

Revista médica de Panamá

ARTICULO ORIGINAL

Nanomodificación Hidrotérmica de la Superficie de Microtransportadores de Aleación de Titanio asistida por Microondas como Vehículo para la Reparación Ósea.

[Microwave-Assisted Hydrothermal Nanomodification of the Surface of Titanium Alloy Microcarriers as a Vehicle for Bone Repair]

Venettia Leslie ¹ , Kevin Amaya ² , Rolando A. Gittens ³

1. Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT-AIP), Ciudad del Saber; Centro de investigación Innovación y Gestión del Conocimiento, Ciudad de la Salud, C.S.S. Panamá. 2. Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT-AIP), Ciudad del Saber. Panamá. 3. Centro de Investigación e Innovación Educativa, Ciencia y Tecnología (CiiECYT-AIP); Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT-AIP) Panamá.

Palabras clave

reparación ósea; MWHT; Microtransportadores; Aleación de titanio; Superficies nanoestructuradas similares a hueso; Terapia mínimamente invasiva.

Keywords:

bone repair; MWHT; Microcarriers; Titanium alloy; Bone-like nanostructured surfaces; Minimally invasive therapy.

Correspondencia

Rolando A. Gittens
rgittens@itse.ac.pa
Venettia. Leslie
venles@cwpanama.net

Recibido

5 de julio de 2025

Aceptado

30 de noviembre de 2025

Uso y reproducción

© 2025. Artículo de acceso abierto.
Creative Common CC-BY 4.0

DOI

<https://doi.org/10.48204/medica.54%20n.9.096>

Resumen

La creciente incidencia de complicaciones esqueléticas asociadas a metástasis de cáncer, al deterioro de la cicatrización ósea después de la radioterapia y la quimioterapia, y a otras pérdidas de densidad ósea resalta la necesidad urgente de terapias de regeneración ósea con opciones mínimamente invasivas y efectivas. Los enfoques convencionales basados en implantes de masa sólida siguen limitados por su naturaleza invasiva, los desafíos de la osteointegración y su bajo rendimiento en entornos fisiológicos.

Presentamos una nanomodificación hidrotérmica optimizada, asistida por microondas, de microtransportadores de aleación de titanio (Ti6Al4V) (~150 µm de diámetro) para generar superficies biomiméticas que imitan las características jerárquicas del hueso. Refinamos un protocolo publicado anteriormente utilizando H₂O₂ como solvente y modulando su concentración, la temperatura y la duración del proceso. Generamos nanoestructuras superficiales similares a la del hueso trabecular, dejando el agua como subproducto primario de la reacción de oxidación. La caracterización de los microtransportadores nanomodificados reveló un aumento de la rugosidad y la humectabilidad de la superficie, así como cambios en la química de superficie, lo que confirma la oxidación controlada. Los experimentos de adhesión celular con células VERO y MG-63 mostraron que los microtransportadores nanomodificados pueden mantener la adhesión y proliferación celular.

Estos resultados confirman la capacidad de la plataforma para promover la adhesión celular, como primer paso crítico en el proceso de restauración ósea. Esta estrategia propone una solución traslacional, localmente inyectable, mínimamente invasiva y relevante para la regeneración ósea en pacientes con deficiencias esqueléticas complejas, al miniaturizar décadas de conocimiento sobre implantes de titanio.

Abstract

The increasing incidence of skeletal complications associated with cancer metastasis, impaired bone healing after radiotherapy and

Aspectos Bioéticos: El modelo de investigación es experimental puro "In Vitro", que no incluye ensayos en humanos ni en animales de experimentación.

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Financiamiento: Los resultados presentados en este estudio fueron apoyados con fondos de una beca IFARHU/SENACYT (contrato No. 270-2020-122), subsidios SNI-SENACYT (SNI-12-2020, SNI-051-2023), y un subsidio adicional de SENACYT (PFID-INF-2020-43). También se utilizaron recursos personales de VRL. Las agencias de financiamiento no participaron en el diseño del estudio.

Revista médica de Panamá

ARTICULO ORIGINAL

chemotherapy, and other bone density losses highlights the urgent need for minimally invasive and effective bone regeneration therapies. Conventional approaches based on solid mass implants remain limited by their invasive nature, challenges with osseointegration, and poor performance in physiological environments.

We present an optimized, microwave-assisted hydrothermal nanomodification of titanium alloy (Ti6Al4V) microcarriers (~150 μm in diameter) to generate biomimetic surfaces that mimic the hierarchical characteristics of bone. We refined a previously published protocol using H_2O_2 as a solvent and modulating its concentration, temperature, and process duration. We generated surface nanostructures similar to those of trabecular bone, leaving water as the primary byproduct of the oxidation reaction.

Characterization of the nanomodified microcarriers revealed increased surface roughness and wettability, as well as changes in surface chemistry, confirming controlled oxidation. Cell adhesion experiments with VERO and MG-63 cells showed that nanomodified microcarriers can maintain cell adhesion and proliferation.

These results confirm the platform's ability to promote cell adhesion, as a critical first step in the bone restoration process. This strategy proposes a translational, locally injectable, minimally invasive, and relevant solution for bone regeneration in patients with complex skeletal deficiencies by miniaturizing decades of knowledge about titanium implants.

INTRODUCCIÓN

La carga global de la pérdida ósea asociada al cáncer continúa en aumento, con metástasis óseas que afectan al 70% de los pacientes con cáncer de mama y de próstata en estadios avanzados. [1, 2] En paralelo, la radioterapia y la quimioterapia, si bien mejoran la supervivencia, deterioran gravemente la capacidad natural del hueso para regenerarse [3]. Las opciones reconstructivas convencionales, incluyendo implantes de titanio (Ti) macizo e injertos óseos, suelen ser invasivas, poco adecuadas para entornos tisulares comprometidos y limitadas en su capacidad para promover una integración funcional. Existe una necesidad crítica de estrategias basadas en biomateriales que permitan la regeneración ósea localizada y mínimamente invasiva, particularmente en pacientes oncológicos con estructuras esqueléticas frágiles y con un potencial de cicatrización disminuido.

La demanda de biomateriales innovadores ha aumentado significativamente en los últimos años, especialmente en el ámbito de los implantes ortopédicos [4]. Las aleaciones de titanio, como Ti6Al4V, se han consolidado como una opción preferida debido a su excelente desempeño biológico,

resistencia a la corrosión y una relación peso-resistencia favorable. [5, 6] Sin embargo, las modificaciones de superficie son esenciales para optimizar la osteointegración y la compatibilidad con los tejidos blandos [7, 8].

La nanoestructuración de superficie ofrece un enfoque potente para imitar las características jerárquicas del hueso nativo, mejorar las interacciones celulares y favorecer el rendimiento a largo plazo de los implantes [9,10]. La rugosidad, la química y la hidrofiliidad de la superficie son parámetros interrelacionados que influyen de manera crítica en la adhesión, la proliferación y la diferenciación osteogénica [11-13]. Las superficies de titanio nanoestructuradas aumentan la adsorción de proteínas y la formación de adhesiones focales al imitar el microambiente óseo [14], mientras que una mayor hidrofiliidad favorece la biointegración selectiva y reduce la adsorción inespecífica de proteínas [15].

Nuestro grupo desarrolló previamente una técnica de modificación superficial hidrotérmica asistida por microondas (MWHT, por sus siglas en inglés) a baja temperatura [16], que permite una oxidación

rápida y eficiente en diferentes medios acuosos, generando capas de óxido nanoestructuradas que mejoran la rugosidad, la humectabilidad y el desempeño biológico de la superficie. La irradiación por microondas acelera el proceso de oxidación superficial al calentar directamente el medio de reacción, reduciendo los tiempos de síntesis y ofreciendo un control preciso de la morfología superficial [16,17].

