



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**“PAPEL DE UN PÉPTIDO DERIVADO DE LA PROTEÍNA DE
ADHESIÓN DEL CEMENTO RADICULAR (HACD1/CAP) EN LA
FUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIES DE TITANIO Y ÓXIDO
DE TITANIO”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

C.D. GUADALUPE DEL CARMEN UREIRO CUETO

DIRECTOR DE TESIS

DR. GONZALO MONTOYA AYALA

POSGRADO DE ODONTOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR

DRA. SANDRA ELIZABETH RODIL POSADA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES (IIM)

DR. HIGINIO ARZATE

POSGRADO DE ODONTOLOGÍA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

AGOSTO, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS PROFESIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado el número de becario 917709 y proporcionarme la beca con la cual pude realizar y concluir mis estudios de maestría.

Al Dr. Higinio Arzate, por abrirme las puertas del laboratorio y darme la oportunidad de formar parte de su equipo.

A la Dra. Sandra Rodil (IIM), por todas las facilidades recibidas, por formar parte de mi comité tutor y sus aportaciones en la mejora de este proyecto.

A la Dra. Phaedra Suriel Silva Bermúdez (INR), por su tiempo y apoyo en la síntesis de las superficies de titanio y óxido de titanio.

A la M. en C. Adriana Tejeda Cruz (IIM), por su apoyo en la realización de los análisis de difracción de rayos X.

A la Dra. Gina Prado Prone (INR) por su apoyo en la realización del ensayo de mojabilidad.

Al Dr. Jesús Ángel Arenas Alatorre, M. en C. Manuel Aguilar Franco, Arq. Diego Quitero, M. en C. Jaqueline Rafaela Cañetas Ortega, Dr. Carlos Raúl Magaña Zavala y al Dr. Samuel Tehuacanero Cuapa del Laboratorio Central de Microscopía del Instituto de Física, UNAM, por brindarme todo el apoyo para la obtención de las imágenes de microscopía de fuerza atómica, microscopía electrónica de barrido, así como los análisis EDS.

Al Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE) del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT), UNAM y al técnico Selene Islas por la caracterización de las muestras mediante las técnicas de espectroscopía de dispersión Raman y reflectancia total atenuada por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (ATR-FTIR).

Por último, pero no menos importante a mi tutor, el Dr. Gonzalo Montoya Ayala. Doctor, gracias por creer y confiar en mí, por ser mi guía, por enseñarme a trabajar con disciplina y respeto, por motivarme a seguir mejorando cada día no solo como estudiante, sino también como persona, gracias su infinita paciencia, por todas las lecciones y por todos sus consejos.

Este trabajo de tesis se realizó con el apoyo de los proyectos PAPIIT de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM IN204120 e IN203920

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi madre

Mamá, gracias por apoyarme a realizar mis metas, sin tu cariño y apoyo no estaría escribiendo estas líneas, mi papá estaría muy orgulloso de ti por sabernos guiar. Este logro también es tuyo.

A mis hermanos... Raúl, Manuel, Carlos y a mi Nano (José)

Hermanos, gracias por cuidarme desde que soy pequeña, por ser mi inspiración para seguir estudiando, sin sus consejos y apoyo no estaría donde estoy ahora, ustedes marcaron mi vida de una manera valiosa.

A mi familia por elección... Luis, Karen, Gaby, Manu y Óscar

Ustedes son más que mis amigos, son la familia que escogí para vivir, ustedes son pieza clave en esta aventura, ustedes hacen más amena la estancia en esta ciudad, todas esas risas, nuestros viernes de tacos, todos esos momentos felices y tristes que hemos pasado juntos nos hacen una gran familia.

A mis amigos... Lore y Ezequiel

Chicos, gracias por tantos momentos felices, por todas esas tardes en las que nos íbamos a comer, por todos esos cafés con galletas, por todas las noches de desvelo estudiando para un examen a través de una videollamada, por su sinceridad por más dura que esta pueda llegar a ser, pero sobre todo gracias por toda la paciencia que se necesita para aguantarme como amiga.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
ANTECEDENTES	5
Aspectos biológicos	5
El periodonto	5
El ligamento periodontal (LPD)	5
Encía	6
Hueso	6
Cemento radicular	7
Componente inorgánico	9
Componente orgánico	9
Proteína del cemento 1 (CEMP1)	11
Secuencias peptídicas aisladas de CEMP1	12
Proteína de adhesión del cemento (HACD1/CAP)	13
CAP_{p15}	14
Proceso de biomineralización	14
Fases del proceso de biomineralización	15
El titanio como biomaterial en la fabricación de implantes	17
Funcionalización de superficies de implantes y su papel en el proceso de oseointegración	20
Métodos que modifican la superficie de los implantes:	
modificación de la rugosidad y funcionalización	22
Modificación de la rugosidad	23
Arenado (Grit-blasting)	23
Grabado ácido	24
Anodización	24
Funcionalización	24
Recubrimientos inorgánicos	25

Pulverización con plasma	25
Magnetron sputtering	25
Revestimientos con hidroxiapatita (HA)	25
Cationes y aniones como sustitutos de cubiertas de hidroxiapatita	25
Incorporación catiónica	26
Incorporación aniónica	27
Recubrimientos orgánicos	28
Uso de secuencias peptídicas	28
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	33
OBJETIVOS	34
Objetivo general	34
Objetivos específicos	34
HIPÓTESIS	34
DISEÑO EXPERIMENTAL	35
Síntesis del péptido	35
Síntesis de superficies de Ti y TiO₂ por evaporación catódica en radiofrecuencia (magnetron sputtering)	35
Adsorción y autoensamblaje de CAP_{p15}	37
Microscopía de fuerza atómica (MFA)	37
Microscopía de fluorescencia	38
Cuantificación del péptido marcado	38
Ángulo de contacto	39
Medición del ángulo de contacto	39
Formación de cristales <i>in situ</i>	41
Microscopía electrónica de barrido (MEB)	42
Espectroscopía por dispersión de energía de rayos X (EDS)	43
Caracterización espectroscópica de los cristales	44
Espectroscopía de dispersión Raman	44
Reflectancia total atenuada por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (ATR-FTIR)	44
Identificación de la fase mineral	45

Difracción de rayos X (haz rasante)	45
Pruebas biológicas	46
Ensayo de proliferación celular (MTT)	46
Ensayo de cierre de herida	46
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	48
RESULTADOS	49
Características fisicoquímicas de CAP_{p15}	49
Adsorción y autoensamblaje de CAP₁₅	50
Cuantificación de CAP_{p15}-AF488 adsorbido a superficies	54
Humectabilidad	55
Medición del ángulo de contacto	55
Formación de cristales <i>in situ</i>	56
Caracterización espectroscópica de los cristales	63
Difracción de rayos X (haz rasante)	67
Pruebas biológicas	69
Ensayo de proliferación celular (MTT)	69
Ensayo de cierre de herida	70
DISCUSIÓN	73
CONCLUSIONES	80
PERSPECTIVAS	80
REFERENCIAS	81

RESUMEN

Actualmente el titanio es el biomaterial de elección en la fabricación de implantes de uso biomédico (dentales u ortopédicos) debido a su biocompatibilidad y alta resistencia a la corrosión. En el caso de los implantes dentales, aunque poseen una tasa de supervivencia elevada, aún existen casos en los cuales pueden perderse debido a un proceso de oseointegración deficiente en los primeros 6 meses posterior a su colocación o como consecuencia de un proceso de peri-implantitis, el cual provoca un proceso inflamatorio de los tejidos blandos circundantes y la pérdida del soporte del implante oseointegrado. Debido a que el proceso de oseointegración se encuentra relacionado con la interacción que existe entre el biomaterial y el organismo a través de características químicas y topográficas que el implante posea en su superficie, se han desarrollado alternativas para la funcionalización de implantes encaminadas a acelerar dicho proceso promoviendo la migración, adhesión, proliferación y posterior diferenciación de células osteoblásticas, algunos ejemplos son el grabado ácido, arenado, la adición de iones y la incorporación de moléculas bioactivas como los péptidos.

Partiendo de la premisa en cuanto al uso de moléculas bioactivas, nuestros estudios se centraron en la evaluación de superficies de Ti y TiO₂ funcionalizadas a partir de la adsorción física (fisisorción) del péptido CAP_{p15}. Esta secuencia peptídica se deriva de la porción C-terminal de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP), la cual se encuentra relacionada con el proceso de biomineralización. El estudio consistió en la caracterización de superficies de Ti y TiO₂ en presencia y ausencia de péptido a partir de microscopía de fuerza atómica (MFA), ensayos de mojabilidad, así como en la cuantificación de péptido adsorbido a partir de su marcaje previo con Alexa Fluor 488. Posteriormente, se estudió la capacidad de CAP_{p15} como regulador en la formación y crecimiento de minerales cuando se encuentra adsorbido a superficies de Ti y TiO₂, para ello, superficies con y sin péptido fueron incubadas bajo condiciones controladas como el pH (~7.4) y temperatura (37 °C), es decir bajo condiciones cercanas a las fisiológicas. Se ocuparon dos disoluciones experimentales: saliva artificial y un buffer con

sobresaturación de calcio y fosfato (BSat Ca-PO₄). Con la primera disolución evaluamos la capacidad de CAP_{p15} en la promoción de la formación de mineral y con la segunda solución se determinó la capacidad de CAP_{p15} como un regulador en la morfología de los cristales de hidroxiapatita (HA), dado que esta última solución es capaz de promover la formación de dicho mineral, su estudio se centró únicamente al análisis morfológico de los depósitos a partir de la microscopia electrónica de barrido. Finalmente, se evaluó el efecto de las superficies prístinas y funcionalizadas con CAP_{p15} en la proliferación y migración de fibroblastos gingivales.

Los resultados demostraron que CAP_{p15} tiene la capacidad de adsorberse en ambos tipos de superficies, adsorbiéndose de manera preferencial al TiO₂ además actuar como molécula osteoconductora al promover la precipitación de cristales de hidroxiapatita carbonatada (principal componente del tejido óseo humano) y como molécula bioactiva al promover proliferación y migración de fibroblastos gingivales.

ABSTRACT

Titanium is currently the biomaterial of choice in the manufacture of implants for biomedical use (dental or orthopedic) due to its biocompatibility and high resistance to corrosion. In the case of dental implants, although they have a high survival rate, there are still cases in which they can be lost due to a poor osseointegration process in the first 6 months after their placement or as a consequence of a peri-implantitis process, the which causes an inflammatory process of the surrounding soft tissues and the loss of the osseointegrated implant support. Due the osseointegration process is related to the interaction that exists between the biomaterial and the organism through chemical and topographic characteristics that the implant has on its surface, alternatives have been developed for the functionalization of implants aimed at accelerating said process promoting the migration, adhesion, proliferation and subsequent differentiation of osteoblastic cells, some examples include acid etching, sandblasting, ions addition and the incorporation of bioactive molecules such as peptides.

Starting from the premise regarding the use of bioactive molecules, our studies focused on the evaluation of functionalized Ti and TiO₂ surfaces from the physical adsorption (physisorption) of the CAP_{p15} peptide. This peptide sequence is derived from the C-terminal portion of the root cement adhesion protein (HACD1 / CAP), which is related to the biomineralization process. The study consisted of the characterization of Ti and TiO₂ surfaces in the presence and absence of peptide from atomic force microscopy (AFM), wettability assays, as well as the quantification of adsorbed peptide from its previous labeling with Alexa Fluor 488. Subsequently, the capacity of CAP_{p15} as a regulator in the formation and growth of minerals when it is adsorbed to Ti and TiO₂ surfaces. For this, surfaces with and without peptide were incubated under controlled conditions such as pH (~ 7.4) and temperature (37 ° C), that is to say, under conditions close to physiological. Two experimental dissolutions were used: artificial saliva and a buffer with calcium and phosphate supersaturation (BSat Ca-PO₄). With the first dissolution we evaluated the capacity of CAP_{p15} in promoting mineral formation and with the second dissolution the capacity of CAP_{p15}

as a regulator in the morphology of hydroxyapatite (HA) crystals. Due this last solution is capable to promote the formation of this mineral, their study focused solely on the morphological analysis of the deposits from the scanning electron microscopy (SEM). Finally, the effect of pristine and CAP_{p15} functionalized surfaces on the proliferation and migration of gingival fibroblasts was evaluated.

The results showed that CAP_{p15} has the ability to adsorb on both kinds of surfaces, preferentially adsorbing to TiO₂ and also acting as an osteoconductive molecule by promoting the precipitation of crystals of carbonated hydroxyapatite (main component of human bone tissue) and as a bioactive molecule by promoting proliferation and migration of gingival fibroblasts.

Aspectos biológicos

El periodonto

El periodonto es el conjunto de tejidos encargados de proporcionar soporte y dar integridad a los órganos dentarios a partir de la interacción que existe entre ellos. Se encuentra constituido por tejidos de naturaleza *blanda* como el ligamento periodontal y la encía, así como por tejidos *duros* como el hueso alveolar y el cemento radicular (Fig.1) [1].

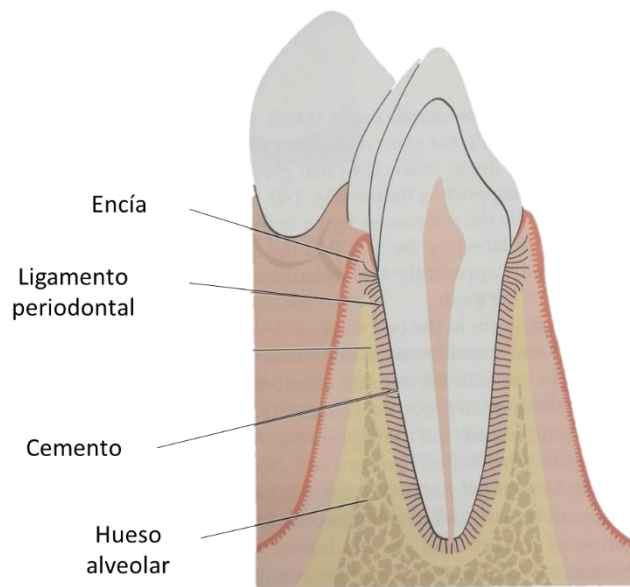


Fig.1 Distribución anatómica de los 4 tejidos que componen el periodonto. Imagen tomada de Periodontología Clínica e Implantológica de Lindhe. 6° Edición.

El ligamento periodontal (LPD)

Tejido altamente especializado en forma de red fibrosa cuya función es mantener el anclaje de los dientes a través del cemento radicular al hueso alveolar, proporcionando estabilidad y distribuyendo las fuerzas producidas por la

masticación. El espacio que abarca el ligamento periodontal es de aproximadamente 100-400 μm ; se compone por células óseas, del cemento, endoteliales, restos epiteliales de Malassez y principalmente por fibroblastos, los cuales actúan como productores de matriz extracelular y fibras de colágena. La colágena producida por los fibroblastos es principalmente tipo I seguida por colágena tipo III, y en mucho menor proporción colágena tipo IV, V, VI y XII [2-6].

Encía

Otro componente periodontal considerado de naturaleza blanda es la encía; la cual podemos clasificar como encía marginal, adherida e interdental, mismas que varían con base en su localización anatómica, así como sus características histológicas y funcionales. De manera general, la principal función de la encía es formar una barrera contra el daño mecánico y la penetración de microorganismos y/o agentes nocivos [4-6].

Además de los tejidos blandos descritos anteriormente; el periodonto, se encuentra formado por dos tejidos duros o mineralizados: hueso alveolar y cemento radicular. Entre ambos tejidos existen similitudes en cuanto a composición de la matriz, sin embargo, existen notables diferencias morfológicas y metabólicas [7-9].

Hueso

Este tejido forma parte de los huesos maxilares (inferior y superior), corresponde a las porciones que rodean y contienen a los alvéolos, que a su vez alojan a las raíces de los órganos dentarios. Anatómicamente consta de hueso compacto delgado que forma la pared alveolar, placas corticales externa e interna y hueso esponjoso ubicado entre las placas de hueso cortical. El hueso alveolar posee un grosor de 100-400 μm , y como principal característica es su proceso de remodelación constante. La nutrición del hueso es abastecida por el sistema de Havers y los canales de Volkmann por donde transitan vasos sanguíneos, linfáticos y fibras nerviosas, los cuales conectan el ligamento periodontal a la médula ósea. La

composición química del hueso está constituida por la matriz inorgánica, que son sales de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita, mientras que la matriz orgánica se compone mayormente de colágena tipo I y III, en menor proporción se encuentran las proteínas no colágenas como la sialoproteína ósea (BSP), osteocalcina (OCN), osteopontina (OPN), proteoglicanos, fosfatasa alcalina (ALP), proteínas morfogénicas óseas (BMP) y factores de crecimiento, con características y funciones específicas en la homeostasis del hueso [6,14,24,27].

Cemento radicular

El cemento radicular es descrito como un tejido conectivo mineralizado avascular y no innervado que reviste la raíz de los órganos dentarios, mantiene el anclaje entre el diente y el hueso alveolar a través de las fibras del ligamento periodontal protegiendo la integridad de la superficie de la raíz [8-10]. El grosor del cemento abarca las 50-200 μm y a diferencia del hueso, tiene una baja tasa metabólica, ya que no se encuentra en constante remodelación, sino que continúa su crecimiento en grosor a lo largo de la vida.

El cemento puede ser clasificado con base en la presencia o ausencia de cementocitos en su estructura (celular y acelular), en la presencia de fibras intrínsecas y extrínsecas (dependiendo de la presencia de fibras de colágena formada por cementoblastos o fibroblastos, respectivamente) [10-13].

Cemento acelular afibrilar

Se encuentra ubicado en la unión cemento esmalte, es una matriz mineralizada sin contenido de fibras de colágena, debido a esto no se cree que tenga función en el anclaje del diente al alvéolo. Su depósito se presenta como parches aislados a lo largo de la unión cemento-esmalte, además su ubicación depende del tipo de órgano dentario en el que se encuentre; en cuanto a composición, la materia orgánica lidera con la presencia de los glucosaminoglicanos. Su función aún es desconocida [10-13].

Cemento celular con fibras intrínsecas (fibrocemento intrínseco)

Conformado por cementocitos dentro de una matriz y fibras de colágena intrínsecas secretadas por cementoblastos las cuales se encuentran orientadas paralelamente a la superficie de la raíz rodeando el órgano dentario. Este tipo de cemento lo podemos localizar en la furca de órganos dentarios bi o triradicales, así como en el ápice de la raíz. Una característica importante de este tipo de cemento es que tiene la capacidad de reparar un defecto de reabsorción de la raíz a corto plazo debido a su capacidad innata de crecer de una manera más rápida que cualquier otro tipo de cemento [11-15].

Cemento acelular con fibras extrínsecas

Se encuentra confinado a la zona cervical y media de la raíz dental, cubriendo aproximadamente del 40-70% de la superficie total (aunque algunos autores mencionan que puede llegar a ser del 60-90%) y un grosor que va de las 50-200 μm . Se compone fundamentalmente de fibras colágenas y proteínas no colágenas. Las fibras extrínsecas se disponen perpendicularmente a la superficie de la raíz con un diámetro aproximado de 3-6 μm [11,15].

Composición del cemento radicular

El cemento es un tejido conectivo mineralizado no uniforme que comparte mucha similitud en cuanto a composición química con el hueso. Su componente inorgánico principal son cristales de hidroxiapatita, el componente orgánico a base de colágena, glicoproteínas y proteoglicanos y agua.

Componente inorgánico

Corresponde aproximadamente al 50% de la composición del cemento en forma de cristales de hidroxiapatita (HA), sin embargo, con base en estudios fisicoquímicos se ha demostrado la presencia de fosfatos de calcio amorfos, así como la presencia de elementos traza como magnesio, cobre, zinc y sodio [8,11,13].

Componente orgánico

Colágena

La colágena es una proteína fibrilar y es el componente principal de la materia orgánica del cemento radicular. De la colágena, el 90% de ella corresponde a colágena tipo I mientras que la colágena tipo III representa un 5%, aproximadamente. La colágena es una proteína imprescindible en el proceso de biomineralización debido a que las interacciones colágena-mineral permiten la precipitación y crecimiento de cristales de hidroxiapatita. Dichas interacciones se encuentran reguladas por la estructura y composición de la colágena. Por ejemplo, la presencia del ácido poli-aspártico (pAsp), el cual interactúa con los fosfatos de calcio amorfos (*ACP, amorphus calcium phosphates*, por sus siglas en inglés) formando un complejo cargado negativamente que le permite interactuar con regiones cargadas positivamente de la colágena de su región carboxilo-terminal (C-terminal), este complejo pAsp-ACP-colágena permite el depósito de mineral en la fibrilla de colágena. Por otro lado, mutaciones en la secuencia de los aminoácidos que la componen alteran la formación, orientación, así como la organización de las apatitas, propiciando un aumento en la fragilidad de los huesos; la osteogénesis imperfecta representa un ejemplo de ello [11,13,14].

Proteínas no colágenas

Las principales proteínas no colágenas que conforman al cemento radicular son la BSP y la OPN, ambas pertenecen a la familia de proteínas SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand N-Linked Glycoproteins) debido a que en su secuencia se encuentra el motivo de unión a integrinas RGD (Arg-Gly-Asp). Son glicoproteínas fosforiladas y sulfatadas, expresadas fundamentalmente durante el desarrollo temprano de la raíz del órgano dentario en el cemento acelular de fibras extrínsecas y cemento afibrilar acelular. Llevan a cabo un papel importante en el proceso de mineralización ya que permiten la unión a fibras de colágena e hidroxiapatita ayudando a mantener la integridad estructural del tejido [15].

Sialoproteína ósea (BSP)

Glicoproteína fosforilada y sulfatada importante en el proceso de mineralización; en su secuencia podemos encontrar el motivo de unión a integrinas RGD, esencial en el proceso de adhesión celular. Constituye aproximadamente del 8-12% del total de las proteínas no colágenas encontradas en el cemento radicular.

Dada su capacidad de promover la adhesión y diferenciación celular, BSP es capaz de promover la quimioatracción de pre-cementoblastos y la nucleación de cristales de hidroxiapatita. Así mismo, es una proteína crucial en el proceso de biomineralización ya que se ha demostrado su capacidad nucleadora de cristales de HA. BSP se ha encontrado en una alta expresión en sitios de formación ósea de *novo* y en la reparación de fracturas [6,8,13,16].

Osteopontina (OPN)

Proteína fosforilada, acídica y con múltiples sitios de poli-Asp. Se encuentra presente en el ligamento periodontal de dientes maduros, es expresada preferencialmente cerca del cemento acelular y cementocitos, así como en frentes de mineralización, además posee propiedades de unión celular gracias a su secuencia RGD, por tanto, también se sugiere que actúa como un regulador en el

proceso de migración y diferenciación de células progenitoras de cementoblastos [8].

Además del cemento y hueso, se ha observado que la osteopontina puede estar presente en calcificaciones ectópicas en riñón, placas ateroscleróticas, lumen de vasos y fluidos altamente saturados como leche y orina, sugiriendo que juega un papel modulador de la biomineralización [16,17].

Glucosaminoglucanos

Químicamente son macromoléculas compuestas por una proteína unida covalentemente a largas cadenas repetitivas de disacáridos. Los principales glucosaminoglucanos presentes en el cemento humano son el ácido hialurónico, dermatán sulfato y condroitín sulfato. Son un componente integral debido a que actúan como mediadores de unión entre el cemento ya formado y el recién formado, creando líneas incrementales. Su presencia disminuye posterior al proceso de mineralización [8].

Además de las proteínas antes mencionadas, se han identificado y descrito dos proteínas que juegan un papel importante en la formación del cemento radicular: la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) [6,8,9].

Proteína del cemento 1 (CEMP1)

CEMP1 se encuentra codificada en el brazo corto del cromosoma 16 segmento 13.3 (16p13.3). Fue aislada por primera vez del cemento radicular humano, es secretada por cementoblastos y se ha identificado en células localizadas en zonas endosteales del hueso y en zonas paravasculares del ligamento periodontal. CEMP1 es una proteína glicosilada, fosforilada y termoestable. Se encuentra compuesta por 247 aminoácidos y su secuencia se encuentra enriquecida principalmente por prolinas, glicinas, alaninas y leucinas. Se considera una proteína con regiones intrínsecamente desordenadas, ya que se encuentra conformada principalmente

por un 61.5% de estructura aleatoria (*random coil*), seguida de un 28.6% de estructura alfa hélice y apenas un 9.9% de estructura beta plegada. Estudios realizados con fibroblastos gingivales, a los cuales se realizó la transfección de CEMP1, mostraron la capacidad de expresar un fenotipo cementoblástico/osteoblástico, es decir, promovieron la expresión de proteínas asociadas a cemento/hueso y producir matriz mineralizada [18,19].

CEMP1 actúa como un regulador clave en el proceso de mineralización del cemento radicular debido a su capacidad para promover la adhesión y diferenciación celular, así como regulador en el depósito de cristales de hidroxiapatita en estudios *in vitro* [8,18,19].

Secuencias peptídicas aisladas de CEMP1

Actualmente existen reportes de dos péptidos sintéticos derivados de la proteína del cemento 1: CEMP1-p1 y CEMP1-p4. CEMP1-p1 es una secuencia de 20 aminoácidos (MGTSSTDSQQAGHRRRCSTSN) derivada de la porción amino-terminal (N-terminal). Estudios recientes han demostrado la capacidad de CEMP1-p1 en la nucleación de cristales de hidroxiapatita. A partir de análisis *in vitro* e *in vivo* se demostró que CEMP1-p1 induce la diferenciación de células del ligamento periodontal hacia un fenotipo osteoblástico y posee la capacidad de promover la formación de nuevo hueso en defectos de tamaño crítico en calvaria de ratas, 30 y 60 días posterior a la colocación de los andamios funcionalizados con dicho péptido. Por otro lado, CEMP1-p4 es una secuencia formada por 15 aminoácidos (QGQGDTE DGRMTLMG) derivada de la porción C-terminal, que posee la capacidad de promover la proliferación y diferenciación de células troncales de la mucosa oral (*HOMSC*, por sus siglas en inglés) hacia un fenotipo mineralizante a partir de la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina [20,21].

