



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**“ESTUDIO *IN VITRO* DE CÉLULAS TRONCALES DE LA MUCOSA ORAL (hOMSC)  
CULTIVADAS SOBRE PELÍCULAS DE ÓXIDO DE TITANIO (TiO<sub>2</sub>)  
BIOFUNCIONALIZADAS CON EL PÉPTIDO CAP-p15”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA

**M. en C. GUADALUPE DEL CARMEN UREIRO CUETO**

**DIRECTOR DE TESIS**

DR. GONZALO MONTOYA AYALA

Facultad de Odontología, UNAM

DRA. SANDRA E. RODIL POSADA

Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM

**COMITÉ TUTOR**

DRA. PHAEDRA SURIEL SILVA BERMÚDEZ

Instituto Nacional de Rehabilitación (INR)

DR. HIGINIO ARZATE

Facultad de Odontología, UNAM



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades y Tecnología (**SECIHTI**) por la beca otorgada (CVU: 917709) con la cual pude realizar mis estudios de doctorado.

A mi tutor, **Dr. Gonzalo Montoya** por su apoyo en la realización de este proyecto.

Gracias a mi tutora, la **Dra. Sandra Rodil** por todo su apoyo y paciencia a lo largo de estos años, por apoyarme a sacar adelante este proyecto, por enseñarme el maravilloso mundo de los materiales y por supuesto, por todos sus consejos que han enriquecido mi vida profesional. Sin duda alguna, usted es mi ejemplo de inspiración para ser una mujer de ciencia.

A la **Dra. Phaedra Silva Bermúdez**, por sus valiosas aportaciones como miembro de mi comité tutor, y por todos sus consejos y sugerencias en mis proyectos desde que estudiaba la maestría y ahora durante mi doctorado.

Al **Dr. Higinio Arzate** por haberme brindado la oportunidad de formarme como maestra y ahora doctora en ciencias dentro del laboratorio de biología periodontal y tejidos mineralizados.

Gracias a los miembros de mi jurado de examen: **Dra. Argelia Almaguer**, **Dr. Luis Felipe Jiménez**, **Dr. Jesús Arenas Alatorre** y el **Dr. José Ocotlán Flores** por sus valiosas aportaciones en la realización de este escrito.

Al programa de apoyo a los estudios de posgrado (**PAEP**) por la beca “*Estancia de investigación de larga duración*” con la cual pude realizar mi estancia de investigación en el Instituto de Biomateriales (Lehrstuhl Biomaterialien) en la Friedrich-Alexander-Universität (FAU), Erlangen-Nürnberg, Alemania.

Gracias **Prof. Aldo Roberto Boccaccini**, por brindarme la oportunidad de formar parte del instituto de biomateriales y poder realizar además de mi estancia de investigación, cumplir un sueño académico que antes de usted veía muy lejano, casi imposible, y que sin duda, marcó un antes y un después en mi vida profesional. Gracias por haberme integrado, por todas las enseñanzas y el apoyo a pesar del corto tiempo, gracias por haber sido mi tutor de estancia, por inspirarme y ser un ejemplo a seguir como investigador.

Agradezco el apoyo técnico de los biólogos **Armando Zepeda** y **Francisco Pasos** del laboratorio de morfología celular y toxicología del departamento de Biología celular y tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM, por su asistencia en el procesamiento de muestras y toma de imágenes SEM.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-PAPIIT-UNAM) con claves IT00123, IN206723, IN213822. Este trabajo es parte de la patente: *Novel biologically active peptide for bone repair and regeneration*; Higinio Arzate. Patente No. 348746, 2017- Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI).

## DEDICATORIAS

**A mi mamá**, por ser el pilar de mi vida, por todo tu amor incondicional, porque a pesar de la distancia, y de no poderte abrazar todos los días, siempre estás en mi mente y corazón, sin ti yo no hubiera alcanzado todo esto. Gracias por motivarme y apoyarme a alcanzar mis sueños, te debo todo lo que soy. Este logro también es tuyo mamá, te amo infinitamente.

A mis hermanos: **Raúl, Juan Manuel, Carlos Adrián y José**, por todo su apoyo y cariño a lo largo de mi vida. Les debo mucho de lo que soy. Los amo mucho

A mi gatita **Piya**, quien llegó a mi vida envuelta en un trapito, por estar conmigo y darme tranquilidad cuando más la necesité, por estar a mi lado cuando empecé a escribir las primeras líneas de esta tesis en tiempos de pandemia, gracias por ser mi gatita de apoyo, gracias por rescatarme.

A **Lore & Ezequiel**, por enseñarme el sentido de la amistad. Por estar siempre unidos en las buenas y en las malas. La maestría y el doctorado no hubieran sido lo mismo sin ustedes. Nunca olvidaré los cafés, las comidas que compartimos mientras las risas no faltaban, por hacerme sentir que no estoy sola en esta ciudad. Por apoyarme en los momentos más complicados de este largo camino. Los aprecio mucho

A **Marisol y Nicté** por su valiosa amistad en este largo camino llamado posgrado y por todos los momentos que compartimos dentro y fuera del aula.

**Marisela**, gracias por haberme brindado tu amistad, por esas tardes de comida donde las risas y el conocimiento nunca faltaron y por hacer amena mi estancia en el laboratorio.

An meine Freunde, die ich während meines Forschungsaufenthaltes in Deutschland kennengelernt habe: **Michael, Sophie, Laurenz und Lukas**. Danke für eure Unterstützung und dafür, dass ihr mich mit eurem wundervollen Land vertraut gemacht, mir eure Kultur gezeigt und mir meine ersten Worte auf Deutsch beigebracht habt. Dankeschön!

Last but not least: **James S.M. Anderson**, my sunshine. Thank you for supporting me in every step I made during my PhD, for helping me in difficult moments, for drying my tears on bad days and doing everything to see me happy and smiling again, thank you for motivating me in all my plans, and for help me every day to be a better person. I love you infinitely.

*“Be a goldfish”*

**Ted Lasso**

# CONTENIDO

<b>I. RESUMEN</b> .....	3
<b>II.ABSTRACT</b> .....	4
<b>II.INTRODUCCIÓN</b> .....	5
¿Qué es un implante?.....	7
Los metales como materiales de elección en la fabricación de implantes ortopédicos y dentales.....	8
Acero inoxidable.....	9
Aleaciones a base de cobalto-cromo (Co-Cr) .....	10
Titanio (Ti) .....	11
Oseointegración .....	13
Modificación de superficies.....	15
Adición de recubrimientos .....	15
Biofuncionalización con moléculas orgánicas.....	16
Adsorción física (fisorción) .....	17
Unión covalente .....	17
Polarización anódica.....	17
Capa por capa.....	18
Cemento radicular.....	21
HACD1/CAP.....	22
CAP-p15.....	25
<b>IV.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN</b> .....	26
<b>V.OBJETIVOS</b> .....	27
General.....	27
Específicos.....	27
<b>VI.HIPÓTESIS</b> .....	27

<b>VII.METODOLOGÍA</b> .....	28
Síntesis de CAP-p15.....	28
Síntesis de las películas delgadas de TiO <sub>2</sub> .....	28
Biofuncionalización de las películas de TiO <sub>2</sub> .....	28
Generación de cultivo de células troncales de la mucosa oral.....	29
Ensayo de adhesión celular.....	29
Ensayo de proliferación celular .....	30
Evaluación de la formación de nódulos de calcio a partir de la tinción alizarina roja .....	31
Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) .....	31
RT-qPCR.....	32
Western Blot.....	32
Análisis estadístico .....	33
<b>VIII.RESULTADOS</b> .....	36
Síntesis de películas delgadas de TiO <sub>2</sub> .....	34
Adhesión celular.....	35
Proliferación celular .....	36
Identificación de nódulos de calcio a partir de la tinción alizarina roja .....	37
Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) .....	38
RT-qPCR.....	39
Western Blot.....	40
<b>IX.DISCUSIÓN</b> .....	41
<b>X.CONCLUSIONES</b> .....	47
<b>XI.PRODUCTOS ACADÉMICOS</b> .....	49
<b>XII.REFERENCIAS</b> .....	51

## I. RESUMEN

En implantología, los metales son los materiales más empleados para el desarrollo de dispositivos dentales u ortopédicos debido su alta resistencia mecánica, aceptable nivel de deformación elástica, durabilidad, buena resistencia térmica, ductilidad y compatibilidad química-biológica. Entre ellos destaca el titanio (Ti), siendo el más utilizado para estos fines, cuya biocompatibilidad se encuentra estrechamente relacionada con la formación de una capa de óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ), la cual aumenta su resistencia a la corrosión, y promueve la adsorción de proteínas y la interacción de los osteoblastos. Sin embargo, la estabilidad de los implantes puede verse comprometida por una serie de eventos multifactoriales que pueden llegar a comprometer la interacción hueso-implante, siendo una insuficiente osteointegración un factor que condiciona su éxito a largo plazo. Por ello, se han desarrollado diferentes modificaciones superficiales, como recubrimientos de óxido multifuncionales, fosfatos de calcio y la adición de moléculas como péptidos, para mejorar la bioactividad de los implantes. En este trabajo, investigamos el comportamiento de células troncales derivadas de la lámina propia de la mucosa oral (hOMSCs) cultivadas sobre películas de óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ), biofuncionalizadas con un péptido (CAP-p15) derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular en la diferenciación hacia un fenotipo mineralizante. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de adhesión y proliferación celular. Posteriormente, se evaluó la diferenciación de las hOMSCs a partir de la tinción con alizarina roja, se evaluó la actividad enzimática de ALP y a partir de PCR y western blot se estudió la expresión de RUNX2, BSP, BMP-2 y OCN a nivel génico y proteico. Los resultados mostraron que las películas funcionalizadas con CAP-p15 ( $1 \mu\text{g/mL}$ ) mostraron un efecto sinérgico aumentando la adhesión y proliferación celular, la actividad ALP y la expresión de marcadores relacionados con la osteogénesis. Estos datos demuestran que la funcionalización de películas de óxido de titanio con CAP-p15 promueven la diferenciación hacia un fenotipo mineralizante de las hOMSC en comparación con las muestras prístinas. Por lo tanto, CAP-p15 muestra potencial para ser utilizada como molécula terapéutica capaz de inducir la regeneración de tejido mineralizado sobre implantes a base de titanio.

## II. ABSTRACT

In implantology, metals are the most widely used materials for the development of dental or orthopedic devices. This is due to their high mechanical strength, acceptable level of elastic deformation, durability, thermal resistance, ductility and chemical-biological compatibility. Amongst the metals used, titanium (Ti) stands out being the most widely used for these purposes. The biocompatibility of Ti is closely related to the formation of a titanium oxide layer (TiO<sub>2</sub>), which increases its resistance to corrosion, and promotes protein adsorption and osteoblast interaction. However, implant stability can be compromised by a series of multifactorial events affecting bone-implant interaction being insufficient for osseointegration. This can be a factor that inhibits its long-term success. Therefore, different surface modifications have been developed to improve the bioactivity of implants such as multifunctional oxide coatings, calcium phosphates and the addition of molecules such as peptides.

In this work, we investigated the behavior of stem cells derived from the lamina propria of the oral mucosa (hOMSCs) cultured on titanium oxide (TiO<sub>2</sub>) films biofunctionalized with the peptide CAP-p15 derived from the cementum attachment protein (CAP) in the differentiation towards a mineralizing phenotype. For this purpose, cell adhesion and proliferation assays were performed. Subsequently, the differentiation of hOMSCs was evaluated by alizarin red staining, the enzymatic activity of ALP was assessed, and the expression of RUNX2, BSP, BMP-2 and OCN at the gene and protein level was studied by PCR and western blot, respectively.

The results showed that films functionalized with CAP-p15 (1 µg/mL) showed a synergistic effect by increasing cell adhesion and proliferation, ALP activity and in the expression of markers related to osteogenesis. Our data demonstrate that functionalization of titanium oxide films with CAP-p15 promotes a better differentiation towards a mineralizing phenotype of hOMSCs compared to pristine samples. Therefore, CAP-p15 shows potential in being used as a therapeutic molecule capable of inducing the regeneration of mineralized tissue on titanium-based implants.

### III. INTRODUCCIÓN

Uno de los retos en el ámbito biomédico es el desarrollo de implantes que ejerzan un adecuado proceso de osteointegración. Dentro de las características que estos debieran poseer destacan la biocompatibilidad, la resistencia al desgaste, y a la oxidación, e incluso, que sean asequibles a la población. Estas propiedades son cruciales para crear dispositivos que puedan interactuar eficazmente con los tejidos, mejorando así la regeneración y la calidad de vida de los pacientes.

Entre los materiales comúnmente utilizados en el desarrollo de implantes dentales u ortopédicos, se encuentran los metales. Se estima que aproximadamente el 70% de los implantes y dispositivos médicos producidos a nivel mundial son a base de metales (1,2), esto debido a su alta resistencia mecánica, aceptable nivel de deformación elástica, durabilidad, buena resistencia térmica, ductilidad y compatibilidad química-biológica.

En este sentido, el Titanio (Ti) y sus aleaciones, conocidos por su biocompatibilidad y su resistencia a la corrosión, son los más utilizados en implantología. Su biocompatibilidad se encuentra estrechamente relacionada con la formación de una capa de óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) (3), además, posee un módulo de Young relativamente bajo (~105-110 GPa), lo que lo hace más adecuado para la sustitución ósea en comparación con otros metales.

Sin embargo, su estabilidad y sobrevida pueden verse comprometidas por una serie de eventos multifactoriales entre los que destacan las infecciones, sobrecarga, traumatismo quirúrgico y corrosión que pueden llegar a comprometer su estabilidad a largo plazo, afectando la interacción hueso-implante (4).

Se sabe que la respuesta biológica entre huésped y el biomaterial se encuentra estrechamente relacionada con las características que este último posea en la superficie; en este sentido, la composición química, topografía y la humectabilidad pueden tener un papel sinérgico en los procesos de adhesión y proliferación celular, modulando el proceso de osteointegración (5).