En este contexto, el objetivo del trabajo es reportar un método optimizado de oxidación por MWHT para ajustar las características nanométricas de la superficie de microtransportadores de aleación de titanio Ti6Al4V (~150 μm de diámetro), que podrían emplearse como terapia inyectable local para la regeneración ósea. Este estudio se basa en nuestro trabajo previo, adaptando y optimizando la nanomodificación por MWHT para incorporarla a la superficie de microtransportadores de aleación de titanio, miniaturizando de forma efectiva décadas de investigación en implantes en un formato inyectable y escalable. Estos microtransportadores están diseñados para actuar como andamios osteoinductivos, proporcionando una superficie nanoestructurada jerárquica con curvatura microscópica que podría potenciar la producción de factores de crecimiento osteogénicos y favorecer la regeneración tisular en sitios con defectos óseos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Biomateriales

Se utilizaron microtransportadores de aleación Ti6Al4V (Goodfellow® GF12641701-1EA, Merck) con diámetro de 150-200 μm (promedio: 175 μm) y densidad de 4,43 g/cm³, como biomaterial experimental para servir como sustrato de adherencia y proliferación celular. El número de microtransportadores por

pocillo de plato de cultivo se calculó para garantizar una cobertura uniforme de la superficie monocapa en función del área del pocillo: 23,05 mg/pocillo para platos de 24 pocillos (2 cm²/pocillo) y 16,53 mg/pocillo para platos de 96 pocillos (0,32 cm²/pocillo). Todos los valores se redondearon.

Los experimentos se diseñaron para emplear un n = 6 por grupo de muestras en al menos 3 ensayos independientes y repetidos.

Líneas Celulares:

- Líneas celulares VERO (ATCC CCL-81, ATCC, Manassas, VA, USA),
- Células MG-63 (cat. No. CRL-1427, ATCC, Rockville, MD, EE. UU.)

Estas líneas celulares se utilizaron principalmente para evaluar cualitativamente el patrón de crecimiento morfológico y la adhesión a las superficies de los microtransportadores. Sus características y método de cultivo se detallan a continuación.

La línea celular VERO es una línea celular tipo epitelial derivada de riñón de mono verde africano.

Estas trabajan junto con los fibroblastos y los macrófagos durante el proceso de regeneración tisular, proliferando, migrando y cubriendo la superficie de un implante, lo que ayuda a restaurar la estructura normal del tejido.

Las células MG-63 son una línea derivada de osteosarcoma humano con fenotipo osteoblasto-like, y constituyen un modelo de estudio de células óseas humanas.

Método

Incluye básicamente 2 fases: el de la ingeniería y nanomodificación de la superficie del biomaterial y la otra, el del cultivo celular sobre dicha superficie para valorar adherencia y proliferación.

Nanomodificación superficial de microtransportadores de aleación de titanio (Ti6Al4V)

Protocolo de limpieza

El polvo de Ti6Al4V (Goodfellow Cambridge, Huntingdon, Inglaterra) fue limpiado mediante sonicación: 30 min en solución de Alconox al 10%, seguido de una sonicación secuencial (15, 15 y 5 min) en agua ultrapura. Tras el secado en un desecador al vacío, las partículas fueron esterilizadas mediante radiación UV en una cabina de flujo laminar.

Tratamiento hidrotérmico asistido por microondas (MWHT)

La nanoestructuración se realizó en una plataforma de síntesis por microondas Mars 6 (CEM Corporation, Matthews, NC, USA). Se procesaron lotes de 25 mg de polvo de Ti6Al4V en vasos de Teflón, sumergidos en 20 mL de H₂O₂ (2.5–5 M) y expuestos a 100–200 °C durante 1–2 h. Cada vaso contenía un mini agitador y la opción de “mezcla” permaneció activa durante las corridas. Las condiciones que generaron la cobertura más homogénea de nanoestructuras en la superficie de los microtransportadores se denominaron “NanoWave” (NW). Las muestras sin tratamiento sirvieron como controles “Nativos”. Las partículas tratadas se lavaron y almacenaron en agua ultrapura estéril en microtubos de centrifugación, hasta su caracterización y uso en estudios de adhesión celular.

Estandarización de parámetros MWHT en microtransportadores de Ti6Al4V

Se diseñó un plan experimental para determinar los parámetros óptimos de nanomodificación de los microtransportadores, basándonos en nuestro método patentado de modificación hidrotérmica aplicado a

superficies sólidas de titanio, pero ahora a partículas de aleación de titanio.

Se utilizó H₂O₂ como solución hidrotérmica debido a su potencial para favorecer un ambiente oxidativo y, al mismo tiempo, ofrecer una alternativa de química verde que solo deje agua como residuo. El calor suministrado por las microondas promueve una reacción de descomposición térmica/radicalaria del H₂O₂ que libera O₂ y ayuda a generar nanoestructuras mediante la oxidación controlada de las superficies de la aleación de titanio:

Para encontrar la cobertura homogénea óptima de nanoestructuras en la superficie de los microtransportadores de aleación de titanio, evaluamos un rango de concentraciones (2.5 a 9.8 M), temperaturas (100 a 200 °C) y tiempos (60 a 120 min) (Ver Tabla 1) y caracterizamos los diferentes grupos experimentales mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

Los microtransportadores “Nativos”, sin tratamiento, presentaban una superficie lisa, sin más características que algunos bordes cristalinos. Para confirmar que el calor aportado por las microondas era necesario, evaluamos un grupo de control sumergido en H₂O₂ durante 120 min sin calor (“Exp1”) y no se observaron cambios evidentes en la superficie.

Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR) para caracterización del solvente

Para monitorear la posible disminución de H₂O₂ debida a la oxidación de los microtransportadores en los vasos de

Teflón durante el tratamiento MWHT, se utilizó un Alpha FTIR (Bruker, Billerica, MA, USA) para medir el H_2O_2 en el solvente antes (5 M H_2O_2) y después (5 M H_2O_2 MWHT) de la nanomodificación. También se incluyeron dos grupos de control: un control positivo con la mayor concentración de H_2O_2 (9.8 M) y un control negativo con agua tipo I, para representar una concentración “cero” de H_2O_2 . Cada espectro representó el promedio de dos adquisiciones (entre 4000 y 400 cm^{-1}) de 32 barridos, con una resolución espectral de 2 cm^{-1} .

Un espectro de fondo recolectado justo antes de cada corrida se restó del espectro de la muestra.

Caracterización de la superficie

Microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía de dispersión de energía (EDS)

Se obtuvieron micrográficas electrónicas de microtransportadores Nativos y de los distintos grupos experimentales (6 mg/muestra, $n=4$) mediante un SEM Quattro S (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) con un detector de electrones secundarios en alto vacío, a voltajes de aceleración de 5–10 kV y aumentos de hasta 50.000 $\times$. Se calcularon histogramas del tamaño de algunas nanoestructuras (es decir, el diámetro mayor de los nanoporos y el grosor de la pared de las nanocrestas) tras 150 mediciones por característica, utilizando software de análisis de imágenes (ImageJ, Bethesda, MD, USA). En el mismo equipo, la composición elemental superficial y volumétrica se evaluó con un detector EDS a 30 kV, a 10 mm de distancia de trabajo y con un aumento máximo de 5000 $\times$. Las proporciones elementales se

promediaron en tres regiones por muestra.

Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS)

Para un análisis más sensible y preciso de la química superficial elemental, se empleó un microscopio de barrido VersaProbe III Scanning XPS Microprobe (Physical Electronics, Chanhassen, MN, USA). Las muestras nativas y experimentales se montaron sobre láminas de indio y se analizaron a 5×10^{-4} mbar, con una distancia de trabajo de 100 μm , una energía de paso de 280 eV y un ángulo de salida de 45° ($n = 6$ partículas por grupo). Se analizaron seis puntos o partículas por grupo.

Mediciones de ángulo de contacto

Dado que los microtransportadores eran considerablemente pequeños (150–200 μm) para su interrogación individual mediante la técnica tradicional de gota sésil, la humectabilidad superficial se evaluó mediante dos métodos complementarios:

(1) mediciones estáticas del ángulo de contacto en una monocapa colectiva de microtransportadores, y (2) imágenes dinámicas de gotas de condensación bajo condiciones de SEM ambiental (ESEM) en el Quattro S SEM (Thermo Scientific). Para las mediciones estáticas, los microtransportadores de cada grupo se colocaron sobre una superficie plana adhesiva en forma de monocapa, y se adquirieron en serie cuatro imágenes por gota (3 μL de agua destilada), con tres gotas independientes analizadas y promediadas.