Proteína de adhesión del cemento (HACD1/CAP)

La proteína de adhesión del cemento fue la primera proteína en ser aislada e identificada del cemento radicular. Se encuentra codificada en el brazo corto del cromosoma 10, segmento 13.14 (p13.14) y es una secuencia conformada por 140 aminoácidos. Se considera una isoforma truncada de la 3-hidroxiacil-CoA-deshidratasa 1, la cual está constituida por 288 aminoácidos y cuya actividad se relaciona con el desarrollo de músculo esquelético y en la elongación de ácidos grasos de cadena larga en la formación de fibras musculares [22,38,39].

De los 140 aminoácidos que componen a HACD1/CAP, los 125 residuos correspondientes a la porción N-terminal son idénticos a HACD1. Esto es producto del empalme que elimina la secuencia **IVHCLIGIVPT** (motivo de unión de fosfatasa) de HACD1 y lo sustituye por la secuencia **VSPSCCFSIAVIFM** (especifica de CAP) produciendo un cambio en la función de la proteína (Tabla 1). En la secuencia se han descrito la presencia de treoninas y serinas que le confieren la capacidad de poder sufrir modificaciones postraduccionales, como fosforilaciones. HACD1/CAP ha sido aislada, caracterizada y purificada de extractos de cemento bovino y humano a partir de un anticuerpo monoclonal: *anti-CAP bovino*, además, a partir de estudios de dicroísmo circular, se ha comprobado que su estructura secundaria se encuentra fundamentalmente compuesta por conformaciones desordenadas (45.9%) y estructuras alfa hélice (43.2%) [6,8,24].

En estudios previos, se ha observado que esta proteína participa de manera activa en el reclutamiento y diferenciación celular durante la formación del cemento y durante el proceso de biomineralización [6,9,22-24].

CAP_{p15}

Como se mencionó anteriormente, el empalme alternativo que sufre HACD1 provoca un cambio en su sitio de actividad modificando la porción C-terminal por la secuencia de 15 aminoácidos **VSFPSCCFSIAVIFM** (Tabla 1), generando un producto de 140 residuos: HACD1/CAP. Se ha propuesto que esta modificación genera un cambio en la función de la proteína. CAP_{p15} es un péptido de naturaleza ácida e hidrofóbica y con base en análisis *in silico* se ha propuesto que posee un punto isoeléctrico teórico de 5.48 y un peso molecular de 1.65 kDa. Por otro lado, estudios en sistemas libres de células, demostraron su capacidad de mimetizar algunas funciones de la proteína completa, como la afinidad y promoción en la formación de cristales de hidroxiapatita. Finalmente, a partir de estudios *in vivo*, CAP_{p15} actúa promoviendo la formación de tejido óseo *de novo* en defectos de tamaño crítico en calvarias de rata y tibias de conejo [24,25].

10	20	30	40	50
MGRLTEAAAA	GSGSRAAGWA	GSPPTLLPLS	PTSPRCAATM	ASSDEDGTNG
60	70	80	90	100
GASEAGEDRE	APGERRRLGV	LATAWLTFYD	IAMTAGWLVL	AIAMVRFYME
110	120	130	140	
KGTHRGLYKS	IQKTLKFFQT	FALLE VSFPS	CCFSIAVIFM	

Tabla 1. Secuencia de HACD1/CAP, en negritas se marca la porción C-terminal de 15 aminoácidos

Fuente: ExPASy Bioinformatics Resource Portal

Proceso de biomineralización

La “*biomineralización*” hace referencia al proceso por medio del cual los organismos son capaces de producir tejidos “duros” indispensables para realizar movimientos, apoyo, protección y defensa; todo esto a través del depósito de iones como el calcio, silicio, hierro, bario y estroncio. La biomineralización dependerá en gran medida de la función de las células y de la matriz; mientras que su regulación dependerá de las interacciones que ocurran entre minerales y moléculas orgánicas extracelulares. En vertebrados, los tejidos mineralizados incluyen hueso, dentina, esmalte y

cartílago calcificado, en donde la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$) es el componente inorgánico principal [30-33].

El proceso de biomineralización comienza con la síntesis de vesículas de la matriz (50-200 nm de diámetro) las cuales son producidas y liberadas por condrocitos, osteoblastos, cementoblastos y odontoblastos. Algunos autores sugieren que estas vesículas actúan como sitio de nucleación inicial o primaria para la posterior mineralización de la matriz extracelular (mineralización secundaria) es decir, la biomineralización es un fenómeno bifásico [31,33,37].

Fases del proceso de biomineralización

Fase 1

Consiste en la formación de pequeños cristales al interior de vesículas sintetizadas por células especializadas. En la periferia de estas vesículas se da un incremento de la concentración de Ca^{+2} , posiblemente por la atracción electrostática que ocurre entre los fosfolípidos que recubren la membrana vesicular y el calcio del medio intracelular. El transporte de calcio hacia el interior de la vesícula se da a partir de una proteína llamada *Anexina V*, mientras que la concentración de PO_4^{-3} está en función de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP). La acumulación de PO_4^{-3} y Ca^{+2} al interior de la vesícula permite la formación de precipitados de CaPO_4 (fosfato de calcio), una estructura mineral poco madura, que se cree puede ser una fase temprana o precursora de cristales de fosfato octacálcico, los cuales posteriormente darán lugar a la hidroxiapatita [30,33].

Fase 2

Esta fase comienza con la liberación de los cristales de calcio intravesiculares al medio extracelular que, bajo condiciones termodinámicas favorables, comienzan a crecer y madurar. Posteriormente, el depósito, crecimiento y maduración de los cristales de hidroxiapatita en el medio extracelular estará determinado por la disposición de las fibras de colágena de la matriz, la concentración de iones

extracelulares como Ca^{+2} y PO_4^{-3} , pH (~7.2-7.4), y la participación de moléculas orgánicas (proteínas no colágenas) [30-33].

La prevalencia a nivel mundial del uso de los implantes ortopédicos y dentales se encuentra relacionada a procesos traumáticos, fracturas o procesos neoplásicos. Los implantes ortopédicos funcionan como dispositivos de osteosíntesis, es decir, pueden actuar permitiendo la reducción y fijación interna de una fractura o como materiales de sustitución articular como en el caso de rodilla y cadera. Por citar un ejemplo, en odontología, las placas de titanio son utilizadas como materiales de osteosíntesis mandibular en técnicas de fijación, madibulectomías marginales o en defectos óseos segmentales, fracturas de cóndilo o fracturas orbitomales. Los implantes también pueden ser usados como estructuras que asemejan la raíz dental de órganos dentarios perdidos, es decir, en casos de edentulismo. La fabricación de estos dispositivos de reemplazo es, generalmente a base del titanio, el cual se ha convertido en un estándar de oro. A pesar de tener aceptación en el organismo, existe una proporción significativa de falla debido a un insuficiente proceso de oseointegración o procesos infecciosos. Es por ello, que el objetivo de muchas investigaciones es mejorar la biocompatibilidad de estos dispositivos a través de diversos tipos de modificaciones de la superficie de los implantes que permitan optimizar la respuesta biológica, es decir que promuevan la diferenciación de células osteoblásticas y la formación de tejido óseo alrededor del implante, lo cual conllevaría a su integración.

El titanio como biomaterial en la fabricación de implantes

Los implantes son dispositivos insertados quirúrgicamente de manera temporal o permanente dentro del cuerpo para mejorar o mantener la función del tejido perdido o lesionado. Su fabricación está destinada al reemplazo de estructuras ausentes en el organismo, los cuales pueden integrarse a través de la interacción que existe de manera directa entre su superficie y los tejidos circundantes [38]. Dentro de las estructuras comúnmente reemplazadas tenemos: huesos, articulaciones, dientes, cadera y válvulas cardiacas. La manufacturación de estos puede abarcar uno o más materiales denominados "*biomateriales*", los cuales con base en sus características los podemos agrupar en:

- **Metálicos:** Los metales son los materiales más extensamente utilizados en el área biomédica debido a su fuerza y resistencia a la corrosión. El acero inoxidable, aluminio, oro, plata, titanio, cobalto, magnesio y aleaciones a base de cobalto y cromo son algunos ejemplos. Los implantes metálicos pueden tener dos aplicaciones; la primera destinada al reemplazo total de articulaciones (cadera o rodilla) o en la fijación de fracturas o vasos en forma de clavos o tornillos [41,42].
- **Polímeros:** Son materiales de naturaleza orgánica de cadena larga, formados por unidades repetitivas llamadas monómeros unidos por enlaces covalentes. Pueden ser sintéticos (polietileno, polimetilsiloxano, politetrafluoroetileno) o naturales (colágena, ácido hialurónico, chitosan). Son utilizados principalmente en órganos como corazón, riñón e hígado y estructuras óseas como cadera y rodilla. En odontología se han utilizado como materiales capaces de mimetizar los movimientos del ligamento periodontal. Sin embargo, algunas de sus desventajas son la adición de estabilizadores, los cuales pueden llegar a ser tóxicos para el organismo, así mismo son más susceptibles al desgaste y descomposición en comparación con los metales y los cerámicos [41,42].
- **Cerámicos:** Materiales inorgánicos que son mucho más rígidos y resisten mejor la degradación que los metales, sin embargo, son altamente frágiles debido a los enlaces iónicos presentes en su estructura. Son resistentes a la

abrasión, de ahí que su uso ha sido destinado al reemplazo de articulaciones. Se pueden dividir en dos categorías: cerámicas bioinertes y bioactivas. La alúmina, zirconia, fosfatos de calcio y vidrios bioactivos son algunos ejemplos [41,42].

A pesar de ser diferentes en cuanto a composición y estructura, todos los materiales de uso biomédico comparten una característica imprescindible que les permite interactuar con las células y tejidos: *la biocompatibilidad*. La biocompatibilidad es por definición, la capacidad de un material para llevar a cabo las funciones deseadas sin desencadenar toxicidad, rechazo local y/o sistémico por parte del sistema inmune o algún tipo de lesión, permitiéndole interactuar con el huésped. Además de este concepto, en el año 2018 fue acuñado un nuevo concepto: *La hemocompatibilidad*, la cual hace referencia a la capacidad de un biomaterial que, al estar en contacto con la sangre evite una reacción adversa como la formación de un trombo o la liberación de algún componente que desencadene una respuesta inmunológica [42].

Hemos mencionado con anterioridad que los biomateriales usados con mayor frecuencia son los metales como acero inoxidable, titanio, magnesio y las aleaciones a base de cobalto debido a que ofrecen mejores propiedades en comparación con otros biomateriales [40]. En este contexto, cobra especial interés el titanio y sus aleaciones como principal material usado en la elaboración de implantes ortopédicos y dentales, dada su biocompatibilidad, resistencia a los efectos de los biofluidos lo cual le confiere una mayor resistencia a la corrosión y a sus propiedades mecánicas. El titanio fue descubierto en 1791 por el geólogo William Gregor y es el noveno elemento más abundante en la tierra. En la industria, el titanio es utilizado en la fabricación de colorante blanco, en alimentos, cosméticos, fabricación de pastas dentales, etc. Además, cerca del 2% del total del titanio es utilizado para la elaboración de implantes biomédicos [41,42].

De acuerdo con el contenido intersticial de elementos como el nitrógeno, carbono y oxígeno, se han descrito distintos niveles de pureza del titanio. Considerándose

puros aquellos que van del grado 1 al 4, mientras que el titanio grado 5 es aquel que en su composición contiene otros elementos; tal es el caso de la aleación Titanio-Aluminio-Vanadio (Ti-6AL-4V). Generalmente el grado 4 y 5 son los usados para la fabricación de implantes dentales [43-45].

Al estar en contacto con el oxígeno, el titanio sufre un proceso de oxidación pasiva, promoviendo la formación de una capa de óxido de titanio (TiO_2) aproximadamente 9-10 segundos posterior a su exposición, llegando a tener un grosor aproximado de 2-10 nm, esta superficie oxidada es biocompatible y le otorga una mejor resistencia a la corrosión, así como una mayor estabilidad en ambientes fisiológicos [46-49]. El TiO_2 se puede encontrar en tres formas cristalinas: **Rutilo, Anatasa y Brookita**. De las tres poliformas, solo el Rutilo es el que posee mayor estabilidad, la Anatasa y la Brookita son metaestables; en el caso de la Brookita, su síntesis resulta compleja, por tal motivo existen pocos reportes. Por otro lado, la Anatasa alcanza su termoestabilidad alrededor de los 800 °C provocando una transformación irreversible a la fase Rutilo. A elevadas temperaturas, la estructura cristalina pasa de un cristal hexagonal compacto (*hcp*, hexagonal close-packed, por sus siglas en inglés) o fase α , a un cúbico centrado en el cuerpo (*bcc*, body centered cubic) o fase β . Las aleaciones de titanio pueden ser clasificadas como α , β y $\alpha+\beta$, las cuales dependen del tipo de elemento añadido (por ejemplo, el hidrógeno, molibdeno, tungsteno y el vanadio promueven una fase β , mientras que elementos como el oxígeno, nitrógeno y carbono promueven una fase α) y su capacidad de alterar las temperaturas de transformación de las fases α y β . Las aleaciones del tipo α son usadas en la industria debido a la capacidad de resistir a temperaturas elevadas, por otro lado, el tipo β y $\alpha+\beta$ son las ideales para la generación de implantes ortopédicos y dentales, debido al bajo módulo elástico (comparado con la fase α), alta resistencia a la corrosión, y biocompatibilidad [40]. Algunos ejemplos son las aleaciones Titanio-Aluminio-Vanadio (Ti-6Al-4V) y Titanio-Aluminio-Niobio (Ti-6Al-7Nb). Sin embargo, una desventaja en el uso de aleaciones a base de titanio es la citotoxicidad provocada por los elementos estabilizantes, debido a una disminución en la resistencia a la corrosión y posterior liberación de elementos [51-53].

Funcionalización de superficies de implantes y su papel en el proceso de oseointegración

Además de la biocompatibilidad, otro factor importante a tomar en consideración en el diseño y empleo de implantes es la *oseointegración*. Esta idea fue descrita por primera vez por Branemark y colaboradores, la oseointegración referencia al contacto directo que existe entre el hueso y la superficie de un implante al ser observado bajo un microscopio óptico; por otro lado, Dorland la define como el anclaje directo de un implante alrededor del tejido óseo promoviendo su formación con ausencia de tejido fibroso [54-55]. Albrektsson menciona que la oseointegración no es un proceso aislado, sino que dependerá en gran medida de otros dos procesos: la osteoinducción¹ y de la osteoconducción², es decir, si un material llega a promover una respuesta lo suficientemente tóxica tendría la capacidad de alterar la osteoconducción y osteoinducción, afectando así el proceso de oseointegración [57].

Un implante se considera oseointegrado cuando no existen movimientos progresivos entre la superficie del implante y el hueso, es decir, que se mantenga el anclaje directo [58]; para ello, existen una serie de etapas que promoverán la oseointegración:

- **Respuesta inicial del tejido en la implantación**
- **Osteogénesis peri-implantaria**
- **Remodelado óseo peri-implantario**

¹ Osteoinducción: Capacidad de un biomaterial de promover el reclutamiento y estimulación de células inmaduras hacia un fenotipo osteoblástico.

² Osteoconducción: Capacidad de un biomaterial para promover el crecimiento de hueso en su superficie.

Respuesta inicial del tejido en la implantación

Inmediatamente después de la colocación del implante dentro del nicho, se crea una estabilidad primaria durante las primeras 72 horas. El trauma generado desencadena una respuesta inflamatoria en la cual se ve incrementada la liberación de factores de crecimiento y citocinas, así como la generación de un coágulo en donde la actividad de las plaquetas lleva a cabo una cascada de eventos de adhesión y agregación para la generación de una matriz de fibrina; esta matriz permite la migración, proliferación y posterior diferenciación de leucocitos, células mesenquimales y osteoblastos. La migración de los osteoblastos al sitio de la lesión permite el depósito de proteínas relacionadas al proceso de biomineralización, así como la generación de una capa no colágena que regula la adhesión celular y la unión de minerales [57-60].

Osteogénesis peri-implantaria

En las primeras 2 semanas ocurren dos eventos importantes: la angiogénesis y la generación de una matriz ósea. La primera relacionada a la generación de nuevos vasos que permiten el aporte sanguíneo a la zona mientras que la segunda es consecuencia de la migración de células mesenquimales sobre la superficie del implante y su posterior diferenciación hacia un linaje osteoblástico, estas células tienen la capacidad de formar un tejido óseo inmaduro de aproximadamente 0.5 mm de grosor, rico en calcio, fósforo y moléculas orgánicas como osteopontina y sialoproteína ósea. A pesar de que esta capa recién formada no posea una alta resistencia mecánica debido a la disposición aleatoria de las fibras de colágena, el implante permanece firmemente anclado al hueso debido a la formación de hueso trabecular aproximadamente 10 días después del evento quirúrgico [57-60].

Remodelado óseo peri-implantario

A partir del aporte sanguíneo generado en la zona, los precursores de macrófagos se diferencian a osteoclastos debido a la interacción de la citocina CSF1 y RANKL, además su unión y activación se encuentra mediada por integrinas como la $\alpha V\beta 3$

(implicada en mecanismos de señalización que controlan la reorganización del citoesqueleto). Los osteoclastos ya diferenciados promueven el proceso de reabsorción y remodelado de la capa recién formada a través del reemplazo con hueso laminar de mayor grado de mineralización. Esta capa de hueso laminar permite una mejor resistencia a la carga mecánica y en la generación de osteonas alrededor del eje del implante, lo cual proporciona una estabilidad secundaria de aproximadamente 3 meses posterior a la colocación del implante [57-60].

En el área odontológica, dadas las características que posee el titanio (biocompatibilidad, resistencia a la corrosión, etc.) se ha empleado como biomaterial en la fabricación de implantes intra y extraorales. Existe una amplia gama de sistemas de implantes los cuales varían en forma, dimensión y modificaciones en su superficie (topografía, química y humectabilidad). Aunque los implantes dentales poseen una tasa de supervivencia elevada, un proceso de oseointegración deficiente durante los primeros 6 meses, así como un proceso de peri-implantitis pueden provocar un fracaso en el tratamiento. El proceso de oseointegración también puede verse afectado por enfermedades metabólicas como la diabetes mellitus, osteoporosis, así como por la ingesta de algunos fármacos como los bifosfonatos [61-63].

Métodos que modifican la superficie de los implantes: modificación de la rugosidad y funcionalización

Las propiedades de la superficie de implantes (físicas, químicas, y/o mecánicas) condicionan la manera en que las células pueden llevar a cabo sus actividades como proliferación, adhesión y posterior secreción de matriz que permitan un adecuado proceso de oseointegración. Por tal motivo, el propósito de una serie de investigaciones consiste en incrementar la bioactividad de los implantes generando superficies con modificaciones topográficas (cambios en la rugosidad a nivel macro, micro y nanométrico) o funcionalizándolas a partir de la adición de moléculas bioactivas de carácter inorgánico (adición de iones como Mg^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{+2} , Sr^{+2} y moléculas como fosfatos de calcio) u orgánico (adsorción de secuencias peptídicas,

proteínas, enzimas y fármacos) capaces de acelerar el proceso de oseointegración y con ello aumentar la tasa de supervivencia de los implantes.

Modificación de la rugosidad

La rugosidad presente en las superficies mejora el anclaje del implante al hueso permitiéndole tener una mayor estabilidad biomecánica. A partir de estudios *in vitro* se ha demostrado que la proliferación y diferenciación de osteoblastos se ve incrementada en este tipo de superficies [64,65].

Por tal motivo, se han desarrollado modificaciones de la rugosidad a niveles macro, micro y nanométrico. La primera abarca una escala de milímetros a micrómetros. Se encuentra relacionada con la geometría, así como el roscado y porosidades que presenta el implante. Las irregularidades de la superficie permiten una estabilidad primaria, así como una fijación a largo plazo; las modificaciones de la rugosidad a nivel micrométrico mejoran el contacto hueso-implante y mayor resistencia a la remoción de torque y su rango va de 1-10 micrómetros, finalmente los cambios a nivel nanométrico se basan en el uso de partículas de un tamaño que va de 1-100 nm capaces de promover la adsorción de proteínas, así como la adhesión de osteoblastos [50,66].

Dentro de los métodos capaces de generar modificaciones que inducen un cambio en la rugosidad encontramos el arenado (Grit-blasting), grabado ácido y la anodización (Tabla 2) [62].

Arenado (Grit-blasting): Se basa en el uso de partículas abrasivas químicamente estables y biocompatibles a una alta presión sobre un biomaterial, produciendo un aumento en la rugosidad, a su vez esta puede ser controlada a partir del tamaño de la partícula abrasiva. Algunos ejemplos son las partículas de alúmina, titanio e hidroxiapatita [42,45].

Grabado ácido: Se basa en el uso de ácidos fuertes como HCl, HNO₃, H₂SO₄ y HF. La inmersión de los implantes en disoluciones ácidas a elevadas temperaturas (100 °C) promueven la formación de poros de un tamaño aproximado de 0.5 a 2 μm. Además, se ha reportado que las superficies tratadas a partir de esta técnica promueven un proceso de oseointegración más rápido [45].

Anodización: Este método requiere el uso de un voltaje anódico en una disolución iónica como H₂SO₄, H₃PO₄ o CH₃COOH. Este tratamiento a base de la creación de un ambiente polarizado tiene como finalidad formar una capa gruesa de TiO₂ optimizando con ello su resistencia a la corrosión. Este proceso se considera complejo debido a su dependencia a factores como la concentración del ácido, la composición de la disolución electrolítica y la temperatura [42,46].

Funcionalización

Al igual que los cambios en la rugosidad, el objetivo de la funcionalización es promover una respuesta biológica con el fin de optimizar el proceso de oseointegración. Para lograrlo, la funcionalización busca modificar la química superficial a partir de recubrimientos inorgánicos (capaces de mimetizar fases minerales) y cubiertas orgánicas (biofuncionalización) que promuevan la adhesión, proliferación y diferenciación celular, angiogénesis y nucleación de fases minerales lo cual subsecuentemente permitiría el depósito de hueso, mejorando el anclaje (ver tabla 2). Algunos ejemplos de funcionalización son descritos a continuación.

Recubrimientos inorgánicos

Pulverización con plasma: La pulverización permite estructurar la superficie de un implante a escala micrométrica a partir de la adición de moléculas bioinertes como la alúmina o zirconia, las cuales poseen mayor resistencia al desgaste [42]. Sin embargo, al ser moléculas de carácter bioinerte son incapaces de formar una unión directa con el tejido óseo, por lo tanto, su uso es limitado.

Magnetron sputtering: Permite el depósito de películas delgadas a escala nanométrica de cualquier tipo de material. Los recubrimientos presentan una buena adhesión al sustrato llegando a tener espesores uniformes que pueden ir de la escala de nanómetros a micras, permitiendo una cobertura de las irregularidades presentes en la superficie [67].

Revestimientos con hidroxiapatita (HA): Permite la adición de partículas de HA a elevadas temperaturas sobre la superficie del implante de titanio. Dentro de las desventajas de este sistema se encuentra un tratamiento previo con grabado ácido para generar un sistema de retención para las partículas de HA. Además, el esfuerzo residual entre la superficie y la cubierta de HA puede afectar la cristalinidad de los fosfatos de calcio [45].

Cationes y aniones como sustitutos de cubiertas de hidroxiapatita.

La incorporación de cationes (Mg^{+2} , Zn^{+2} , Sr^{+2}) y aniones (CO_3^{-2} , F^{-1}) se ha convertido en una técnica cada vez más frecuente en la funcionalización de las superficies. A continuación, se resumen los elementos más estudiados [67-70].

Incorporación catiónica:

Magnesio (Mg^{+2}): La presencia del Magnesio en tejidos duros como esmalte, dentina y hueso oscila entre el 0.5-1.2% del total del peso. Existe una mayor concentración de este elemento durante el inicio de la osteogénesis disminuyendo paulatinamente al concretarse la calcificación. A pesar de que sea un elemento fundamental en el desarrollo de las actividades de muchas enzimas, su papel como recubrimiento de superficies en implantes provoca una supresión en la nucleación y cristalización de la hidroxiapatita provocado por una disminución en el eje c (eje de crecimiento) de la red hexagonal. Esta deficiencia en la cristalización de la HA da como resultado un incremento en la solubilidad. Por otra parte, su presencia favorece la adhesión en cultivos de células osteoblásticas [67-69].

Estroncio (Sr^{+2}): Dependiendo el tejido, su presencia varía entre los 0.03-0.05%, en regiones con alta actividad metabólica. El estroncio actúa como un sustituto del calcio y diversos estudios han revelado que en altas concentraciones (3-7%) tiene la capacidad de aumentar las dimensiones de los cristales, así como su cristalinidad, lo cual se traduce en un bajo índice de solubilidad. La incorporación de estroncio a través de métodos como *magnetron sputtering*, deposición láser y pulverización por plasma han demostrado que promueve la adhesión, proliferación y diferenciación de células osteoblásticas, no así la actividad de los osteoclastos, ya que se ha visto que su proliferación decrece al aumentar la concentración de estroncio en el medio [67].

Silicatos: Tienen propiedades bioactivas sobre las superficies de implantes siempre y cuando se use en concentraciones menores al 1%. Incrementa la proliferación celular, la actividad de la ALP y la mineralización de la matriz extracelular [28]. Por otro lado, se ha visto que incrementa la solubilidad de los cristales de HA además de promover la formación de fases amorfas y defectos cristalinos [70].

Zinc (Zn⁺²): Elemento traza presente en tejidos mineralizados. Posee funciones en cuanto a síntesis de proteínas y en la replicación del ADN y ARN además de actuar como cofactor de muchas enzimas. Promueve la actividad osteoblástica e inhibe la osteoclástica. Como sustituto de iones Ca⁺² se ha visto que inhibe el crecimiento de los cristales de HA [70].

Manganeso (Mn⁺²): Elemento traza presente en tejidos duros como esmalte, hueso y dentina en concentraciones cercanas a 0.17-0.6 ppm. Su déficit causa una reducción en la síntesis de matriz ósea, retardando el proceso de osteogénesis. A partir de ensayos *in vitro* se ha comprobado que actúa como inhibidor del crecimiento cristalino de la hidroxiapatita. Por otro lado, influye de manera positiva en células osteoblásticas incrementando la actividad de las integrinas a sus ligandos promoviendo su adhesión y proliferación [67,70].

