in vivo* de células madres en trasplantes.

Hay estudios donde se utiliza microorganismos para obtener moléculas para luchar contra la *chytridiomycosis*, infección producida en anfibios por del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd). Quizá en el futuro se pueda utilizar injertos de piel a base de células madres que contengan bacterias y péptidos protectores con propiedades antifúngicas para tratar a los anfibios y protegerlos del *Bd*.

XII. Bibliografía

1-http://2014.igem.org/Team:Tokyo-NoKoGen/trehalose_production

2-<http://2017.igem.org/Team:CIEI-China>

3-Agrawal CM, Attawia M, Borden MD, Boyan BD, Bruder SP, Bucholz RW, et al. Bone graft substitutes: ASTM - AAOS; 2003.

4-Alan D. Elbein Y.T. Pan Irena Pastuszak David Carroll. New insights on trehalose: a multifunctional molecule *Glycobiology*, Volume 13, Issue 4, 1 April 2003, Pages 17R–27R, <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg047>

5-Ali, N. et al. Regulatory T cells in skin facilitate epithelial stem cell differentiation. *Cell* 169, 1119–1129 (2017).

6-Aurora, A. B. & Olson, E. N. Immune modulation of stem cells and regeneration. *Cell Stem Cell* 15, 14–25 (2014).

7-Bonewald LF, Schwartz Z, Swain LD, Ramirez V, Poser J, Boyan BD. Stimulation of plasma membrane and matrix vesicle enzyme activity by transforming growth factor-beta in osteosarcoma cell cultures. *J Cell Physiol*. 1990;145:200-6.

8-Boyan BD, Lossdorfer S, Wang L, Zhao G, Lohmann CH, Cochran DL, et al. Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. *European cells & materials*. 2003;6:22-7.

9-Boyan BD, Schwartz Z, Park-Snyder S, Dean DD, Yang F, Twardzik D, et al. Latent transforming growth factor beta is produced by chondrocytes and activated by extracellular matrix vesicles upon exposure to 1,25-(OH)2D3. *J Biol Chem*. 1994;269:28374-81.

10-Bryant DM, Sousounis K, Payzin-Dogru D, Bryant S, Sandoval AGW, Martinez Fernandez J, Mariano R, Oshiro R, Wong AY, Leigh ND, Johnson K, Whited JL. Identification of regenerative roadblocks via repeat deployment of limb regeneration in axolotls. *NPJ Regen Med*. 2017 Nov 6;2:30. doi: 10.1038/s41536-017-0034-z.

11-Brown, S. et al. Correction of aberrant growth preserves tissue homeostasis. *Nature* 548, 334–337 (2017). Demonstration that wild-type cells are involved in actively eliminating cells with an activating β -catenin mutation from the epidermis.