Para el análisis dinámico, los microtransportadores se fijaron en un adhesivo de cobre y se mantuvieron en una platina fría a 1 °C en el SEM. La presión de la cámara se varió gradualmente de 200 Pa a 625 Pa mediante la inyección de vapor de agua, generando condensación de nano- y microgotas sobre la superficie al alcanzar el 100% de humedad relativa. Las gotas se midieron a un ángulo de haz de aproximadamente 70° en el límite de la curvatura de las micropartículas. Se analizaron diez gotas, cada una con al menos cinco imágenes secuenciales. Todos los ángulos de contacto se calcularon con software de análisis de imágenes (ImageJ), promediando los ángulos internos e inversos.

Microscopía confocal láser de barrido

Los parámetros de rugosidad superficial (R_a y R_z) se obtuvieron con un microscopio confocal láser de barrido LSM 710 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) con una longitud de excitación de 405 nm, diafragma de 0,29 unidades, ganancia de 436 y offset digital de 32. Se adquirieron bloques de imágenes Z a intervalos de 1 μm por corte, comenzando con un aumento de 10 $\times$ y finalizando con 20 $\times$. Se analizaron 12 muestras por grupo.

Cultivo celular y estudios de adhesión celular

Todos los experimentos de cultivo celular se realizaron bajo condiciones estándar en una incubadora con camisa de agua y CO_2 (37 °C, 5% CO_2). Se utilizaron dos tipos celulares para evaluar la adhesión:

- Células VERO fueron cultivadas en EMEM (cat. No. 30-2003, ATCC)

suplementado con 10% de FBS (cat. No. 30-2020, ATCC), según las indicaciones del proveedor. Densidad de siembra: 20.000 células por pocillo; medios reemplazados cada 48 h.

- Células MG-63 se cultivaron en EMEM suplementado con 10% de FBS. Densidad de siembra: 20.000 células por pocillo; medios reemplazados cada 48 h.

Para todos los ensayos de adhesión, los distintos tipos celulares, a sus densidades correspondientes, se cultivaron sobre 17 mg de microtransportadores Nativos o NanoWave en placas de 24 pocillos ($n=3/\text{grupo}$). Los microtransportadores de aleación de Ti no son translúcidos, por lo que la confluencia celular se evaluó en un grupo control con placas de TCPS de 24 pocillos ($n=3/\text{grupo}$) para confirmar la morfología celular saludable durante el cultivo. Para evitar la pérdida de microtransportadores durante los cambios de medio, se diseñó un método que empleaba un inserto de colador celular para mantenerlos en el fondo del pocillo mientras se retiraba el medio por el otro lado de la malla. Al día 7, las células se lavaron con PBS, se fijaron con solución de Karnovsky durante 24 h, se lavaron y se mantuvieron en agua tipo I y se almacenaron a 4 °C hasta la obtención de imágenes por ESEM.

Análisis estadístico

Los datos de los experimentos de caracterización superficial de los sustratos se presentan como la media $\pm$ una desviación estándar (DE) de todas las mediciones realizadas en diferentes muestras del mismo tipo de espécimen. Todos los experimentos se repitieron al menos dos veces para asegurar la validez de las observaciones. Las diferencias significativas entre los grupos se determinaron mediante la prueba t de Student para dos muestras. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Tabla 1. Parámetros de tratamiento y resultados de los distintos tratamientos de superficie aplicados a los microtransportadores de Ti6Al4V.

<u>Grupo experimental</u>	<u>Tratamiento</u>	<u>Solvente</u>	<u>Temperatura (°C)</u>	<u>Tiempo (min)</u>	<u>Observaciones</u>
<u>Nativo</u>	<u>Sin tratamiento</u>	<u>Ninguno</u>	<u>TA</u>	<u>--</u>	• <u>Superficie lisa</u>
<u>Exp1</u>	<u>Inmersión sin calor</u>	<u>H₂O₂, 2.5 M</u>	<u>TA</u>	<u>120</u>	• <u>Sin cambios visibles</u>
<u>Exp2</u>	<u>Tratamiento hidrotérmico asistido por microondas (MWHT)</u>	<u>H₂O₂, 2.5 M</u>	<u>200</u>	<u>120</u>	• <u>Capas densas de nanoestructuras</u> • <u>Fragmentación de partículas</u>
<u>Exp3</u>	<u>MWHT</u>	<u>H₂O₂, 2.5 M</u>	<u>150</u>	<u>120</u>	• <u>Cobertura irregular de nanoestructuras</u> • <u>Menor fragmentación de partículas que a 200 °C</u>
<u>Exp4</u>	<u>MWHT</u>	<u>H₂O₂, 2.5 M</u>	<u>150</u>	<u>100</u>	• <u>Cobertura irregular de nanoestructuras</u> • <u>Sinterización de partículas</u> • <u>Fragmentación de partículas aún presente</u>
<u>Exp5</u>	<u>MWHT</u>	<u>H₂O₂, 2.5 M</u>	<u>150</u>	<u>90</u>	• <u>Microrugosidad</u> • <u>Digitaciones desorganizadas y estructuras en forma de pétalo</u> • <u>Sinterización de partículas</u>
<u>Exp6</u>	<u>MWHT</u>	<u>H₂O₂, 2.5 M</u>	<u>125</u>	<u>60</u>	• <u>Nanomodificación superficial limitada</u>
<u>Exp7</u>	<u>MWHT</u>	<u>H₂O₂, 2.5 M</u>	<u>100</u>	<u>60</u>	• <u>Sin cambios visibles</u>
<u>Exp8</u>	<u>MWHT</u>	<u>H₂O₂, 5.0 M</u>	<u>100</u>	<u>90</u>	• <u>Cobertura irregular de nanoestructuras</u> • <u>Sin sinterización</u>
<u>NanoWave</u>	<u>MWHT</u>	<u>H₂O₂, 5.0 M</u>	<u>125</u>	<u>90</u>	• <u>Cobertura homogénea de nanoestructuras con poros y septos de aspecto trabecular</u> • <u>Sin sinterización</u>
<u>Exp9</u>	<u>MWHT</u>	<u>H₂O₂, 9.8 M</u>	<u>100</u>	<u>90</u>	• <u>La corrida no pudo completarse debido a incremento de presión</u>

*TA= Temperatura ambiente

Tabla 1. Se presentan los parámetros de tratamiento (concentración, temperatura, tiempo) aplicados a los microtransportadores de aleación de titanio, con un rango de concentraciones (2.5 a 9.8 M), temperaturas (100 a 200 °C) y tiempos (60 a 120 min) y se caracterizaron los diferentes grupos experimentales mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

Nanomodificación Hidrotérmica de la Superficie de Microtransportadores de Aleación de Titanio asistida por Microondas como Vehículo para la Reparación Ósea, 2025.

Venetia Leslie, Kevin Amaya, Rolando A. Gittens

Los experimentos realizados utilizando nuestro método previamente publicado con 2.5 M de H_2O_2 a 200 °C durante 120 min ("Exp2") revelaron una capa densa de nanoestructuras distribuidas de manera

relativamente homogénea en la superficie de los microtransportadores (Ver fig. 1); sin embargo, también se observó una considerable fragmentación de las partículas.