Incorporación aniónica

Carbonatos (CO₃⁻²): Poseen la capacidad de sustituir grupos fosfatos (sustitución tipo B) o grupos OH⁻ (sustitución tipo A) en cristales de HA, siendo la sustitución tipo B más soluble que la A. A nivel biológico poseen una alta solubilidad debido a que forman carbonatos tipo B provocando una disminución en los ejes *a* y *c* de la HA. Mediante estudios *in vitro* se ha comprobado que la hidroxiapatita carbonatada ayuda a promover la adhesión y proliferación de osteoblastos [67,70].

Flúor (F⁻¹): Actúa como un sustituto de los grupos OH⁻ formando fluorapatita (FA). La fluorapatita presenta una red cristalina más estable y menos susceptible a la solubilidad provocada por ácidos. En cultivo celular, el flúor a altas concentraciones puede inhibir el proceso de proliferación celular debido a una reducción en la liberación de iones Ca⁺² producto de la baja solubilidad de los cristales [68].

Recubrimientos orgánicos

Uso de secuencias peptídicas

Las propiedades fisicoquímicas de la superficie en un implante permiten que exista una interacción inmediata con moléculas de agua, iones y principalmente con proteínas del medio, las cuales tendrán la capacidad de adsorberse y regular las interacciones célula-superficie que permitan la formación de tejido óseo [71]. Si bien, se ha demostrado que la capa de óxido de titanio mejora la biocompatibilidad y regula el proceso de oseointegración, las cargas negativas de esta y de las membranas celulares podrían tener un efecto repulsivo; para ello, las proteínas adsorbidas en la superficie actúan como mediadores de estas fuerzas. La unión de esta capa orgánica ha sido explicada a partir de la teoría del “Efecto Vroman”, descrita en 1962 por Leo Vroman, la cual menciona que las proteínas pequeñas son las primeras en ser adsorbidas y posteriormente serán reemplazadas por proteínas de mayor tamaño y con mayor afinidad a la superficie. Además de adsorberse primero, como resultado de su rápido transporte en sangre; las proteínas de menor tamaño actúan mediando la unión de proteínas más grandes y como reguladoras en la adhesión de la matriz extracelular [72-74].

La humectabilidad y la carga de la superficie son dos condicionantes para la adsorción de proteínas, adhesión celular y el proceso de coagulación. Siedlecki y colaboradores mencionan que superficies hidrofóbicas favorecen la adsorción de proteínas debido a las fuertes interacciones hidrofóbicas, en contraste con las fuerzas de solvatación que surgen por la interacción del agua con superficies consideradas hidrofílicas, provocando un decaimiento en la adhesión celular [75]. Sin embargo, existen reportes que mencionan que superficies con moderada hidrofiliidad tendrían la capacidad de mejorar la adhesión celular. Por otro lado, la carga superficial es clave en las interacciones proteína-superficie, muchas proteínas que se encuentran en plasma sanguíneo adquieren carga negativa al encontrarse en un pH fisiológico (~7.4), esto traería como consecuencia interacciones electrostáticas repulsivas al entrar en contacto con la carga negativa presente en la superficie del titanio [74]. Walsh y colaboradores mencionan una serie de investigaciones que han permitido identificar el papel que desempeñan ciertos

aminoácidos como el aspartato (Asp), glutamato (Glu), cisteína (Cys), glicina (Gly), metionina (Met) y serina (Ser) en la adsorción de proteínas y/o péptidos sobre superficies de TiO₂ parcialmente hidroxiladas. Los resultados indican que la adsorción podría estar modulada por puentes de hidrógeno o por enlaces entre los grupos carboxilo orientados hacia la superficie [72,76].

El uso de proteínas o péptidos en la funcionalización de superficies de implantes ortopédicos o dentales se basa en la interacción que estos pudieran tener con células como osteoblastos y plaquetas. Dentro de las proteínas empleadas en este proceso encontramos proteínas de adhesión de la matriz extracelular (vitronectina y fibronectina), proteínas de transporte (albúmina sérica), proteínas reguladoras del proceso de coagulación (fibrinógeno), así como proteínas presentes en procesos de biomineralización; como los miembros de la familia de las proteínas morfogénicas óseas (BMP's). Las proteínas poseen la capacidad de mediar procesos celulares como la adhesión, proliferación, así como diferenciación; sin embargo, se han identificado ciertas secuencias peptídicas bioactivas con la capacidad de mimetizar algunas funciones proteicas, como el reconocimiento de unión a integrinas de la membrana celular (secuencia RGD). Aunque el uso de proteínas en la funcionalización ha demostrado cierto éxito, existen una serie de factores que hacen más atractivo el uso de secuencias cortas de aminoácidos (denominados péptidos) que las proteínas, por ejemplo, el uso de proteínas representa un reto debido a que pueden desencadenar una respuesta inmunológica en el organismo hospedero; además, el proceso de purificación representa un alto costo técnico y económico. Por otro lado, dentro de las ventajas que representa el uso de secuencias peptídicas radica en su capacidad para mantener una estructura simple a diferencia de las proteínas, las cuales pueden adoptar diversas estructuras complejas y que las hacen poco estables. Los péptidos pueden llegar a mimetizar funciones de las proteínas como la adhesión celular, funciones enzimáticas y propiedades antimicrobianas al encontrarse conjugados con biomateriales. Sin embargo, aunque poseen mayor capacidad de adsorción que las proteínas, su cobertura completa en una superficie representa un desafío [77].

Los péptidos mayormente estudiados en la funcionalización de superficies de implantes son aquellos derivados de proteínas que participan en la adhesión celular. Estos péptidos son cadenas cortas de aminoácidos localizados en motivos específicos para receptores de adhesión celular. Estas secuencias se han utilizado en la funcionalización de diversos tipos de biomateriales como hidrogeles, fibras, andamios y superficies de implantes a base de titanio. Si bien son secuencias bien caracterizadas y de fácil obtención, la concentración, solubilidad, estabilidad y adhesión a la superficie son factores que pudieran limitar su uso. Dentro de las secuencias mayormente estudiadas se encuentran los péptidos RGD, IKVAV, YIGSR y GFOGER [80-83].

RGD (Arginina-Glicina-Aspartato): Motivo de adhesión celular presente en proteínas de la matriz extracelular como fibronectina, vitronectina, sialoproteína ósea, osteopontina y en proteínas presentes en el proceso de coagulación como el fibrinógeno. RGD es el péptido más estudiado en el área de funcionalización de superficies en implantes y andamios tanto en estudios *in vitro* e *in vivo* debido a su alta afinidad a integrinas como $\alpha v \beta 3$ y $\alpha 5 \beta 1$, esta última altamente expresada en osteoblastos. Si bien se ha comprobado que esta secuencia promueve la adhesión y proliferación celular, se ha visto que las proteínas estimulan mucho mejor la señalización de integrinas que el motivo aislado; esto se debe a que las proteínas contienen en su estructura secuencias adicionales que cooperan con el péptido, potenciando así la activación de la señalización. Además, se ha visto una relación entre la funcionalización con el motivo RGD y la activación de la vía de la caspasa 3, implicada en procesos de apoptosis [80,81].

IKVAV (Isoleucina-Lisina-Valina-Alanina-Valina): Péptido bioactivo derivado de la laminina. Sus estudios se basan principalmente en la diferenciación de células progenitoras neuronales a neuronas aplicadas sobre distintos andamios, por ejemplo, hidrogeles. IKVAV participa en la activación de vías de señalización como fosfatidil inositol (Pi3K/Akt) y tiene la capacidad de unirse a la integrina $\beta 1$ [81].

YIGSR (Tirosina-Isoleucina-Glicina-Serina-Arginina): Péptido derivado de la laminina B1, es considerado un péptido que promueve adhesión, pero no interactúa con la familia de integrinas sino con la proteína de unión a laminina (LBP). YIGSR promueve la angiogénesis cuando se encuentra ligado a otros péptidos como REDV, en hidrogeles [82].

GFOGER (Glicina-Fenilalanina-Hidroxiprolina-Glicina-Glutamina-Arginina): Péptido mimético de la colágena que promueve la adhesión celular a partir de su unión a la integrina $\alpha2\beta1$, importante en el proceso de diferenciación de osteoblastos. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que GFOGER incrementa la diferenciación osteoblástica y la reparación de defectos óseos en fémur de rata; sin embargo, se ha comprobado que al estar presente en superficies funcionalizadas con cubiertas de hidroxiapatita pierde la capacidad de promover la adhesión celular [83].

		Modificación	Usos	Limitaciones		
M E T O D O	R u g o s i d a d	Arenado (Grit-blasting)		Uso de partículas abrasivas: alúmina o zirconia	Pueden promover la colonización bacteriana	
		Grabado ácido		Generación de poros	Pueden promover la colonización bacteriana	
		Anodización		Generación de capas de óxido de titanio	Proceso complejo que depende de varios factores como la solución electrolítica, pH, tiempo y temperatura	
	F u n c i o n a l i z a c i ó n	Pulverización con plasma		Incorporación de moléculas bioinertes: alúmina y zirconia	No forman una unión directa con el hueso	
		Revestimientos de HA		Adición de partículas de HA	Requiere tratamiento previo como el grabado ácido	
		Magnetron sputtering		Formación de películas delgadas sobre un sustrato (TiO ₂)	Se requiere equipo especial	
		I o n e s	+	Magnesio	Recubrimiento	Disminución del eje c de la estructura cristalina de la HA. Aumento de la solubilidad
				Estroncio	Recubrimiento	Se necesitan altas concentraciones
				Silicatos	Recubrimiento	Aumento de la solubilidad, formación de fases amorfas y defectos cristalinos
				Zinc	Recubrimiento	Inhibe el crecimiento de cristales de HA
				Manganeso	Recubrimiento	Inhibidor del crecimiento cristalino
		-	Carbonatos	Recubrimiento	Formación de sustituciones del tipo B provocando un aumento en la solubilidad del cristal de HA	
			Flúor	Recubrimiento	A altas concentraciones puede inhibir el proceso de proliferación celular.	
		S p é c t u e n d i c i c a s	RGD		Molécula promotora de adhesión celular	Estudios <i>in vitro</i> demuestran que activan al marcador apoptótico caspasa 3
IKVAV			Estimula la diferenciación de células troncales mesenquimales	Usado principalmente en diferenciación neural		
YIGSR			Promueve la angiogénesis	Sus efectos se dan como resultado de la interacción con otros péptidos sintéticos		
GFOGER			Promueve la unión a la integrina α2β1 de osteoblastos	<i>In vitro</i> no promueve adhesión celular cuando se coloca sobre superficies tratadas con cubiertas de HA		

Tabla 2. Diversos métodos empleados en la modificación de superficies de implantes

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existe una amplia gama de materiales para su aplicación en implantes tanto de uso odontológico y ortopédico. A pesar de que el titanio sigue siendo el estándar de oro y posea una buena aceptación por el organismo, existe una proporción significativa de falla debido a un insuficiente proceso de oseointegración o procesos infecciosos. Una alternativa para subsanar dicho problema es la adsorción de moléculas funcionales que permitan incrementar la adhesión celular a las superficies.

Las investigaciones enfocadas al mejoramiento de las superficies de implantes tienen como objetivo aumentar la capacidad osteoinductora de los mismos; esto es, mediante el recubrimiento con moléculas bioactivas que optimicen la respuesta biológica a través de la estimulación de la maduración de osteoblastos. Con base en las propiedades biológicas de la proteína HACD1/CAP en el proceso de biomineralización, se ha identificado una secuencia peptídica biofuncional que ha demostrado tener la capacidad de promover la adhesión y proliferación celular además de tener un efecto promotor de la mineralización, es decir, puede llegar a mimetizar algunas funciones de la proteína *per se*. Además, al tratarse de un péptido nos brinda ventajas como una estructura química más estable, su tamaño reduce la probabilidad de desencadenar una respuesta inmune y su síntesis resulta económica. Es por ello que este proyecto se centró en el estudio de la adsorción física de un péptido sintético (CAP_{p15}) biológicamente activo derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) a dos películas con características químicas y topográficas distintas en su superficie: titanio (Ti) y óxido de titanio (TiO₂), esto con la finalidad de evaluar además de la adsorción, la promoción del proceso de mineralización bajo condiciones que emulan un ambiente fisiológico así como su efecto sobre procesos proliferación y migración de fibroblastos gingivales.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la capacidad de adsorción de CAP_{p15} sobre superficies de Ti y TiO₂ y evaluar la actividad biológica durante el proceso de mineralización, así como en la proliferación y migración de fibroblastos gingivales.

Objetivos específicos

- I. Evaluar la capacidad de adsorción de CAP_{p15} sobre superficies de Ti y TiO₂.
- II. Determinar el efecto de CAP_{p15} adsorbido a superficies de Ti y TiO₂ en la formación de cristales de hidroxiapatita
- III. Evaluar el papel biológico de CAP_{p15} adsorbido a superficies de Ti y TiO₂ sobre el proceso de proliferación y migración de fibroblastos gingivales, *in vitro*.

HIPÓTESIS

El péptido (CAP_{p15}) derivado de la porción C-terminal de la proteína HACD1/CAP se adsorbe preferencialmente en superficies de TiO₂ en comparación con Ti, induciendo la precipitación de cristales de hidroxiapatita.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Síntesis del péptido

La síntesis de la secuencia **VSFPSCCFSAVIFM** fue llevada a cabo por la casa comercial NEP (New England Peptide) a partir de la técnica de Sheppard para la síntesis de péptidos en fase sólida. Durante el proceso se utilizó Fluorenil-9-metoxicarbonil (Fmoc) como protector de la porción N-terminal, t- Butil para la porción C-terminal y ácido trifluoroacético (TFA) como eluyente. Finalmente, su grado de pureza se determinó a partir de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Síntesis de superficies de Ti y TiO₂ por evaporación catódica en radiofrecuencia (*magnetron sputtering*)

Para la producción de las superficies de Ti y TiO₂ se utilizó la técnica de evaporación/pulverización catódica en radiofrecuencia o también conocida como magnetron sputtering, la cual se basa en la generación de un plasma a partir del flujo de un gas inerte [argón (Ar), kriptón (Kr)] o un gas reactivo [nitrógeno (N²⁺) u oxígeno (O²⁻)] y una descarga eléctrica entre el blanco (cátodo) y el sustrato (ánodo) en una cámara de vacío. Este plasma arranca átomos de la superficie del blanco, los cuales son transportados a través del plasma y se condensan sobre el sustrato o ánodo (Fig.2). Este sustrato puede ser el material al cual se desea modificar las propiedades de superficie o actuar únicamente como un soporte físico con poca o nula interacción con el depósito [56,84-87].

El blanco empleado para nuestras superficies fue de titanio con alto grado de pureza (99.998%), usando como sustrato obleas de silicio, las cuales previamente fueron cortadas para obtener superficies de 1 cm². Para la generación de superficies de TiO₂ los sustratos fueron colocados en una cámara bajo una presión de 1x10⁻⁶ Torr, una potencia de 200 W y una atmósfera reactiva de Ar con un flujo de 8 cm³/min y 3 cm³/min en el caso del oxígeno, con un tiempo total de depósito de 45 minutos. En el caso de las superficies de Ti, el flujo de gas consistió únicamente en argón (flujo de 8 cm³/min) y un tiempo de

exposición de 10 minutos. La presión y la potencia fueron las mismas para ambos depósitos.

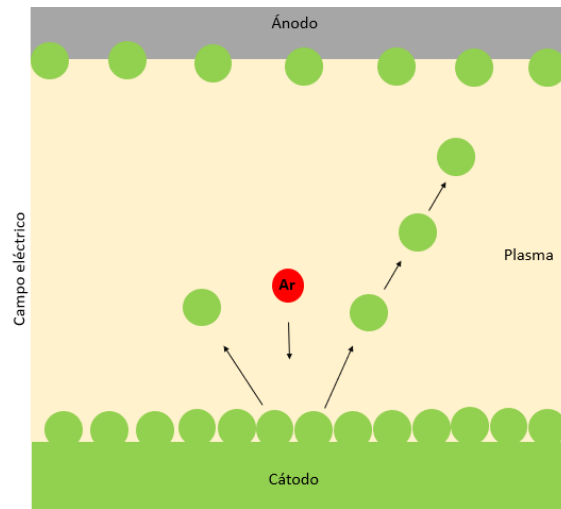


Fig.2 Proceso de generación de superficies a partir del magnetron sputtering

Posteriormente, las superficies obtenidas fueron sometidas a un protocolo de limpieza para eliminar cualquier tipo de residuo proveniente del medio una vez retiradas de la cámara de síntesis. El protocolo de limpieza se basó en el uso de tres soluciones con sonicación: acetona durante 10 minutos, 2-isopropanol y agua desionizada por 20 minutos cada una.

Adsorción y autoensamblaje de CAP_{p15}

Microscopía de fuerza atómica (MFA)

Para evaluar la capacidad de adsorción de CAP_{p15} se utilizaron superficies de Ti y TiO₂ de 1 cm² las cuales fueron divididas en dos grupos: un grupo control, el cual consistió en 3 superficies sin péptido, y el grupo experimental, compuesto por 3 superficies funcionalizadas con CAP_{p15} (1 µg/mL); CAP_{p15} fue colocado distribuyendo el volumen con uniformidad por toda la superficie. Después, las muestras fueron colocadas en una cámara de vacío para la eliminación de la humedad. Las superficies de ambos grupos fueron analizadas a partir del modo tapping también llamado de modulación de la amplitud (MA) el cual evalúa la topografía mediante pulsaciones intermitentes en la superficie [88,89]. Esta técnica nos proporciona una resolución atómica de superficies, partículas o películas delgadas independientemente del sustrato en el que se encuentren (conductor o no conductor). Las imágenes que son obtenidas a partir de esta técnica nos permiten conocer la manera en que está estructurada una superficie. Una de las ventajas de la técnica radica en que no daña la superficie al entrar en contacto con ella, es decir, no es destructiva [90-92].

Para la evaluación de la topografía y la rugosidad presente en superficies de Ti y TiO₂ en presencia y ausencia de CAP_{p15} se tomaron imágenes a escalas que van desde las 5 µm hasta los 500 nm de las superficies del grupo control y experimental, utilizándose el microscopio electrónico de fuerza atómica, modelo JSPM-4210, del Laboratorio Central de Microscopía, IF, UNAM.

El procesamiento y la obtención del análisis de rugosidad se obtuvo con el programa WINSPM SYSTEM, realizando mediciones por triplicado en muestras prístinas y experimentales de un área de 5 x 5 µm, evaluándose la rugosidad media (Ra) y la rugosidad cuadrática media (Rq) así como el análisis estadístico ANOVA con una p<0.05. La tabla 4 contiene los valores de la Ra y Rq de las superficies evaluadas.

Microscopía de fluorescencia

Para determinar la afinidad y la cantidad de CAP_{p15} adsorbido las superficies de Ti y TiO₂, el péptido CAP_{p15} fue marcado con fluorocromo. El colorante de elección fue Alexa Fluor (AF488), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se añadieron 5 µL de Alexa Fluor 488 en dimetilformamida (10 µg / µL) a 200 µL de péptido CAP_{p15} en PBS más 20 µL de bicarbonato de sodio (1 M). Las disoluciones se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. El péptido no conjugado (marcado) se eliminó mediante diálisis con 4 cambios de 2 L de disolución salina tamponada con Tris, pH 7.4, durante 4 h cada uno, usando un tubo de diálisis de 3.5 kDa (Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA). Después de la liofilización, las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso. La elección de este colorante se basó en su capacidad de unión a la porción N-terminal del péptido, además a la fotoestabilidad y estabilidad a los cambios de pH, por lo que nos proporciona un mayor tiempo de trabajo y de captura de imágenes [93].

En el ensayo se formaron grupos control (3 superficies de Ti y TiO₂ + AF488 [1 µg/mL]) y experimental (3 superficies de Ti y TiO₂ + CAP_{p15}-AF488 [1 µm/mL]). Ambos grupos se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 1 h. Después al tiempo de incubación, las superficies fueron lavadas en 2 ocasiones con TBS (1X) dejándose secar a temperatura ambiente por 1 h; posteriormente se tomaron fotografías con el microscopio de fluorescencia ZEISS Modelo Axioskop 2™ con los objetivos 10x, 20x y 40x.

Cuantificación del péptido marcado

La cuantificación de CAP_{p15} se llevó a cabo utilizando dos disoluciones de lavado: TBS (1x) (utilizado previamente) y TBS+EDTA. El TBS (disolución salina tamponada con Tris) es una disolución isotónica a base de Tris, cloruro de sodio (NaCl) y ácido clorhídrico (HCl) que no altera el pH. Por otro lado, el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) se utilizó como un detergente para desprender el péptido adsorbido sobre las superficies. Previamente se realizó una curva de calibración de la concentración del péptido marcado (CAP_{p15}-AF488). Para este ensayo se formaron grupos con 3 superficies de Ti y TiO₂ + CAP_{p15}-AF488 [1

$\mu\text{g/mL}$). CAP_{p15} fue distribuido en un área de 0.5 cm² sobre cada una de las superficies y posteriormente colocadas en cajas de 24 pozos. Ambos grupos se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 1 h. Al término del tiempo de incubación se realizaron 2 lavados con TBS (1X) para recolectar el péptido no adsorbido. Al final, se realizaron 2 lavados con TBS+EDTA, para recuperar el péptido adsorbido a las superficies. A partir de los lavados con TBS+EDTA, se tomaron 200 μL de disolución y se colocaron en una caja de 96 pozos para la medición de la fluorescencia a una excitación de 490 nm y a una emisión de 520 nm en el espectrofotómetro de fluorescencia Filter Max F5 (Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices®). El ensayo se realizó por triplicado realizándose el análisis estadístico que consistió en una T-Student no pareada, con una $p < 0.001$.

Ángulo de contacto

Medición del ángulo de contacto

La determinación de la humectabilidad de las superficies de Ti y TiO₂ con y sin CAP_{p15} fue realizada para determinar si el péptido (de naturaleza hidrofóbica) poseía la capacidad de alterar las características hidrofílicas de las superficies reportadas en 2017 por Fonseca y colaboradores [56]. La técnica del ángulo de contacto se basa en el concepto de la energía libre superficial, la cual se define como la capacidad de un sólido para aumentar su área de humectabilidad al interactuar con un líquido [94]. A partir de este concepto partimos que la humectabilidad depende del fluido (en este caso agua) así como con la composición y características superficiales de los materiales, determinando la interacción de las moléculas de agua. Esta propiedad puede ser medida a partir de la obtención del valor del ángulo de contacto con base en la ecuación propuesta por Thomas Young en el año de 1803 (Fig.3). Con base en los valores obtenidos a partir del ángulo formado entre la gota y el sustrato donde es depositado, las superficies pueden ser clasificadas como hidrofílicas o hidrofóbicas (Fig.4). Existen tres técnicas empleadas para medir el ángulo de contacto: gota sésil, burbuja cautiva y el método de equilibrio de Wilhelmy. La más utilizada (y empleada en este trabajo) es la técnica de gota sésil, la cual

consiste en colocar una gota inyectada por una jeringa sobre la superficie, posteriormente se mide el ángulo formado entre la gota y la superficie a evaluar a partir de un goniómetro, el cual captura la imagen al caer la gota sobre la superficie del material, midiendo la interfaz del líquido-sólido (Fig.5) [56,94,95].

$$\cos \theta = \frac{\gamma_s - \gamma_{SL}}{\gamma_L}$$

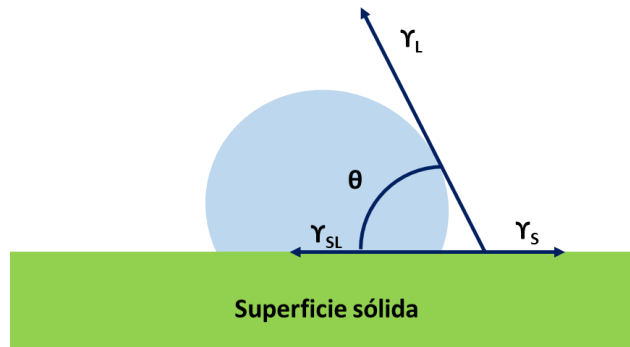


Fig.3 θ : Ángulo de contacto, γ_s : Energía libre del sólido, γ_L : Tensión superficial del líquido, γ_{SL} : Tensión interfacial

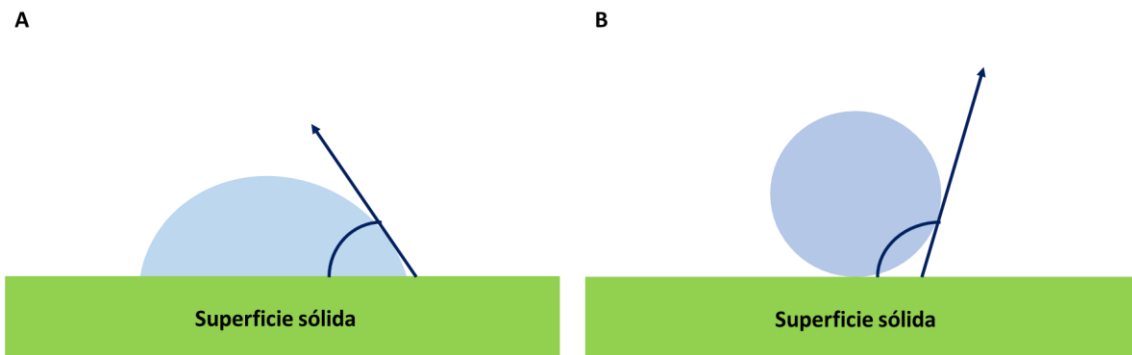


Fig.4 Superficies hidrofílicas (A) propician menores ángulos de contacto a diferencia de superficies de carácter hidrofóbico (B)

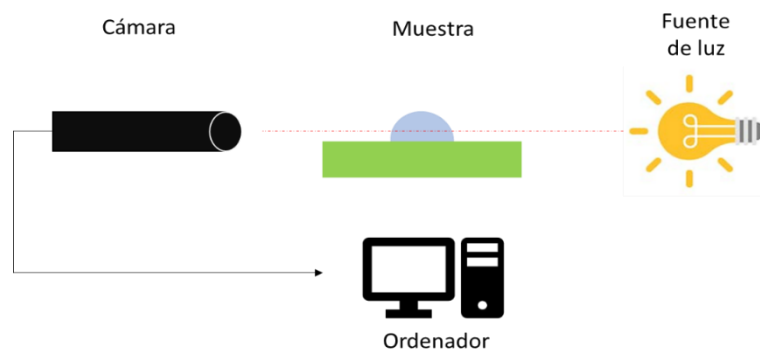


Fig.5 Flujo de trabajo de la técnica de gota sésil

Las superficies de Ti y TiO₂ fueron preparadas con CAP_{p15} a una concentración de 1 µg/mL dejándose en una cámara de vacío durante 24 h previas a la realización del análisis para su completa desecación. Las muestras fueron agrupadas en un grupo control (superficie sin péptido) y un grupo experimental (superficie + CAP_{p15} [1 µg/mL]). Posteriormente las muestras fueron trasladadas al Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM) y utilizando el goniómetro modelo Ramé-Hart Inc a partir de la técnica de gota sésil, a cada superficie le fue colocada 4 µL de agua desionizada realizándose 3 mediciones de ángulo. Los ángulos obtenidos por cada muestra fueron evaluados por triplicado para su posterior análisis estadístico que consistió en una prueba ANOVA, $p < 0.05$.