La funcionalización de superficies a través de distintos métodos (físicos, químicos o mecánicos) surge como una estrategia que busca optimizar las propiedades superficiales sin alterar las propiedades mecánicas del implante. Entre los métodos más comunes e incluso llevado a la práctica clínica, tenemos los cambios en la rugosidad, a partir de técnicas como el grabado ácido o el arenado, los cuales que permiten crear una superficie idónea para la adhesión celular y dirigir el proceso de osteointegración (6,7).

Por otro lado, el empleo de recubrimientos surge como una estrategia que permite reducir la tasa de corrosión de los implantes metálicos y que a su vez permitan la regeneración de tejido óseo. En este sentido, la síntesis de capas de óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) resultan ser uno de los recubrimientos más estudiados, demostrándose que su incorporación aumenta la resistencia a la corrosión de los implantes metálicos, retardando la degradación del metal, promueve la adsorción de proteínas y la interacción de los osteoblastos, mejorando la bioactividad general y el rendimiento del implante. Además, se ha demostrado que los recubrimientos a base de  $\text{TiO}_2$ , favorecen la diferenciación de células troncales mesenquimales hacia un fenotipo mineralizante y reduce la adhesión de bacterias a diferencia de fases cristalinas (8,9).

Recientemente, el empleo de moléculas orgánicas como proteínas o péptidos como sistemas de funcionalización de superficies en implantes, resultan ser una estrategia novedosa que permite mejorar los procesos de migración, adhesión, proliferación y diferenciación celular (10–17). Aunque se ha visto que las proteínas mejoran la osteointegración y ofrecen versatilidad debido a su gran afinidad por receptores específicos y a la abundancia de sitios de unión, su uso sigue presentando limitaciones (15). Las proteínas naturales son difíciles de aislar o producir, y su inmovilización en diferentes biomateriales podría alterar su conformación, desencadenando el riesgo de reacciones inmunes no deseadas. El uso de pequeñas secuencias peptídicas es una alternativa prometedora ya que los péptidos son químicamente más estables a variaciones de las condiciones ambientales (pH y temperatura) (15), y se pueden obtener grandes rendimientos en comparación con las proteínas, lo que reduce considerablemente los costos.

En un trabajo previo, demostramos que la funcionalización de superficies de  $\text{TiO}_2$  con un péptido sintético (CAP-p15) derivado de la proteína de adhesión al cemento radicular (HACD1/CAP) promovió la formación de cristales de hidroxiapatita carbonatada a partir de su incubación en una solución de saliva artificial, además de mejorar la adhesión, proliferación y migración celular de las células del ligamento periodontal humano *in vitro* (18).

Teniendo en cuenta estos prometedores resultados, nos formulamos la siguiente pregunta de investigación: ***¿Es posible promover un mejor estadio de diferenciación osteogénica en películas de  $\text{TiO}_2$  funcionalizadas con CAP-p15?***

El presente estudio se centra en evaluar la capacidad de las superficies de TiO<sub>2</sub> biofuncionalizadas con CAP-p15 para inducir la diferenciación osteogénica de células troncales derivadas de la lámina propia (hOMSC). Mediante este trabajo, se busca estudiar si CAP-p15 puede inducir eficazmente la diferenciación de las células troncales hacia el fenotipo osteoblástico, contribuyendo así a la comprensión de las posibles aplicaciones de este péptido para mejorar la osteointegración de los implantes.

## **¿Qué es un implante?**

De manera general, los implantes son dispositivos destinados a brindar soporte o como estructuras de reemplazo de un tejido dañado. Su diseño y desarrollo se encuentran en función al papel que van a desempeñar en el tratamiento, ya que pueden ser empleados para brindar apoyo a órganos o tejidos, como es el caso de las placas/tornillos ortopédicos, o bien, actuar en la administración de fármacos controlados o como andamios para la regeneración tisular.

Dentro de este campo, la colocación de implantes dentales es probablemente la práctica biomédica más común de la historia. Desde la antigüedad, las civilizaciones realizaban procedimientos dentales con los cuales reemplazaban piezas dañadas o ausentes. Los primeros registros datan de hace más de 4,000 años, cuando la población asentada en lo que actualmente es China, tallaban trozos de bambú para reemplazar dientes. Otras culturas como la egipcia o fenicia (2500 a.C) utilizaban ligaduras de oro como sistemas de fijación para estabilizar las piezas dentales o dientes artificiales esculpidos a base de marfil o gemas preciosas como el jade (19).

Sin embargo, al no ser materiales biocompatibles es muy probable que los tratamientos tuvieran una baja tasa de éxito, aunado a que materiales como el oro, marfil o el jade eran considerados recursos costosos, por lo que su uso se limitaba a las clases altas, además, su uso tenía un enfoque más estético que funcional.

El primer vestigio de un implante del que se tiene registro proviene de la cultura Maya (600 d.C), en donde a partir del descubrimiento de una mandíbula se encontraron tres implantes esculpidos a base de conchas de mar para restaurar tres incisivos. Al realizarse estudios radiográficos se descubrió que existía la formación de tejido óseo alrededor de conchas marinas insertadas, sugiriendo una interacción positiva entre este material y el tejido circundante, a diferencia de otros materiales empleados (20).

Fue hasta el siglo XVIII con la llegada de la revolución industrial y el auge en la industria de los metales, que estos empezaron a ser considerados como material para la fabricación de implantes destinados en el tratamiento de fracturas. Siendo el oro, cobre y platino algunos metales utilizados en el área odontológica con fines protésicos (19).

## Los metales como materiales de elección en la fabricación de implantes ortopédicos y dentales

En implantología, los implantes convencionales son típicamente materiales bioinertes no biodegradables como los metales. Estos son el material biomédico de elección debido a que poseen numerosas ventajas sobre otros materiales, como su alta resistencia mecánica, un aceptable nivel de deformación elástica, durabilidad, buena resistencia térmica, ductilidad y compatibilidad química-biológica (Tabla 1).

	<b>Acero inoxidable (316 y 316L)</b>	<b>Aleaciones Co-Cr</b>	<b>Ti/aleaciones de Ti</b>
<b>Uso</b>	<i>Implantes de cadera, clavos y placas usados de manera temporal (meses a un par de años)</i>	<i>Implantes de cadera, rótula, articulaciones, principalmente en zonas de contacto metal-metal</i>	<i>Implantes ortopédicos (cadera, articulaciones, placas de osteosíntesis) e implantes dentales</i>
<b>Ventajas</b>	<i>Bajo costo, biocompatible</i>	<i>Excelente resistencia a la corrosión y al desgaste</i>	<i>Excelente biocompatibilidad, permite la aposición de hueso (oseointegración), bajo modulo elástico,</i>
<b>Desventajas</b>	<i>Pobre resistencia a la corrosión, al ser temporales se requiere segunda intervención quirúrgica, la presencia de níquel (Ni) llega a desencadenar alergias.</i>	<i>Escasa oseointegración, un elevado modulo elástico en comparación con el hueso cortical.</i>	<i>Puro, tiene escasa resistencia, para subsanar esto se crean las aleaciones, la más común Ti-6Al-4V, sin embargo, estos elementos pueden llegar a desencadenar desordenes neurológicos y citotoxicidad.</i>
<b>Módulo de Young (Gpa)</b>	180-200	200-253	105 ( $\alpha$ ), 110 ( $\alpha+\beta$ )
<b>Fuerza tensil (Mpa)</b>	861	665-1793	690-1100

*Tabla 1. Propiedades de los tres metales más empleados en área biomédica (2,21,22)*

Los metales más empleados con estos fines son el acero inoxidable (316 y 316L), las aleaciones a base de cobalto-cromo (Co-Cr), y el titanio (Ti) y sus aleaciones (23,24) (Figura 1). Cada uno posee características diferentes y por tanto su uso es variado, las cuales describiremos a continuación:

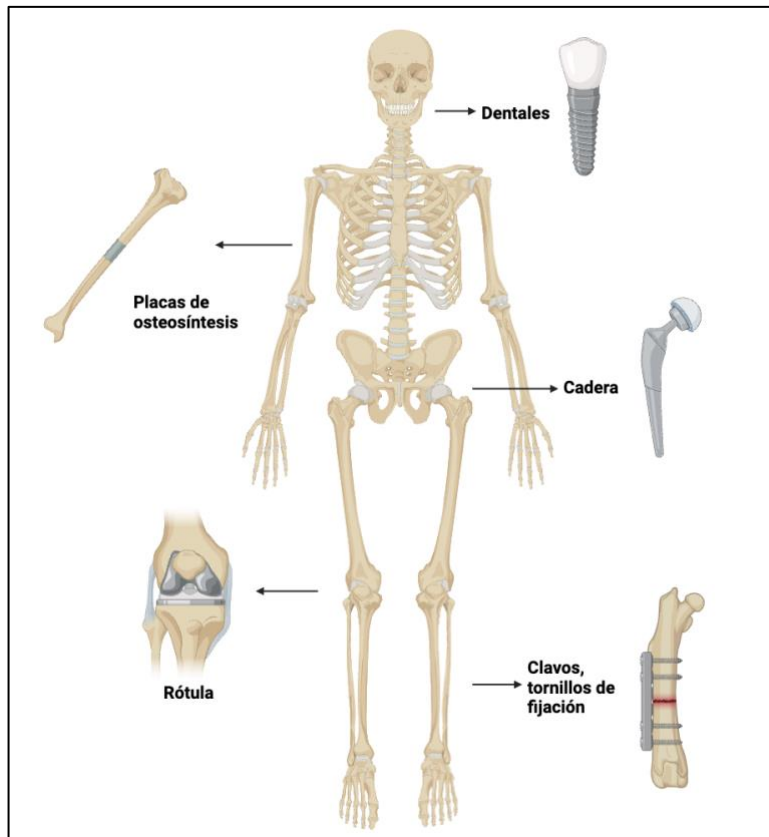


Figura 1. Implantes metálicos comúnmente utilizados en la práctica clínica.

## Acero inoxidable

El uso del hierro data del 1200 a.C al 500 a.C (Era precisamente denominada como la Edad del Hierro). Desde la antigüedad, este material ha sido usado para la elaboración de herramientas y armas debido a que posee una alta dureza y fuerza ténsil; sin embargo, es propenso a reaccionar con el oxígeno desencadenando un proceso de corrosión (2,25). Fue hasta principios del siglo pasado cuando Harry Brearley comenzó a experimentar con la adición de cromo al hierro para hacerlo más resistente a la corrosión. Al realizar pruebas de grabado se percató que esta nueva aleación era más resistente al ataque electroquímico que el hierro convencional, a la que inicialmente denominó *“Rustless Steel”* para después llamarse *“Stainless Steel”* o acero inoxidable.

De manera general esta aleación se basa en hierro y elementos como el cromo y el níquel, y con base en su microestructura, se clasifica en tres clases: Austenítico, Martensítico y Ferrítico. De ellos, los aceros martensíticos y ferríticos poseen de menos propiedades mecánicas y de corrosión deseables, por tal motivo no son utilizados en la industria biomédica (Tabla 1). No así el acero inoxidable austenítico del cual la serie 300 (301,304,

316L y 347) es la más utilizada en la industria biomédica para elaborar diversos dispositivos como válvulas cardíacas o clavos, placas y tornillos ortopédicos (26). Además, el acero inoxidable es el material más rentable debido a su bajo costo, disponibilidad y facilidad de fabricación. Sin embargo, uno de sus principales inconvenientes es su baja resistencia a la corrosión, comparado con otros metales como el titanio (Ti). Una de las principales causas es la presencia de contaminantes (inclusiones) como la alúmina o silicatos dentro de su estructura cristalina, actuando como centros de iniciación del proceso de corrosión. Si bien los implantes a base de acero inoxidable son utilizados como un material permanente (articulaciones artificiales), lo cierto es que su uso es predominantemente temporal, como sistemas de fijación de fracturas o bien para elaborar material quirúrgico (2).

### **Aleaciones a base de cobalto-cromo (Co-Cr)**

Este tipo de aleación es ampliamente utilizada en ortopedia y en el área odontológica a partir de los trabajos de Elwood Haynes (27), quien entre 1097-1913 inventó las aleaciones a base de cobalto, como cobalto-cromo (Co-Cr) y cobalto-cromo-molibdeno (Co-Cr-Mo). El uso de las aleaciones a base de cobalto en la implantología data de la década de los 30, donde el uso de la aleación Co-Cr-Mo, conocida como Vitallium fue utilizada en prótesis dentales, posteriormente entre 1950-1960, la aleación Co-Cr-Mo comenzó a ser utilizada en prótesis de cadera marcando el comienzo de la aplicación biomédica de la aleación Co-Cr, la cual actualmente se desarrolla bajo estándares de la *American Society for Testing and Materials* (ASTM, por sus siglas en inglés) como F799, F90, F562 y F1058 (28).

Esta aleación posee una estructura cristalográfica del tipo hcp (hexagonal close-packed, por sus siglas en inglés), tiene elevada resistencia mecánica, es resistente al calor, y no es magnética. Las aleaciones Co-Cr poseen una adecuada resistencia a la corrosión, y una excelente biocompatibilidad, debido a que estas aleaciones se componen de un 20% de cromo lo cual juega un papel importante en la formación de óxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) en su superficie (28).

Actualmente las aplicaciones biomédicas para este material se centran en la fabricación de prótesis sometidas a altas cargas mecánicas, como rodilla, reemplazo total de cadera, hombro, y como dispositivos de fijación como placas, férulas y cuerdas (22).