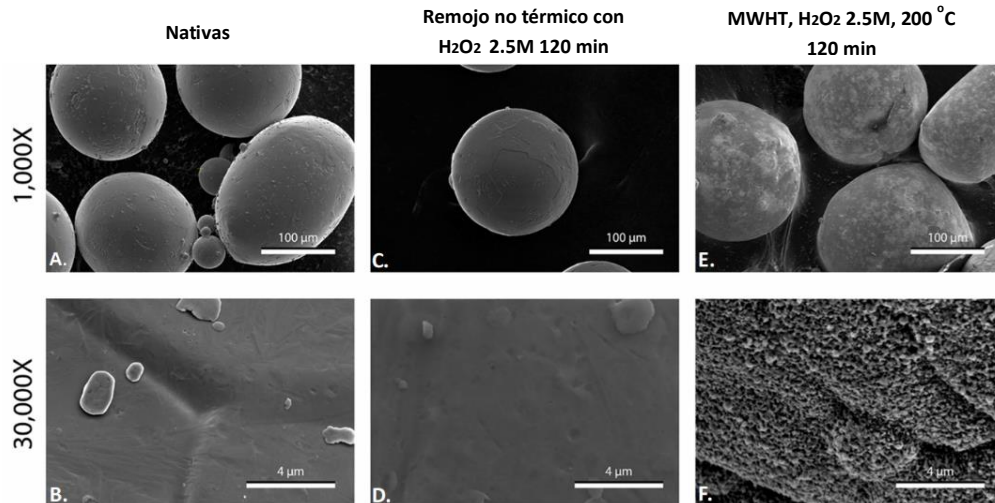


Figura 1. Micrografías electrónicas (EM) de los ensayos iniciales de fabricación de microtransportadores de aleación Ti6Al4V a magnificaciones bajas y altas. Las imágenes EM se recolectaron de muestras con diferentes tratamientos: (A, B) tal como se recibieron ("Nativas"); (C, D) 2.5 M H_2O_2 a temperatura ambiente (sin energía de microondas, "Exp1"); y (E-F) tratados con H_2O_2 2.5 M mediante tratamiento hidrotérmico asistido por microondas (MWHT) a 200 °C durante 120 min ("Exp2"). El tratamiento MWHT con 2.5M H_2O_2 generó alta densidad y cobertura homogénea de nanoestructuras, pero con mucha fragmentación de partículas a mayores temperaturas y tiempos prolongados; mientras que temperaturas más bajas y duraciones cortas resultaron en nanomodificación superficial irregular o mínima. Las barras de escala representan 100 µm a 1.000× y 4 µm a 30.000×.

Al disminuir la temperatura a 150 °C y variar los tiempos entre 120 y 90 min ("Exp3, 4 y 5"), se observó una cobertura irregular de nanoestructuras y de estructuras microrugosas en la superficie, potencialmente relacionadas con la aglomeración y la sinterización de partículas (Ver figuras 2A y 2B). En algunos casos, las estructuras se asemejaban a digitaciones desorganizadas y formaciones en forma

de pétalo, con fragmentación de partículas aún presente, aunque menos frecuente que a 200 °C y aparentemente correlacionada con el tiempo de tratamiento. Reducir la duración a 60 min a 125 °C ("Exp6") y a 100 °C ("Exp7") evitó, en efecto, la fragmentación visible, pero también generó una escasa nanomodificación de la superficie, con una cobertura heterogénea y esporádica, o sin cambios visibles en absoluto.

MWHT, H₂O₂ 2.5M, 150 °C, 90 min

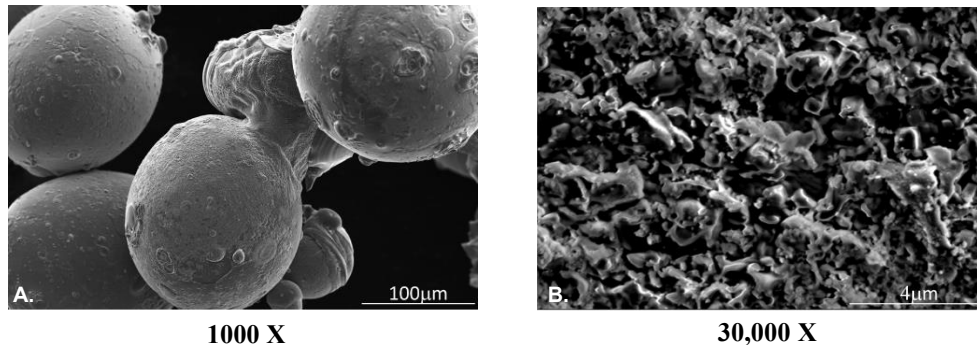


Figura 2. Micrografías electrónicas (EM) de la superficie de los microtransportadores de aleación de titanio a magnificaciones bajas y altas. Luego del tratamiento de MWHT con parámetros en rangos arriba presentados se observó la superficie microrugosa con la formación de estructuras irregulares y en general sinterización de las partículas.

Consideramos entonces aumentar la concentración del solvente a 5 M de H₂O₂ para mejorar la fuerza oxidante del ambiente hidrotérmico, lo que, en teoría, podría permitirnos reducir la duración y la temperatura del tratamiento.

Por razones de seguridad, dado que se utilizaba una concentración considerablemente alta de H₂O₂, comenzamos a 100 °C durante 90 min ("Exp8") y no observamos sinterización ni fragmentación de partículas, aunque los

microtransportadores mostraron una cobertura irregular de nanoestructuras en la superficie. Posteriormente, aumentamos la temperatura a 125 °C durante 90 min ("NanoWave") y, por primera vez, encontramos condiciones experimentales que permitieron obtener una cobertura muy homogénea de nanoestructuras, sin sinterización ni fragmentación de partículas. Cualitativamente, los poros y septos mostraron características similares a las de las trabéculas óseas. (Ver figura 3)

MWHT, H₂O₂ 5M 125 °C, 90 min

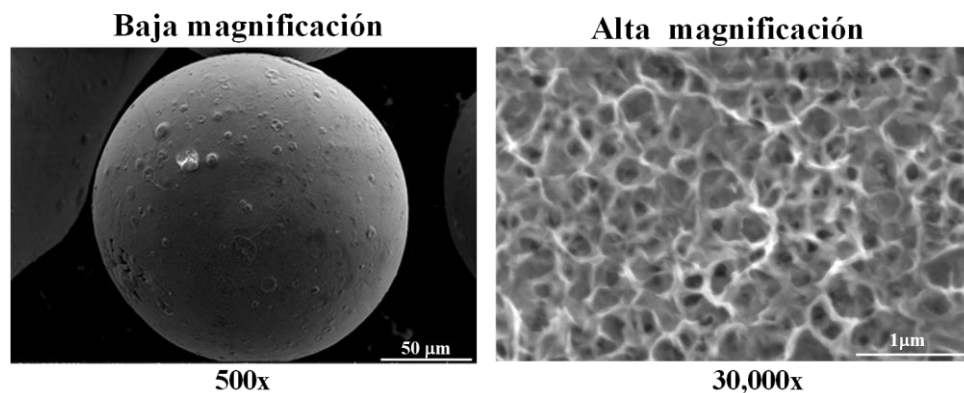


Figura 3. Micrografías electrónicas (EM) de la superficie de los microtransportadores de aleación de titanio a magnificaciones bajas y altas. Luego del tratamiento de MWHT con los parámetros aquí presentados, se observó una cobertura homogénea de la superficie con nanoestructuras porosas de aspecto trabecular.

También intentamos utilizar la concentración máxima de solvente, 9.8 M de H_2O_2 a 100 °C durante 90 min ("Exp9"), pero la corrida no pudo completarse porque la presión en los vasos aumentó bruscamente y activó el sistema de seguridad de la plataforma de microondas (datos no mostrados).