Formación de cristales *in situ*

La capacidad de CAP_{p15} como un regulador en la formación y/o crecimiento de minerales sobre las superficies de Ti y TiO₂ fue evaluada al incubarlas bajo condiciones controladas como pH (~7.4) y temperatura (37 °C), es decir bajo condiciones cercanas a las fisiológicas. Se ocuparon dos disoluciones experimentales: saliva artificial y un buffer con sobresaturación de calcio y fosfato (BSat Ca-PO₄). Con la primera solución evaluamos la capacidad de CAP_{p15} en la promoción de la formación de mineral y con la segunda disolución se determinó la capacidad de CAP_{p15} como un regulador en la morfología de los cristales de hidroxiapatita (HA). Dado que esta última disolución es capaz de promover la formación de dicho mineral, su estudio se centró únicamente al

análisis morfológico de los depósitos a partir de la microscopía electrónica de barrido.

Los grupos fueron divididos en un grupo control (3 superficies sin CAP_{p15}) y un grupo experimental (3 superficies + CAP_{p15} [1 µg/mL]), a cada superficie le fue agregado aproximadamente, 10 µL de péptido distribuido con uniformidad. En el caso de las superficies experimentales, estas se dejaron incubar a 37 °C durante una hora a temperatura ambiente para desecar el péptido. Posteriormente, cada una de las superficies de cada grupo fue colocada en un volumen de 10 mL de saliva artificial y 10 mL de BSat Ca-PO₄, respectivamente.

Todas las muestras fueron colocadas al fondo de los contenedores y se dejaron incubar durante 21 días a 37 °C. Posterior a este periodo, las muestras fueron cuidadosamente extraídas de los refractarios donde fueron colocadas, se dejaron desecar y finalmente se procedió a la caracterización de los depósitos formados en cada una de las superficies de ambos grupos con microscopía electrónica de barrido (MEB), técnicas espectroscópicas como la espectroscopía por pérdida de energía (EDS), espectroscopía de dispersión Raman y reflectancia total atenuada (ATR-FTIR). Finalmente, con difracción de rayos X (DRX) obtuvimos la fase mineral constitutiva de los depósitos.

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

El principio del microscopio electrónico de barrido es hacer incidir sobre una muestra un haz de electrones para poder llevar a cabo un barrido superficial. Este haz, al interactuar con la muestra producirá señales que nos permiten obtener información como la topografía de la superficie y composición química superficial. Las señales que pueden ser detectadas por un microscopio electrónico de barrido son: electrones secundarios y electrones retrodispersados.

El análisis de los depósitos en las superficies fue realizado a partir de las dos técnicas en MEB, con electrones secundarios evaluamos la morfología de los cristales precipitados, mientras que el uso del filtro de electrones retrodispersados (*Backscattered*) estuvo fundamentado con base en la necesidad de evaluar un

cambio en la composición y distribución elemental en cristales formados, el cual fue complementado con la técnica semicuantitativa EDS para conocer las proporciones de los elementos presentes.

Las ampliaciones se obtuvieron a partir del microscopio electrónico de barrido de ultra-alta resolución, modelo JSM-7800F Schottky Field Emission Scanning Electron Microscope (análisis a partir del filtro de electrones secundarios) y del microscopio electrónico de barrido SEM 5600LV (análisis a partir del filtro de electrones retrodispersados) del Laboratorio Central de Microscopía, Instituto de Física (IF), UNAM.

Espectroscopía por dispersión de energía de rayos X (EDS)

Con la finalidad de conocer la composición elemental de los depósitos formados en las superficies en presencia y ausencia de CAP_{p15} se procedió a la realización del análisis EDS. Este método analítico semicuantitativo permite identificar la composición química elemental a través de la ionización de átomos en una muestra por la expulsión de un electrón de la capa interna cuando se hace incidir un haz de electrones. Después de ser excitado por el haz, el átomo busca la manera de entrar a un estado de relajación a través de la pérdida de energía por un electrón de la capa externa que pasa a ocupar el lugar del electrón expulsado por el haz. La pérdida de energía ocasiona la emisión de un fotón de rayos X, la energía de dicho rayo X es la diferencia en los niveles de energía entre el electrón expulsado y la capa interna involucrada, por tanto, será específica para cada elemento.

La realización del análisis elemental de las muestras se llevó a cabo utilizando el microscopio electrónico de barrido de ultra-alta resolución, modelo JSM-7800F Schottky Field Emission Scanning Electron Microscope del Laboratorio Central de Microscopía, Instituto de Física (IF), UNAM.

Caracterización espectroscópica de los cristales

Espectroscopía de dispersión Raman

La espectroscopía de dispersión Raman está basada en la dispersión inelástica de la luz generada por la muestra a partir de una fuente monocromática. Debido a que la luz dispersada presenta cambios en la longitud de onda respecto al haz incidente dependiendo de la estructura química de la muestra, esta diferencia de energía entre los fotones incidentes y los dispersados genera un espectro vibracional de Raman el cual es único para cada tipo compuesto y sirve como una "huella digital" para identificarlo, por lo tanto, permite determinar vibraciones moleculares y caracterizar fases puras y mezclas de minerales con un empaquetamiento atómico similar [96-98]. Con base en lo anterior, esta técnica nos permitió el reconocimiento de los grupos funcionales presentes en los depósitos formados sobre las superficies de Ti y TiO₂ y con ello tener un acercamiento al tipo de mineral implicado, para ello el equipo utilizado fue el microscopio focal AF acoplado a espectroscopia Raman, Witec® a una longitud de onda de 532 cm⁻¹ y una potencia de 0.26μW del Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCÉ) del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT), UNAM.

Reflectancia total atenuada por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (ATR-FTIR)

La espectroscopía ATR-FTIR se basa en la obtención de la absorbancia característica de las vibraciones moleculares de una muestra a partir del efecto de atenuación de la luz cuando es internamente reflectado en una interfaz entre un material con un alto índice refractivo y una absorción infrarroja de bajo índice de refracción, esta reflectancia interna crea una onda evanescente que se extiende más allá de la superficie del cristal hasta la muestra mantenida en contacto con el cristal. ATR-FTIR es considerada una técnica que no requiere preparación de la muestra, es poco destructiva y el periodo de obtención de muestra es relativamente corto, además permite la identificación de bandas que no son detectables en la espectroscopia de dispersión Raman y debido a la alta

sensibilidad, es una herramienta complementaria en la caracterización de las muestras [99].

El análisis se realizó con el espectrómetro de FTIR Nicolet modelo iS50R acoplado con el equipo Smart iTX con punta de diamante, del Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE) del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT), UNAM.

Identificación de la fase mineral

Difracción de rayos X (haz rasante)

La difracción de rayos X (DRX) es una técnica no destructiva útil en la caracterización de un material determinado. DRX posee la capacidad de proporcionar las propiedades estructurales internas, como la fase cristalina de un material debido a la capacidad de penetración del haz monocromático. La señal de DRX es producida por la dispersión elástica del haz monocromático con los electrones de los átomos de la muestra, los átomos de la red cristalina hacen que estos rayos X sean difractados produciendo los patrones de difracción. DRX se fundamenta matemáticamente en la ley de Bragg:

$$2d\text{Sen}\theta = m\lambda$$

En donde la d representa la separación entre los planos cristalinos, los cuales nos permiten conocer la estructura cristalina de la muestra; θ es el ángulo de Bragg, m es el orden de difracción y λ es la longitud de onda de los rayos X [56].

La orientación cristalina de los depósitos fue analizada con la técnica de difracción de rayos X, incidencia rasante 1° , a 40 kV/44 mA, el intervalo del escaneo fue de 20° a 55° , un barrido de 0.02° y una velocidad de escaneo de $0.5^\circ/\text{min}$ con el difractómetro Rigaku Ultima IV del Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM), UNAM. Para determinar la estructura cristalina, los resultados fueron comparados con las siguientes fichas PDF (Powder Diffraction Files): 00-009-0432 y 01-073-0380, para hidroxiapatita y cloruro de potasio, respectivamente.

Pruebas biológicas

Ensayo de proliferación celular (MTT)

La realización del ensayo MTT se basó en la evaluación de la biocompatibilidad a partir del efecto de las superficies Ti y TiO₂ (prístinas y funcionalizadas con CAP_{p15}) sobre la proliferación de fibroblastos gingivales sembrados en un área de 1 cm².

Esta técnica molecular permite determinar un posible efecto citotóxico de un agente (droga o material) midiendo la integridad y actividad/función mitocondrial de células en cultivo, dicha actividad se encuentra en relación con la viabilidad y el número de células presentes. MTT se basa en la reducción metabólica del Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol que es llevada a cabo por la enzima succinato deshidrogenasa, presente en la mitocondria [100-102]. El desarrollo del ensayo consistió en la siembra de fibroblastos gingivales (1x10⁴ células) sobre superficies de Ti y TiO₂ (1 cm²) con y sin CAP_{p15}. Los fibroblastos fueron crecidos en medio DMEM suplementado con 0.2% de suero fetal bovino (FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire y se mantuvieron en cultivo durante 0, 24, 48 y 72 h. Posterior a cada periodo de incubación, el medio fue retirado y le fue agregado 10 µL de MTT (0.5 mg/mL) dejándolo incubar por 3 h; posteriormente se añadieron 100 µL de DMSO dejándose incubar por 15 min. Finalmente, se procedió a la obtención de la lectura de la absorbancia a 570 nm en el espectrofotómetro Filter Max F5 Multimode Microplate Reader, Molecular Devices. Cada grupo fue analizado por triplicado para su posterior análisis estadístico.

Ensayo de cierre de herida

Una vez obtenidos los resultados de viabilidad celular, el siguiente paso fue evaluar la migración de fibroblastos gingivales sobre las superficies incubadas con y sin el péptido, para ello se desarrolló el ensayo de cierre de herida el cual tiene como objetivo evaluar la migración bidimensional de un cultivo confluyente bajo condiciones controladas. La técnica consiste en la creación de un espacio (herida) en una monocapa de células confluyente capturando imágenes bajo determinados intervalos de tiempo, permitiendo evaluar la interacción célula-

matriz y célula-célula, así como la realización de un análisis cuantitativo y cualitativo de la migración celular bajo diferentes condiciones experimentales [103,104]. Para ello se sembraron fibroblastos gingivales (1×10^4 células) entre el segundo y quinto pasaje durante 24 h, las células fueron crecidas en medio DMEM suplementado con 0.2% (control negativo) y 10% (control positivo) de suero fetal bovino (FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) en una atmósfera de 5% de CO_2 y 95% de aire para evaluar la migración celular en dos intervalos de tiempo establecidos: 0 y 72 horas. Los grupos fueron agrupados de la siguiente manera: 0 h, superficies de Ti y TiO_2 con y sin CAP_{p15} suplementados con SFB a 0.2%, 72 horas; superficies de Ti y TiO_2 (sin péptido) + 0.2% SFB, como control negativo; superficies de Ti y TiO_2 (sin péptido) + 10% SFB, como control positivo; superficies de Ti y TiO_2 + CAP_{p15} + 0.2% SFB, como grupo experimental.

Previo al cultivo celular, todas las superficies destinadas a la realización del ensayo les fueron colocada una cinta con un grosor cercano a 1 mm con la finalidad de crear una herida delimitada. Una vez transcurridas las 24 h de cultivo, la cinta fue retirada con la finalidad de evaluar la migración en los dos intervalos de tiempo descritos anteriormente. Al finalizar cada periodo de incubación, el medio fue retirado y las células se fijaron con glutaraldehído al 2% durante 24 h. Posteriormente, se llevaron a cabo lavados con etanol a distintas concentraciones (20, 40, 60, 80 y 100%). Finalmente, las muestras fueron recubiertas con oro para su posterior análisis en el microscopio electrónico de barrido. Se obtuvieron imágenes a diversas ampliaciones (22, 100, 500 y 1000X) a 3 kV en el microscopio electrónico de barrido de ultra-alta resolución, modelo JSM-7800F Schottky Field Emission Scanning Electron Microscope, Laboratorio Central de Microscopía, Instituto de Física (IF), UNAM.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los resultados obtenidos de los ensayos de rugosidad, mojabilidad, proliferación y migración celular fueron analizados por medio del análisis de varianza (ANOVA). Posteriormente, con la finalidad de conocer las diferencias entre cada uno de los grupos evaluados, se procedió a la realización de la prueba post-hoc Tukey. Valores con una $p < 0.05$ se consideraron significativos.

Mientras que los resultados obtenidos a partir de la cuantificación del péptido marcado se analizaron con una T- student no pareada con una $p < 0.001$. En ambos casos se utilizó el software GraphPad (GraphPad Software Inc, USA).

RESULTADOS

Características fisicoquímicas de CAP_{p15}

El análisis *in silico* de la secuencia se llevó a cabo utilizando las herramientas informáticas ExPasy y ProtParam, donde ambas coincidieron con la serie de datos que son presentados en la tabla 3. En resumen, la secuencia obtenida se encuentra compuesta por aminoácidos como Valina, Prolina, Isoleucina, Alanina y Metionina, los cuales le confieren un comportamiento hidrofóbico al estar en contacto en solución acuosa; CAP_{p15} posee un peso molecular de 1.65 kD y presenta un punto isoeléctrico teórico de 5.4. Es importante hacer énfasis en estos dos últimos datos, debido a que el peso molecular representa una gran ventaja, dado que la probabilidad a que desencadene una respuesta inmune es mínima y, además, el punto isoeléctrico (pI) es un indicador de la carga negativa que el péptido adquiere al encontrarse en una disolución a un pH fisiológico (pH ~7.4) debido a un proceso de desprotonación; esta carga le permitirá interactuar con cationes divalentes como el calcio (Ca⁺²), un elemento imprescindible en el proceso de biomineralización [103-105].

Secuencia	VSFPSCCFSIAVIFM
Apolares	V-P-I-A-M
Polares sin carga (Hidrofílicos)	S-C
Aromáticos	F
Peso molecular	1.65 kDa
Punto isoeléctrico (teórico)	5.48

Tabla 3 Características fisicoquímicas de CAP_{p15}

Adsorción y autoensamblaje de CAP_{p15}

La microscopia de fuerza atómica permite observar el contraste topográfico de la muestra, esto debido a que las zonas oscuras representan las partes más bajas de la superficie, por otro lado, las partes más altas presentan una tonalidad más clara, es por ello que a partir de esta técnica es posible la apreciación de las características superficiales relacionadas con la topografía [56].

En el análisis de las microfotografías topográfica y de fase de la superficie prístina de Ti (Fig.6 A-B, Fig. 7 A) y de la superficie funcionalizada con CAP_{p15} (Fig.6 C-D, Fig.7 B) no se observaron cambios topográficos aparentes; sin embargo, al realizar el análisis de la rugosidad observamos que la presencia de CAP_{p15} disminuye dicha propiedad, al pasar de una rugosidad promedio (Ra) de 13.1 nm (± 0.2) a 6.21 nm (± 0.085) (ver tabla 4) esto podría explicarse a que la distribución de CAP_{p15} se dio en las irregularidades presentes de manera nativa en la superficie del Ti.

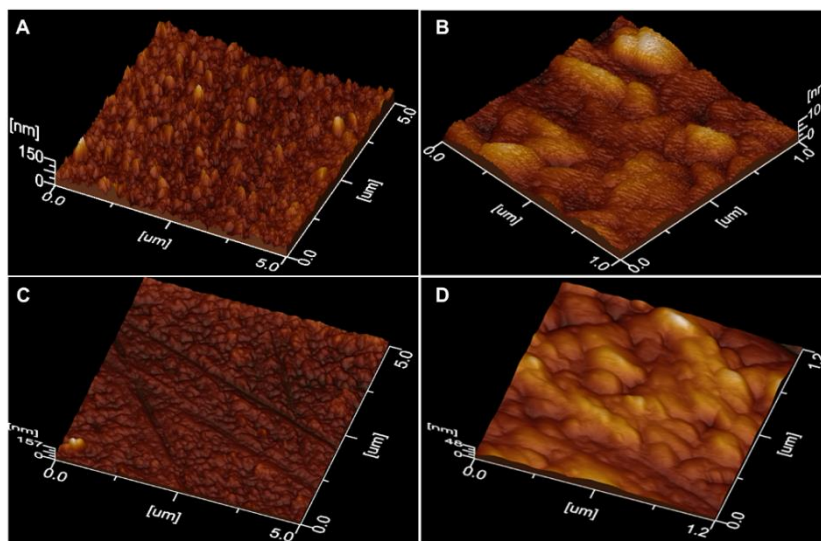


Fig.6 Microfotografías obtenidas con MFA en Ti. A y B Superficie prístina, C y D superficie con CAP_{p15}

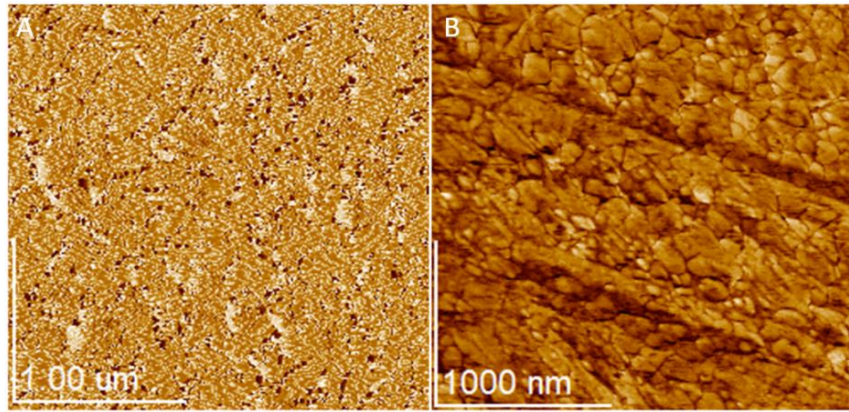


Fig.7 Microfotografías de las imágenes de fase entre las superficies superficie prístina (A) y la superficie con CAP_{p15} (B)

La evaluación de las muestras de TiO₂ mostraron que la superficie prístina posee mayor homogeneidad y menos irregularidades que la de Ti al mostrar una rugosidad promedio (Ra) de 0.530 nm (± 0.001), lo cual concuerda con lo observado en las imágenes topográficas y de fase (Fig.8 A-B, Fig.9 A). Debido a que las imágenes de fase nos permiten identificar un cambio en el tipo de material que es sentido por la punta al llevar a cabo el barrido, es posible apreciar que las superficies de TiO₂ incubadas con CAP_{p15} muestran la presencia de partículas esferoides, las cuales presentan dimensiones que oscilan entre los 372-601 nm de diámetro y una altura cercana a los 170 nm (Fig.8 C y D, Fig. 9 A-C). La formación de estas estructuras promueve un cambio en la rugosidad del TiO₂, dado que la rugosidad aumentó de 0.530 nm (± 0.001) a 33.2 nm (± 0.2).

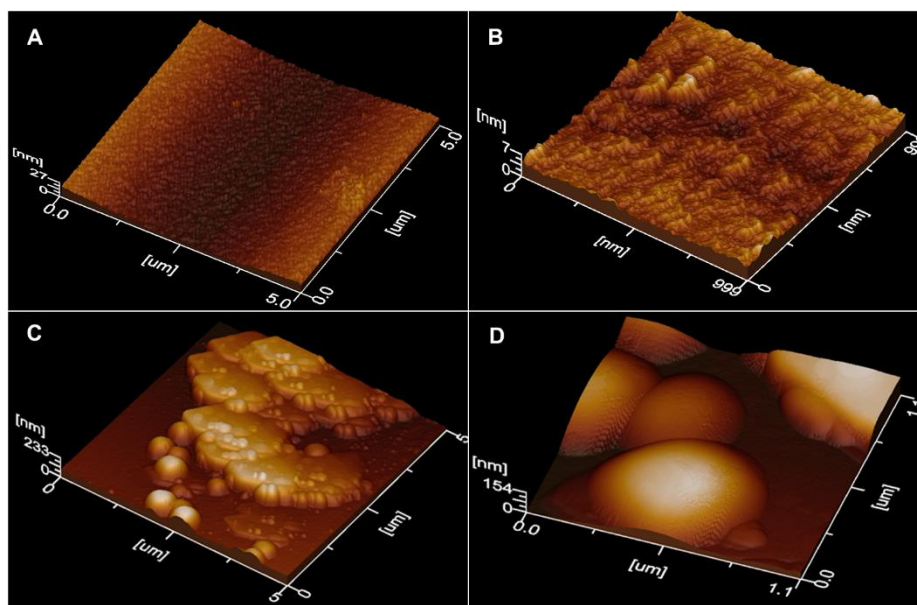


Fig. 8 Microfotografía obtenidas de TiO_2 con MFA. A y B superficie prístina. C y D superficie con CAP_{p15}

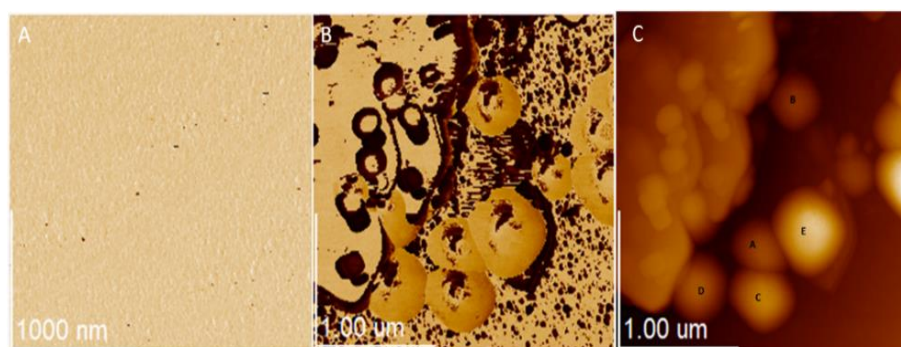


Fig. 9 Microfotografías de la imagen de fase entre A superficie prístina y B superficie experimental. Se observa el contraste entre la superficie TiO_2 y CAP_{p15} adsorbido. En C se indica el tamaño de esferas. A: 372 nm, B: 426 nm, C: 460 nm, D: 557 nm, E: 601 nm

Superficie	Rugosidad promedio	Rugosidad cuadrática media
	Ra (nm)	Rq (nm)
Ti	13.1 (± 0.2)	15.56 (± 0.11)
Ti+ CAP_{p15}	6.21 (± 0.085)	8.11 (± 0.18)
TiO_2	0.530 (± 0.001)	0.685 (± 0.018)
TiO_2 + CAP_{p15}	33.2 (± 0.2)	39.13 (± 0.15)

Tabla 4 Rugosidad R_a (media aritmética de los valores absolutos) y R_q (promedio cuadrático de las desviaciones del perfil de rugosidad) medidas mediante AFM, ANOVA $p < 0.05$

Posteriormente y como parte de los ensayos de adsorción, el siguiente paso fue evaluar si el fluorocromo (AF488) posee alguna afinidad por las superficies de Ti y TiO₂, los resultados demostraron que el colorante no tiene la capacidad de adsorberse a las películas (Fig.10 A-D).

Por otro lado, la unión covalente de AF488 a CAP_{p15} reveló la presencia de péptido distribuido sobre las superficies de Ti las cuales se presentaron como partículas de distintos tamaños, posiblemente siguiendo el patrón de rugosidad del Ti (Fig.10 E-F). Mientras que las moléculas de CAP_{p15}-AF488 adsorbidas sobre TiO₂ adquirieron una disposición esferoide similar a las observadas bajo MFA (Fig.10 G-H). Esta disposición esferoide puede deberse a dos aspectos importantes, el primero va en relación con la hidrofobicidad del péptido, el cual al encontrarse en un medio polar como lo es el agua promueve su autoensamble en estructuras esferoides; el segundo está en relación con la rugosidad que presenta la superficie de TiO₂ en comparación del Ti, debido a que su bajo índice de rugosidad le otorgaría la capacidad de exponer al péptido sobre la superficie. Se ha observado que la estructura esferoide que caracteriza a CAP_{p15}, su hidrofobicidad y la carga negativa que el péptido adquiere al encontrarse a un pH fisiológico, pudieran mediar su actividad como centros nucleadores de cristales minerales ya que podrían interactuar con cationes divalentes como lo es el calcio [22,106].