## Titanio (Ti)

El Ti fue descrito por primera vez en 1791 por el geólogo Reverend William Gregor. Dentro de sus características químicas, el Ti es un metal blanco-plateado con número atómico 22, con peso molecular de 47.87 g/mol, densidad de 4.50 gr/cm<sup>3</sup> y un punto de fusión de 1669 °C. Es el noveno material con mayor presencia en el planeta, además de su uso en el área biomédica, el titanio es utilizado en la elaboración de pigmentos, cosméticos, industria alimentaria, en la fabricación de paneles solares, así como en la industria aeroespacial. En la naturaleza, el titanio se puede encontrar en tres tipos de óxido: rutilo, anatasa y brookita (21), los dos primeros comparten una estructura cristalográfica tetragonal con el grupo espacial P4<sub>2</sub>/mnm y I4<sub>1</sub>/amd, respectivamente, en contraparte, la brookita presenta una estructura cristalográfica ortorrómbica con un grupo espacial Pbca. De las tres, el rutilo es el más estable a temperatura ambiente, mientras que la anatasa y la brookita son metaestables a elevadas temperaturas y pueden transformarse a rutilo. La brookita se considera la menos estable, y debido a su estructura ortorrómbica, su síntesis resulta compleja, lo cual se traduce en un escaso número de aplicaciones y reportes (29).

En implantología, el Ti resulta ser el material de elección ya que existe aposición directa con el hueso, posee un bajo módulo elástico en comparación con otros metales como las aleaciones Co-Cr. Además, el Ti posee baja densidad y principalmente una alta resistencia a la corrosión, este último, producto de la formación de una capa pasiva de óxido (TiO<sub>2</sub>) que se forma al entrar en contacto con el ambiente, misma que contribuye al aislamiento del material en bulto del entorno biológico al que es expuesto.

Otro factor importante en consideración es el módulo elástico; ya que a pesar de que el Ti posee un “bajo” modulo elástico en comparación con el acero inoxidable o las aleaciones a base de Co-Cr, éste sigue siendo alto comparado con el del hueso esponjoso y cortical, cuyo módulo elástico oscila entre 0.5-2 GPa y 10-40 GPa, respectivamente. Esta disparidad entre implante y hueso se asocia al desarrollo del *stress shielding* que a su vez desencadena la reabsorción ósea (21).

Dependiendo de su contenido intersticial, es decir, de la presencia de otros elementos como carbón, hierro y oxígeno, el Ti puede ser clasificado con base en su grado de pureza. Se estima que existen cerca de 50 grados de pureza, empero, la ASTM reconoce solo algunos (Tabla 2), entre ellos, el Ti comercialmente puro (cp-Ti) que va del grado 1-4, mientras que el grado 5, es aquel que contiene en su composición aluminio y vanadio (Ti-6Al-4V). De ellos, el cp-Ti grado 2 es el más usado en el área odontológica, mientras que cp-Ti grado 5

(Ti-6Al-4V) el más común para uso biomédico, estimándose que éste último, representa aproximadamente el 50% de las aleaciones que se usan en industrias como la aeroespacial, biomédica o marítima (21). No obstante, a pesar de poseer una adecuada resistencia a la corrosión, los cambios de pH promueven la liberación de partículas metálicas, mismas que se han asociado a citotoxicidad, daño al DNA, así como estrés oxidativo. Particularmente, la presencia de vanadio se vincula a carcinogénesis, hipersensibilidad y neurotoxicidad (30); mientras que el aluminio se ha encontrado en tejidos periimplantarios, y se asocia a desordenes neurológicos como Alzheimer, daño renal además de actuar como un agente pro-inflamatorio y pro-apoptótico (31).

Grado Cp-Ti	% N	% C	% O	% Fe	Fuerza tensil (MPa)	Modulo elástico (GPa)	Usos
1	0.03	0.1	0.15	0.2	240	103-107	<i>Es el menos resistente. más dúctil y conformable en el grupo. Debido a ello, su uso es principalmente en forma de láminas y tubos en la industria de la construcción, automotriz, procesos químicos</i>
2	0.03	0.1	0.25	0.3	345	103-107	<i>Presenta buena resistencia y ductilidad. Es el más usado entre los cp-Ti (sin contar al grado 5) principalmente en la industria de la construcción, elaboración de equipos biomédicos y revestimientos</i>
3	0.05	0.1	0.35	0.3	450	103-107	<i>Aeroespacial y marítima, principalmente. Aunque es ligeramente más fuerte que el grado 1 y 2, es el menos usado debido a que presenta menos resistencia a la corrosión que el resto del grupo</i>
4	0.05	0.1	0.40	0.5	550	103-107	<i>Industria aeroespacial, debido a que presenta mayor fuerza tensil de los 4 primeros cp-Ti</i>
5	0.05	0.08	0.13	0.25	860	110	<i>Usado principalmente en área biomédica y el más común entre los cp-Ti. Posee buenas propiedades mecánicas y es biocompatible</i>

Tabla 2. Principales grados de Ti reconocidos por la ASTM (21,29,30)

La biocompatibilidad del Ti y sus aleaciones recae fundamentalmente en la formación de la capa pasiva de óxido que se forma al exponerse al oxígeno. Esta capa pasiva de TiO<sub>2</sub> se considera amorfa y alcanza grosores aproximados que van de 0.5 a los 10 nm, pudiendo triplicar su espesor durante los primeros tres meses y a los 6 años alcanzar espesores que van de los 50 a los 200 nm (32). La capa de TiO<sub>2</sub> crea una interface que evita la liberación de partículas metálicas a los tejidos adyacentes que pudieran desencadenar reacciones inmunológicas adversas; además, al ser una cobertura porosa, facilita la deposición de iones calcio y fosfatos del medio mejorando así el proceso de oseointegración, esto supone que la biocompatibilidad del titanio depende más de las características superficiales que del metal en bulto *per se*. Esta capa nativa, al entrar en contacto con el entorno biológico desencadena una reacción a cuerpo extraño a través de un proceso llamado estrés

oxidativo llevado a cabo por células de la serie granulocítica (principalmente neutrófilos) presentes en sangre, las cuales promueven la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS: *Reactive Oxygen Species*) como el ion superóxido ( $O_2^-$ ) el cual es dismutado a  $H_2O_2$  (peróxido de hidrógeno) por la enzima superóxido dismutasa, con la finalidad de contrarrestar al agente invasor. Esta respuesta inflamatoria, lejos de ser perjudicial, es un evento que permite que se lleven a cabo las interacciones tejido-implante que promoverán la interacción con el tejido circundante, como es la angiogénesis y la oseointegración. La importancia de este proceso fue explicada por Tengvall *et al* (33) a finales de la década de los 80's. Sus trabajos consistieron en crear una respuesta inflamatoria *in vitro* a través de la interacción de Ti con soluciones ricas en  $H_2O_2$ , formando especies reactivas del oxígeno; demostrando así que la interacción de  $H_2O_2$  con la superficie de Ti formarían un aducto<sup>1</sup> de  $TiOOH$  que le permitiría interactuar con los componentes extracelulares que lo rodean como proteínas, iones y células osteoblásticas (Fig. 2)

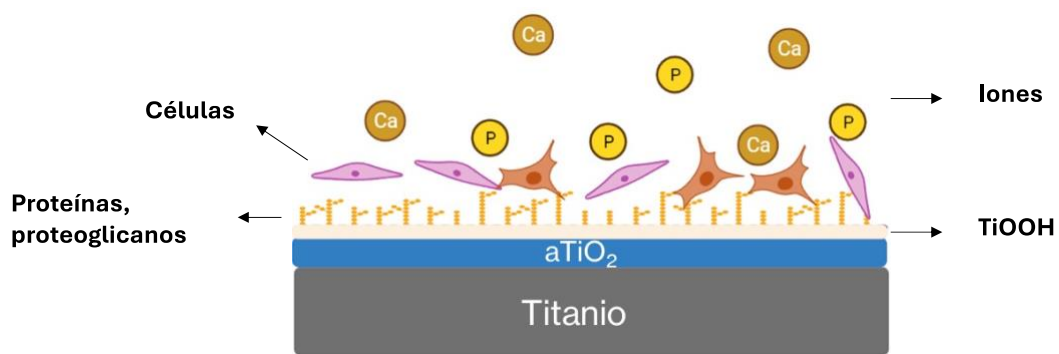


Figura 2. Interacción de la capa nativa de óxido de titanio amorfo ( $aTiO_2$ ) con los componentes extracelulares. Modelo propuesto por Tengvall (33)

## Oseointegración

Si bien los metales son los materiales más empleados para la elaboración de implantes, cada uno de los metales descritos poseen desventajas que merman su integración con los tejidos, haciéndolos incluso materiales de uso temporal como el acero inoxidable, además, su naturaleza bioinerte y su limitada resistencia a la corrosión juegan un papel importante en su proceso de integración a los tejidos que los rodean.

Esta integración del implante a los tejidos recibe el nombre de oseointegración, que de acuerdo con *la American Academy of Implant Dentistry*, se define como “el contacto establecido sin interposición de tejido no óseo entre el hueso remodelado y el implante, que

<sup>1</sup> En química, un aducto es el producto de la interacción de dos moléculas ( $A+B$ ) sin que esto genere cambios en las moléculas A y B.

conlleva a una transferencia y distribución sostenida de la carga del implante al tejido óseo” o, dicho de otro modo, el anclaje directo entre hueso e implante.

Este término fue acuñado por Branemark en 1962, quien estudiando la integración de placas de Ti a tibias de conejo descubrió que estas placas estaban fuertemente adheridas al hueso, haciendo difícil su separación, fue hasta 1965 que este proceso fue estudiado clínicamente en implantes dentales (34).

La oseointegración es un proceso complejo en el cual diversos factores como el material, las características superficiales del implante, la carga mecánica, la técnica quirúrgica y la calidad del hueso interactúan para desencadenar una serie de eventos biológicos que ocurren desde que el implante es colocado hasta su fijación en el tejido óseo. En él se ven involucrados una serie de eventos como la acumulación de precursores de osteoblastos, la formación de la matriz ósea y la formación de mineral, descritos a continuación. Un prerrequisito para que este proceso se lleve a cabo es la estabilidad primaria (<1 mm) entre el hueso y el implante (35). Posteriormente, en la fase temprana del proceso, además de la adsorción de agua y moléculas orgánicas, la formación de un coagulo que se distribuye en esta micrométrica brecha es necesaria para atraer células troncales, las cuales migran hacia la superficie del implante para posteriormente diferenciarse en osteoblastos y depositar una matriz de colágena. Después de aproximadamente 4-6 semanas, esta estructura será reemplazada por una delgada capa de entramado óseo entre el implante y los tejidos circundantes. La cual conforme pasa el tiempo será sustituida por tejido óseo lamelar (34,36).

La oseointegración resulta esencial para la sobrevida de los implantes, en donde las características superficiales juegan un papel primordial para que se lleve a cabo un adecuado proceso de oseointegración Algunos estudios clínicos retrospectivos indican que éstos pueden llegar a tener una sobrevida de hasta 25 años, otros estudios indican que superficies tratadas redujeron su tasa de fracaso hasta el 5% dentro de los primeros 10 años posterior a su colocación (34).

En este sentido, el diseño de superficies a través de su topografía o química superficial pueden tener un papel sinérgico en los procesos de adhesión, proliferación celular y diferenciación de osteoprogenitores, mejorando de este modo el proceso de oseointegración.

## Modificación de superficies

En la búsqueda de materiales que mejoren la interacción del implante al tejido óseo, el desarrollo de superficies con propiedades bioactivas ha sido el foco de una plétora de diversas investigaciones.

La modificación de superficies se puede llevar a cabo alterando las propiedades físicas, químicas, mecánicas y topográficas. Estas propiedades no actúan de manera independiente, y por tanto el análisis no puede llevarse a cabo por separado, por ejemplo, si se lleva a cabo una modificación topográfica de los sustratos usualmente la química también se ve modificada.

## Adición de recubrimientos

Debido a que la biocompatibilidad del Ti recae primordialmente en su pasivación, actualmente existen diversos métodos que nos permiten sintetizar cubiertas de  $\text{TiO}_2$  con grosores  $\sim 100\text{nm}$ , esto con el objetivo de mejorar y acelerar la oseointegración, como la oxidación térmica (TO) (3), sol-gel, anodización (37), deposición atómica (ALD, por sus siglas en inglés) (38), oxidación por micro arco (MAO) (39) o *magnetron sputtering* (MS) (40). A partir de estas técnicas se obtienen fases amorfas o cristalinas, como el rutilo o anatasa.

Para obtener estas fases, los métodos de síntesis involucran generalmente temperaturas de transición mayores a los  $400\text{ }^\circ\text{C}$ , con lo cual pasaríamos de tener  $\text{TiO}_2$  amorfo a la fase cristalina anatasa, mientras que para el rutilo se necesitaría mayor energía e incluso mayor tiempo de síntesis, ya que para pasar de anatasa a rutilo se requieren temperaturas que oscilen entre los  $600$  a  $1100\text{ }^\circ\text{C}$  (41).

Recientemente se ha demostrado que la síntesis de nano recubrimientos de óxido de titanio amorfo ( $\text{aTiO}_2$ ) a partir de la técnica *magnetron sputtering* tienen la capacidad de aumentar la resistencia a la corrosión de sustratos metálicos, retardando la degradación del metal. Además, promueve la diferenciación de células troncales mesenquimales hacia un fenotipo mineralizante, y ayuda a reducir la adhesión bacteriana en comparación con superficies cristalinas u óxidos nativos (40,42,43). Estos trabajos sugieren que el uso de cubiertas de óxido, pueden llegar a tener un impacto en la interacción superficie-tejido, mejorando de este modo la oseointegración. Además, el uso del *magnetron sputtering* como sistema de

síntesis de nano recubrimientos ofrece una serie de ventajas como uniformidad, control del espesor y una adecuada adhesión al sustrato (44).

### **Biofuncionalización con moléculas orgánicas**

En los últimos 25 años, el desarrollo de sistemas que modifican las superficies ha sido el principal foco de investigación en la implantología dental. En la búsqueda de cubiertas que mejoren las propiedades superficiales de los implantes, se han desarrollado métodos que permitan realizar modificaciones alterando ya sea su topografía o química.