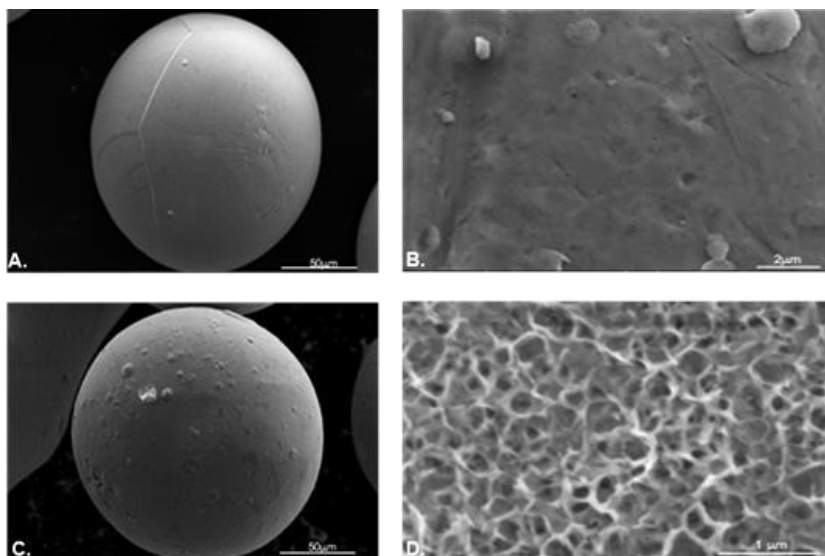
Los espectros obtenidos de la espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR) para caracterización del solvente H_2O_2 5 M antes y después del tratamiento MWHT se evaluaron para confirmar que la fuerza oxidante del solvente no se había agotado durante la duración del tratamiento. El agua tipo I, utilizada como control negativo, mostró una banda ancha centrada en $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ (es decir, vibraciones de estiramiento O–H) y otra cercana a $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ (es decir, flexión H–O–H). El control positivo (9.8 M H_2O_2) presentó, además de estas absorciones asociadas al agua, una banda distintiva en $\sim 880\text{ cm}^{-1}$ (i.e., vibración de estiramiento O–O del H_2O_2) y un hombro alrededor de 1350 cm^{-1} (i.e., vibración de flexión O–H del H_2O_2). También se detectó una banda débil en $\sim 2850\text{ cm}^{-1}$ (es decir, vibraciones de estiramiento C–H), típicamente atribuida a contaminantes hidrocarbonados adventicios. La solución de H_2O_2 5 M antes del tratamiento mostró el mismo perfil espectral, con posiciones de banda consistentes con el control concentrado. Después de 90 min de tratamiento con

la máxima de solvente, 9.8 M de H_2O_2 a 100 MWHT, el espectro de H_2O_2 a 5 M retuvo todas las bandas de agua y de H_2O_2 .

En todos los grupos, se observó una disminución progresiva en la intensidad de las bandas asociadas al peróxido, con espectros de menores concentraciones de peróxido que se asemejaban cada vez más al del agua pura, lo cual constituye un efecto favorable que se acentuó con el tratamiento MWHT.

Morfología y rugosidad de la superficie

Una vez verificado que las nanoestructuras obtenidas con los parámetros de NanoWave eran consistentes y reproducibles, este enfoque se aplicó a todos los microtransportadores de aleación de Ti necesarios para la caracterización superficial y para los experimentos de adhesión celular. Las nanoestructuras en las superficies de los microtransportadores NanoWave mostraron una combinación de nanoporos y nanocrestas que imitaban estructuras similares al hueso (Fig. 4). Los histogramas de los diámetros de los nanoporos NanoWave estuvieron en el rango de 50–250 nm, con un pico en 150 nm; mientras que el grosor de las paredes de las nanocrestas varió principalmente entre 40–260 nm, con una frecuencia máxima en 60 nm.



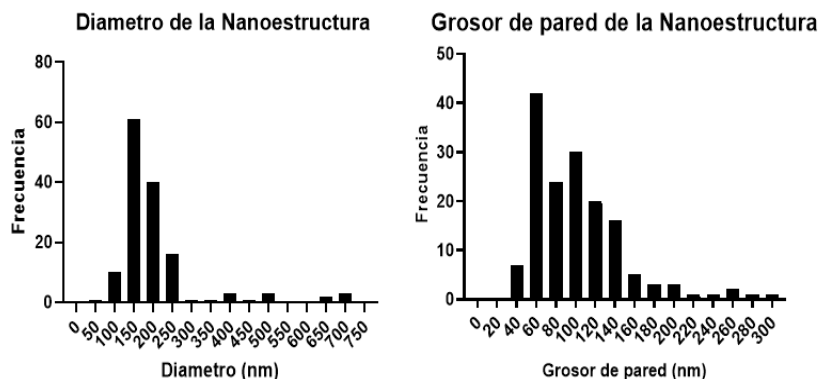


Figura 4. Micrografías electrónicas de las superficies de microtransportadores de aleación Ti6Al4V nanomodificados. (A-B) Nativos y (C-D) NanoWave, caracterizados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) a bajas y altas magnificaciones. Los microtransportadores NanoWave (5 M de H₂O₂, 125 °C, 90 min) mostraron una cobertura compleja y homogénea de nanoporos y septos en la superficie, sin fragmentación de las partículas. Los histogramas de (E) el diámetro de los nanoporos y (F) el grosor de la pared de las nanoseptos estuvo en los rangos de 50–250 nm y 40–260 nm, respectivamente.

Los valores promedio de rugosidad superficial aritmética (RSa) y altura pico a valle (RSz) se obtuvieron analizando doce muestras de cada grupo (Nativo y NanoWave) mediante microscopía confocal láser de barrido (Fig. 5).

En ambos casos, los valores medios de RSa y RSz fueron más altos para las muestras NanoWave, con un RSa de 1.35 vs 0.873 μm y un RSz de 22.65 vs 14.74 μm en comparación con las muestras Nativas.

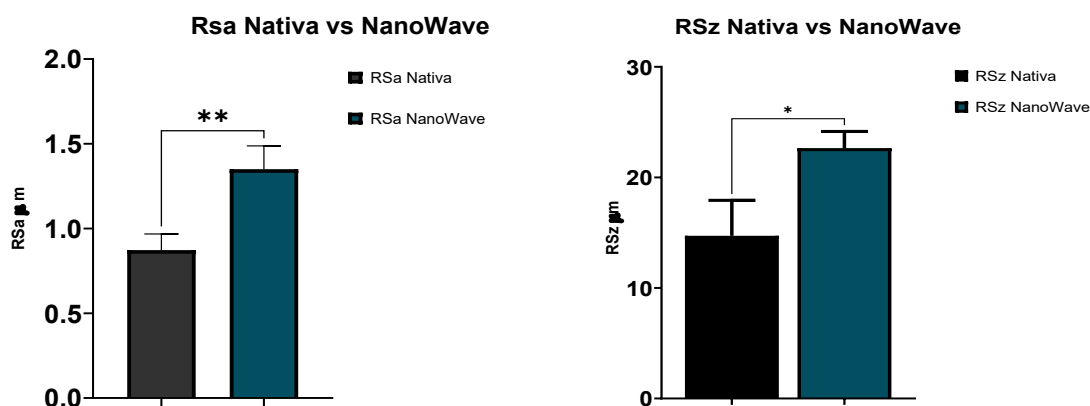


Figura 5. Caracterización de la rugosidad de microtransportadores de aleación de Ti mediante microscopía confocal láser. (A) Rugosidad promedio (RSa) y (B) altura pico a valle (RSz) en microtransportadores de Ti nativos y NanoWave. * indica un valor de p estadísticamente significativo (< 0.05) vs. Nativo; ** indica p < 0.01 vs. Nativo.

Química de superficie (EDX/XPS) y humectabilidad (estática vs. dinámica)
La composición elemental en volumen

(i.e., 1–3 μm de profundidad) de microtransportadores Nativos y NanoWave fue analizada mediante

espectroscopía EDX (Tabla 2). Las muestras nativas presentaron únicamente los tres elementos esperados en la aleación: Ti (87,1 %), Al (9,4 %) y V (3,5 %). En contraste, los

microtransportadores NanoWave mostraron un alto contenido de O (70.1%), lo que redujo significativamente las concentraciones de Ti (29.5%), Al (0.3%) y V (0.1%).

Muestra	Porcentaje atómico medio (%)			
	O	Ti	Al	V
Nativa	0.0	87.1	9.4	3.5
NanoWave	70.1	29.5	0.3	0.1

Tabla 2. Porcentaje atómico promedio (%) de las concentraciones elementales determinadas mediante espectroscopía de dispersión de energía (EDX).

Para un análisis más sensible de la composición química superficial (i.e., 5–8 nm de profundidad), se utilizó la espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS, Fig. 6). A nivel superficial, los microtransportadores Nativos presentaron la mayor concentración de C

(50%), seguida de O (30%) y Al (11%). En el caso de los microtransportadores NanoWave, la presencia de C se redujo al mínimo, mientras que O (58%) aumentó considerablemente, seguido de Ti (24%) y Al (10%) en niveles similares a los de las muestras nativas.