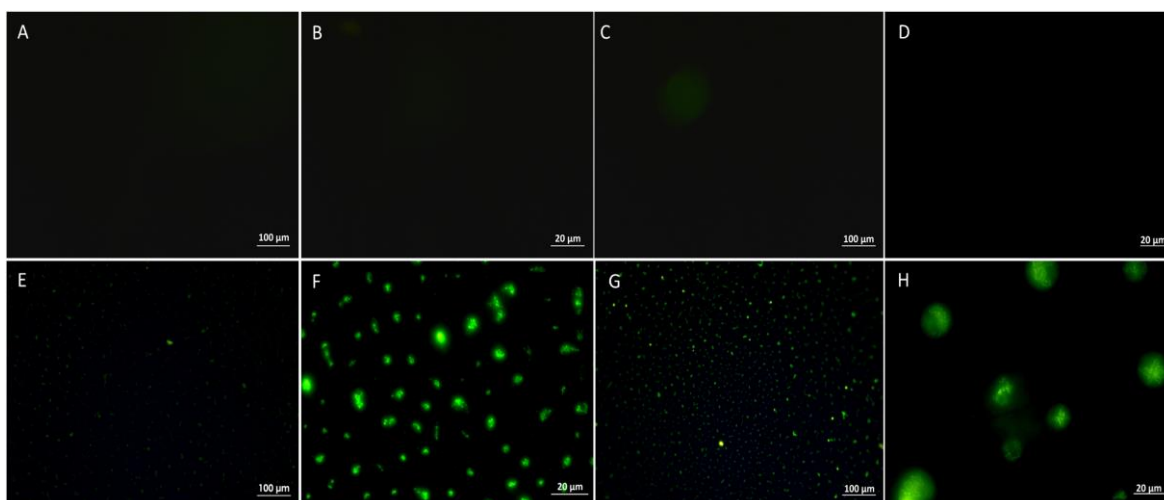


Fig. 10 A-B Superficie prístina **Ti**, C-D superficie prístina **TiO₂**. No se observa la adsorción de AF488. Panel inferior E-F superficie de **Ti** con CAP_{p15}-AF488 se observa la distribución de CAP_{p15}. G-H superficie de **TiO₂** con CAP_{p15} -AF488, la morfología de CAP_{p15} se presenta a manera de partículas esferoides distribuidas por todo el campo

Cuantificación de CAP_{p15}-AF488 adsorbido a superficies

A través de la cuantificación de CAP_{p15}-AF488 adsorbido a las superficies nos fue posible identificar si el péptido posee mayor afinidad por el Ti ó TiO₂. El gráfico mostrado en la Fig.11 indica la cantidad adsorbida de péptido en un área de 0.5 cm², observándose una mayor adsorción de CAP_{p15} sobre la superficie de TiO₂ con 27 ng/μL (±0.001), mientras que en el caso de la superficie de Ti la adsorción fue de 10 ng/μL (± 0.0009) del péptido. Este resultado podría encontrarse relacionado con la carga neta negativa que adquiere el péptido al encontrarse a un pH fisiológico y/o a la interacción de aminoácidos como la cisteína, serina y metionina los cuales podrían estar mediando la unión del péptido a las superficies de TiO₂ a través de puentes de hidrógeno o a través de la unión mediada por sus grupos carboxilos [72,76].

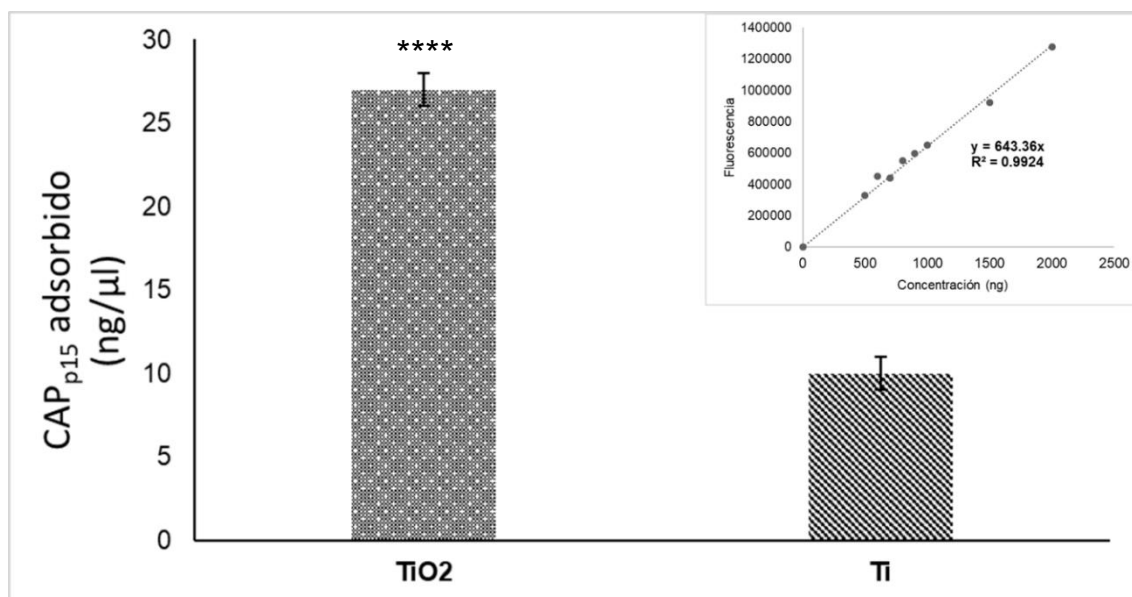


Fig.11 La cantidad de CAP_{p15} TiO₂ presentó 27 ng/μL (±0.001) versus 10 ng/μL (± 0.0009) en Ti de péptido adsorbido. T- Student no pareada con una p < 0.0001. La gráfica mostrada en la esquina superior derecha representa la gráfica de curva de calibración de la concentración de AF488 para evaluar la cantidad de péptido marcado

Humectabilidad

Medición del ángulo de contacto

A pesar de que CAP_{p15} se caracteriza por ser una secuencia con baja solubilidad al estar en presencia de agua debido a su naturaleza hidrofóbica, su adsorción en ambas superficies no alteró de manera significativa el comportamiento hidrofílico que caracteriza *per se* al Ti y TiO₂. Como se muestra en la figura 12 y 13, el Ti como superficie control presentó un ángulo de contacto de 54° (± 2.01), el cual incrementó a 61.93° (± 1.69) por la presencia de CAP_{p15}. Por otro lado, la superficie prístina de TiO₂ y en presencia de CAP_{p15} no mostraron cambios significativos en el ángulo de contacto (57.89° ± 2.10 y 58.05° ± 1.7, respectivamente). Con estos datos, observamos que aún con la presencia de una molécula de carácter hidrofóbico como CAP_{p15}, las superficies conservan un moderado comportamiento hidrofílico el cual permitiría tener una fuerte unión a proteínas del medio, que a su vez mediaría procesos de migración y unión celular a la superficie de estudio [61,107].

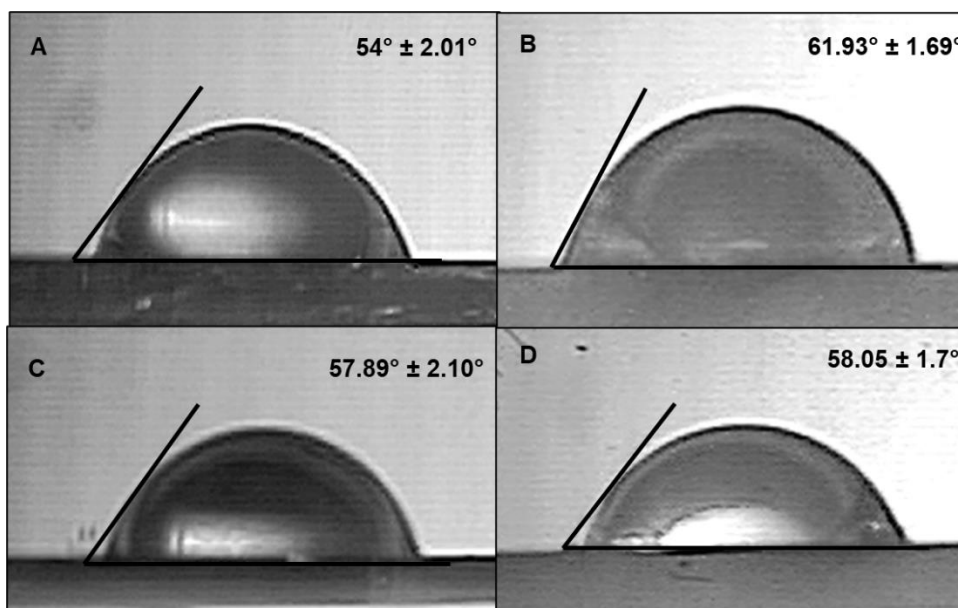


Fig.12 Imágenes representativas del análisis de mojabilidad en superficies control y experimental y sus respectivos promedios. A) Ti control, B) Ti+CAP_{p15}, C) TiO₂ control y D) TiO₂+ CAP_{p15}

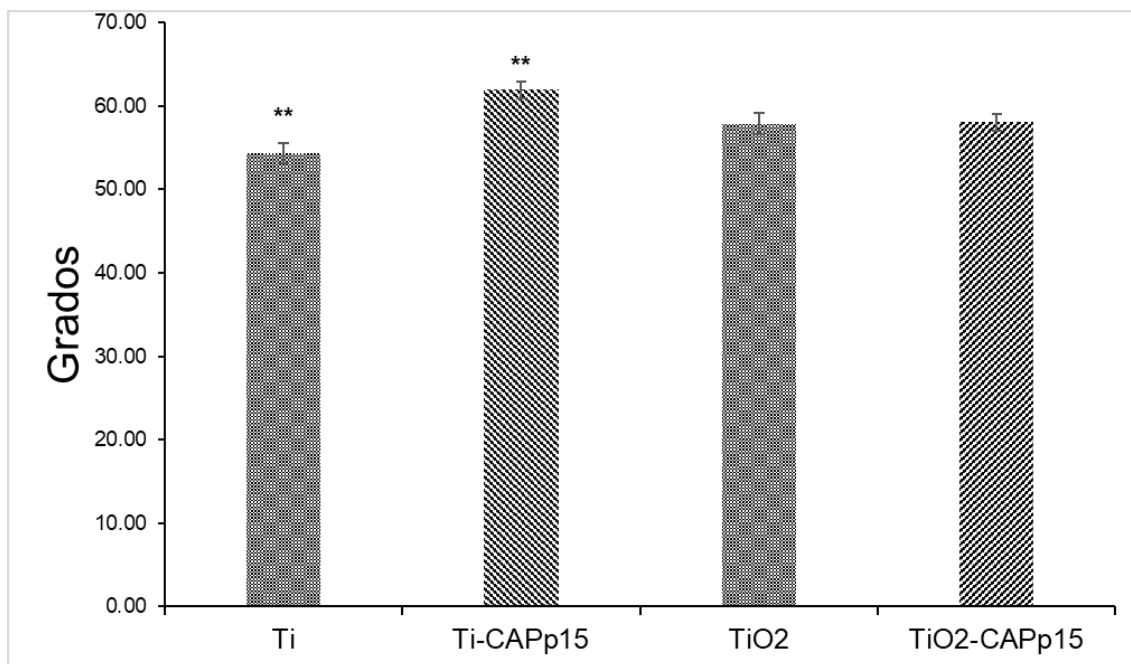


Fig.13 Análisis estadístico del ángulo de contacto por cada tipo de superficie. ANOVA, $p < 0.05$

Formación de cristales *in situ*

Para evaluar si la presencia del péptido podría estar regulando la morfología de precipitados cristalinos, empleamos un buffer con sobresaturación de iones calcio y fosfato (BSat Ca-PO₄). La figura 14 muestra la morfología cristalina en la película de Ti posterior a 21 días de incubación, si bien se observa la formación de una densa capa de depósito mineral, a mayores aumentos podemos apreciar que dicha capa adquiere una apariencia porosa, mientras que la superficie funcionalizada con CAP_{p15} (Fig.14 D-F) además de esta capa porosa se presenta la formación de estructuras que se han descrito como “estructuras en forma de flor”, las cuales un tamaño aproximado entre 1.4 μm y 2 μm. En el caso de la superficie de TiO₂ incubada con el péptido, el depósito formado parece adquirir una morfología más densa comparada con su grupo control (Fig.15). Se ha descrito que dichas capas densas están relacionadas con biomateriales bioactivos de carácter poroso, lo cual nos hace inferir que la rugosidad que se mantiene en ambas superficies al ser funcionalizadas con CAP_{p15} podría estar modulando esta morfología de precipitados de Ca/P en dichas superficies bajo condiciones de sobresaturación.

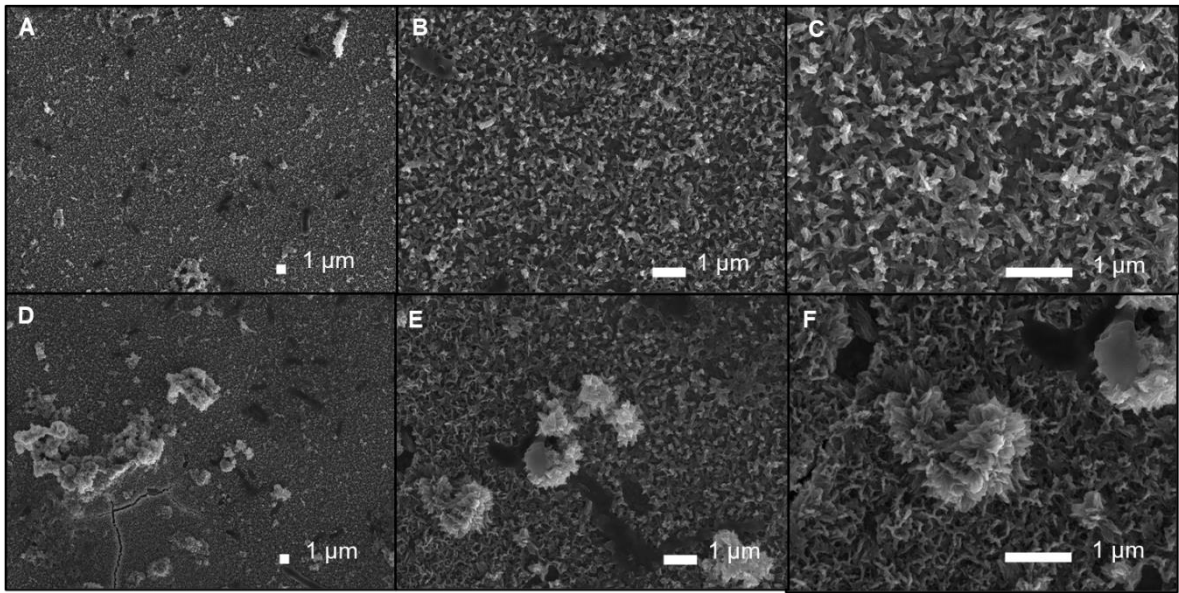


Fig.14 Depósitos formados en las superficies del grupo control **Ti** (A-C) y experimental **Ti + CAP_{p15}** (D-F). En el panel inferior observamos la formación de estructuras en flor cuando la superficie es tratada con CAP_{p15}. Amplificaciones 3,000 x, 5,000x y 20,000x, respectivamente

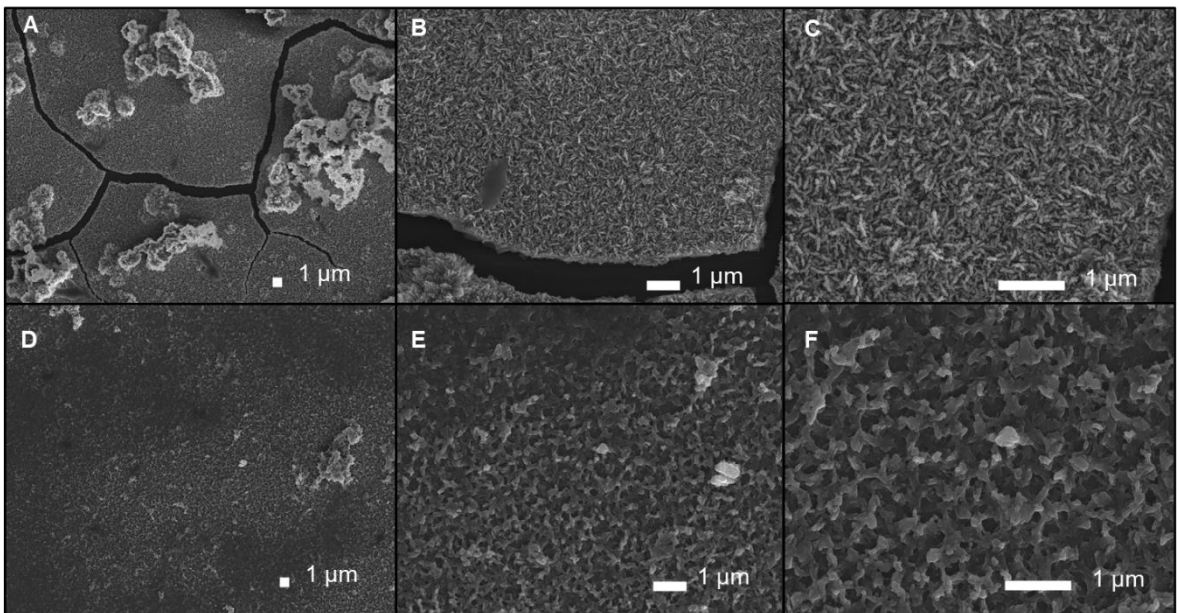


Fig.15 Depósitos formados sobre el **TiO₂**, control (A-C) y experimental (D-F).
Amplificaciones 3,000 x, 5,000x y 20,000x, respectivamente

Por otro lado, la utilización de un suero fisiológico simulado como lo fue la saliva artificial nos permitió conocer el efecto de CAP_{p15} sobre superficies de Ti y TiO₂ cuando se tiene un ambiente con un pH y temperatura controlada. En la figura 16 se muestran los depósitos formados sobre la superficie de Ti en ausencia de CAP_{p15} (A y B), dichos precipitados se encuentran dispersos sobre toda la superficie y con variadas morfologías, los cuales al ser analizados bajo el filtro de electrones retrodispersados (C) demostraron ser estructuras químicamente diferentes al sustrato. Al mismo tiempo, el análisis EDS reveló que estos precipitados se encuentran formados principalmente por elementos como K (0.97 Wt%) y Cl (1.26 Wt%), por lo que podrían tratarse de sales de cloruro de potasio (KCl) formados a partir de la solución de saliva artificial; además, se identificaron elementos como Ca (0.61 Wt%) y P (0.66 Wt%), cuya relación Ca/P fue de apenas 0.92 (Fig.17). Las superficies incubadas con CAP_{p15} mostraron precipitados dispersos y de morfología similar al grupo control (Fig.16 D-F). Al realizar el análisis EDS (Fig.18) se encontró que los precipitados se encontraban formados principalmente por elementos como K (0.92 Wt%), Na (0.86 Wt%) y Cl (0.15 Wt%). La poca o nula formación de depósitos minerales sobre la superficie de Ti funcionalizada con CAP_{p15} posiblemente esté asociada a la distribución del péptido sobre las irregularidades presentes en la superficie (como fue observado en el análisis de MFA), lo cual no permitió observar su efecto en la nucleación y crecimiento de depósitos minerales.

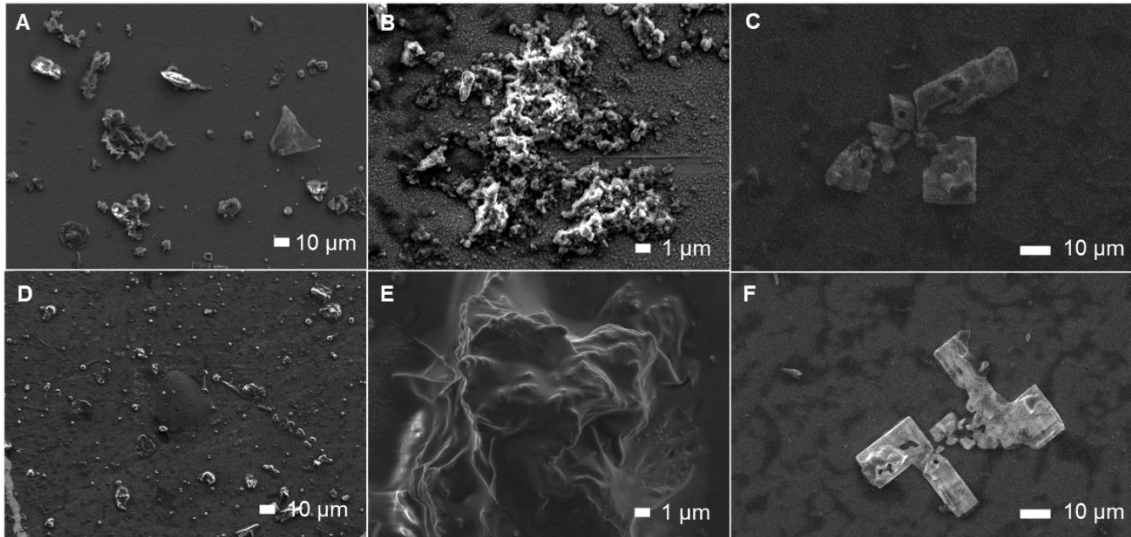


Fig.16 Superficie control de **Ti** (A-C) y experimental (D-F). En ambos grupos se observa la presencia de pequeños cristales distribuidos sobre toda la superficie. Imágenes C y F tomadas con el filtro de electrones retrodispersados. Amplificaciones 500x, 5,000x y 1,000x, respectivamente

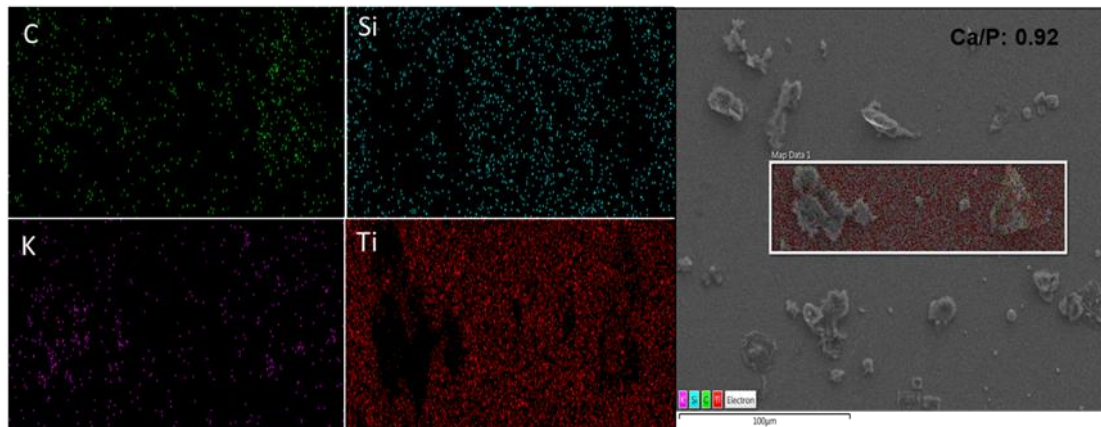


Fig.17 Mapeo elemental en la superficie prístina de **Ti**. Con colores se muestra la distribución por elemento. Al realizar el análisis de relación Ca/P observamos que esta es de 0.92

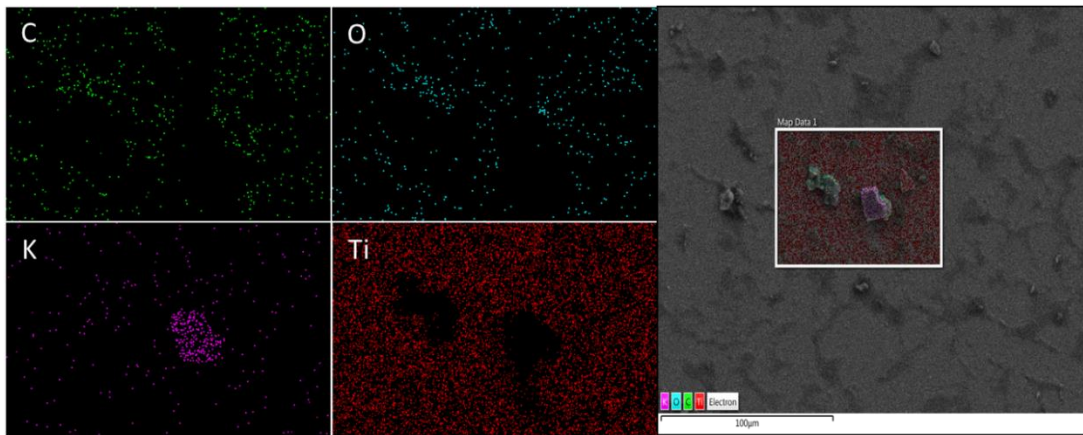


Fig.18 Mapeo de elementos presentes en la superficie de **Ti** funcionalizada con CAP_{p15}. Los precipitados analizados están compuestos principalmente de K y Cl

Los depósitos formados sobre la superficie control de TiO₂ se pueden apreciar precipitados dispersos, los cuales presentan un patrón similar a placas. Al realizar acercamientos de estas estructuras, parecen estar formadas de placas desorganizadas (Fig.19 A-C). Su análisis elemental (Fig.20) reveló diferencias notables en cuanto al porcentaje en peso de elementos como Ca, P, Na, K y Cl, ya que los depósitos se encontraban mayoritariamente formados por Ca (17.56 Wt%), P (11.74 Wt%), seguido por Cl (1.53 Wt%) y K (1.19 Wt%). Es importante señalar que dentro de las estructuras dichos elementos se encuentran distribuidos en toda la estructura de los cristales, es decir no presentan un acomodo preferencial.

La superficie funcionalizada con CAP_{p15} presenta precipitados de aproximadamente 4.5 µm de diámetro, similares a *flores*, formadas a partir de cristales en forma de placas/láminas con un grosor de 50 nm las cuales se distribuyen sobre un depósito conformado por hojuelas (Fig.19 D-F). Al observar dichos precipitados con el filtro de electrones retrodispersados (Fig.19 F), podemos apreciar que ambos tipos de estructuras se encuentran compuestos por elementos *pesados* y *ligeros*, es decir, existe un cambio en cuanto a conformación elemental. El análisis EDS (Fig.21) reveló que los precipitados localizados sobre el lecho de hojuelas se encuentran compuestos principalmente por elementos como Cl (15.8 Wt%) y K (8.9 Wt). Mientras que la distribución elemental de Ca y P se concentró principalmente en las hojuelas con una

presencia en peso de 16.5 Wt% y 9.2 Wt%, respectivamente; además el ratio Ca/P fue 1.78, mayor que el presentado en la superficie control. Las morfologías adoptadas en los depósitos formados en la superficie de TiO_2 con CAP_{p15} han sido identificadas como formas que puede adquirir la hidroxiapatita al ser sintetizada a pH fisiológico (~7.4). Como se mencionó anteriormente, la carga adquirida por la secuencia peptídica a este valor de pH le permite interactuar con los iones calcio, así como la distribución de CAP_{p15} sobre la superficie de TiO_2 son características importantes que contribuyen en la nucleación de cristales de apatitas [22,108,109].