- 12-Cosin-Roger, J. et al. Hypoxia ameliorates intestinal inflammation through NLRP3/mTOR downregulation and autophagy activation. *Nat. Commun.* 8, 98 (2017).
- 13-Deschepper M, Manassero M, Oudina K et al. Proangiogenic and prosurvival functions of glucose in human mesenchymal stem cells upon transplantation. *Stem Cells* 2013;31:526–535.
- 14-Donati, G. et al. Wounding induces dedifferentiation of epidermal Gata6+ cells and acquisition of stem cell properties. *Nat. Cell Biol.* 19, 603–613 (2017).
- 15-Gittens RA, Olivares-Navarrete R, McLachlan T, Cai Y, Hyzy SL, Schneider JM, et al. Differential responses of osteoblast lineage cells to nanotopographically-modified, microroughened titanium-aluminum-vanadium alloy surfaces. *Biomaterials.* 2012;33:8986-94.
- 16-Gittens, RA. Tesis doctoral. The role of nanostructural and electrical surface properties on the osteogenic potential of titanium implants. 2012.
- 17-Gittens, RA. Microtransportadores de titanio nanoestructurados como vehículo de células madre para el tratamiento de osteoporosis. 2017. Informe técnico financiero 83-2016-4-ITE15-016.
- 18-Guo, N., Puhlev, I., Brown, D.R., Mansbridge, J., and Levine, F. (2000) Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nature Biotechnol.*, 18, 168–171.
- 19-Gu, Ye; Wang, Zhirong; Shi, Jiawei; Wang, Liangliang; Hou, Zhenyang; Guo, Xiaobin; Tao, Yunxia Wu, Xiexing; Zhou, Wei; Liu, Yu; Zhang, Wen ; Xu, Yaozeng ; Yang, Huilin ; Xue, Feng; Geng, Dechun. Titanium particle-induced osteogenic inhibition and bone destruction are mediated by the GSK-3 β / β -catenin signal pathway. *Cell Death & Disease.*
- 20-Higashima, Takanobu. Novel functions and application of trehalose. *Pure appl. Chem.* , Vol. 74, No. 7, pp. 1263-1269, 2002.
- 21-[History of electron microscopy, 1931–2000](#). Authors.library.caltech.edu (2002-12-10). Retrieved on 2017-04-29.
- 22-Hing KA. Bioceramic bone graft substitutes: Influence of porosity and chemistry. *Int J Appl Ceram Technol* 2005;2:184-199.
- 23-[Hou Y, Cai K, Li J, Chen X, Lai M, Hu Y, Luo Z, Ding X, Xu D](#). Effects of titanium nanoparticles on adhesion, migration, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells. [Int J Nanomedicine](#). 2013;8:3619-30. doi: 10.2147/IJN.S38992. Epub 2013 Sep 23.

- 24-Ito, M. et al. Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature* 447, 316–320 (2007).
- 25-J. Wu et al., "Effect of Titanium Particle Size on Osteogenic Differentiation of Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells", *Key Engineering Materials*, Vols. 474-476, pp. 1939-1942, 2011
- 26-Jacobs JJ, Andersson GBJ, Bell JE, Weinstein SL, Dormans JP, Gnatz SM, et al. *United States Bone and Joint Decade: The burden of musculoskeletal diseases in the United States*. 1st ed. Rosemont: AAOS; 2008.
- 27-Jia, J. et al. LGR5 expression is controlled by IKK α in basal cell carcinoma through activating STAT3 signaling pathway. *Oncotarget* 7, 27280–27294 (2016).
- 28-[Jiang Y](#),[Jia T](#),[Gong W](#),[Wooley PH](#),[Yang SY](#). Titanium particle-challenged osteoblasts promote osteoclastogenesis and osteolysis in a murine model of periprosthetic osteolysis. [Acta Biomater.](#) 2013 Jul;9(7):7564-72. doi: 10.1016/j.actbio.2013.03.010. Epub 2013 Mar 19.
- 29-[Kandror O](#),[DeLeon A](#),[Goldberg AL](#). Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures.[Proc Natl Acad Sci U S A.](#) 2002 Jul 23;99(15):9727-32.
- 30-[Lapasset L](#),[Milhavet O](#),[Prieur A](#),[Besnard E](#),[Babled A](#),[Ait-Hamou N](#),[Leschik J](#),[Pellestor F](#),[Ramirez JM](#),[De Vos J](#),[Lehmann S](#),[Lemaitre JM](#). Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state.[Genes Dev.](#) 2011 Nov 1;25(21):2248-53. doi: 10.1101/gad.173922.111.
- 31-[Lee SS](#),[Sharma AR](#),[Choi BS](#),[Jung JS](#),[Chang JD](#),[Park S](#),[Salvati EA](#),[Purdue EP](#),[Song DK](#),[Nam JS](#). The effect of TNF α secreted from macrophages activated by titanium particles on osteogenic activity regulated by WNT/BMP signaling in osteoprogenitor cells. [Biomaterials.](#) 2012 Jun;33(17):4251-63. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.03.005. Epub 2012 Mar 19.
- 32-[Li YM](#),[Schilling T](#),[Benisch P](#),[Zeck S](#),[Meissner-Weigl J](#),[Schneider D](#),[Limbert C](#),[Seufert J](#),[Kassem M](#),[Schütze N](#),[Jakob F](#),[Ebert R](#). Effects of high glucose on mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. [Biochem Biophys Res Commun.](#) 2007 Nov 9;363(1):209-15.
- 33-Lichtenberger, B. M., Mastrogiannaki, M. & Watt, F. M. Epidermal β -catenin activation remodels the dermis via paracrine signaling to distinct fibroblast lineages. *Nat. Commun.* 7, 10537 (2016).
- 34-Lincks J., Boyan B.D., Blanchard C.R., Lohmann C.H., Liu Y., Cochran D.L., Dean D.D.,