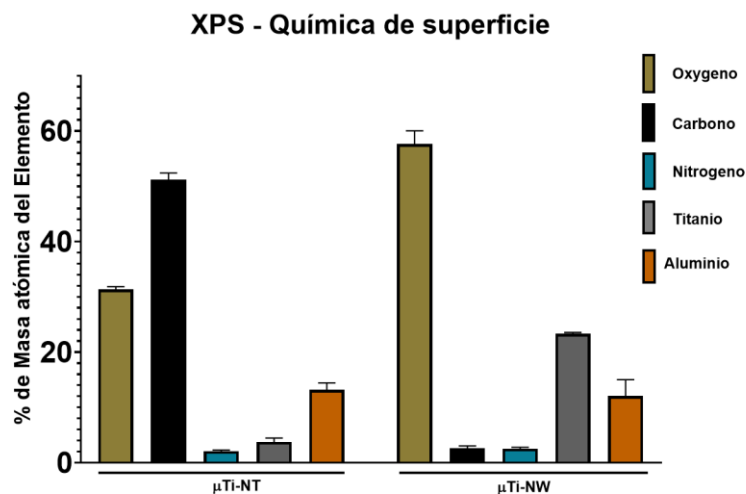


Figura 6. Caracterización química de la superficie de microtransportadores de aleación de Ti mediante XPS. La composición superficial elemental obtenida por XPS revela que, para los microtransportadores Nativos, los elementos de mayor concentración fueron C (i.e., contaminación orgánica atmosférica) y O (i.e., capa pasiva de óxido), con Al en tercer lugar. En contraste, los microtransportadores NanoWave muestran una presencia casi nula de C en la superficie, mientras que las concentraciones de O y Ti aumentan considerablemente, y Al se mantiene en un nivel similar al de las muestras Nativas.

La humectabilidad de los microtransportadores se analizó mediante dos métodos complementarios: mediciones estáticas del ángulo de contacto e imágenes dinámicas obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) (Ver Fig.7). Para las mediciones estáticas, los microtransportadores de cada grupo se colocaron sobre una superficie plana adhesiva organizada en monocapa, y se realizaron adquisiciones seriadas de cuatro imágenes por gota. El grupo de microtransportadores Nativos mostró ángulos de contacto estáticos promedio de $59.4^\circ \pm 2.8^\circ$, mientras que el grupo NanoWave presentó un valor promedio de

$75.0^\circ \pm 8.9^\circ$ (Fig.7 A-D). Ambos valores estuvieron por debajo de 90° , lo que indica un comportamiento hidrofílico. Para el método dinámico con ESEM (Fig. 7F-I), la condensación de microgotas de agua en la superficie permitió evaluar microtransportadores individuales.

El grupo Nativo mostró un ángulo de contacto promedio de $92.3^\circ \pm 26.44^\circ$, mientras que el grupo NanoWave presentó un promedio de $40.0^\circ \pm 7.0^\circ$ (Fig. 6J). A pesar de la naturaleza dinámica de la medición, los ángulos obtenidos para cada micropartícula/gota individual no variaron significativamente con

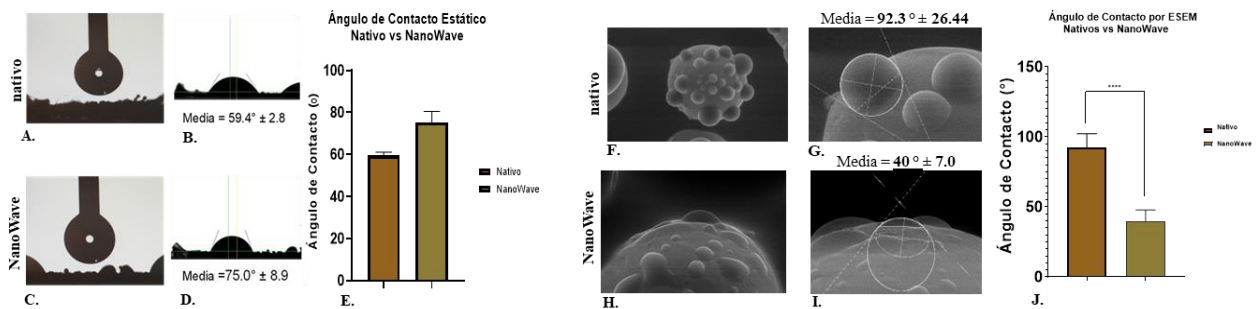


Figura 7. Mediciones estáticas y dinámicas de ángulo de contacto en microtransportadores de aleación de titanio. (A-D) Imágenes representativas del ángulo de contacto estático de gotas de agua sobre microtransportadores de Ti nativos y NanoWave, agrupados y colocados por separado, sobre un sustrato adhesivo. (E) La cuantificación de los ángulos estáticos promedio $\pm$ desviación estándar (DE) fue de $59.4^\circ \pm 2.8^\circ$ para Ti Nativo y de $75.0^\circ \pm 8.9^\circ$ para Ti NanoWave. (F-I) Imágenes dinámicas de gotas de condensación formadas sobre los microtransportadores mediante microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM), bajo condiciones controladas de presión y temperatura. (J) Los ángulos dinámicos promedio fueron de $92.3^\circ \pm 26.44^\circ$ para Ti Nativo y de $40.0^\circ \pm 7.0^\circ$ para Ti NanoWave. Los recuadros muestran imágenes secuenciales utilizadas para determinar la base de la gota y el ángulo.

Adhesión celular en microtransportadores
La capacidad de las superficies de microtransportadores Nativos y NanoWave para promover la adhesión celular se evaluó mediante SEM. Se cultivaron células VERO con fenotipo epitelial y células MG-63 derivadas de osteosarcoma sobre

microtransportadores. Las imágenes SEM obtenidas al día 7, verificadas con confluencia celular en placas TCPS, mostraron una adhesión celular exitosa a las superficies de los microtransportadores, con extensiones observadas a lo largo de la microcurvatura y de la nanotopografía. La monocapa de células adheridas a las superficies lisas y

no tratadas de los microtransportadores Nativos mostró un crecimiento uniforme, con algunas áreas de los microtransportadores que con mayor frecuencia permanecían sin cobertura, y otras con desprendimiento celular (Ver Fig. 8 A, B).

La adhesión celular en los microtransportadores NanoWave, por otro lado, mostró una formación robusta de múltiples capas, con cobertura completa en la mayoría de los microtransportadores y evidencia de puentes celulares (células VERO) entre partículas, lo que ocasionó cierta aglomeración de los

microtransportadores (Ver Fig. 8 C ,D).

La obtención secuencial de imágenes y el análisis cualitativo mostraron un aumento progresivo de la cobertura superficial a lo largo del tiempo en los microtransportadores NanoWave.

En el caso de las células MG-63, se observó una muy buena adhesión a las superficies nanoestructuradas de los microtransportadores NanoWave, aunque con una densidad de crecimiento menor que la observada con las células VERO. Se observó la presencia de protrusiones a modo de filopodios extendidos sobre los microtransportadores