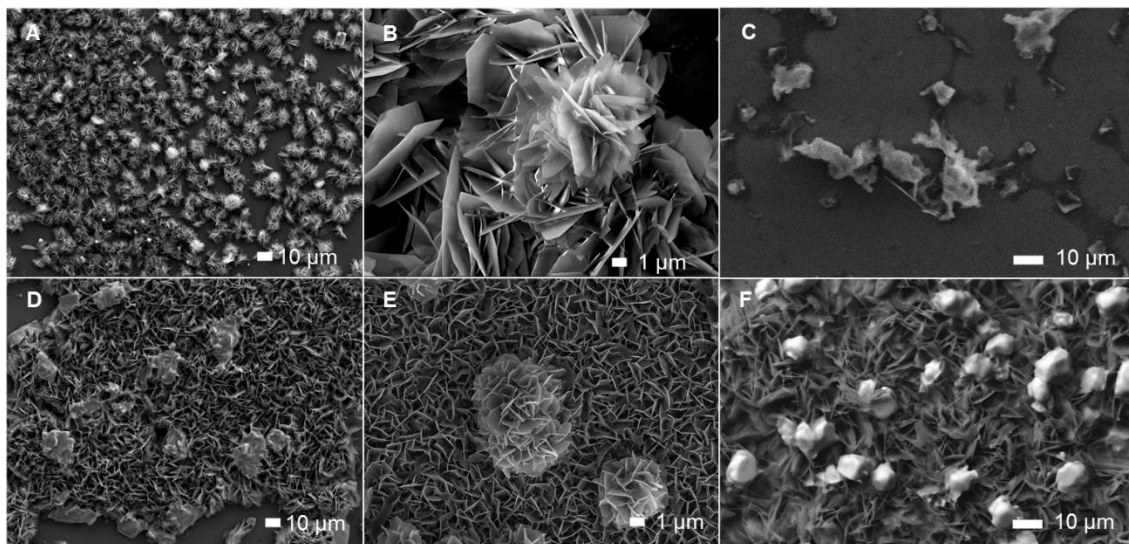


Fig.19 Superficies de TiO_2 control y experimental. En el panel superior se muestran los depósitos formados en ausencia de CAP_{p15} , los cuales presentan un patrón en forma de placas/láminas distribuidos por toda la superficie, algunos de ellos adquieren una morfología indefinida. La funcionalización con CAP_{p15} permite la precipitación de depósitos con una morfología en nano hojuelas. Imágenes C y F tomadas con el filtro de electrones retrodispersados. Amplificaciones 500x, 5,000x y 1,000x, respectivamente

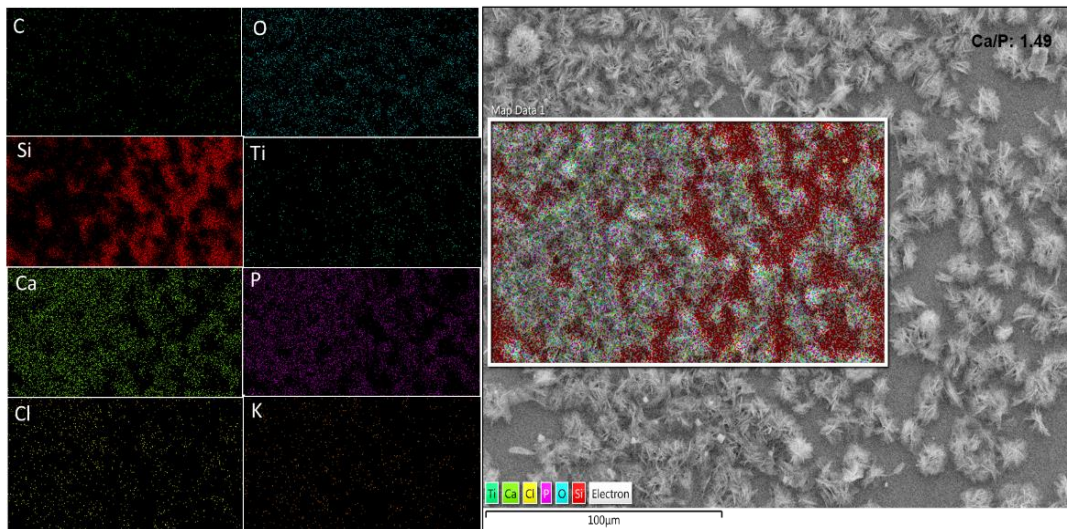


Fig.20 Mapeo elemental de la superficie control de TiO_2 . La distribución de los elementos se torna más homogénea. Relación Ca/P 1.49

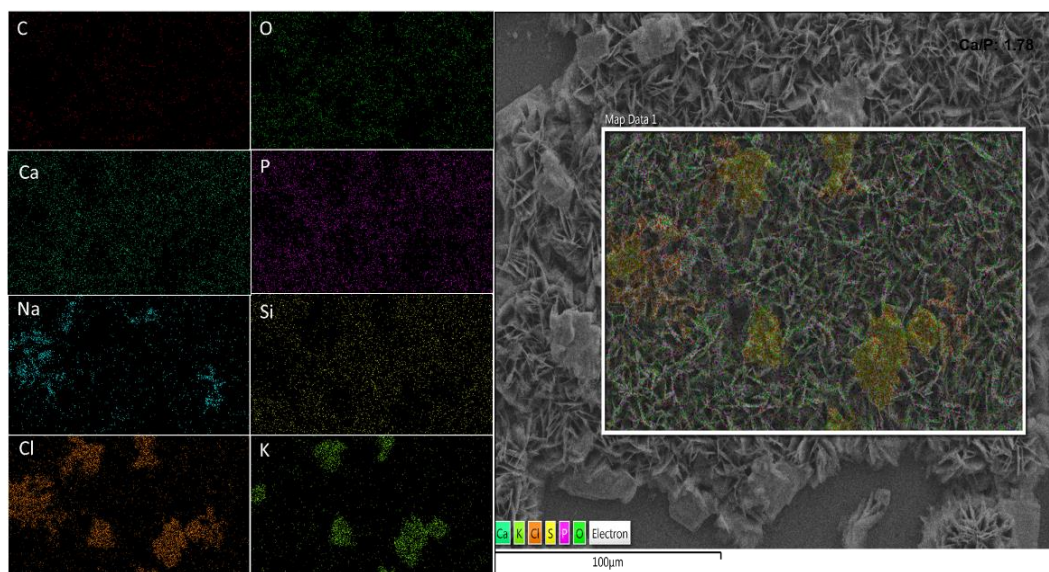


Fig.21 Mapeo elemental de los depósitos formados en la superficie de TiO_2 funcionalizada con CAP_{15} . Por color, es posible apreciar la distribución de cada elemento dentro del depósito. La relación Ca/P fue de 1.78

Caracterización espectroscópica de los cristales

Los subsecuentes análisis espectroscópicos de ambas superficies con y sin péptido nos permitieron determinar la presencia de grupos funcionales constituyentes de los depósitos formados. Al realizar el análisis de todas las superficies por medio de la espectroscopía de dispersión Raman se presentó fluorescencia como señal de interferencia; sin embargo, solo la superficie del grupo control del Ti fue la única en donde la interferencia produjo un fondo que no permitió la observación de bandas (Fig.22 A). En el caso de la superficie funcionalizada con CAP_{p15}, la espectroscopía Raman nos permite observar la banda 521 cm⁻¹ correspondiente al modo vibracional propio del silicio cristalino, material utilizado como sustrato para el depósito de las películas, (misma que podemos seguir observando en los demás grupos) además de la presencia de dos bandas más, una a 963 cm⁻¹ y 3576 cm⁻¹, la primera es característica de un ν_1 stretching simétrico (P-O) del fosfato (PO₄³⁻), la segunda corresponde a un stretching (O-H) y es producto de la presencia de grupos hidroxilo (Fig. 22 B). Por otro lado, y a pesar de que la fluorescencia estuvo presente en el análisis de todas las muestras, los espectros obtenidos en las superficies de TiO₂ (tanto del grupo control y experimental) permitió la identificación de bandas, como por ejemplo las bandas ν_2 438 cm⁻¹ (bending, O-P-O) y ν_1 960 cm⁻¹ (stretching, P-O) que corresponden a modos vibracionales del grupo fosfato (PO₄³⁻), mientras que la banda 2861 cm⁻¹ corresponde a un grupo OH⁻. La superficie experimental además de las bandas descritas en la superficie control, permitió identificar la presencia de otras como ν_4 596 cm⁻¹ (bending), 839 cm⁻¹, ν_3 1048 cm⁻¹ (stretching asimétrico), 1309 cm⁻¹, 1452 cm⁻¹ correspondientes al PO₄³⁻. La banda a 2979 cm⁻¹ corresponde al KCl, mientras que las bandas 3122 cm⁻¹ y 3499 cm⁻¹ abarcan el intervalo de los modos vibracionales del grupo OH⁻ (ver tabla 5), ambos compuestos por elementos presentes en los análisis EDS previos (Fig.23) [109-113].

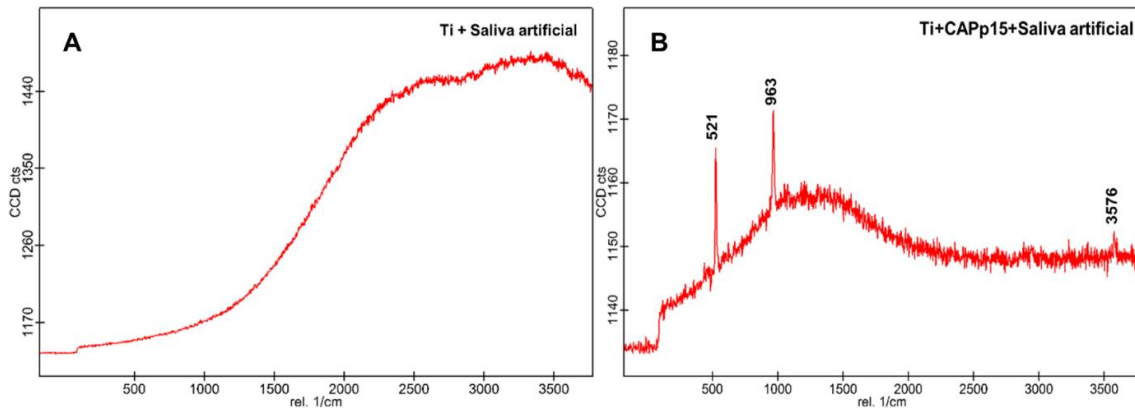


Fig.22 Espectro Raman de las superficies de **Ti**. Grupo control (A) no se logran apreciar bandas debido a la fluorescencia. Grupo experimental (B) es posible distinguir 3 bandas características de silicio cristalino, PO_4^{3-} y OH

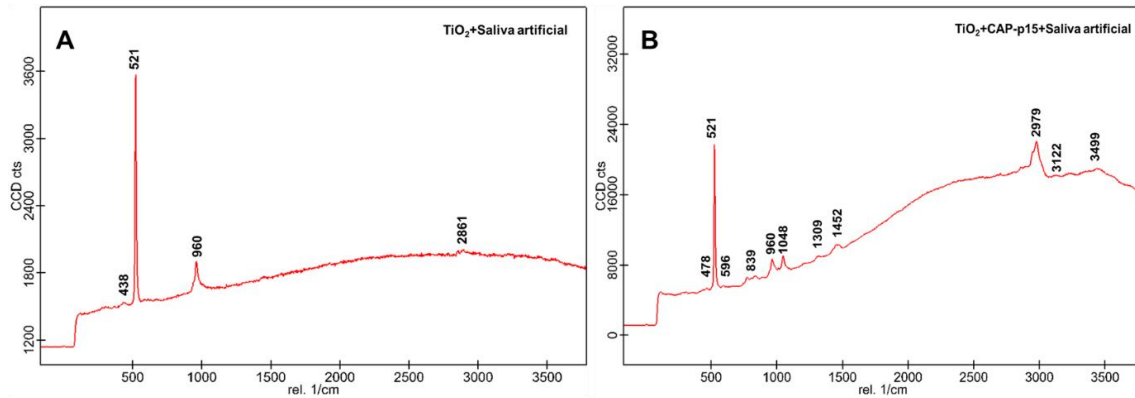


Fig.23 Espectro Raman en superficies de **TiO₂**. En el grupo control (A) y grupo experimental (B) se observan bandas características de grupo PO_4^{3-} , Si cristalino, KCl y grupos OH

El análisis a partir de ATR-FTIR permitió identificar bandas que con espectroscopía de dispersión Raman no pudieron ser visibles. La superficie control de Ti (Fig.24 A) muestra un conjunto de bandas, mismas que en la literatura se han reportado como características del fosfato octacálcico (OCP) como 992 cm^{-1} la cual es representativa de un stretching P-O del PO_4^{3-} ; las bandas a 1040 cm^{-1} , 1078 cm^{-1} y 1181 cm^{-1} se asocian a un $\nu_3\text{ PO}_4^{3-}$; mientras que la banda $\nu_2\text{ }1647\text{ cm}^{-1}$ sería representativa de las sales de cloruro de potasio (KCl). La superficie experimental además de presentar las bandas mencionadas con anterioridad (a excepción de 1181 cm^{-1} y 1647 cm^{-1}) presentó otro conjunto de bandas características de OCP como $590\text{ cm}^{-1}\text{ } \nu_4\text{ PO}_4^{3-}$, 635 cm^{-1} del grupo

OH⁻, mientras que las bandas a 877 cm⁻¹ y 986 cm⁻¹ representan un stretching del PO₄³⁻ asociadas a la fase mineral Brushita. Las bandas 1127 cm⁻¹, 1213 cm⁻¹ y 1273 cm⁻¹ corresponden a un stretching ν_3 asociado al HPO₄²⁻, 1173 cm⁻¹ es una banda característica del sulfato de calcio (CaSO₄), 1441 cm⁻¹ y 1541 cm⁻¹ son bandas características de un ν_3 CO₃²⁻ y finalmente 1630 cm⁻¹ se asocia a un ν_2 del H₂O [113-116,119].

A diferencia de los espectros obtenidos de las superficies de Ti, los obtenidos a partir del TiO₂ mostraron modos vibracionales correspondientes a la hidroxiapatita. En el caso del grupo control, podemos identificar bandas ubicadas en un intervalo que va de los 500-2000 cm⁻¹. La mayoría de las bandas localizadas en la superficie control se presentaron de igual manera en la superficie experimental, a excepción de la banda 601 cm⁻¹ y 1179 cm⁻¹ correspondientes a un ν_4 y ν_3 del PO₄³⁻, respectivamente. El espectro obtenido a partir de la superficie del grupo experimental (Fig. 25) presenta un doblete a 1455 cm⁻¹ y 1541 cm⁻¹ (vibración de estiramiento asimétrico ν_3) y un singulete ν_2 a 875 cm⁻¹ representativos de CO₃²⁻ del tipo A (presentes en hidroxiapatita carbonatada). Por otro lado, las bandas 557 cm⁻¹ (estiramiento ν_4), 589 cm⁻¹ (estiramiento ν_4), 963 cm⁻¹ (estiramiento ν_1), 1021 cm⁻¹, 1038 cm⁻¹ y 1088 cm⁻¹ (estiramiento ν_3) corresponden a modos vibracionales del PO₄³⁻, 630 cm⁻¹ y 931 cm⁻¹ corresponden a la presencia de grupos OH⁻ (ver tabla 5), 1216 cm⁻¹ es representativo de stretching ν_3 del HPO₄²⁻, las sales de KCl se estaría confirmando con la presencia de la banda ν_2 1647-1644 cm⁻¹ [114-119].

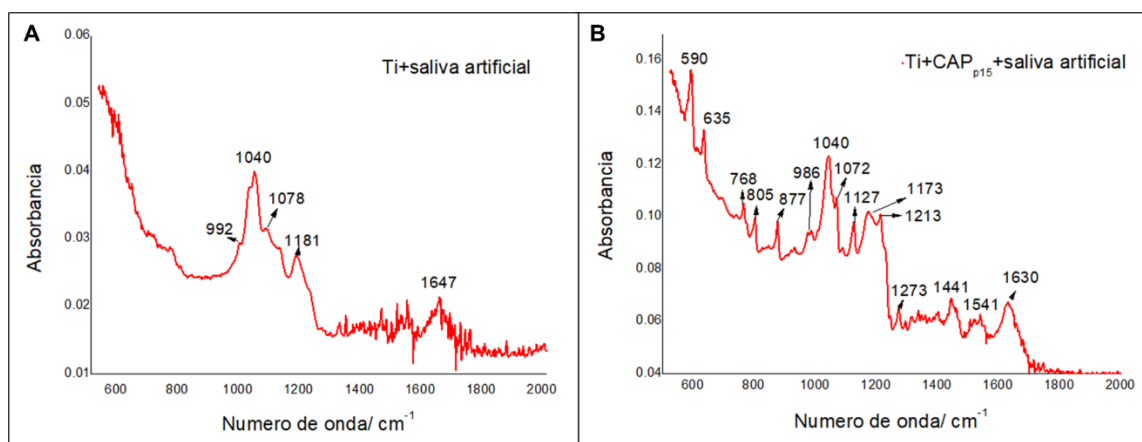


Fig. 24 Espectro ATR-FTIR. En A superficie control y B superficie con CAP_{p15}. La presencia de las bandas 590, 635, 877, 986-992, 1040 y 1072-1078 cm⁻¹ en la superficie experimental confirman la presencia de OCP

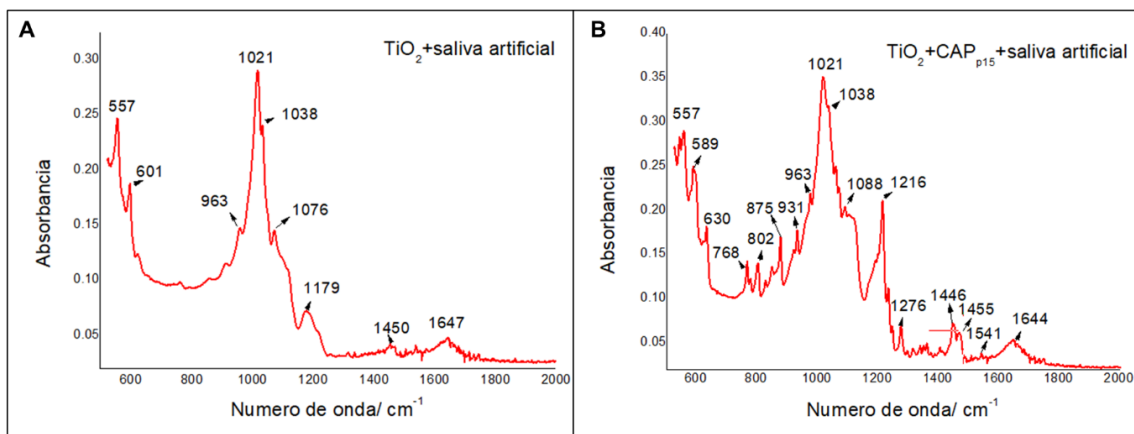


Fig.25 Espectro ATR-FTIR: En A se observan bandas en el intervalo de los 500-1100 cm^{-1} correspondientes a HA, en el grupo experimental (B) además de estas bandas, se observa un singulete a 873 cm^{-1} y un doblete a 1415 cm^{-1} y 1455 cm^{-1} correspondiente al grupo funcional CO_3^{2-}

Tipo de superficie	Espectroscopia Raman			ATR-FTIR		
	PO_4^{3-}	OH	CO_3^{2-}	PO_4^{3-}	OH	CO_3^{2-}
Ti	-----	-----	-----	992 cm^{-1} 1040 cm^{-1} 1078 cm^{-1} 1181 cm^{-1}	-----	-----
Ti + CAP _{p15}	963 cm^{-1}	3576 cm^{-1}	-----	590 cm^{-1} 877 cm^{-1} 986 cm^{-1} 1040 cm^{-1} 1072 cm^{-1}	635 cm^{-1} 1630 cm^{-1}	1441 cm^{-1} 1541 cm^{-1}
TiO ₂	438 cm^{-1} 960 cm^{-1}	2861 cm^{-1}	-----	557 cm^{-1} 601 cm^{-1} 963 cm^{-1} 1021 cm^{-1} 1038 cm^{-1} 1076 cm^{-1} 1179 cm^{-1}	-----	1450 cm^{-1}
TiO ₂ + CAP _{p15}	839 cm^{-1} 1048 cm^{-1} 1309 cm^{-1} 1452 cm^{-1}	3122 cm^{-1} 3499 cm^{-1}	-----	557 cm^{-1} 589 cm^{-1} 963 cm^{-1} 1021 cm^{-1} 1038 cm^{-1} 1078 cm^{-1}	630 cm^{-1} 931 cm^{-1}	875 cm^{-1} 1455 cm^{-1} 1541 cm^{-1}

Tabla 5. Principales bandas presentes en los espectros Raman e infrarrojo por cada tipo de superficie

Difracción de rayos X (haz rasante)

Los difractogramas obtenidos de las superficies de Ti indican, en el caso de la superficie control, únicamente la presencia de cristales de KCl (Fig. 26 A). Por otro lado, el difractograma de la superficie experimental (Fig.26 B) no mostró la presencia de los precipitados compuestos por K y Cl, como se observó de manera previa a partir de MEB y EDS, esto podría deberse a una escasa presencia sobre la superficie o incluso a una falta de cristalinidad de los depósitos. Las fases cristalinas fueron indexadas con ayuda del software y con fichas PDF mostradas en la figura 26.

En el caso de las superficies de TiO_2 , la superficie control presenta cristales de KCl (Fig. 27 A), identificándose planos de crecimiento como (111), (220) y (222) mientras que en la superficie experimental se presentan los planos (200), (220) y (222). La hidroxiapatita presente en los depósitos se identifica a partir de los planos (002), (102), (211), (112), (202), (221), (203), (222) y (004) en la superficie control; mientras que las orientaciones de crecimiento observados en la superficie con CAP_{p15} son (101), (002), (211), (112), (004) y (511).

Es importante mencionar que el difractograma de la superficie control presenta un patrón difuso, esto posiblemente resultado de una escasa cristalinidad de los depósitos precipitados, al tiempo de exposición o al espesor de la capa precipitada en comparación con la superficie funcionalizada con CAP_{p15} en la cual el patrón de difracción presenta menos ruido. La identificación de ambas fases cristalinas se llevó a cabo con las fichas PDF 01-073-0380 para KCl y 00-009-0432 para HA (Fig.27) [120-121].

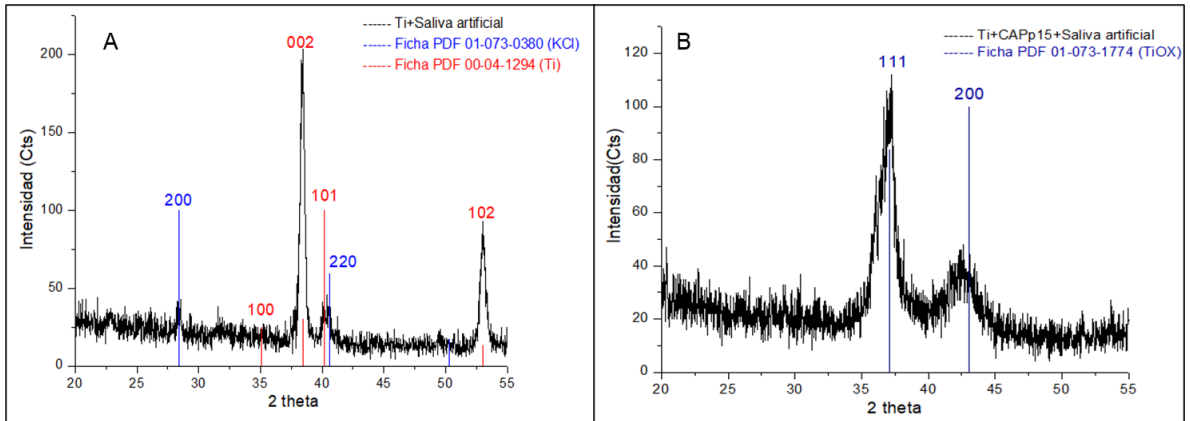


Fig.26 Superficie control (A) se observan planos de crecimiento correspondientes a cristales de KCl (azul) y Ti (rojo). Superficie experimental (B) solo muestra la presencia de planos que corresponden a óxido de titanio

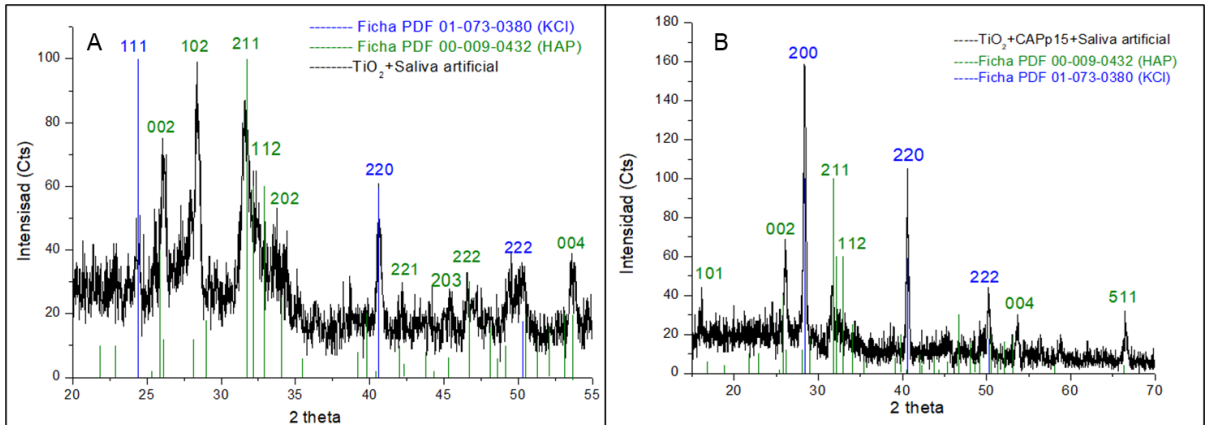


Fig.27 Superficie control (A) y superficie experimental (B) se observan planos de crecimiento correspondientes a cristales de KCl (azul) y cristales de hidroxiapatita (verde)

Pruebas biológicas

Ensayo de proliferación celular (MTT)

Los resultados del ensayo muestran que las superficies empleadas en este trabajo no son citotóxicas, ya que favorecen la proliferación celular. Las superficies de Ti y TiO₂ tratadas con CAP_{p15} presentaron un incremento significativo en la proliferación celular, ANOVA $p < 0.05$ (Fig.28). Si bien la adsorción de CAP_{p15} a las superficies propicia un aumento en la proliferación celular, su mecanismo de acción aún es un campo de estudio por explorar. Algunos estudios han mostrado que la proteína completa (HACD1/CAP) induce la proliferación de fibroblastos gingivales mediante la activación de la vía MAPK; esto es, a partir de la activación de la fosforilación de ERK2, lo cual finalmente conduce a la activación del factor de transcripción *c-fos*, dicho factor de transcripción se encuentra relacionado a la proliferación celular [25,87].