Schwartz Z. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials*. 1998;19:2219–2232. doi: 10.1016/S0142-9612(98)00144-6.

35-[Lian F](#), [Zhao C](#), [Qu J](#), [Lian Y](#), [Cui Y](#), [Shan L](#), [Yan J](#). Icariin attenuates titanium particle-induced inhibition of osteogenic differentiation and matrix mineralization via miR-21-5p. *Cell Biol Int*. 2018 Aug;42(8):931-939. doi: 10.1002/cbin.10957. Epub 2018 Mar 26.

36-[Madl CM](#), [Heilshorn SC](#), [Blau HM](#). Bioengineering strategies to accelerate stem cell therapeutics. *Nature*. 2018 May;557(7705):335-342. doi: 10.1038/s41586-018-0089-z.

37-Mathys, Daniel, Zentrum für Mikroskopie, [University of Basel](#): *Die Entwicklung der Elektronenmikroskopie vom Bild über die Analyse zum Nanolabor*, p. 8.

38-McMullan, D. (1988). "Von Ardenne and the scanning electron microscope". *Proc Roy Microsc Soc*. 23: 283–288.

39-McMullan, D. (2006). "[Scanning electron microscopy 1928–1965](#)". *Scanning*. 17 (3): 175–185. doi:[10.1002/sca.4950170309.PMC2496789](#).

40-Meng, S., Chanda, P., Thandavarayan, R. A. & Cooke, J. P. Transflammation: innate immune signaling in nuclear reprogramming. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 120, 133–141 (2017).

41-Merrell, A. J. & Stanger, B. Z. Adult cell plasticity in vivo: de-differentiation and transdifferentiation are back in style. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 413–425 (2016).

42-Michael, S., Achilleos, C., Panayiotou, T. & Strati, K. Inflammation shapes stem cells and stemness during infection and beyond. *Front. Cell Dev. Biol.* 4, 118 (2016).

43-Mills, J. C. & Sansom, O. J. Reserve stem cells: differentiated cells reprogram to fuel repair, metaplasia, and neoplasia in the adult gastrointestinal tract. *Sci. Signal.* 8, re8 (2015).

44-MINSA, Indicadores de salud del, http://www.minsa.gob.pa/sites/default/files/publicaciones/asis_final_2018c.pdf

45-[Moya A](#), [Paquet J](#), [Deschepper M](#), [Larochette N](#), [Oudina K](#), [Denoeud C](#), [Bensidhoum M](#), [Logeart-Avramoglou D](#), [Petite H](#). . Human Mesenchymal Stem Cell Failure to Adapt to Glucose Shortage and Rapidly Use Intracellular Energy Reserves Through Glycolysis Explains Poor Cell Survival After Implantation. *Stem Cells* 2018;36(3):363-376. doi: 10.1002/stem.2763.

46-Naik, S. et al. Inflammatory memory sensitizes skin epithelial stem cells to tissue damage. *Nature* 550, 475–480 (2017). Inflammation can trigger the epigenetic memory of injury by maintaining chromosomal accessibility to key stress-response genes.

47-"NSF: Abt Report on "The Emergence of Tissue Engineering as a Research Field".<https://www.nsf.gov/pubs/2004/nsf0450/start.htm>

48-Olivares-Navarrete R, Raz P, Zhao G, Chen J, Wieland M, Cochran DL, et al. Integrin alpha 2 beta 1 plays a critical role in osteoblast response to micron-scale surface structure and surface energy of titanium substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:15767-72.