En este sentido, la funcionalización a partir del empleo de moléculas orgánicas como proteínas o péptidos surge como una estrategia prometedora debido a la implicación de estas moléculas en mecanismos de señalización celular, además que la adsorción de proteínas es una de las primeras etapas dentro del proceso de oseointegración. Realizando búsqueda de la información en la base de datos MEDLINE (PubMed) con palabras clave como ***(((implant) AND (surface)) AND (functionalization)) AND (osseointegration)*** arroja un total de 3,614 publicaciones desde el año 1983; al restringir la búsqueda a ***(((Implant) AND (surface)) AND (functionalization)) AND (peptides) OR (proteins)) AND (osseointegration)*** esta se reduce a 2,811 publicaciones desde el año 1987 hasta el 2024.

La funcionalización de superficies con moléculas orgánicas en su mayoría, se basan en la incorporación de proteínas de la matriz extracelular (fibronectina, vitronectina, laminina, sialoproteína ósea, colágena tipo I), factores de crecimiento (BMPs, IGF, FGF), e incluso fármacos como los bifosfonatos (alendronato) es decir, moléculas biológicamente activas, cuyo principal objetivo sea mimetizar el entorno biológico, actuando como moléculas de señalización o modulando las interacciones en la interface tejido-implante, el cual derive en el incremento de la actividad celular.

Para ello, el mecanismo de inmovilización y/o anclaje de estas moléculas es clave para asegurar su actividad, dentro de las técnicas empleadas se incluyen: la adsorción física (fisisorción), unión covalente, polarización anódica y la técnica de capa por capa; descritas a continuación.

- **Adsorción física (fisisorción)**

Considerado el método más sencillo y de bajo costo, la adsorción física es un tipo de unión no covalente en donde el anclaje de las moléculas depende de atracciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas y/o de fuerzas de Van der Waals. Cho *et al* (45) demostraron que superficies de Ti previamente sometidas a un tratamiento de arenado con partículas de alúmina y grabado ácido (ácido clorhídrico) y funcionalizadas por adsorción física con la secuencia RVYFFKKGKQYWE (VnP-16) derivada de vitronectina, promovían una mejor oseointegración en conejos Nueva Zelanda tras 2 semanas de implantación, e *in vitro* una mejor adhesión y diferenciación osteogénica. Si consideramos la carente fuerza de unión, estas moléculas pueden fácilmente desprenderse de la superficie o ser susceptibles al efecto Vroman, el cual explica que las proteínas adsorbidas pueden ser reemplazadas en el tiempo por moléculas más grandes con mayor afinidad a la superficie. Para superar este problema, se han descrito técnicas como: 1) el empleo de hidrogeles cargados con la proteína/péptido y 2) a partir de la incorporación de grupos tresil (sulfonil triclorometano (SO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)), estas crean un enlace iónico entre los grupos OH<sup>-</sup> de la superficie y los S<sup>2+</sup> terminal del compuesto, actuando como moléculas guía que posteriormente es desplazada vía nucleofílica por la proteína o péptido, generando un enlace iónico entre el grupo amino de la molécula empleada y el grupo hidroxilo de la superficie; esto permitirían una mayor retención de la molécula y menor probabilidad de desorción (23).

- **Unión covalente**

Este tipo de unión garantiza la inmovilización de las moléculas en cuestión al sustrato a través de 1) grupos funcionales presentes en la molécula o 2) a través de la incorporación previa de *linkers* que modulan dicho anclaje como polietilenglicol (PEG), silanos (SiH<sub>4</sub>) o compuestos orgánicos como la dopamina (DOPA), el chitosan (CS) y heparina (HEP) (23). La funcionalización a partir de la silanización es el más común y ha sido empleada en inmovilización tanto de proteínas como Col I, ácido hialurónico y péptidos derivados de la proteína de la matriz dentinaria 1 (DMP1), mostrando mejor capacidad osteogénica que superficies no tratadas (12).

- **Polarización anódica**

Esta técnica se basa en la interacción y adsorción previa de electrólitos, nanopartículas, iones y algunas proteínas con el sustrato y que posteriormente son sometidas a un proceso de anodización para incrementar la capa de TiO<sub>2</sub>; las moléculas previamente adsorbidas

quedan inmersas en la creciente capa de TiO<sub>2</sub>. Schliephake *et al* (46) evaluaron la incorporación de colágena tipo I (COL I) a superficies de implantes de Ti, posteriormente sometidos con este método, encontrando un aumento del contacto hueso implante (BIC) del 60.2% y de la densidad del volumen óseo peri-implantario (BVD) del 62.6% después de 3 meses de implantación en mandíbulas de perros.

- **Capa por capa**

Este sistema, descrito por Decher *et al* (47) consiste en la adición alternada de capas con cargas opuestas para formar una multicapa poli electrolítica auto ensamblada. Siguiendo el principio, la adición de moléculas bioactivas al sustrato ha contribuido a la promoción de la actividad osteogénica. Por ejemplo, Halthur *et al* (48) evaluaron el efecto de la inmovilización de amelogenina en constructos polipeptídicos compuestos por PLL (poli L-Lys) y PGA (poli L-ácido glutámico), demostrando que es posible obtener superficies bioactivas y biodegradables con capacidad osteogénica. Nawae *et al* (49) por otro lado, evaluaron multicapas compuestas por fibras de sílice (SF), colágena I (Col I) y cloruro de poli dialildimetilamonio (PDDA), generando constructos con distinto número de capas (10-50 capas) el cual conforme aumenta es directamente proporcional al incremento de la actividad osteogénica.

El uso de moléculas orgánicas como estrategia para mejorar la oseointegración y biocompatibilidad de los implantes, nace del papel que éstas desempeñan tan pronto el implante es colocado, ya que, en conjunto con moléculas de agua, iones y plaquetas, éstas actúan mediando las interacciones bioquímicas entre células y superficie, influyendo de este modo en la migración, adhesión, proliferación y diferenciación celular. En este sentido, las proteínas fueron las primeras moléculas en ser evaluadas como sistemas de funcionalización, principalmente aquellas derivadas de matriz extracelular (MEC) como la colágena tipo I, fibronectina, vitronectina, tropoelástina o laminina, las cuales, a partir de estudios *in vitro* promovieron un incremento en la adhesión celular y diferenciación osteoblástica (15). Una de las proteínas más evaluadas ha sido la colágena tipo I (COL 1), debido a su relevancia en la estructura del tejido óseo. Recientemente, Bae *et al* (50) evaluaron superficies de Ti cubiertas con COL 1, sus resultados mostraron, *in vitro* una alta diferenciación hacia linaje osteogénico y una alta expresión de marcadores de

osteogénesis, mientras que *in vivo* se obtuvo un mayor contacto hueso-implante que el grupo control.

Otro tipo de macromoléculas empleadas en la funcionalización de superficies son los factores de crecimiento, como lo es el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), proteínas morfogénicas óseas (BMP 2 y 7) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF). Su uso se basa en su capacidad para actuar como moléculas de señalización capaces de transducir señales en busca de una adecuada respuesta celular. Dado su papel en la osteogénesis, las BMP son las más empleadas dentro de este grupo. *In vitro*, BMP-2 promueve mayor expresión de marcadores de la osteogénesis como la ALP. Incluso cubiertas de BMP-7 a bajas concentraciones incentiva la diferenciación de células troncales mesenquimales hacia un fenotipo mineralizante (51). Sin embargo, en muchos de los casos, estas cubiertas van acompañadas de otros materiales como fosfatos de calcio, hidrogeles u otros factores de crecimiento con la finalidad de potencializar su efecto.

Aunque el uso de proteínas representa una alternativa aparentemente versátil por su alta capacidad de reconocimiento con receptores específicos y mayor exposición de sitios de unión que podrían mejorar la respuesta del tejido circundante al implante, su uso acarrea una serie de limitaciones, por ejemplo, su inmovilización podría alterar su conformación y por tal motivo modificar su función. Otra de las limitaciones en el uso de proteínas completas es su síntesis y purificación que podría incrementar su costo de producción, así como la probabilidad de desencadenar una reacción indeseable por parte del sistema inmune (15,52,53).

Adicionalmente, su uso ha sido gradualmente reemplazado a partir de la identificación de péptidos bioactivos presentes en la estructura de muchas de ellas y capaces de llevar a cabo algunas determinadas funciones como lo haría la proteína completa. Por ejemplo, los péptidos RGD y REDV los cuales derivan de proteínas como la fibronectina, vitronectina, y osteopontina; el hexapéptido GFOGER, proveniente de colágena tipo I; o los péptidos YIGSR e IKVAV constitutivos de la laminina. El uso de estas secuencias cortas trae consigo ventajas sobre el uso de la proteína completa, como su fácil síntesis a través de la técnica de fase sólida, lo cual haría más asequible su producción; el tamaño, mismo que minimiza la probabilidad de una reacción inmunogénica; además de ser más resistentes a variaciones de pH y temperatura, evitando de esta manera su desnaturalización. Dentro de los oligopéptidos más estudiados tenemos la secuencia RGD. Esta secuencia fue

identificada a partir de los trabajos realizados por Pierschbacher (54) y desde principios de los noventa se ha perfilado como la secuencia de elección para promover adhesión en la superficie de los implantes. La secuencia RGD se encuentra presente en distintas proteínas de la MEC, como fibronectina, vitronectina, colágena tipo I, osteopontina y sialoproteína ósea. Esta secuencia específica promueve la adhesión celular a través de su reconocimiento por parte de heterodímeros transmembranales llamados integrinas, las más reportadas son las  $\alpha V\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$  y  $\alpha 5\beta 1$ , ésta última la de mayor afinidad y presente en osteoblastos (11,55,56). *In vitro*, RGD promueve un aumento en adhesión proliferación y expresión de genes asociados a mineralización en osteoblastos (57).

Otra clase de péptidos empleados con estos fines, son aquellos que provienen directamente de proteínas con potencial osteogénico, en este sentido podríamos mencionar a la secuencia SKIPKASSVPTELSAISTLYL (*Knuckle*) correspondiente a la región 72-92 de la BMP-2, el cual ha demostrado poseer las mismas propiedades osteoinductoras que la proteína completa (58).

El péptido de crecimiento osteogénico (OGP) es un factor de crecimiento originalmente purificado por Bab (59). Esta región se compone de 14 residuos (ALKRQGRTLYGFGG) y que, además, comparte homología con la región C-terminal de la histona 4 (H4). Su actividad se asocia al aumento de la actividad osteogénica y proliferación de líneas celulares como osteoblastos y fibroblastos; en células troncales derivadas de médula ósea, OGP estimula la diferenciación y mineralización de matriz extracelular. De esta secuencia, es posible obtener el pentapéptido YGFGG (OGP<sub>10-14</sub>), el cual muestra actividad similar al péptido completo, promoviendo la diferenciación de células troncales de médula ósea hacia un fenotipo mineralizante (15).

Además del tejido óseo, los tejidos dentales son reservorios de moléculas encargadas de dirigir procesos como adhesión, proliferación y diferenciación celular en los tejidos que componen dichas estructuras. Recientemente, el empleo de secuencias aisladas de proteínas como Copine-7, amelogenina, o de la proteína de la matriz dentinaria 1 (DMP1) como moléculas de funcionalización de superficies han demostrado promover la nucleación de fosfatos de calcio con un ratio Ca/P cercano al de la hidroxiapatita, además de incitar la diferenciación osteogénica de células troncales de origen mesenquimal al verse incrementada la expresión de marcadores como ALP, OPN, OCN, BSP, RUNX2 y COL I (12).

## Cemento radicular

Desde el punto de vista anatómico, el cemento radicular es uno de los dos tejidos mineralizados que componen el periodonto y uno de los tres tejidos duros que componen estructuralmente a los órganos dentarios. En términos generales, el cemento radicular es el encargado del mecanismo de anclaje entre el hueso alveolar y diente, esto a través de las fibras del ligamento periodontal. El cemento se clasifica como cemento intermedio, ubicado en la unión cemento esmalte; cemento acelular, el cual abarca la porción media de la raíz y finalmente el cemento celular (formado por cementoblastos), el cual se encuentra ubicado en la zona interradicular (en dientes bi o triradicales) y la porción apical de la o las raíces (60), abarcando dos poblaciones celulares: **cementoblastos** (de origen mesenquimal) y **cementocitos**; los primeros encargados de la cementogénesis y los segundos son cementoblastos que conforme desempeñan su función, quedan atrapados en espacios denominados *lagunas* dentro de la matriz mineralizada producida por ellos mismos, una vez encapsulados, se cree que su función es mecanosensorial, contribuyendo al mantenimiento del cemento ya formado.

A diferencia del hueso, el cemento no se encuentra en constante remodelado, sino que su crecimiento depende de su aposición sostenida a lo largo de la vida, su grosor varía de la zona, alcanzando magnitudes que van de las 50 hasta las 200  $\mu\text{m}$ . Aproximadamente el 45-50% de la composición total del cemento la conforma la matriz inorgánica, compuesta en su mayoría por cristales de hidroxiapatita y en menor proporción por fosfatos de calcio amorfos, así como por elementos traza como magnesio, cobre, zinc y sodio; la porción orgánica, por otro lado, se compone principalmente de proteínas colágenas, de las cuales la colágena tipo I abarca cerca del 90% de las mismas, seguida por la colágena tipo III, cuya presencia fluctúa en un 5%; los glucosaminoglucanos como el dermatán sulfato, ácido hialurónico y condroitín sulfato, implicados en el mantenimiento de la unión entre cemento ya formado y el recién formado (61); por proteínas no colágenas de naturaleza acídica como la osteopontina (OPN) y la sialoproteína ósea (BSP) cuya función se encuentra asociada a los procesos de migración, adhesión y diferenciación celular así como en la nucleación de cristales de hidroxiapatita, proteínas ricas en ácido glutámico como la proteína GLA y osteocalcina asociadas a la regulación del proceso de biomineralización y la fosfatasa alcalina (ALP) encargada de la hidrólisis de grupos fosfato.