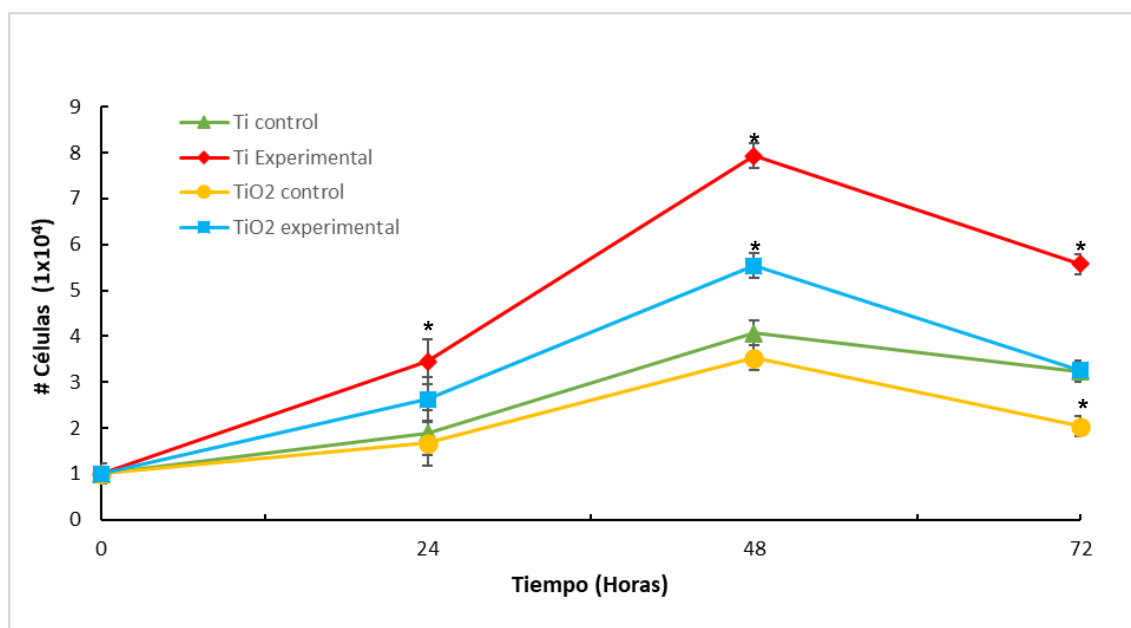


Fig.28 Efecto de la funcionalización de CAP_{p15} en la proliferación celular. ANOVA, $p < 0.05$

Ensayo de cierre de herida

El diseño de una herida homogénea de aproximadamente 1 mm de ancho a lo largo de las superficies permitió la evaluación de la migración de fibroblastos gingivales cultivados en ausencia y presencia de CAP_{p15}. La observación de las superficies a las 0 h muestra una herida bien delimitada con la ausencia de células en su interior, (superficie control de Ti en Fig. 29 A y E, y la de TiO₂ en la Fig.30 A y E). El porcentaje de cierre de la herida se evaluó al transcurrir 72 h de cultivo. Las superficies del grupo control suplementado con 0.2% de SFB fue de 7.49% para el Ti (Fig. 29 B y F) y de 6.83% en el caso del TiO₂ (Fig. 30 B y F). Se empleó un segundo grupo control suplementado con 10% de SFB (control positivo), el cual mostró un porcentaje de cierre del 8.63% en la superficie de Ti (Fig. 29 C y G) y un 7.01% en el TiO₂ (Fig. 30 C y G). Mientras que la mayor tasa de migración se presentó en las superficies tratadas con CAP_{p15}, en donde la superficie de Ti presentó un porcentaje de cierre 23% (Fig. 29 D y H) y en el caso de la superficie de TiO₂ el porcentaje de cierre fue de 17.59 % (Fig.30 D y H). La migración celular se identificó por la pérdida de los bordes a lo largo de toda la herida; la morfología de las células se caracterizó por ser alargada y estrellada, además de que se observaron prolongaciones citoplasmáticas denominadas *filopodios*, los cuales se encuentran asociados con mecanismos de adhesión y migración celular (Fig. 29 y 30 E-H). ANOVA $p < 0.0001$

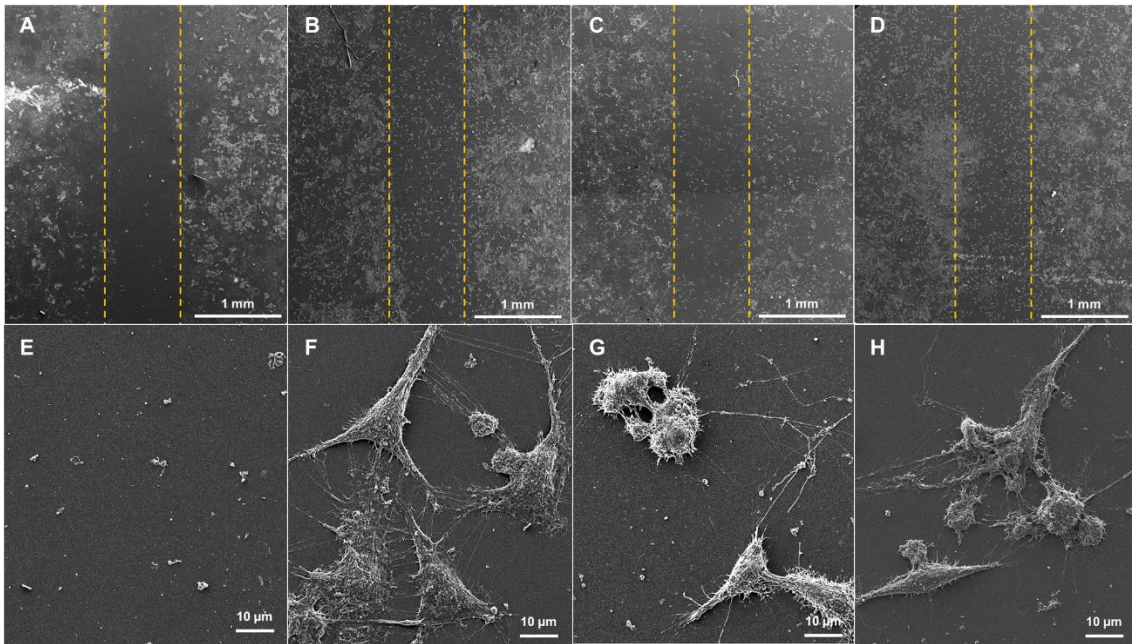


Fig.29 Migración de fibroblastos gingivales sobre superficies de **Ti** a 0 h (A y E). El control negativo (B y F), positivo (C y G) y el experimental con CAP_{p15} (D y H) fueron analizados a las 72 h de cultivo

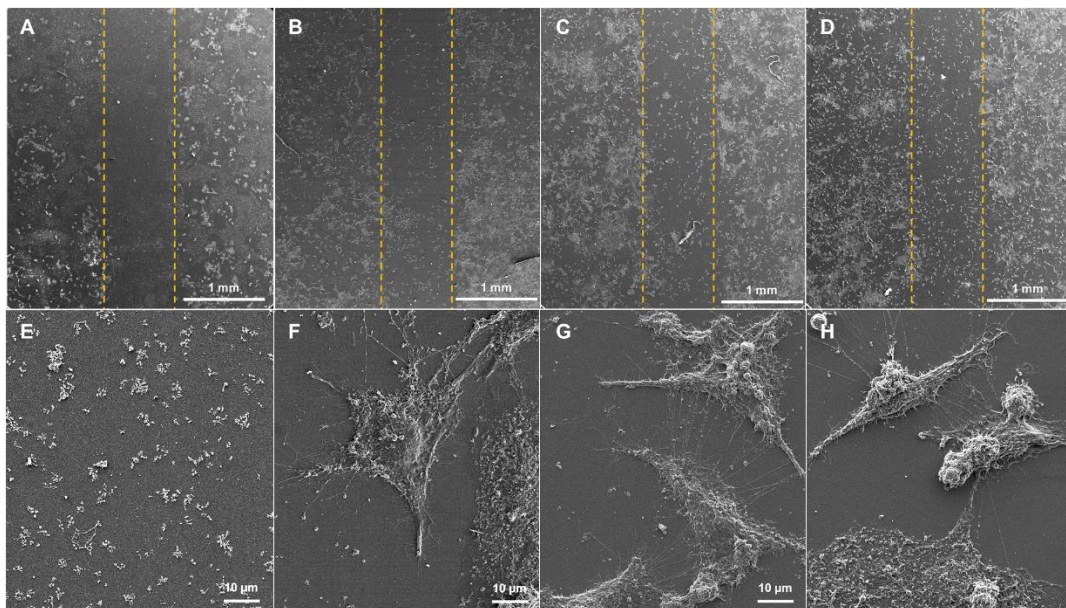


Fig.30 Migración de fibroblastos gingivales sobre superficies de **TiO₂** a 0 h (A y E). El control negativo (B y F), positivo (C y G) y experimental con CAP_{p15} (D y H) fueron analizados a las 72 h de cultivo

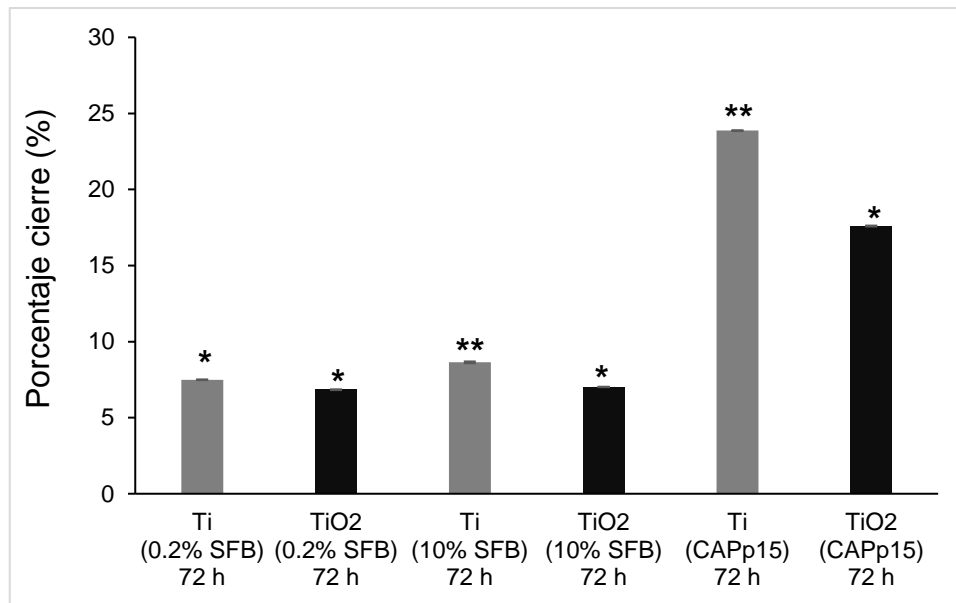


Fig.31 Porcentaje del cierre promedio en los grupos. El mayor cierre se obtuvo en las superficies tratadas con CAP_{p15} versus los grupos control positivo y negativo. ANOVA $p < 0.0001$

DISCUSIÓN

La respuesta biológica que se forma entre el huésped y un implante se encuentra íntimamente relacionada con las características que este último posea en su superficie. Factores como la composición química, topografía y humectabilidad pueden tener un papel sinérgico en el proceso de adhesión y proliferación celular modulando el proceso de oseointegración, el cual contribuye a una mayor estabilidad del implante, minimizando el riesgo al fracaso. Dadas las cualidades como la biocompatibilidad y la resistencia a la corrosión, el titanio y las aleaciones a base de titanio son utilizadas ampliamente en la fabricación de implantes de carácter dental y ortopédico.

Se sabe que la biocompatibilidad del titanio es producto de su interacción con el oxígeno al formar una capa de óxido (TiO_2) la cual contribuye a la unión de moléculas orgánicas, iones y células, incrementando la actividad osteogénica [73,122]. A pesar de que la sobrevivencia de los implantes generalmente es alta, aún existe un alto riesgo de fracaso. De Trino y colaboradores [63] en 2018, mencionan que la tasa de fracaso puede ser del 20% en caso de los implantes dentales y hasta de un 35% en el caso de implantes ortopédicos, es por ello que a partir de la modificación de las superficies en los implantes se busca diseñar superficies bioactivas que permitan acelerar el proceso de oseointegración. Nuestro trabajo de investigación se basó en la utilización de un péptido (CAP_{p15}) derivado de la porción C-terminal de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) como molécula bioactiva capaz de promover el proceso de mineralización al ser adsorbida sobre superficies de Ti y TiO_2 . Dicha capacidad como promotor del proceso de mineralización está basada en investigaciones previas realizadas por Salgado [25] y Hernández [24] en donde demostraron a partir de estudios *in vivo*, que CAP_{p15} posee la capacidad de promover formación ósea *de novo* en tibias de conejo y promover el proceso de remineralización en ratas con osteoporosis inducida.

Con base en nuestros resultados, comprobamos que tanto la topografía y la química superficial de las películas de Ti y TiO_2 influyeron en la adsorción y en

la distribución del péptido. Dentro de los resultados encontramos que las superficies de Ti presentaron una topografía irregular, dando lugar a una rugosidad característica lo cual limitó la distribución de CAP_{p15} a dichas irregularidades, por tanto la distribución del péptido fue difícil de identificar en las imágenes de fase y topográficas del análisis de MFA y únicamente es posible comprobar su presencia a partir de los ensayos de fluorescencia y humectabilidad, por lo que posiblemente no logramos evidenciar un efecto considerable en la regulación de la morfología y maduración de cristales. Por otro lado, en las superficies de TiO₂ fue más evidente identificar la presencia del péptido mediante las diferentes técnicas analíticas. CAP_{p15} adquirió una morfología esferoide cuando se adsorbe sobre las superficies de TiO₂, esta característica puede estar relacionada en principio al carácter hidrofóbico de CAP_{p15}, el cual debido a su baja solubilidad al encontrarse en un medio acuoso genera ese tipo de ensamble; además, de que su presencia condujo a un aumento del índice de rugosidad del TiO₂. Montoya y colaboradores [22] en 2014 observaron esta misma característica de ensamble en la proteína completa (HACD1/CAP), y ellos determinaron que estas esferas nanoestructuradas pueden tener un tamaño aproximado entre 7-27 nm teniendo la capacidad de agruparse en partículas más grandes actuando como centros nucleadores de cristales de hidroxiapatita. Se ha visto que esta misma disposición en nano esferas a pH fisiológico se presenta en la amelogenina, la cual es una proteína hidrofóbica (al igual que HACD1/CAP) implicada en el crecimiento y organización del esmalte dental. Esta estructura en nano esferas, le permite controlar la fase mineral, forma y organización de minerales. Deshpande [129] demostró que la interacción que existe entre las fibras de colágena con las nano esferas de amelogenina regulan la mineralización de fosfatos de calcio promoviendo la formación de matrices de cristales minerales asociados a las fibras de colágena, es decir, esta disposición esferoide podría contribuir a la formación de interacciones entre una fase mineral y una orgánica.

La adsorción de moléculas orgánicas a superficies ya sean proteínas o secuencias peptídicas es producto de una serie de eventos relacionados con la interacción de la molécula con el medio, la interacción del agua con la superficie (hidrofilia/hidrofobicidad) así como de las interacciones que puedan surgir entre

la molécula y la superficie a partir de las interacciones hidrofóbicas, fuerzas de Van Der Waals, interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno. Por consiguiente, además de la organización del péptido evaluamos su afinidad a las superficies a partir de su cuantificación para conocer la existencia de una mayor atracción ya sea a las superficies de Ti o TiO₂ a partir de su marcaje con un fluoróforo. Los resultados revelaron que CAP_{p15} posee una mayor afinidad a las superficies de TiO₂, esto podría estar en relación con lo citado por YazdanYar [73] en 2018, el cual menciona que ya sea en condiciones *in vitro* o *in vivo*, el TiO₂ sufre una hidroxilación en su superficie producto de la adsorción de moléculas de agua al encontrarse en el medio acuoso, sumado a lo demostrado por Langen y Menkel [124] en 2003, en donde mencionan que en el caso de aminoácidos como la cisteína y la serina (los cuales poseen en su cadena lateral grupos tiol e hidroxilo, respectivamente) su adsorción a superficies de TiO₂ tendría la capacidad de crear enlaces fuertes a partir de sus cadenas laterales. En este sentido, considerando que CAP_{p15} es una secuencia mayoritariamente compuesta por serinas y cisteínas, esto podría ser una aproximación al entendimiento del mecanismo por el cual existe una mayor adsorción del péptido a las superficies de TiO₂ que de Ti.

Otro factor implicado en el mecanismo de adsorción de moléculas a superficies es el tipo de interacción que existe entre moléculas de agua y superficie, es decir la hidrofilia e hidrofobicidad. La energía libre superficial de los materiales al ser medida a través de la técnica de ángulo de contacto con una sustancia polar (agua, por ejemplo), clasifica a los materiales como hidrofóbicos e hidrofílicos, es decir, un ángulo de contacto que oscile entre 90° y 150° se presenta en superficies consideradas hidrofóbicas (baja humectabilidad) mientras que valores de ángulo de contacto inferiores a los 90° se asocian con sustratos que adsorben de manera fácil moléculas de agua debido a la presencia de grupos polares presentes en su superficie, es decir, son consideradas hidrofílicas (alta humectabilidad) incluso se considera que ángulos menores a los 5° son representativos de superficies superhidrofílicas [56,94]. El comportamiento de las superficies de Ti y TiO₂ en presencia de CAP_{p15} nos demostró que aun cuando el péptido es de naturaleza hidrofóbica, las superficies mantenían su naturaleza hidrofílica al presentar valores por debajo de los 65°. Estos resultados

concuerdan con lo descrito por Fonseca [56] en 2017, demostrando a partir de ensayos de ángulo de contacto la hidrofilia presente en superficies de TiO₂. La moderada hidrofilia presente en las superficies de Ti y TiO₂ podrían actuar mediando una mejor respuesta en la adsorción del péptido, así como de una futura adhesión celular. Kulkarni [74] en 2015 mencionó que superficies hidrofóbicas podrían propiciar un mayor aumento en la adsorción de proteínas producto de interacciones hidrofóbicas presentes, sin embargo, esto también podría desencadenar cambios conformacionales e incluso desnaturalización de las proteínas adsorbidas, en el otro extremo, superficies altamente hidrofílicas no tienen la capacidad de adsorber proteínas en un medio acuoso además de promover una disminución de la adhesión y proliferación celular.

Además de influir en la morfología y adsorción del péptido, las interacciones que surgen a partir de la unión péptido-superficie pueden llegar a modular el proceso de mineralización. Es por ello, que a partir de los ensayos para evaluar el efecto de CAP_{p15} adsorbido a las superficies de Ti y TiO₂ bajo condiciones que emulan un ambiente fisiológico, comprobamos la afinidad de elementos como calcio y fósforo sobre las superficies de TiO₂ principalmente en presencia de péptido. Las imágenes obtenidas por medio de MEB y los análisis EDS demostraron que los precipitados formados en ambas superficies fueron distintos en cuanto a morfología y composición, encontrándose mayoritariamente precipitados compuestos principalmente por Na y K sobre las superficies de Ti. En el caso de las superficies de TiO₂ sin la adsorción de CAP_{p15} se forman precipitados con una morfología similar a placas concéntricas, mientras que las superficies funcionalizadas con CAP_{p15} muestran estructuras en forma de “flor”, en ambos casos el análisis EDS reveló que dichos precipitados se encontraban principalmente formados por los elementos Ca y P, mostrando una relación Ca/P de 1.49 y 1.78, respectivamente. Pedrota [126] en 2004 evaluó la interacción de algunos iones mono y divalentes (Na⁺, Rb⁺, Ca²⁺, Sr²⁺ y Zn²⁺) que están presentes soluciones fisiológicas simuladas y en el suero sanguíneo humano, con superficies de TiO₂ neutras y con carga negativa, es decir parcialmente hidroxiladas; se observó que los cationes más pequeños como Na⁺, Ca²⁺ y Zn²⁺ poseen mayor adsorción en comparación con los iones más grandes como Rb⁺ y Sr²⁺. En otro estudio Köppen y Langel [125] en 2006 demostraron la interacción

preferencial de cationes hacia superficies de TiO_2 parcialmente hidroxiladas (carga negativa) mientras que iones con la misma carga (aniones) se mantienen difundidos en la solución. La morfología de los precipitados formados sobre las superficies de TiO_2 en presencia de péptido han sido identificadas como formas que puede adquirir la hidroxiapatita al ser sintetizada a pH fisiológico (~ 7.4) sin embargo debido a la capacidad de CAP_{p15} de actuar como centro nucleador de cristales de hidroxiapatita producto de la carga que adquiere al estar en un medio con un pH fisiológico y su morfología de nano esferas le permite interactuar preferencialmente con iones calcio contribuyendo en la nucleación de cristales de hidroxiapatita, es por ello que si bien los precipitados se encuentran mayoritariamente conformados por calcio y fósforo se mantiene con una distribución diferente del potasio, sodio y cloro.

Al evaluar estos depósitos a partir de la espectroscopía de dispersión Raman se demostró la presencia de grupos fosfatos en todas las superficies. Timchenko [110] en 2018 menciona que el modo vibracional ν_1 (stretching) correspondiente al PO_4^{3-} tiende a ser la banda más intensa en los tejidos mineralizados y que esta banda puede llegar a variar debido al entorno, así como a la sustitución de grupos aniónicos produciendo cambios en el grado de cristalinidad. Por ejemplo, se ha visto que una sustitución de las apatitas del tipo B, es decir cuando existe una sustitución de un grupo PO_4^{3-} por CO_3^{2-} la banda ν_1 tiende a ubicarse en el intervalo $955\text{-}959\text{ cm}^{-1}$, cuando hablamos de una hidroxiapatita altamente cristalina esta banda se desplaza en el intervalo $960\text{-}963\text{ cm}^{-1}$, mientras que una banda ubicada en el rango de $945\text{-}950\text{ cm}^{-1}$ nos estaría hablando de una apatita con una red desordenada de fosfatos. Los espectros obtenidos a partir de la funcionalización con CAP_{p15} en Ti presenta la ubicación de esta banda a 963 cm^{-1} mientras que el TiO_2 lo presenta a 960 cm^{-1} , lo cual nos estaría indicando la formación de una hidroxiapatita con un alto grado de cristalinidad en ambas superficies.

Al realizar el análisis infrarrojo de las superficies de Ti (tanto control como en presencia de CAP_{p15}) se pudo identificar la presencia de bandas en 590 , 635 , 877 , 980 , 1040 y 1072 cm^{-1} , que son características del fosfato octacálcico (OCP). Sin embargo, las superficies de TiO_2 incubadas con CAP_{p15} permitieron identificar la presencia de grupos PO_4^{3-} (557 , 589 , 963 , 1021 , 1038 y 1088 cm^{-1}),

así como de CO_3^{2-} del tipo A, que se caracteriza por presentar un doblete entre los 1555 y 1450 cm^{-1} (modo vibracional asimétrico ν_3) mientras que el singulete a 875 cm^{-1} (bending fuera del plano de vibración ν_2) es característico de CO_3^{2-} del tipo B, por lo que se podría tratar de una sustitución del tipo A-B (con un alto contenido de CO_3^{2-} del tipo A).

La caracterización de los depósitos formados en las superficies de TiO_2 con CAP_{p15} mediante el análisis de DRX permitió corroborar la presencia de cristales de hidroxiapatita, mediante la identificación de los planos cristalinos (002), (211) y (112), mientras que en el grupo control se observaron los planos (002), (102) y (211). Con todos estos hallazgos, determinamos que en las superficies de Ti con el péptido se observaron depósitos minerales de fases inmaduras como el OCP, mientras que en las superficies de TiO_2 funcionalizada con CAP_{p15} , se identificó la sustitución de PO_4^{3-} y OH^- por CO_3^{2-} que corresponde a hidroxiapatita carbonatada.

Además de los análisis libres de células, se realizaron pruebas biológicas como el ensayo de MTT y de cierre de herida. Los resultados obtenidos del ensayo MTT demostraron que la secuencia aminoacídica propicia un aumento en la proliferación de fibroblastos gingivales hasta las 48 h de ser cultivados. Si bien hasta el momento el mecanismo de acción por el cual CAP_{p15} podría estar promoviendo la proliferación celular es una incógnita, se sabe que la proteína de la cual deriva este péptido (HACD1/CAP) induce la proliferación de fibroblastos gingivales a través de la activación de la vía MAPK (donde se promueve la activación del factor de transcripción *c-fos* mediante la fosforilación de ERK2) en estudios realizados en 1999 por Saito y Narayanan [130]. Por otro lado, la presencia de CAP_{p15} favoreció el incremento en la tasa de migración de fibroblastos gingivales en el ensayo de cierre de herida. Un dato curioso e importante por destacar, es que las superficies de Ti mostraron un mejor comportamiento en el cierre de la herida, esto puede ser debido a las características topográficas de dichas superficies, las cuales mostraron que en presencia del péptido disminuye su rugosidad, mientras que en las superficies de TiO_2 la incrementa. Es decir, existe un comportamiento preferencial de los fibroblastos hacia superficies con menor rugosidad. Zhou y Paschalis en 2016 evaluaron el comportamiento de fibroblastos corneales en superficies de Ti con

diferentes grados de rugosidad, sus estudios demostraron que superficies con topografía lisa incrementa la adhesión y la proliferación celular, así como un mayor aumento en la producción de matriz extracelular [128].