49-Ori, D., Murase, M. & Kawai, T. Cytosolic nucleic acid sensors and innate immune regulation. *Int. Rev. Immunol.* 36, 74–88 (2017).

50-Ong JL, Bess EG, Bessho K. Osteoblast progenitor cell responses to characterized titanium surfaces in the presence of bone morphogenetic protein-atelopeptide type I collagen in vitro. *J Oral Implantol*. 1999;25:95-100.

51-Patel, A. S. et al. TIE2-expressing monocytes/macrophages regulate revascularization of the ischemic limb. *EMBO Mol. Med.* 5, 858–869 (2013).

52-Pietzsch, Joachim. "[The Nobel Prize in Physics 1986—Life through a Lens](https://www.nobelprize.org)".[Nobelprize.org](https://www.nobelprize.org). Retrieved 18 August 2013.

53-Ping Z, Hu X, Wang L, Shi J, Tao Y, Wu X, Hou Z, Guo X, Zhang W², Yang H¹, Xu Y³, Wang Z, Geng D. Melatonin attenuates titanium particle-induced osteolysis via activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway. [Acta Biomater.](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.034) 2017 Mar 15;51:513-525. doi: 10.1016/j.actbio.2017.01.034. Epub 2017 Jan 11.

54-Qi Liu, Wenjun Li, Liang Cao, Jiajia Wang, Yingmin Qu, Xinyue Wang, Rongxian Qiu, Xu Di, Zuobin Wang, Bojian Liang. Response of MG63 osteoblast cells to surface modification of Ti-6Al-4V implant alloy by laser interference lithography. *Journal of Bionic Engineering*, 2017, Volume 14, Number 3, Page 448.

55-Rajagopal, J. & Stanger, B. Z. Plasticity in the adult: how should the Waddington diagram be applied to regenerating tissues? *Dev. Cell* 36, 133–137 (2016).

56-Redlich, K; Smolen, J. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. *Nature Reviews Drug Discovery* volume 11, pages 234–250 (2012).

57-Rognoni, E. et al. Inhibition of β -catenin signaling in dermal fibroblasts enhances hair follicle regeneration during wound healing. *Development* 143, 2522–2535 (2016).

58-Rudenberg, H Gunther; Rudenberg, Paul G (2010). "Chapter 6 – Origin and Background

of the Invention of the Electron Microscope: Commentary and Expanded Notes on Memoir of Reinhold Rüdénberg". *Advances in Imaging and Electron Physics*. 160. Elsevier. [doi:10.1016/S1076-5670\(10\)60006-7](https://doi.org/10.1016/S1076-5670(10)60006-7). ISBN978-0-12-381017-5.

59-Ruska, Ernst (1986). "[Ernst Ruska Autobiography](#)". Nobel Foundation. Retrieved 2010-01-31.

60-Schwartz Z, Olivares-Navarrete R, Wieland M, Cochran DL, Boyan BD. Mechanisms regulating increased production of osteoprotegerin by osteoblasts cultured on microstructured titanium surfaces. *Biomaterials*. 2009;30:3390-6.

61-Sisk MA, Lohmann CH, Cochran DL, Sylvia VL, Simpson JP, Dean DD, et al. Inhibition of cyclooxygenase by indomethacin modulates osteoblast response to titanium surface roughness in a time-dependent manner. *Clin Oral Implants Res*. 2001;12:52-61.

62-Shook, B., Xiao, E., Kumamoto, Y., Iwasaki, A. & Horsley, V. CD301b+macrophages are essential for effective skin wound healing. *J. Invest. Dermatol*. 136, 1885–1891 (2016).

63-Smith KCA, Oatley, CW (1955). "The scanning electron microscope and its fields of application". *British Journal of Applied Physics*. 6 (11): 391–399. [Bibcode:1955BJAP...6..391S](#). [doi:10.1088/0508-3443/6/11/304](https://doi.org/10.1088/0508-3443/6/11/304).