Si bien hoy en día el cemento es un tejido del que se cuenta una basta cantidad de literatura, las primeras observaciones parten del siglo XVII gracias a los trabajos de Malpighi, Blake,

Tenon y Cuvier, este último cambiando el término *crusta petrosa* (acuñado por Blake en el siglo XVIII) por el que actualmente conocemos: *Cemento*. Sin embargo, no fue hasta finales del siglo XIX que la importancia anatómica del cemento fue descrita por G.V Black, quien, en un detallado estudio microscópico sobre el ligamento periodontal, describió la posible función de las fibras de Sharpey, Black decía que la inserción de estos ases al cemento promovía unión y soporte, siendo un elemento estructural clave del periodonto (60). Estas primeras observaciones y las subsecuentes dieron como resultado la actual plétórica presencia de literatura especializada sobre dicho tejido, donde es posible hallar información acerca de estructura, fisiología, patologías, así mismo, técnicas de caracterización, como la microscopía electrónica de transmisión, inmunohistoquímica, hibridación *in situ* las cuales, al ser más sensibles, han permitido ampliar el conocimiento en cuanto a ultraestructura y composición (60–66). Ejemplo de ello, son el factor de crecimiento derivado de cemento (CGF), la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP), antiguamente nombradas proteínas “*cemento-específicas*” (60), es decir, proteínas antiguamente consideradas como “nativas” con funciones “exclusivas” y por tanto consideradas como marcadores de dicho tejido. Hoy, gracias a estos métodos de detección se sabe que pueden encontrarse en otros tejidos, aunque en menor proporción.

## **HACD1/CAP**

Además de su contenido celular, proteínas colágenas, fosfoproteínas y glucosaminoglicanos, el cemento radicular es reservorio de moléculas adicionales involucradas en la promoción de la migración, adhesión y proliferación de células del ligamento periodontal principalmente durante la formación del cemento (67), ejemplo de ello es la proteína de adhesión del cemento radicular (*CAP cementum attachment protein*, por sus siglas en inglés). CAP antes PTPLa/CAP y recientemente renombrada como HACD1/CAP (Figura 3) fue la primera proteína en ser aislada e identificada del cemento radicular a partir de los estudios realizados por McAllister *et al* (68) cuando, comparando extractos de cemento humano y bovino, descubrieron que estos promovían la adhesión y proliferación de fibroblastos gingivales al plato de cultivo, es decir, poseían componentes mitogénicos; a partir de la purificación de dichos extractos, se identificó una proteína con una masa molecular relativa ( $M_r$ ) entre 55-56 kDa, misma que al no tener reacción cruzada con anticuerpos contra fibronectina y sialoproteína ósea sugería que se trataba de una

proteína específica del cemento. CAP es sintetizada por cementoblastos durante la cementogénesis, participa en el desarrollo del germen dental promueve la diferenciación de células del folículo dental (62,66) y de células del ligamento periodontal, además promueve la adhesión de osteoblastos células del músculo liso y endoteliales en fibroblastos. CAP promueve la adhesión a través del receptor  $\alpha_5\beta_1$  induciendo la fosforilación de la cinasa de adhesión focal (pp125<sup>fak</sup>) (65). Presenta una alta afinidad a la hidroxiapatita, promoviendo la formación de tejido mineralizado en cultivos de células de ligamento periodontal. Su evaluación *in vivo* ha demostrado actuar en la neoformación ósea en defectos de tamaño crítico en calvarias de rata. Con base en estudios de dicroísmo circular, se ha determinado la distribución porcentual de su estructura secundaria, indicando que CAP contiene 43.2% de estructura  $\alpha$ -hélice, 8.9% en estructura  $\beta$ -lamina, 2%  $\beta$ -giro y 45.9 de estructura *random coil* (64,69).

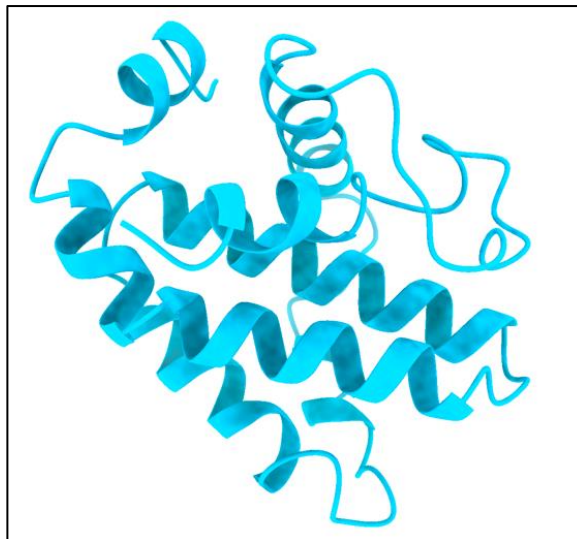


Figura 3. Estructura teórica de CAP. Imagen obtenida en ChimeraX

Recientemente, la identificación y procesamiento de un RNA mensajero (RNAm) derivado de un fibroma cementante humano en el vector  $\lambda$ -ZAP, permitió la obtención de una librería de DNA copia/complementario (DNAC) compuesta por 1435 pb (pares de bases) la cual codifica a un polipéptido recombinante compuesto por 140 residuos aminoacídicos, mismo que a partir de un análisis BLAST demostró ser idéntico a los 125 primeros aminoácidos de la región N-terminal de la proteína 3-hidroxiacil-coA-deshidratasa 1 (HACD1, antes PTPLa) compuesta por un total de 288 residuos, la cual se codifica en el cromosoma 10 (p13-14). HACD1/CAP (Figura 4) es una isoforma truncada producto del *splicing* alternativo que ocurre en el transcrito primario que codifica a HACD1, el cual se conforma por 6 exones, de los cuales el exón 2 abarca del residuo 121-125 y el exón número 3 del residuo 126-146; sin embargo, para dar lugar a HACD1/CAP, el exón 3 es reemplazado por el intrón río abajo

correspondiente al exón 2, trayendo consigo la sustitución del fragmento **IVHCLIGIVPT** (motivo de unión de fosfatasa propio de HACD1) por la región hidrofóbica de 15 aminoácidos **VSFPSCCFSIAVIFM** (específica de HACD1/CAP). Como proteína completa, la presencia de treoninas y serinas a lo largo de la estructura primaria le confiere la capacidad de poder sufrir modificaciones postraduccionales, como fosforilaciones, esto explicaría el porqué de la diferencia en peso entre el modelo recombinante ( $M_r$  de 14.9kDa) y la proteína aislada de tejido ( $M_r$  de ~55kDa).

	10	20	30	40	50	
Isoforma 1	MGRLTEAAAA	GSGSRAAGWA	GSPPTLLPLS	PTSPRCAATM	ASSDEDGTNG	
Isoforma 2	MGRLTEAAAA	GSGSRAAGWA	GSPPTLLPLS	PTSPRCAATM	ASSDEDGTNG	
	60	70	80	90	100	
Isoforma 1	GASEAGEDRE	APGERRRLGV	LATAWLTFYD	IAMTAGWLVL	AIAMVRFYME	
Isoforma 2	GASEAGEDRE	APGERRRLGV	LATAWLTFYD	IAMTAGWLVL	AIAMVRFYME	
	110	120	130	140	150	
Isoforma 1	KGTHRGLYKS	IQKTLKFFQT	FALLE	<b>IVHCL</b>	<b>IGIVPTSVIV</b>	<b>TGVQVSSRIE</b>
Isoforma 2	KGTHRGLYKS	IQKTLKFFQT	FALLE	<b>VSFPSCCFSIAVIFM</b>		
	160	170	180	190	200	
Isoforma 1	MVWLITHSIK	PIQNEESVVL	FLVAWTVTEI	TRYSFYTFSL	LDHLPYFIKW	
	210	220	230	240	250	
	ARYNFFIILY	PVGVAGELLT	IYAALPHVKK	TGMFSIRLPN	KYNVSDFYDY	
	260	270	280			
	FLLITMASYI	PLFPQLYFHM	LRQRRKVLHG	EVIVEKDD		

Figura 4. Secuencias de HACD1 (isoforma 1) resaltado en amarillo y HACD1/CAP (isoforma 2) resaltado en azul. En rojo se muestra la sustitución de la región IVHCLIGIVPT por la región VSFPSCCFSIAVIFM.

## CAP-p15

El *splicing* alternativo que sufre HACD1 provoca un cambio en su sitio de actividad modificando la porción C-terminal en el aminoácido 126 por la región de 15 aminoácidos **VSPSCCFSIAVIFM** (Val-Ser-Phe-Pro-Ser-Cys-Cys-Phe-Ser-Ile-Ala-Val-Ile-Phe-Met) llamado CAP-p15 (Figura 5), generando así un producto de 140 residuos: **HACD1/CAP**. CAP-p15 (Figura 6) es un péptido de naturaleza ácida e hidrofóbica, estudios *in silico* indican que posee un punto isoeléctrico de 5.48 y un peso molecular de 1.65 kDa. A partir de estudios *in vitro* se ha demostrado su capacidad de mimetizar

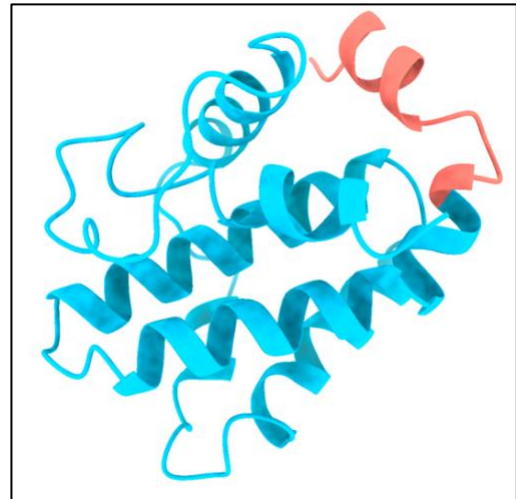


Figura 5. Modelo teórico de CAP, en salmón se resalta la secuencia CAP-p15. Imagen obtenida en ChimeraX

algunas funciones de la proteína completa, como la afinidad y promoción en la formación de cristales de hidroxiapatita (70). Por otro lado, *in vivo*, CAP-p15 es capaz de inducir la formación de tejido mineralizado en un modelo de defecto de tamaño crítico y de promover la remineralización en ratas con osteoporosis inducida (71–73). En un estudio reciente, la biofuncionalización de películas de TiO<sub>2</sub> con CAP-p15 mostró su capacidad de adsorción a películas delgadas de TiO<sub>2</sub> sin causar un cambio en sus propiedades hidrofílicas, además de promover la formación y crecimiento de cristales de hidroxiapatita carbonatada y promover la proliferación y migración de células derivadas del ligamento periodontal humano (18).

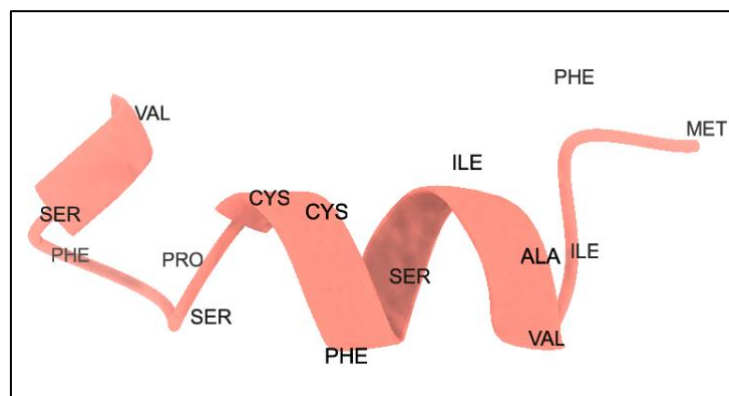


Figura 6. Modelo teórico de la secuencia de CAP-p15 (VAL-SER-PHE-PRO-SER-CYS-CYS-PHE-SER-ILE-ALA-VAL-ILE-PHE-MET). Imagen obtenida en ChimeraX

## IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El uso de implantes con fines ortopédicos o dentales como opción terapéutica ante eventos causados por infecciones, traumatismos o tumores, entre otras enfermedades, es utilizado de manera rutinaria y poseen una alta tasa de éxito. Se estima que para el 2026 el empleo de implantes dentales podría aumentar un 23%, mientras que, en el caso de los implantes ortopédicos, las proyecciones para el 2030 indican un aumento del 137% para implantes de cadera y un 601% en el caso de prótesis de rodilla. A pesar de que los implantes presentan una alta tasa de éxito >90% dentro de los primeros 10 años posterior a su colocación, pueden existir una serie de eventos que desencadenen complicaciones e incluso la pérdida del implante siendo las principales causas una pobre oseointegración y procesos infecciosos (periimplantitis).

Debido a que la estabilidad de los implantes a corto y largo plazo depende de la capacidad de su superficie para promover su integración con los tejidos periimplantarios, su diseño exige tener en cuenta la biocompatibilidad, las propiedades mecánicas y las propiedades superficiales del biomaterial, así como sus propiedades químicas, ya que es un hecho irrefutable que las interacciones moleculares y celulares entre los dispositivos implantados y los tejidos circundantes son esenciales para la integración del implante óseo.

Actualmente existe una plétora de métodos encaminados a optimizar las propiedades de los implantes, como la modificación de la rugosidad, cambios en topográficos, adición de cubiertas (óxidos o fosfatos de calcio), así como el empleo de moléculas adheridas a superficie capaces de tener un impacto a nivel celular. En este sentido, los recubrimientos de óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) juegan un papel importante en el mecanismo de adsorción de proteínas y péptidos. Por otro lado, la funcionalización de superficies a partir de la adsorción de secuencias peptídicas derivadas de proteínas con capacidad osteogénica se ha propuesto como una alternativa novedosa al promover el crecimiento y diferenciación de células troncales mesenquimales incrementando la integración tisular. Estos sistemas de funcionalización permitirían disminuir los riesgos de complicaciones durante el proceso de cicatrización y aumentar el éxito a largo plazo.

## V. OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar el efecto de películas de TiO<sub>2</sub> biofuncionalizadas con el péptido CAP-p15 sobre la diferenciación de células troncales de la mucosa oral (hOMSC) hacia un fenotipo mineralizante.

### Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la biofuncionalización de películas de TiO<sub>2</sub> con el péptido CAP-p15 en el proceso de adhesión de hOMSC.
- Evaluar el efecto de la biofuncionalización de películas de TiO<sub>2</sub> con el péptido CAP-p15 sobre la proliferación de células hOMSC.
- Evaluar el efecto películas de TiO<sub>2</sub> biofuncionalizadas con CAP-p15 en la actividad de la fosfatasa alcalina y la formación de tejido mineralizado de hOMSC.
- Determinar el efecto de la biofuncionalización de las películas de TiO<sub>2</sub> sobre las hOMSC en la expresión de genes y proteínas relacionadas con el proceso de biomineralización a partir de RT-qPCR y Western blot, respectivamente.

## VI. HIPÓTESIS

La biofuncionalización de películas de TiO<sub>2</sub> con el péptido CAP-p15 promueve la diferenciación de células troncales derivadas de la mucosa oral (hOMSC) hacia un fenotipo mineralizante.

## VII. METODOLOGÍA

### Síntesis de CAP-p15

La síntesis de la secuencia peptídica **VSPSCCFSIAVIFM** (CAP-p15) se realizó a partir de la técnica de fase sólida, llevada a cabo por la casa comercial New England Peptide (NEP). 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. La pureza fue evaluada por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), determinando un 95% de pureza.

### Síntesis de las películas delgadas de TiO<sub>2</sub>

La síntesis de películas de TiO<sub>2</sub> se realizó a partir de la técnica *magnetron sputtering*, teniendo silicio cristalino como sustrato para los depósitos. Para ello, previamente obleas de silicio cristalino (100) fueron cuidadosamente cortadas con ayuda de un lápiz punta diamante, obteniendo superficies con un área aproximada a 1cm<sup>2</sup>. Previo al depósito, las superficies de silicio fueron sometidas a un estricto protocolo de limpieza bajo sonicación, utilizando tres disolventes: acetona, isopropanol y agua desionizada por 20 min cada una. Para su completa desecación las superficies fueron colocadas en una cámara de vacío durante 24 h y almacenadas antes de su uso. Posteriormente los sustratos fueron interiorizados en la cámara para interactuar con el blanco de titanio con alto grado de pureza (99.998%) bajo las siguientes condiciones de síntesis: presión de 1x10<sup>-6</sup> Torr, potencia de 200 W y una atmósfera reactiva de Ar con un flujo de 8cm<sup>3</sup> /min y 3cm<sup>3</sup>/min en el caso del oxígeno, con un tiempo total de depósito de 45 minutos. Posterior a un periodo de enfriamiento, las películas de TiO<sub>2</sub> fueron sometidas al mismo protocolo de limpieza y desecación descrito anteriormente y almacenadas previo a su uso.

### Biofuncionalización de las películas de TiO<sub>2</sub>

El péptido liofilizado fue resuspendido a una concentración de 1 µg/mL en agua desionizada. Una vez en disolución, 300 µL fueron tomados y posteriormente distribuidos de manera uniforme sobre la película de TiO<sub>2</sub>, posteriormente las muestras fueron dejadas en desecación durante 24 h en una cámara de vacío. Las películas de TiO<sub>2</sub> biofuncionalizadas con CAP-p15 se consideraron como el grupo experimental, mientras que las películas

prístinas se tomaron como control. Previo a cada ensayo, todas las películas de TiO<sub>2</sub> fueron sometidas a esterilización con luz UV por una hora en ambas caras.

### **Generación de cultivo de células troncales de la mucosa oral**

Las células troncales derivadas de la lámina propia de la mucosa oral (hOMSC) se obtuvieron a partir de explantes humanos, su uso fue aprobado por el comité de ética de la facultad de odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (CIE/0303/02/2018). Las hOMSC fueron cultivadas en cajas de 75 cm<sup>3</sup> (Nunc, Life Technologies, MX) en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco-BRL, Rockville, MD, USA) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU) al 10% y antibióticos (100 µg/ml estreptomycin y 100 UI/ml penicilina (Sigma Chemical CO, Saint Louis MO), MEM NEAA, 100mM de Piruvato de Sodio (Gibco-BRL, Rockville, MD, USA) en un ambiente 100% de humedad a 37 °C, 95% de atmósfera de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Para los ensayos se utilizaron pasajes tempranos (segundo y tercer pasaje).

### **Ensayo de adhesión celular**

Para estudiar el efecto de la secuencia CAP-p15 sobre películas de TiO<sub>2</sub> en la adhesión celular, se sembraron células troncales mesenquimales de mucosa oral (hOMSC) a una densidad de 2x10<sup>3</sup> durante 24 h en medio DMEM libre de SFB, suplementado con antibióticos como penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL). Para este ensayo se evaluaron los siguientes grupos: Películas de TiO<sub>2</sub> prístinas como control, películas de TiO<sub>2</sub> biofuncionalizadas con CAP-p15 como grupo experimental y películas biofuncionalizadas con fibronectina (5 µg/mL) como control positivo, el cual se tomó como referente de obtención del 100% de adhesión celular.

Posterior a las 24 h de cultivo, el medio fue retirado y se realizaron 3 lavados con PBS (1X) para remover las células no adheridas. Subsecuentemente, las células adheridas a los sustratos fueron fijadas con buffer de cacodilato de sodio (0.1 M) durante 1 h y posteriormente incubadas con cristal violeta por 4 h, al final del periodo de incubación las muestras se sometieron a lavados con PBS (1X) para la remoción del colorante no específico. Finalmente, a cada pozo les fue añadido 500 µL de SDS al 1%, tomándose 100

$\mu\text{L}$  del volumen total, mismos que fueron transferidos a una caja de 96 pozos para obtención de la densidad óptica a 605 nm en un espectrofotómetro modelo Filter Max F5 Multimode Microplate Reader, Molecular Devices. El ensayo fue realizado por triplicado para su posterior análisis estadístico.

Para llevar a cabo el análisis de morfología de las hOMSC sobre superficies prístinas y biofuncionalizadas, después de las 24 h de cultivo el medio fue retirado y las células fueron fijadas con buffer de cacodilato de sodio (0.1 M). Posteriormente, se llevaron a cabo lavados con etanol a distintas concentraciones (20, 40, 60, 80 y 100%) y llevadas a desecación de punto crítico para la eliminación del etanol. Finalmente, las muestras fueron recubiertas con oro para su posterior análisis y se obtuvieron imágenes a diversas ampliaciones a partir de microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés), con el microscopio electrónico de barrido DSM 950 Digital Scanning Microscope (West Germany, Zeiss Microscopy).

### **Ensayo de proliferación celular**

Para determinar el efecto de películas biofuncionalizadas con CAP-p15 sobre la proliferación celular, las hOMSC fueron sembradas a una densidad de  $2.5 \times 10^3$  en cajas de 24 pozos (Thermo Fisher Scientific™) con medio DMEM (Gibco-BRL, Rockville, MD, USA), suplementado con 0.2% y 10% de SFB (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA) en una atmósfera de 95% de aire y 5% de  $\text{CO}_2$ . Los grupos evaluados en este ensayo fueron los siguientes: películas de  $\text{TiO}_2$  prístinas cultivadas en 0.2% y 10% de SFB, películas biofuncionalizadas con CAP-p15 cultivadas únicamente en 0.2% de SFB.

Los cultivos se mantuvieron durante 0, 24, 48 y 72 horas. Posterior a cada periodo de incubación, el medio fue retirado y por cada por cada 100  $\mu\text{L}$  de medio se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de MTT (0.5 mg/mL), dejándolo incubar por 4 horas; posteriormente se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, Saint Louis, MO, USA) en cada pozo de cultivo, incubándose durante 1h a 37 °C. De esta disolución se tomaron 100  $\mu\text{L}$  mismas que fueron transferidas a cajas de 96 pozos (Thermo Fisher Scientific™) y se procedió a la lectura de la absorbancia a 570 nm en un lector de placas (Filter Max F5 Multimode Microplate Reader, Molecular Devices). Cada grupo fue analizado por triplicado para su posterior análisis estadístico.

## **Evaluación de la formación de nódulos de calcio a partir de la tinción alizarina roja**

Para evaluar el efecto de películas de TiO<sub>2</sub> biofuncionalizadas con CAP-p15 en la inducción de nódulos de calcio sobre cultivos, se sembraron hOMSC una densidad de 2x10<sup>4</sup> células por pozo, manteniéndose en adherencia durante toda la noche. Después las células fueron tratadas durante 3, 7 y 14 días en medio DMEM (Gibco-BRL, Rockville, MD, USA). Al término de cada periodo de incubación, el medio fue retirado y las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y subsecuentes lavados con PBS. Los nódulos de calcio fueron identificados con la disolución de alizarina roja (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) a pH 4.2 por 10 minutos. El exceso de colorante fue eliminado mediante lavados con PBS por 5 minutos, y posteriormente desecadas a temperatura ambiente. Los nódulos de calcio fueron observados con ayuda de un microscopio de luz, procediendo a la toma de fotografías, mismas que fueron analizadas con el software ImageJ (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA). El análisis cuantitativo de la presencia de nódulos de calcio se evaluó con el método de cetilpiridinio (CPC) al 10%, diluyéndose la alizarina roja con 500 µL de CPC durante 1 h y posteriormente, obteniéndose la lectura de absorbancia a 570 nm en un lector de placas (Filter Max F5 Multimode Microplate Reader, Molecular Devices). Los ensayos fueron realizados por triplicado.

## **Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP)**

Para llevar a cabo la evaluación de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina (ALP) en cultivos de hOMSC, se sembraron células troncales mesenquimales derivadas de mucosa oral a una densidad de 2x10<sup>4</sup> células sobre películas de TiO<sub>2</sub> control y biofuncionalizadas con CAP-p15 en cajas de 24 pozos (Thermo Fisher Scientific™) en medio DMEM durante 3, 7 y 14 días. Pasado el tiempo de cultivo, las células fueron desprendidas y lisadas con 250 µl de un buffer de lisis (10 mM Tris-HCL, pH 7.4, 0.15 M de NaCl y 0.1% de Tritón X-100). Posteriormente, los lisados fueron sometidos a sonicación y centrifugación a 14,000 rpm durante 4 min, conservándose el sobrenadante. Del mismo, fueron tomados 5 µL de muestra de proteína, adicionando 95 µL de buffer de reacción de ALP (0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 1M dietanolamina, 0.25mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM pNPP, pH 9.8) a 37 °C durante 30 min con p-nitrofenilfosfato (pNPP; como sustrato de la enzima). La actividad específica se expresó como microgramos de p-NPP por minuto por miligramo de proteína, en donde la hidrólisis de p-NPP fue proporcional a la actividad de la fosfatasa alcalina. La absorbancia fue leída a 405 nm en un espectrofotómetro y los ensayos fueron realizados por triplicado.

## RT-qPCR

Se sembraron células troncales de la mucosa oral a una densidad de  $2 \times 10^4$  por triplicado sobre películas de  $\text{TiO}_2$  control y biofuncionalizadas con CAP-p15 en cajas de 24 pozos durante 0, 3, 7 y 14 días. Posteriormente se llevó a cabo la extracción de RNAm tomando en cuenta las instrucciones del fabricante a través de TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) fueron amplificados 10 ng de RNA por reacción con SuperScript™ III Platinum SYBR Green One-Step RT-qPCR Kit Con ROX (Invitrogen), y con 10 pM de los arrancadores sentido y antisentido para determinar las moléculas: osteocalcina (OCN), Proteína morfogénica ósea (BMP2), RUNX2, sialoproteína ósea (BSP) y gliceraldehído 3-fosfato (GAPDH) como control endógeno (resumidas en la tabla 2). La reacción de PCR fue llevada a cabo en un termociclador Corbett Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Valencia, Ca) bajo las siguientes condiciones de síntesis de DNAc a 50 °C durante 3 min, desnaturalización a 95 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, y finalmente 40 °C por 1 min. El día cero se consideró la línea base para la determinación del incremento o disminución de la expresión relativa de cada gen en respuesta a los tratamientos. Para determinar la expresión de cada gen, se utilizó el método de cuantificación relativa doble delta CT ( $\Delta\Delta$  CT).

Gen	Sentido (5´-3´)	Antisentido (3´-5´)
<b>BMP-2</b>	GGTTCCTAAGGAGGACGACA	CCAAGTGCTGACACACAACA
<b>OCN</b>	GTTGCAGGCTCAATCCATTT	CCATCCTCATACTGCACCT
<b>BSP</b>	AACGAAGAAAGCGAAGCAGAA	TCTGCCTCTGTGCTGTTGGT
<b>RUNX2</b>	ACCCAGAAGGCACAGACAGAAG	AGGAATCGCCCCTAAATCACT
<b>GAPDH</b>	CAACGGATTTGGTCGTATTGG	GCAACAATATCCACTTTACCAGAGTTAA

*Tabla 2. Arrancadores sentido y antisentido de los genes empleados*

## Western Blot

Por medio de Western Blot se evaluó la expresión relativa de proteínas asociadas al proceso de diferenciación hacia fenotipo mineralizante como RUNX2, BSP, BMP2 y OCN; utilizando GAPDH como control, las hOMSC se sembraron a una densidad de  $2 \times 10^4$  células en superficies de  $\text{TiO}_2$  prístinas y superficies biofuncionalizadas en placas de 24 pozos durante 3, 7 y 14 días, en medio DMEM suplementado con SFB al 10%. Al final de cada día de cultivo establecido, el medio fue retirado cuidadosamente para no afectar la

monocapa, acto seguido las células fueron raspadas con ayuda de un gendarme y se disolvieron en un buffer de lisis para posteriormente ser sonicadas y centrifugadas a 2000 revoluciones por minuto (RPM) durante 5 min. La cuantificación de la proteína obtenida se llevó a cabo por el método de Bradford. Después, el primer paso, fue llevar a cabo la separación de las proteínas a partir de electroforesis en geles de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE), para ello se cargaron 20  $\mu$ g de proteína en geles al 12% en una cámara de electroforesis a 34 mA por 1 h. Luego, los geles fueron recuperados y transferidos a membranas de polimeropolivinildenedifloride (PVDF) con un tamaño de poro de 0.45  $\mu$ m (Amersham Hybond, GE Healthcare, Germany) durante 2 h. Después las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% durante 1 h seguidos de 3 lavados con TBS.