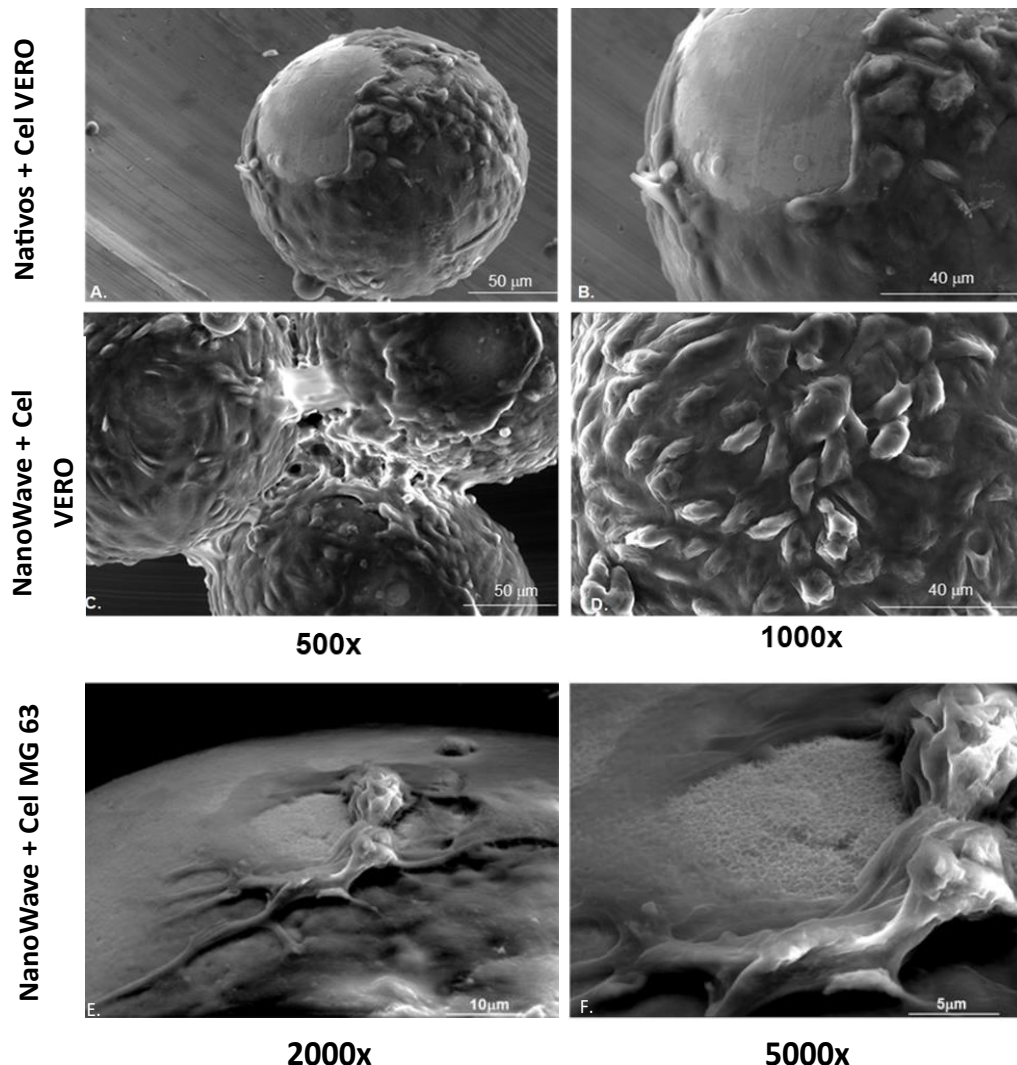


Figura 8. Imágenes de microscopía electrónica ambiental de barrido (ESEM) de la adhesión de células

Nanomodificación Hidrotérmica de la Superficie de Microtransportadores de Aleación de Titanio asistida por Microondas como Vehículo para la Reparación Ósea, 2025.

Venetia Leslie, Kevin Amaya, Rolando A. Gittens

VERO y MG-63 a superficies de microtransportadores a bajas y altas magnificaciones. (A, B) Los microtransportadores Nativos y (C, D) los microtransportadores NanoWave promovieron la adhesión celular. Al día 7, las superficies lisas y no tratadas de los Nativos mostraron una monocapa coherente de células adheridas, con algunas áreas con mayor frecuencia sin cobertura y con desprendimiento celular. La adhesión celular en los microtransportadores NanoWave mostró una formación robusta de múltiples capas, con cobertura casi completa en la mayoría de las partículas, y evidencia de puentes celulares entre microtransportadores. (E, F) Adherencia de células MG-63 en microtransportadores NanoWave. No se logró obtener imágenes de crecimiento sobre microtransportadores Nativos.

DISCUSIÓN

En este trabajo extendimos el concepto de nanomodificación hidrotérmica asistida por microondas (MWHT, por sus siglas en inglés) a microtransportadores esféricos de Ti6Al4V, previamente demostrado, pero en superficies de Ti a granel (16), enfrentando los retos adicionales impuestos por la curvatura, el área superficial y el transporte de masa.

En trabajos previos de nuestro grupo se ha enfatizado que las características a nanoescala superpuestas sobre superficies microrugosas de titanio modulan la adsorción de proteínas, la presentación de integrinas y las respuestas posteriores de la línea osteoblástica (18). Nuestros hallazgos refuerzan la idea de que el control preciso de la fuerza oxidante, la temperatura y el tiempo es crítico para reproducir nanoarquitecturas favorables en sustratos no planos, lo cual impacta positivamente en el desempeño biológico.

Optimización del MWHT en microtransportadores:

Nuestra matriz de parámetros reveló que 5 M de H_2O_2 a 125 °C durante 90 min ("NanoWave") generó nanoporos y nanocrestas uniformes sin fragmentación de partículas. Reducciones de la temperatura o de la duración disminuyeron la cobertura, mientras que aumentos de la temperatura o de los periodos de tratamiento produjeron un "colapso" estructural o fragmentación. De acuerdo con nuestros estudios anteriores, la oxidación controlada de superficies de titanio en etapas tempranas de nucleación

y crecimiento puede dar lugar a una nanoestructuración compleja (18). Asimismo, se sabe que el peróxido puede formar especies peroxo de Ti(IV) y participar en rutas que conducen al crecimiento de TiO_2 en condiciones hidrotérmicas o asistidas por microondas, lo que aporta una base química adicional a la ventana de proceso observada (19).

Al correlacionar estas topografías con los datos de humectabilidad y de cambios químicos, surge una visión más integral: la condición óptima genera nanoarquitecturas biomiméticas, manteniendo la fidelidad estructural y reteniendo el oxidante residual en el medio para una posible reactividad adicional.

Con los parámetros NanoWave (5 M H_2O_2 , 125 °C, 90 min), el SEM mostró nanoporos y nanoseptos uniformes (diámetros de poro de ~50–250 nm; grosor de las paredes de los septos de ~40–260 nm) en la superficie de los microtransportadores.

Las mediciones confocales asociadas indicaron un aumento de RSa y RSz en comparación con los controles Nativos. La nanoestructuración en el rango de 50–200 nm se ha asociado, de manera general, con respuestas osteogénicas favorables en Ti, incluyendo cambios en la adsorción de proteínas y en la actividad de la línea osteoblástica; sin embargo, el tamaño y la organización óptimos siguen siendo dependientes del contexto, de los modelos y de las rutas de fabricación (20).

Los análisis EDX y XPS mostraron un marcado incremento en el contenido de oxígeno y una reducción del carbono espurio o contaminante en la superficie externa. Otros estudios han encontrado que las nanomodificaciones de la superficie pueden acentuar la capa pasiva de óxido, a la vez que reducir la contaminación orgánica adsorbida (8, 21). En efecto, el proceso NanoWave parece inducir una limpieza de la superficie a la par que engrosa o reestructura la capa de óxido. Debido a que la profundidad de análisis de XPS es limitada (~5–8 nm), la señal enriquecida en oxígeno probablemente refleja la región superior del óxido. Sin datos de perfil angular o en profundidad, no pudimos resolver gradientes de óxido ni subóxidos subsuperficiales.

La nanotopografía y la química superficial pueden potenciar los efectos de la humectabilidad y de la energía superficial sobre el comportamiento de la línea osteoblástica. Según nuestros datos, los ángulos de contacto estáticos en superficies NanoWave (75°) fueron más altos que en Nativos (59°), aunque ambos permanecieron < 90°; mientras que las pruebas de condensación por ESEM revelaron ángulos dinámicos más bajos (~40°) en NanoWave frente a Nativos (~92°).

Esta divergencia entre regímenes estáticos y dinámicos indica que la nanoestructura puede influir en la nucleación de gotas, el anclaje de la línea de contacto o el comportamiento de condensación del vapor, aspectos discutidos con frecuencia en la teoría de humectación y en estudios de interfases en implantes (22,23). El resultado aquí sugiere una mayor exactitud en el análisis del ángulo de contacto de las gotas sobre la superficie del microtransportador individualmente en la modalidad dinámica (ESEM), que la gota sobre un conglomerado de microtransportadores en modalidad estática.

Junto con los datos químicos y morfológicos, los cambios derivados del tratamiento hidrotermal sugieren un aumento de la energía superficial o una activación hidrofílica en las superficies NanoWave, consistente con la premisa de que la nanoestructuración hace sinergia con la humectabilidad para modular la respuesta biológica, lo cual está sustentado por la literatura y en cuanto a estructuración de superficies de biomateriales.