Los alcances que posee la superficie de un implante para interactuar con el entorno biológico están dados a partir de sus características químicas y topográficas, por tal motivo la funcionalización a partir del uso de moléculas bioactivas surge como recurso para mejorar el proceso de biomineralización. CAP_{p15} demostró tener la capacidad de actuar como molécula osteoconductora al permitir la precipitación de hidroxiapatita carbonatada, y como molécula bioactiva al mejorar la proliferación y migración celular en estudios *in vitro*.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados, concluimos que el péptido derivado de la porción C-terminal de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) posee una adsorción preferencial a las películas de TiO₂, promoviendo la precipitación de hidroxiapatita carbonatada después de 21 días de incubación en una disolución fisiológica simulada, además de aumentar la proliferación y migración celular sobre superficies de Ti y TiO₂. Sin embargo, se necesitan más estudios que permitan evaluar el efecto de la funcionalización de las superficies con CAP_{p15} en la actividad metabólica de células osteoblásticas.

PERSPECTIVAS

Realizar ensayos bajo distintas concentraciones de CAP_{p15}.

Buscar estrategias que permitan una mayor cobertura del área de adsorción de CAP_{p15}, estas pueden ser desde adsorción física a partir de las interacciones electrostáticas de la biomolécula y el sustrato, hasta la adición de *linkers* ya sean sintéticos como los silanos o derivados biológicos como la heparina, dopamina y quitosán que permitan la unión covalente de la molécula deseada al sustrato.

Realizar estudios de dinámica molecular con la finalidad de entender el mecanismo de interacción entre los átomos de la secuencia aminoacídica con las superficies.

REFERENCIAS

- [1] Nanci A, Bosshardt D. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontology* 2000. 2006; 40:11–28.
- [2] Jong T, Bakker AD, V. Everts. The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration. *J Periodont Res*. 2017; 52: 965–974.
- [3] Xiong J, Gronthos S, Bartold M. Role of the epithelial cell rests of Malassez in the development, maintenance and regeneration of periodontal ligament tissues. *Periodontology* 2000. 2013; (63): 217–233.
- [4] Zeichner-David M. Regeneration of periodontal tissues: cementogenesis revisited. *Periodontology* 2000. 2006; (41):196–217.
- [5] Malgorzata B, Bolstad A, Gullberg D. Role of integrins in the periodontal ligament: organizers and facilitators. *Periodontology* 2000. 2013; (63): 29–47.
- [6] Montoya G. La proteína recombinante de adhesión del cemento radicular (hrCAP) induce la diferenciación de células troncales derivadas del ligamento periodontal humano y regula el proceso de mineralización. [Tesis de maestría]. México: UNAM; 2011. 59 p.
- [7] Schroeder H, Listgarten M. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontology* 2000. 1997; (13): 91-120.
- [8] Arzate H, Zeichner-David M, Mercado G. Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. *Periodontology* 2000. 2015; (67): 211–233.
- [9] Arroyo ST. Determinación del papel individual y/o sinérgico de CEMP1 y CAP en el proceso de mineralización in vitro utilizando ARN de interferencia. [Tesis de maestría]. México: UNAM; 2013. 60 p.
- [10] Hassell T. Tissues and cells of the periodontium. (1993). *Periodontology* 2000. 1993; 3(1): 9–38.
- [11] Furtado P. Dental cementum reviewed: development, structure, composition, regeneration and potential functions. *Braz J Oral Sci*. 2005; (4): 1-12.
- [12] Villareal E, Moreno A, Arzate H. Characterization of recombinant human cementum protein 1 (hrCEMP1): Primary role in biomineralization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009; (384): 49–54.
- [13] Bosshardt D, Selvig, K. A. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontology* 2000. 1997; 13(1): 41–75.
- [14] Nudelman F, LauschNico A, Sommerdijk E, Sone D. In vitro models of collagen biomineralization. *Journal of Structural Biology*. 2013; Vol (183) : 258-269.
- [15] Tsuneyuki Y, Tomoka H, Tomomaya Y. Histology of human cementum: Its structure, function, and development. *Japanese Dental Science Review*. 2016; 52: 63-74.
- [16] Ganss B, Kim R. H, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999; 10 (81): 79-98.

- [17] Hunter G.K. Role of osteopontin in modulation of hydroxyapatite formation. *Calcif Tissue Int.* 2013; 93: 348–354
- [18] Bermúdez M, Arzate H, Mercado G. CEMP1 Induces Transformation in Human Gingival Fibroblasts. *PLOS ONE.* 2015; 26: 1-20.
- [19] Serrano J, Romo E, Arzate H. Bone Regeneration in Rat Cranium Critical-Size Defects Induced by Cementum Protein 1 (CEMP1). *PLOS ONE.* 2013; 8 (11): 1-10.
- [20] Montoya, G, Correa, R., Arenas, J., Hoz, L., Romo, E., Arroyo, R., Arzate, H. Cementum protein 1-derived peptide (CEMP 1-p1) modulates hydroxyapatite crystal formation *in vitro*. *J Pep Sci.* 2019; Vol. 32: 1-11.
- [21] Arroyo, R.; López, S.; Romo, E.; Montoya, G.; Hoz, L.; Pedraza, C.; Garfias, Y.; Arzate, H. Carboxy-Terminal Cementum Protein 1-Derived Peptide 4 (cemp1-p4) Promotes Mineralization through wnt/ β -catenin Signaling in Human Oral Mucosa Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol 21: 1-21.
- [22] Montoya G, Arenas J.A, Arzate H. Human recombinant cementum attachment protein (hrPTPLa/CAP) promotes hydroxyapatite crystal formation *in vitro* and bone healing *in vivo*. *Bone.* 2014; 69: 154-164.
- [23] Valdez de Hoyos A, Hoz-Rodriguez L, Arzate H. Isolation of Protein-Tyrosine Phosphatase-like Member-a Variant from Cementum. *J Dent Res.* 2012; 91(2): 203-209.
- [24] Cortez S. Péptido derivado de CAP para el tratamiento de la osteoporosis en un modelo animal. [Tesis de maestría]. México: UNAM; 2016. 89 p.
- [25] Salgado F. Inducción de la regeneración ósea en defectos óseos severos por el efecto del péptido novel derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (ptpla/cap). [Tesis de maestría]. México: UNAM; 2014. 147 p.
- [26] Newman Michael G. Carranza's Clinical Periodontology. 12 edición. EUA: ELSEVIER; 2014.
- [27] J Lindhe, T Karting, N Lang. Periodontología Clínica e Implantológica. 6ta edición. Argentina: Editorial Panamericana; 2017.
- [28] Schroeder M. Listgarten A. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontology 2000.* 1997; 13: 91-107.
- [29] Moon-il C, Garant P. Development and general structure of the periodontium. *Periodontology 2000.* 2000; 24: 9-27.
- [30] Bonucci E. Bone mineralization. *Frontiers in Bioscience.* 2012; 17: 100-128.
- [31] Golub E. Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1790 (12): 1592–1598.
- [32] Hunter G.K. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem. J.* 1996; 317: 59-64.
- [33] Kawasaki K, Buchanan A, Weiss K.M. Biomineralization in Humans: Making the Hard Choices in Life. *Annual Review of Genetics.* 2009; 43(1): 119–142.
- [34] Weiner S. Biomineralization: A structural perspective. *Journal of Structural Biology.* 2008; 163(3): 229–234.
- [35] Wang L, Nancollas G.H. Pathways to biomineralization and biodemineralization of calcium phosphates: the thermodynamic and kinetic controls. *Dalton Transactions.* 2009; 15: 26-65.

- [36] Veis A, Dorvee J.R. Biomineralization Mechanisms: A new paradigm for cristal nucleation in organic matrices. *Calcif Tissue Int.* 2013; Vol 93: 307–315.
- [37] Anderson C, Garimella R, Tague S. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front Biosci.* 2005; Vol 1(10): 822-37.
- [38] Blondelle J, Ohno Y, Gatche V. HACD1: A regulator of membrane composition and fluidity, promotes myoblast fusi3n and skeletal muscle growth. *Journal of molecular cell biology.* 2015; 7 (5): 429-440.
- [39] Uwanogho DA, Hardcastle Z, Balogh P. Molecular cloning, chromosomal mapping and developmental expression of a novel protein tyrosine phosphatase- like gene. *Genomics.* 1999; 62 (3): 406-416.
- [40] Khorasani A, Goldberg M, Doeven H, Littlefair G. Titanium in Biomedical Applications - Properties and Fabrication: a Review. *J. Biomater. Tissue Eng.* 2015; Vol. 5 (8): 593-619
- [41] Mobarakeh L, Kolahreez D, Ramakrishna S, Williams D. Key Terminology in biomaterial and biocompatibility. *Current opini3n in biomedical engineering.* 2019; Vol (10): 45-50.
- [42] Bauer S, Schmuki P, Von Der Mark K, Park J. Engineering biocompatible implant surfaces. Part 1: Materials and surfaces. *Progress in Materials Science.* 2013; Vol (58): 261-326.
- [43] Su P.E, Justin D.F, Pratt C.R, Sarin V.K. Effects of titanium nanotubes on the osseointegration, cell differentiation, mineralisation and antibacterial properties on orthopaedic implant surfaces. *Bone Joint J.*2018; Vol.100(1):9-16.
- [44] Long M, Rack HJ. Titanium alloys in total joint replacement-a materials science prospective. *Biomaterials.* 1998; Vol. (19): 1621-1639.
- [45] Annunciata M, Guida L. The effect of titanium Surface modifications on dental implant osseointegration. *Front Oral Biol.*2015; Vol (17):62-77.
- [46] Kulkarni M, Mazare A, Gongadze E. Titanium nanostructures for biomedical applications. *Nanotechnology.*2015; Vol (26): 1-18.
- [47] Rucha S, Penmetsa D, Thomas R, Mehta D. Titanium corrosi3n: Implications for dental implants. *European Journal of Prosthodontics and Restorative Dentistry.* 2016; Vol (24): 171-180.
- [48] Kaur M, Singh K. Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications. *Materials Science & Engineering C.* 2019; Vol (102): 844-862.
- [49] Abdel M,Niinomi M. Biocompatibility of Ti-alloys for long term implantation. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials.* 2013; Vol. (20): 407-415.
- [50] Barfeie A, Wilson J, Rees J. Implant Surface characteristics and their effect on osseointegration. *British Dental Journal.* 2015; Vol (9);1-9.
- [51] Di-Mo S, Ching W.Y. Electronic and optical properties of three pahses of titanium dioxide: Rutile, Anatase and Brookite. *Physical Review B.* 1995; Vol 51 (19): 51-70.
- [52] Mohamad M, Ul Haq B, Ahmed R, Shaari A, Ali N. A density functional study of structural,electronic and optical properties of titanium dioxide: Characterization of rutile, anatase and brookite polymorphs. *Materials Science in Semiconductor Processing.*2015; Vol. (31):405–414.

- [53] Damodaran V, Bhatnagar D, Leszczak V, Popat K. Titania nanostructures: a biomedical perspective. *RSC Adv.* 2015; Vol (5): 37149-37171.
- [54] Hannaor D, Sorrell C. Review of the anatase to rutile phase transformation. *J Mater Sci.* 2011; Vol. (46): 855-874.
- [55] Koizumi H, Takeuchi Y, Imai H, Kawai T. Application of titanium and titanium alloys to fixed dental prostheses. *Journal of prosthodontics research.* 2019; Vol (63): 266-270.
- [56] Fonseca A. (2017) Modificaciones inducidas en superficies de titanio y óxido de titanio por la inmersión en soluciones ricas en peróxido de hidrógeno. Tesis de doctorado. UNAM
- [57] Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001; Vol (10): 96-101
- [58] A.F. Mavrogenis, R. Dimitriou, J. Parvizi, G.C. Babis. Biology of implant osseointegration. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2009; Vol. 9(2):61-71.
- [59] J.W Yee Lee, M. Lal Bance. Physiology of osseointegration. *Otolaryngol Clin N Am.* 2019; Vol (52): 231–242.
- [60] Ehrenfest D, Coelho P.G, Kang B, Sul Y-T, Albrektsson T. Classification of osseointegrated implant surfaces: Materials, chemistry and topography. *Trends in Biotechnology.* 2010; Vol.28 No.4: 198-206.
- [61] Smeets R, Stadlinger B, Schwarz K, Broichsitter B, Jung O, Precht C, Kloss F, Gröbe A, Heiland M, Ebker T. Impact of dental implant surface modifications on osseointegration. *BioMed Research International.* 2016/.
- [62] Rupp F, Liang L, Geis-Gerstorfer J, Scheideler L, Hüttig F. Surface characteristics of dental implants: A review. *Dental Materials.* 2018; Vol (34): 40-57
- [63] Trino L, George A. "Titanium surface bio-functionalization -/using osteogenic peptides: Surface chemistry, biocompatibility, corrosion and tribocorrosion aspects". *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials.* 2018; Vol (81): 26–38.
- [64] Gittens RA, Olivares-Navarrete R, Schwartz Zvi, Boyan B. Implant osseointegration and the role of microroughness and nanostructures: Lessons for spine implants. *Acta Biomaterialia.* 2014; Vol (10): 3363-3371.
- [65] Von Wilmsowky C, Moest T, Nkenke E, Stelzle F, Schlegel KA. Implants in bone: Part I. A current overview about tissue response, Surface modifications and future perspectives. *Oral Maxillofac Surg.* 2014, Vol (18): 243-257.
- [66] Ogle O. Implant Surface material, design and osseointegration. *Dent Clin N Am.* 2015. 1-16
- [67] Graziani G, Bianchi M, Sassoni E, Russo A, Marcacci M. Ion-substituted coatings deposited by plasma-assisted techniques: A review. *Materials Science & Engineering C.* 2016; Vol (74): 219-229.
- [68] Supová M. Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review. *Ceramics International.* 2015; Vol (41): 9203-9231.
- [69] Mróz W, Bombalska A, Burdynska S. Structural studies of magnesium doped hydroxyapatite coatings after osteoblast culture. 2010; Vol (977): 145-152

- [70] Boanini E, Gazzano M, Bigi A. Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperatura. *Acta Biomaterialia*. 2010; Vol (6): 1882-1894.
- [71] Silva-Bermudez P, Muhl S, Rodil S.E. A comparative study of fibrinogen adsorption onto metal oxide thin films. *Applied Surface Science*. 2013; Vol (282): 351-362.
- [72] Silva-Bermudez P, Rodil S.E. An overview of protein adsorption on metal oxide coatings for biomedical implants. *Surface & Coatings Technology*. 2013; Vol (233): 147-158.
- [73] YazdanYar A, Aschauer U, Bowen P. Interaction of biologically relevant ions and organic molecules with titanium oxide (Rutile) surfaces: A review on molecular dynamics studies. *Colloids and surfaces B. Biointerfaces*. 2018; Vol (161): 563-577.
- [74] Kulkurani M, Patil-Sen Y, Junjkar I, Kulkurani C, Lorenzetti M, Iglıc A. Wettability studies of topologically distinct titanium surfaces. *Colloids and surfaces B: Biointerferences*. 2015; Vol (129): 47-53.
- [75] Li-Chong X, Siedlecki C. Effects on Surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials*. 2007; Vol 28 (22): 3273-3283.
- [76] Sultan A, Hughes Z, Walsh T. Binding affinities of amino acid analogues at the charged aqueous Titania interface: Implications for Titania-binding peptides. *American chemical society*. 2014; Vol (30): 13321-13329.
- [77] Hari Singh Nalwa. *Handbook of thin films*. 2002.
- [78] Huettner N, Dargaville T, Forget A. Discovering cell-adhesion peptides in tissue engineering: Beyond RGD. *Trends in biotechnology*. 2018; Vol (36): 372-383
- [79] Bell B.F. Osteoblast response to titanium surfaces functionalized with extracellular matrix peptide biomimetics. 2011. *Clin Oral Implants Res*; Vol 22 (8): 865-872.
- [80] Hadman F, Bigdeli Z, Asghari M, Sadremomtaz A, Balaile S. Synthesis of modified RGD-based peptides and their in vitro activity. 2019. *Chem Med Chem*; Vol (14): 282-288.
- [81] Patel R, Santhosh M, Dash J, Karpoormath R, Jha J, Kwak J, Patel M, Kim J. Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV) peptide for neuronal tissue engineering. 2018. *Polymers advanced technologies*; Vol (30): 4-12.
- [82] Yanyan Y, Lei G, Wei W, Jina W, Zhi Y. Dual-peptide-modified alginate hydrogels for the promotion of angiogenesis. *Sci China Chem*. 2015; Vol. 58 (12): 1866–1874.
- [83] Reyes C, Petrie T, Burns K, Schwartz Z, Garcia A. Biomolecular Surface coating to enhance orthopedic tissue healing and integration. *Biomaterials*. 2007; Vol 28 (21): 3228-3235.
- [84] Kelly P.J. Magnetron sputtering :a review of recents developments and aplicaciones. *Vaccum*. 2000; Vol 56 (3): 159-172.
- [85] Feng S. *Introductory Chapter: Basic Theory of Magnetron Sputtering*. 2018.
- [86] Millán B. (2019) *Evaluación electroquímica de películas de TiO₂ depositadas sobre aleaciones de magnesio*. Tesis de maestría. UNAM.
- [87] Barrera C. (2017) *Influencia de las propiedades físicas y químicas superficiales de 3 tipos de biomateriales en el potencial de diferenciación celular in vitro*. Tesis de doctorado. UNAM
- [88] Enrique A López. *El microscopio de fuerza atómica: métodos y aplicaciones*. *Revista de la Universidad del Valle de Guatemala*. 2014; Vol .28: 14-28.

- [89] Hua-Ju S, Po-Jen S. Tip Effect of the Tapping Mode of Atomic Force Microscope in Viscous Fluid Environments. *Sensors (Basel)*. 2015; 15(8): 18381–18401.
- [90] Monyota G. (2015) Estudio de cristales inducidos con el péptido de la proteína de adhesión del cemento radicular (cap) en un sistema libre de células. Tesis de Doctorado. UNAM.
- [91] Yaxin S, Bharat B. Atomic force microscopy dynamic modes: modeling and applications. *J. Phys. Condens. Matter* 2008; Vol. 20: 29 pp.
- [92] Payton O, Champneys A. R. Feedback-induced instability in tapping mode atomic force microscopy: theory and experiment. *Proc. R. Soc. A*. 2011; Vol 467: 1801–1822.
- [93] Dziyana H, Dennis W, Eriks R. Synthesis and properties of peptide nucleic acid labeled at the N-terminus with HiLyte Fluor 488 fluorescent dye. *Bioorg. Med. Chem*. 2016
- [94] Frank Rupp, Rolando A. Gittens. A Review on the Wettability of Dental Implant Surfaces: Theoretical and Experimental Aspects. *Acta Biomater*. 2014; Vol 10 (7): 2894–2906.
- [95] D. Y. Kwok, T. Gietzelt, K. Grundke, H.-J. Jacobasch, and A. W. Neumann. Contact angle measurement and contact angle interpretation. *Langmuir*. 1997; Vol. 13: 2880-2894.
- [96] M Qiang, Chang Chang. Diagnostic applications of Raman spectroscopy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2012; Vol. 8: 545–558.
- [97] Gaintantzopolou M, Spiros Z, Silikas N. Micro-Raman spectroscopy analysis of TiO₂ phases on the root surfaces of commercial dental implants. *Dental Materials*. 2014; Vol. 30: 861-867.
- [98] Ruchita S, Agrawal Y. Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. *Vibrational Spectroscopy*. 2011; Vol. 57: 163–176.
- [99] Jennifer D. Schuttlefield. ATR–FTIR Spectroscopy in the Undergraduate Chemistry Laboratory Part I: Fundamentals and Examples. *Journal of chemical education*. 2008; Vol. 85 (2): 279-281.
- [100] Castro del Prado C. Determination of the cytotoxic effects of extracts, fractions, or substances, by means of the mtt test. *Protocolo*.
- [101] Ian A. Cree. *Cancer Cell Culture Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. Second Edition. 2011.
- [102] Jana Sevcikova, Monika Pavkova, Goldbergova. Biocompatibility of NiTi alloys in the cell behaviour. *Biometals*. 2017; Vol. 30: 163–169.
- [103] James E. N. Jonkman. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adhesion & Migration*. 2014; Vol. 8 (5): 440--451.
- [104] Ayman Grada. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *Journal of Investigative Dermatology*. 2017. Vol. 137: 11-16.
- [105] Chi-Lung Lee A, Louise Harris J, Kum Kum K, Ji-Hong H. A Comprehensive Review on Current Advances in Peptide Drug Development and Design. *Int. J. Mol. Sci*. 2019; Vol. 20: 1-21.
- [106] Feng Q, Yongzhu C, Chengkang T, Xiaojun Z. Amphiphilic peptides as novel nanomaterials: design, self-assembly and application. *International Journal of Nanomedicine* 2018;13 5003–5022
- [107] Stewart C, Akhavana B, Wisec S, Bilek M. A review of biomimetic surface functionalization for bone-integrating orthopedic implants: Mechanisms, current approaches, and future directions. *Progress in Materials Science*. 2019; Vol. 106: 1-40.

- [108] Rodríguez-Lugo V, Karthik TVK, Mendoza-Anaya D, Rubio-Rosas E, Villaseñor LS, Reyes-Valderrama MI, Salinas-Rodríguez E. Wet chemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite flakes: effect of pH and sintering temperature on structural and morphological properties. *R. Soc. open sci.* 2018; Vol 5: 1-14.
- [109] Pradnya N. Chavan, Manjushri M. Bahir, Ravindra U. Mene, Megha P. Mahabole, Rajendra S. Khairnar. Study of nanobiomaterial hydroxyapatite in simulated body fluid: Formation and growth of apatite. *Materials Science and Engineering B* 168 (2010) 224–230
- [110] Timchenko P.E, Timchenko E.V, Pisareva E.V, Vlasov M, Volova L.T, Frolov O, Kalimullina A.R. Experimental studies of hydroxyapatite by Raman spectroscopy. *Journal of Optical Technology.* 2018; Vol. 85 (3): 130-136.
- [111] Bannerman A, Williams L.R, Cox S.C, Grover L.M. Visualising phase change in a brushite-based calcium phosphate ceramic. *Scientific Reports.* 2016; Vol 6 (32671): 1-10.
- [112] De Mul F.F.M, Hottenhuis M.H.J., Bouter P, Greve J, Arends J, Ten Bosch J.J. Micro-Raman Line Broadening in Synthetic Carbonated Hydroxyapatite. 1986. *J DENT RES*; Vol 65: 437-440.
- [113] Maxa J.J, Chapadosb C. IR spectroscopy of aqueous alkali halide solutions: Pure salt-solvated water spectra and hydration numbers. *Journal of Chemical Physics.* 2001; Vol 115 (6): 2664-2675.
- [114] Walters M. A., Lang Y. C., Blumenthal N. C., LeGeros R. Z., Konsker IL A. A Raman and Infrared Spectroscopic Investigation of Biological Hydroxyapatite. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 1990; Vol 39: 193-200.
- [115] Aufort J, Ségalen L, Gervais G, Brouder C, Balan E. Modeling the attenuated total reflectance infrared (ATR-FTIR) spectrum of apatite. *Phys Chem Minerals.* 2016. 1-12.
- [116] Karampasa I.A, Kontoyannis C.G. Characterization of calcium phosphates mixtures. *Vibrational Spectroscopy.* 2013; 64: 126– 133.
- [117] Koutsopoulos S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. *Wiley Periodicals.* 2002. 600-612.
- [118] Beasley M.M, Bartelink E.J, Taylor L, Miller R.M. *Journal of Archaeological Science.* 2014; 46: 16-22.
- [119] Sroka-Bartnicka A, Borkowski L, Ginalska G, Ślósarczyk A, Kazarian S.G. Structural transformation of synthetic hydroxyapatite under simulated in vivo conditions studied with ATR-FTIR spectroscopic imaging. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 2017; 171: 155–161.
- [120] Brundavanam R.K, Jai Poinern G.E, Fawcett D. Modelling the Crystal Structure of a 30 nm Sized Particle based Hydroxyapatite Powder Synthesised under the Influence of Ultrasound Irradiation from X-ray powder Diffraction Data. *American Journal of Materials Science.* 2013; 3(4): 84-90.
- [121] Ślósarczyk A, Paszkiewicz Z, Paluszkiwicz C. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods. *Journal of Molecular Structure.* 2005; 744–747: 657–661.
- [122] Lin Lv, Kai Li, Youtao Xie, Yunzhen Cao, Xuebin Zheng. Enhanced osteogenic activity of anatase TiO₂ film: Surface hydroxyl groups induce conformational changes in fibronectin. *Materials Science and Engineering C.* 2017; Vol 78: 96–104.
- [123] Ping-An F, Margolis H, Conway J.F, Simmer J.P, Beniash E. CryoTEM Study of Effects of Phosphorylation on The Hierarchical Assembly of Porcine Amelogenin and Its Regulation of Mineralization in vitro. *J Struct Biol.* 2013 August; 183(2): 250–257

- [124] Langel W, Menken L. Simulation of the interface between titanium oxide and amino acids in solution by first principles MD. *Surface Science*. 2003; Vol 538: 1–9.
- [125] Köppen S, Langel W. Simulation of the interface of (100) rutile with aqueous ionic solution. *Surface Science*. 2006; Vol. 600: 2040–2050.
- [126] Predota M, Zhang Z, Fenter P, Wesolowski D. J, Cummings P. T. Electric Double Layer at the Rutile (110) Surface. 2. Adsorption of Ions from Molecular Dynamics and X-ray Experiments. *J. Phys. Chem. B* 2004; Vol 108: 12061-12072.
- [127] Mustafa K, Wennerberg A, Wroblewski J, Arvidson K. Determining optimal Surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clin. Oral Impl. Res.* 12, 2001; 515–525
- [128] Chengxin Zhou, Fengyang Lei, James Chodosh, Eleftherios I. Paschalis. The Role of Titanium Surface Microtopography on Adhesion, Proliferation, Transformation, and Matrix Deposition of Corneal Cells. *Investigative Ophthalmology & visual science*. 2016; Vol 57 (4): 1927-1938.
- [129] Deshpande A.S, Fang P.A, Simmer J.P, Margolis H.C, Beniash E. Amelogenin-Collagen Interactions Regulate Calcium Phosphate Mineralization in Vitro. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 285, NO. 25, pp. 19277–19287.
- [130] Saito M, Narayanan S. Signaling Reactions Induced in Human Fibroblasts During Adhesion to Cementum-Derived Attachment Protein. *JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH*. 1999; Vol (14) 1: 65-72.