Para llevar a cabo la inmunodetección, anticuerpos policlonales de conejo anti RUNX2, BSP, BMP-2, OCN y GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA) se incubaron bajo agitación en diluciones 1:1000 durante toda la noche a temperatura ambiente. A continuación, se llevaron a cabo 3 lavados con TBS-Tween para posteriormente llevar a cabo la incubación del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa anti-conejo por 2 h a temperatura ambiente. El revelado de las membranas de PVDF se realizó con diaminobenzidina (Tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB),  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y PBS). Posterior al secado, las membranas fueron escaneadas y analizadas con el programa ImageJ (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, EE. UU.). El nivel de expresión relativa de cada proteína se evaluó midiendo la intensidad integrada de todos los píxeles de cada banda, excluyendo el fondo local. Los resultados son mostrados como porcentajes de la intensidad de la proteína.

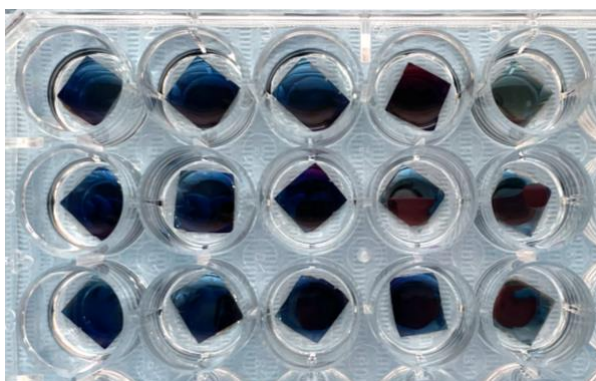
### **Análisis estadístico**

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y analizados a partir de un análisis de varianza (ANOVA). La determinación de la diferencia entre cada uno de los tiempos evaluados por cada grupo se realizó con la prueba post-hoc Tukey. Se determinó un valor de significancia  $p < 0.05$ . Los datos fueron analizados con el software GraphPad (GraphPad Software Inc. USA).

## VIII. RESULTADOS

### Síntesis de películas delgadas de TiO<sub>2</sub>

Se obtuvieron películas delgadas de TiO<sub>2</sub> (Figura 7) de 1 cm x 1 cm depositados sobre obleas de silicio cristalino (100). Si bien el foco de nuestra investigación se basó en el potencial de diferenciación celular sobre las películas de TiO<sub>2</sub>, es importante resumir los resultados obtenidos en cuanto a la caracterización de las propiedades fisicoquímicas reportados en trabajos anteriores.



*Figura 7. Superficies de TiO<sub>2</sub> sintetizadas por magnetron sputtering previo al proceso de esterilización*

La caracterización de dichas películas, bajo las mismas condiciones de síntesis ha sido llevada a cabo en reportes previos. Demostrándose que dichas películas poseen un grosor aproximado a los  $54.5 \pm 7.3$  nm (40). La topografía de las películas ha sido evaluada a partir de estudios de perfilometría y microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés), demostrando que los sustratos poseen una rugosidad promedio ( $S_a$ ) de 0.5 nm (40) y de 0.9 nm (18), respectivamente.

La medición del ángulo de contacto es un método que nos permite conocer la hidrofiliidad o hidrofobicidad de un biomaterial, en este sentido a partir de este ensayo, se sabe las películas poseen una naturaleza hidrofílica de  $74.2^\circ \pm 2^\circ$  (18,43), lo cual se ha demostrado que facilita la interacción celular (74). Estudios de difracción de rayos X (XRD, por sus siglas en inglés) realizados previamente por Almaguer-Flores (43) y Fernández-Lizárraga (40) demostraron la naturaleza amorfa de dichas películas.

## Adhesión celular

La morfología de las hOMSC adheridas a las superficies de TiO<sub>2</sub> control y funcionalizadas con CAP-p15 se muestra en la figura 8. A las 24 horas, las células presentes sobre la superficie control muestran una morfología redondeada con escasas prolongaciones citoplasmáticas, a diferencia de aquellas adheridas a los sustratos funcionalizados, donde se aprecia una morfología alargada e incluso cuboidal, donde además se observan prolongaciones citoplasmáticas, mismas que se encuentran estrechamente relacionadas al proceso tanto de adhesión como de migración celular (Figura 8). A partir de la cuantificación fue posible corroborar lo observado con SEM, las superficies tratadas con el péptido de CAP mostraron un aumento significativo en la adhesión de 3.4 veces más que el grupo de superficies prístinas (Figura 9). Los ensayos de adhesión son esenciales al momento de evaluar las propiedades de un biomaterial ya que son uno de los primeros pasos que ocurren ante la colocación de un implante, ya que se sabe que la adhesión celular está ligada a la inducción de señales que modulan migración, ciclo celular y diferenciación, por tanto, la creación de sustratos que conduzcan a cambios en la organización del citoesqueleto y en la adhesión tendrían de este modo, gran impacto en el fenotipo que las células troncales adquirirían.

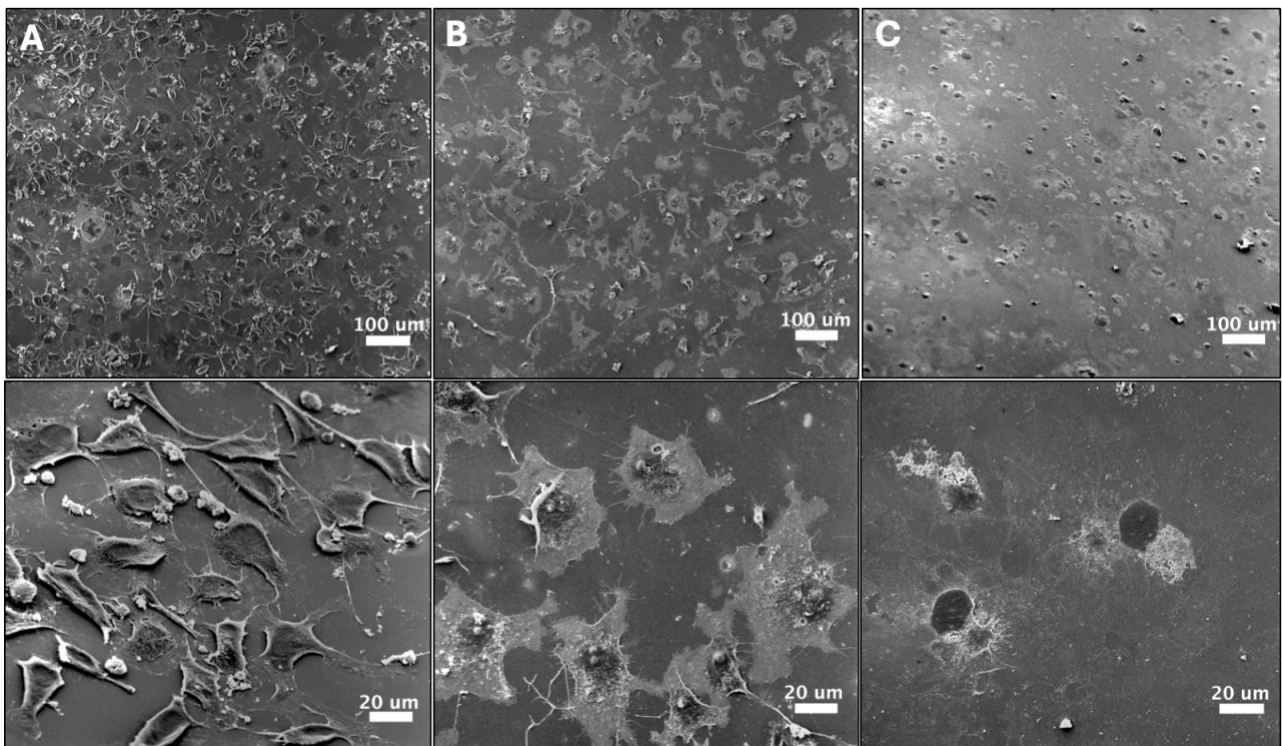


Figura 8. Células adheridas a superficies tratadas con fibronectina (FN) (A), biofuncionalizadas con el péptido de CAP-p15 (B) y películas no tratadas (C) posterior a 24 h de ser cultivadas. En sustratos biofuncionalizados con CAP-p15 se aprecia en una morfología cuboidal con presencia de prolongaciones citoplasmáticas, mientras que sustratos prístinos muestran células con morfología redondeada y escasa presencia de prolongaciones. Aumentos a 100X y 500X

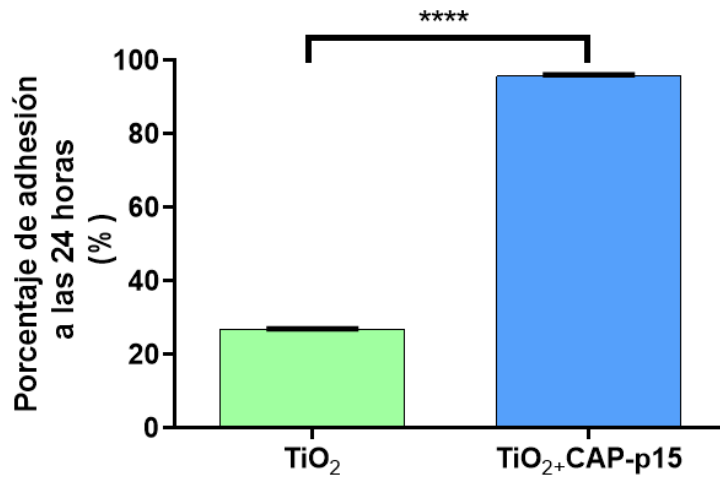


Figura 9. Porcentaje de adhesión posterior a 24 horas de cultivo celular a partir de la tinción de cristal violeta. El porcentaje de adhesión en superficies biofuncionalizadas con fibronectina se tomó como el 100% de adhesión celular. Es posible observar un aumento significativo de 3.4 veces más a diferencia del grupo control, 27% versus 94% de adhesión. T-student  $p < 0.0001$ .

### Proliferación celular

Con el objeto de evaluar si la funcionalización de las superficies de TiO<sub>2</sub> tenía un impacto en el crecimiento de la población de las hOMSCs, se procedió a la evaluación de la proliferación celular a partir del ensayo MTT, demostrando que las superficies de TiO<sub>2</sub> biofuncionalizadas con CAP-p15 presentaron un aumento significativo en el número de células del 162% (1.6 veces) dentro de las primeras 24 horas de cultivo, alcanzando hasta 3.8 veces más en contraste con los grupos control, determinándose un claro efecto positivo de las superficies funcionalizadas con el péptido derivado de CAP (Figura 10) ANOVA  $p < 0.05$ .

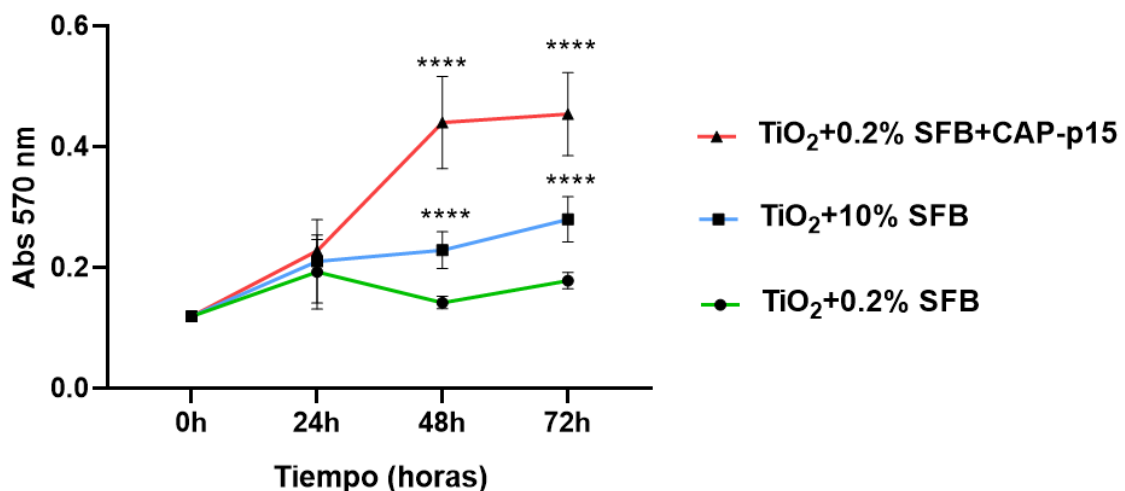


Figura 10. Efecto de la funcionalización de superficies de TiO<sub>2</sub> con el péptido CAP-p15. ANOVA \*\*\*\* $p < 0.0001$

## Identificación de nódulos de calcio a partir de la tinción alizarina roja

La visualización y cuantificación del depósito de la matriz mineralizada fue evaluada a partir de la tinción de alizarina roja (pH 4.2), misma que es un indicativo de diferenciación por parte de las células troncales hacia un fenotipo mineralizante. Como es posible apreciar en la figura 10, a los 3 días de cultivo tanto en el grupo experimental como en el control se observa una incipiente producción de matriz mineralizada caracterizada por la presencia de pequeños nódulos presentes de manera aislada por el campo, no es sino a partir del día 7 y hasta el día 14 donde se observa una mayor presencia de matriz mineralizante en las muestras funcionalizadas con el péptido derivado de CAP versus los grupos control (Figura 11). La cuantificación de la tinción fue llevada a cabo a partir de la disolución de los nódulos de calcio con cloruro de cetilpiridinio (CPC), la gráfica muestra un aumento significativo de la presencia de nódulos de calcio a partir del tercer día misma que se ve incrementada considerablemente al día 14 (Figura 12).