Las imágenes SEM confirmaron una adecuada adhesión celular y, en algunos casos, la formación de puentes celulares entre varios microtransportadores NanoWave, en los tipos celulares evaluados (VERO y MG-63). Aunque cualitativos, estos resultados se alinean con el paradigma establecido de que las características superficiales a nanoescala, junto con una humectabilidad optimizada, mejoran el contacto celular temprano, el anclaje del citoesqueleto y el compromiso osteogénico potencial (24,25). En este sentido, la superficie NanoWave puede ofrecer una interfaz favorable para la interacción de células progenitoras óseas, aunque, como siguiente paso, se requieren ensayos y estudios biológicos cuantitativos para confirmar resultados de proliferación, adhesión focal o diferenciación.

CONCLUSIÓN

Hemos demostrado que el MWHT con 5 M de H₂O₂ en condiciones moderadas puede producir de manera confiable topografías homogéneas de óxido a nanoescala (poros y septos) en microtransportadores de Ti6Al4V, mientras retiene el agente oxidante residual en el medio y deja agua como el solvente residual predominante. La caracterización acoplada de morfología,

química y humectabilidad sugiere que la condición NanoWave orquesta una activación superficial equilibrada, reducción de contaminantes y comportamiento favorable de humectabilidad congruente con los principios biomiméticos establecidos en la literatura científica. Aunque se confirmó la adhesión celular de manera cualitativa, aún se requiere cuantificar los resultados

biológicos, la cinética del oxidante y la estratificación detallada del óxido.

Esta plataforma ofrece una vía prometedora hacia una nanomodificación verde y escalable de partículas implantables, uniendo la ciencia de superficies con aplicaciones traslacionales en biomateriales para vías de regeneración de tejidos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Ryan C, Stoltzfus KC, Horn S, Chen H, Louie AV, Lehrer EJ, et al. Epidemiology of bone metastases. *Bone*. 2022;158:115783.
- [2]. Zhang J, Cai D, Hong S. Prevalence and prognosis of bone metastases in common solid cancers at initial diagnosis: a population-based study. *BMJ Open*. 2023;13(10):e069908.
- [3]. Berk L. The effects of high-dose radiation therapy on bone: a scoping review. *Radiat Oncol J*. 2024;42(2):95–103.
- [4]. Al-Shalawi FD, Mohamed Ariff AH, Jung DW, Mohd Ariffin MKA, Seng Kim CL, Brabazon D, et al. Biomaterials as Implants in the Orthopedic Field for Regenerative Medicine: Metal versus Synthetic Polymers. *Polymers (Basel)*. 2023;15(12).
- [5]. Bandyopadhyay A, Mitra I, Goodman SB, Kumar M, Bose S. Improving Biocompatibility for Next Generation of Metallic Implants. *Prog Mater Sci*. 2023;133.
- [6]. Gittens RA, Olivares-Navarrete R, Schwartz Z, Boyan BD. Implant osseointegration and the role of microroughness and nanostructures: Lessons for spine implants. *Acta Biomater*. 2014;10(8): 3363-3371.
- [7]. Alipour S, Nour S, Attari SM, Mohajeri M, Kianersi S, Taromian F, et al. A review on in vitro/in vivo response of additively manufactured Ti-6Al-4V alloy. *J Mater Chem B*. 2022;10(46):9479–534.
- [8]. 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(35):8986–94.
- [9]. Yuan P, Chen M, Lu X, Yang H, Wang L, Bai T, et al. Application of advanced surface modification techniques in titanium-based implants: latest strategies for enhanced antibacterial properties and osseointegration. *J Mater Chem B*. 2024;12(41):10516–49.
- [10]. Gittens RA, Sandhage KH, Olivares-Navarrete R, Hyzy SL, Schwartz Z, Boyan BD. Micro/nanorough titanium-aluminum-vanadium alloy surfaces trigger alternate osteoblast integrin

- expression profile. NEBEC, 40th; Boston, MA: IEEE; 2014. p. 1–2.
- [11]. Souza JCM, Sordi MB, Kanazawa M, Ravindran S, Henriques B, Silva FS, et al. Nano-scale modification of titanium implant surfaces to enhance osseointegration. *Acta Biomater.* 2019;94:112–31.
- [12]. Mesa-Restrepo A, Byers E, Brown JL, Ramirez J, Allain JP, Posada VM. Osteointegration of Ti Bone Implants: A Study on How Surface Parameters Control the Foreign Body Response. *ACS Biomater Sci Eng.* 2024;10(8):4662–81.
- [13]. Lotz EM, Olivares-Navarrete R, Berner S, Boyan BD, Schwartz Z. Osteogenic response of human MSCs and osteoblasts to hydrophilic and hydrophobic nanostructured titanium implant surfaces. *J Biomed Mater Res A.* 2016;104(12):3137–48.
- [14]. Wu B, Tang Y, Wang K, Zhou X, Xiang L. Nanostructured Titanium Implant Surface Facilitating Osseointegration from Protein Adsorption to Osteogenesis: The Example of TiO(2) NTAs. *Int J Nanomedicine.* 2022;17:1865–79.
- [15]. Xue T, Attarilar S, Liu S, Liu J, Song X, Li L, et al. Surface Modification Techniques of Titanium and its Alloys to Functionally Optimize Their Biomedical Properties: Thematic Review. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:603072.
- [16]. Cheng A, Goodwin WB, deGlee BM, Gittens RA, Vernon JP, Hyzy SL, et al. Surface modification of bulk titanium substrates for biomedical applications via low-temperature microwave hydrothermal oxidation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2018;106(3):782–96.
- [17]. Lin DJ, Fuh LJ, Chen CY, Chen WC, Lin JC, Chen CC. Rapid nano-scale surface modification on micro-arc oxidation coated titanium by microwave-assisted hydrothermal process. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019;95:236–47.
- [18]. Gittens RA, McLachlan T, Olivares-Navarrete R, Cai Y, Berner S, Tannenbaum R, et al. The effects of combined micron- and submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. *Biomaterials.* 2011;32(13):3395–403.
- [19]. de Mendonça VR, Lopes OF, Avansi W, Arenal R, Ribeiro C. Insights into formation of anatase TiO₂ nanoparticles from peroxo titanium complex degradation under microwave-assisted hydrothermal treatment. *Ceramics International.* 2019;45(17, Part B):22998–3006.
- [20]. Cohen DJ, Van Duyn CM, Sugar JT, Slosar PJ, Rawlinson JJ, Schwartz Z, et al. P6. MSCs grown on micro-nano modified titanium-aluminum-vanadium surfaces generate osteogenic, angiogenic, and immunomodulatory factors. *The Spine Journal.* 2024;24(9, Supplement):S65.
- [21]. Konatu RT, Domingues DD, França R, Alves APR. XPS Characterization of TiO(2) Nanotubes Growth on the Surface of the Ti15Zr15Mo Alloy for Biomedical Applications. *Journal of*

- hr/>
- functional biomaterials. 2023;14(7).
- [22]. Rupp F, Gittens RA, Scheideler L, Marmur A, Boyan BD, Schwartz Z, et al. A review on the wettability of dental implant surfaces I: theoretical and experimental aspects. *Acta Biomater.* 2014;10(7):2894–906.
- [23]. Baba S, Sawada K, Tanaka K, Okamoto A. Condensation Behavior of Hierarchical Nano/Microstructured Surfaces Inspired by *Euphorbia myrsinites*. *ACS Applied Materials & Interfaces.* 2021;13(27):32332–42.
- [24]. Illing B, Mohammadnejad L, Theurer A, Schultheiss J, Kimmerle-Mueller E, Rupp F, et al. Biological Performance of Titanium Surfaces with Different Hydrophilic and Nanotopographical Features. *Materials (Basel).* 2023;16(23).
- [25]. Boyan BD, Berger MB, Nelson FR, Donahue HJ, Schwartz Z. The Biological Basis for Surface-dependent Regulation of Osteogenesis and Implant Osseointegration. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons.* 2022;30(13):e894–e8.