64-Stange, D. E. et al. Differentiated Troy+ chief cells act as reserve stem cells to generate all lineages of the stomach epithelium. *Cell* 155, 357–368 (2013).
Stokes, Debbie J. (2008). *Principles and Practice of Variable Pressure Environmental Scanning Electron Microscopy (VP-ESEM)*. Chichester: John Wiley & Sons. [ISBN978-0470758748](#).

65-Stokes, Debbie J. (2008). *Principles and Practice of Variable Pressure Environmental Scanning Electron Microscopy (VP-ESEM)*. Chichester: John Wiley & Sons. [ISBN978-0470758748](#).

66-Sugawara, Y; Kamioka, H; Honjo, T; Tezuka, K; Takano-Yamamoto, T (2005). "Three dimensional reconstruction of chick calvarial osteocytes and their cell processes using confocal microscopy". *Bone*. **36** (5): 877–83. [doi:10.1016/j.bone.2004.10.008](https://doi.org/10.1016/j.bone.2004.10.008). PMID15820146.

67-The free dictionary.com- The medical dictionary. <https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/particulate+wear+debris>

68-von Ardenne M. Improvements in electron microscopes. [GB 511204](#), convention date (Germany) 18 February 1937.

69-von Ardenne, Manfred (1938). "Das Elektronen-Rastermikroskop. Theoretische

Grundlagen". Zeitschrift für Physik (in German). **109** (9–10): 553–572. [Bibcode:1938ZPhy..109..553V](#). [doi:10.1007/BF01341584](#).

70-von Ardenne, Manfred (1938). "Das Elektronen-Rastermikroskop. Praktische Ausführung". Zeitschrift für technische Physik (in German). **19**: 407–416.

71-von Ardenne, M; Beischer, D (1940). "[Untersuchung von metalloxyd-rauchen mit dem universal-elektronenmikroskop](#)". Zeitschrift Electrochemie (in German). 46: 270–277. [doi:10.1002/bbpc.19400460406](#) (inactive 2018-09-22).

72-Wall I, Donos N, Carlqvist K, Jones F, Brett P. Modified titanium surfaces promote accelerated osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in vitro. *Bone* 2009;45(1):17-26.

73-Wang ML, Nesti LJ, Tuli R, Lazatin J, Danielson KG, Sharkey PF, Tuan RS. Titanium particles suppress expression of osteoblastic phenotype in human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 2002 Nov;20(6):1175-84.

74-[Wells JM](#), [Watt FM](#). Diverse mechanisms for endogenous regeneration and repair in mammalian organs. *Nature*. 2018 May;557(7705):322-328. doi: 10.1038/s41586-018-0073-7.

75-Wei J, Shimazu J, Makinistoglu MP, et al. Glucose Uptake and Runx2 Synergize to Orchestrate Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell*. 2015;161(7):1576-1591.

76-Weronika E, Łukasz K. Tardigrades in Space Research - Past and Future. *Orig Life Evol Biosph*. 2016;47(4):545-553.

77-World Bank, The. El Banco Mundial. <https://data.worldbank.org/country/panama>.

78-Zanchetta, S. MacDonald, The Latin American region audit: epidemiology, costs & burden of osteoporosis in 2012, in: J. Stenmark, L. Misteli (Eds.) International Osteoporosis Foundation, Buenos Aires, Argentina, 2012, pp. 1-67.

79-[Ziguan Zhu](#), [Qingping Xie](#), [Yazeng Huang](#), [Shuijun Zhang](#), and [Yu Chen](#). Aucubin suppresses Titanium particles-mediated apoptosis of MC3T3-E1 cells and facilitates osteogenesis by affecting the BMP2/Smads/RunX2 signaling pathway. *Molecular Medicine Reports* 18: 2561-2570, 2018.

80-Zworykin VA, Hillier J, Snyder RL (1942) A scanning electron microscope. *ASTM Bull* 117, 15–23.