Estos resultados indican que, si bien el óxido de titanio posee la capacidad de promover la diferenciación hacia un fenotipo mineralizante, la presencia del péptido CAP-p15 parece tener un efecto sinérgico en la producción de matriz mineralizante al adsorberse a dichas películas.

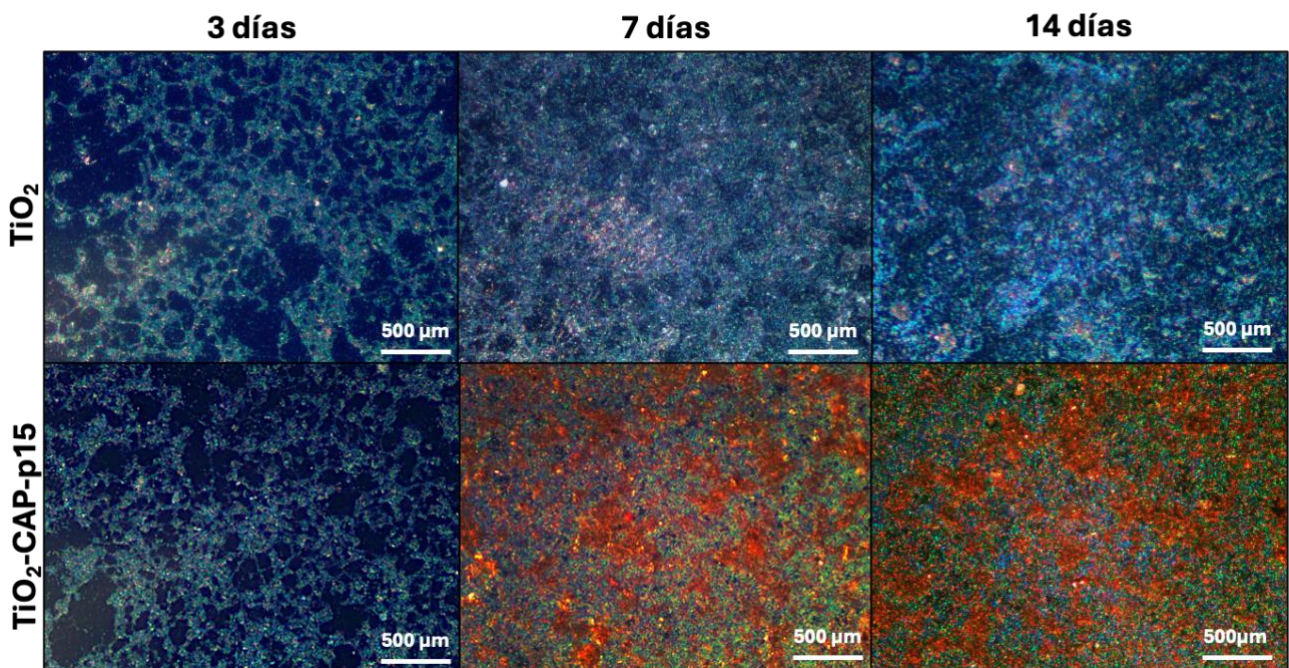


Figura 11. Evaluación de la presencia de nódulos de calcio sobre las superficies de TiO<sub>2</sub> en presencia y ausencia de CAP-p15 a los 3,7 y 14 días de cultivo. Aumento a 4X.

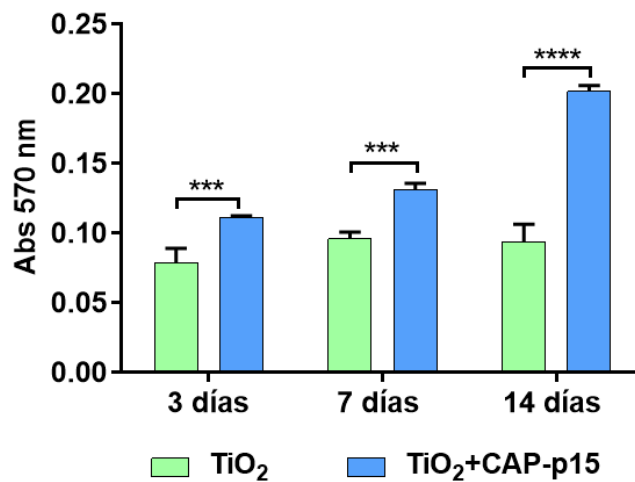


Figura 12. Análisis cuantitativo de la presencia de nódulos de calcio. ANOVA dos vías; \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$

### Actividad específica de la fosfatasa alcalina (ALP)

Al ser un marcador temprano del proceso de biomineralización, la evaluación de la actividad de la fosfatasa alcalina resulta ser un ensayo imprescindible para determinar la diferenciación de células troncales hacia un fenotipo mineralizante. La evaluación de ALP mostró un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la actividad de dicha enzima en superficies tratadas con el péptido CAP-p15 en los días 3 y 14 contra los grupos control (Figura 13).

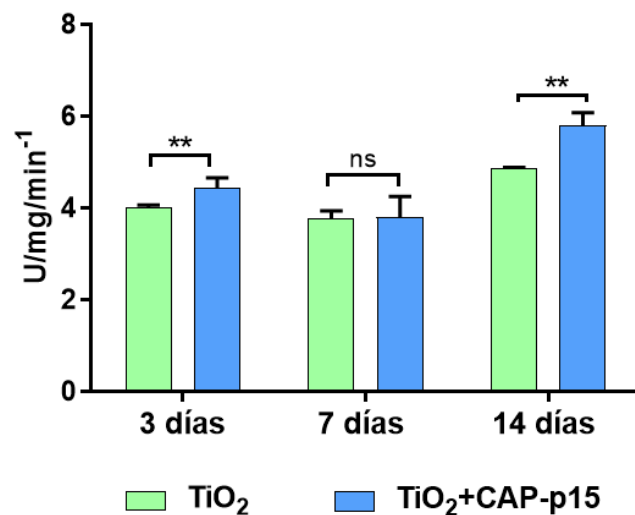


Figura 13. Actividad específica de la ALP. ANOVA dos vías: ns no significativo, \*\* $p < 0.01$

## RT-qPCR

Los marcadores fueron evaluados a los 3, 7 y 14 días de cultivo. Los resultados obtenidos basados en la cuantificación relativa a partir del  $\Delta\Delta$  ct (Figura 14) indican que RUNX2; un factor de transcripción clave del proceso de diferenciación de células osteogénicas, presentó un pico de expresión a los 14 días de cultivo, manteniendo una tendencia en cuanto mayor expresión por parte del grupo experimental a diferencia de las superficies no tratadas.

Por otro lado, la expresión de BSP; un marcador temprano del proceso de biomineralización, mostró un aumento paulatino de 3.6, 5.6 y 1.2 veces respecto al control a los 3, 7 y 14 días respectivamente. Mostrando la misma tendencia, se sostuvo un incremento en cuanto la expresión relativa de RNAm de BMP-2 sobre las películas de TiO<sub>2</sub> biofuncionalizadas, dicho incremento fue de 1.66 y 2.85 veces a los 7 y 14 días, respectivamente, teniendo como referencia al grupo control. Finalmente, OCN; un marcador asociado a la maduración de la matriz mineralizante, expuso un pico máximo a las 2 semanas de cultivo siendo de 3.7 veces más respecto el control. Los resultados indican que la funcionalización de las superficies de TiO<sub>2</sub> con CAP-p15 tiene un efecto positivo en cuanto al alza en la expresión de marcadores asociados a biomineralización de las hOMSC sobre los días de cultivo.

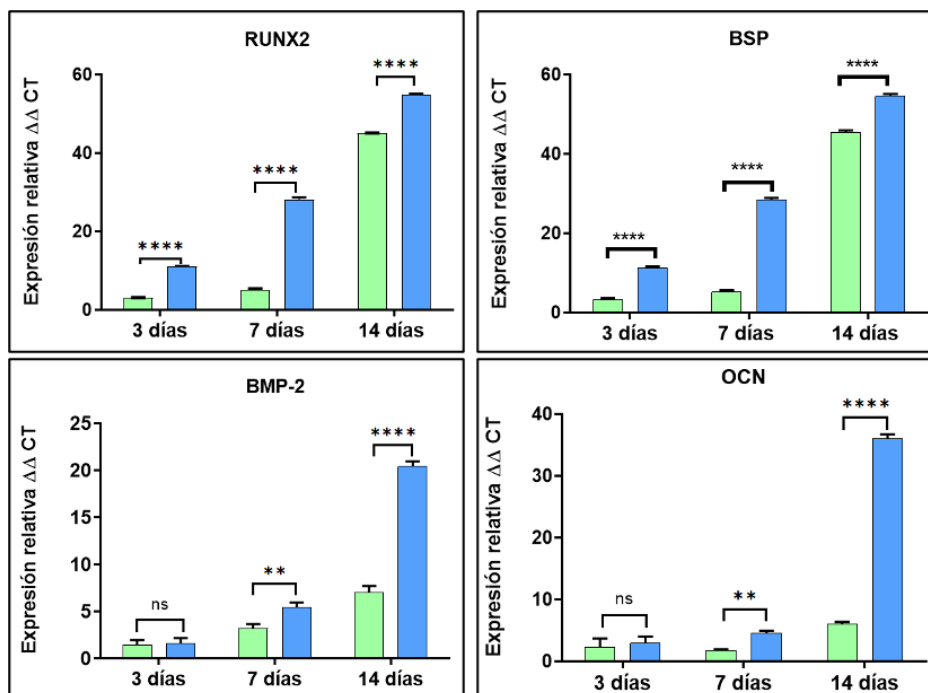


Figura 14. Expresión relativa de RNAm a partir de RT-qPCR de RUNX2, BSP, BMP-2 y OCN a los 3, 7 y 14 días de cultivo en superficies control y funcionalizadas con la secuencia CAP-p15. ANOVA 2 vías: ns: no significativo, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

## Western Blot

La expresión de proteínas asociadas a la diferenciación hacia un fenotipo mineralizante fue determinada a partir de Western Blot a partir de la obtención de la expresión relativa en porcentaje para cada proteína inmunodetectada tanto en el grupo control como el experimental, misma que se presenta en la figura 15. Los resultados arrojaron en todos los casos, un incremento estadísticamente significativo en cuanto al porcentaje de expresión de proteína en superficies tratadas con la secuencia bioactiva derivada de CAP. Por ejemplo, RUNX2 exhibió un incremento de 3.71, 5.44 y 3.18 veces más que los grupos control para cada uno de los tiempos de cultivo celular evaluados. La expresión BSP en superficies biofuncionalizadas mostró incrementos de 1.9, 1.2 y 105 veces más comparadas con sustratos prístinos a los 3, 7 y 14 días. Por otro lado, el porcentaje de expresión de la proteína BMP-2 fue de 3.9, 1.2 y 1.4 veces más respecto a superficies no tratadas. La expresión del marcador OCN mantuvo un incremento sobre los días de cultivo mostrando 1.9, 1.3 y 1.8 veces más expresión en sustratos funcionalizados con CAP-p15 que sustratos no funcionalizados.

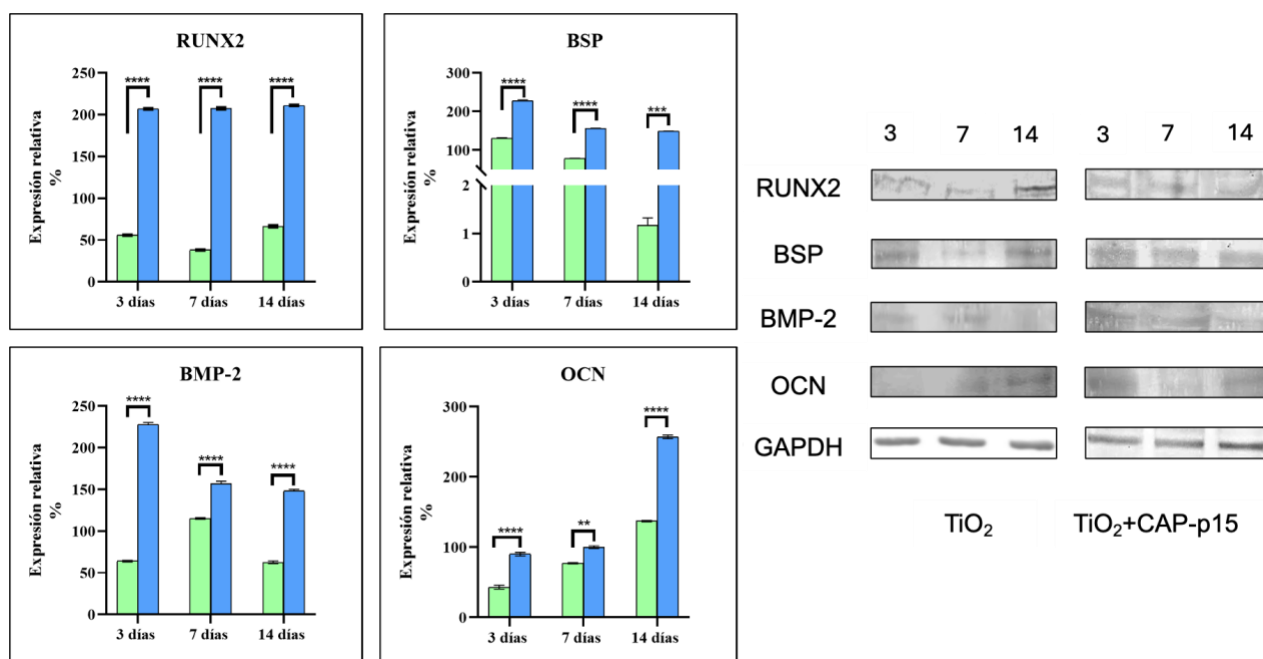


Figura 15. Expresión relativa de proteína presente por día de cultivo. Se aprecia un efecto positivo de la funcionalización con CAP-p15 en la expresión de cada uno de los marcadores a lo largo de los días de cultivo establecidos. ANOVA 2 vías \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

## IX. DISCUSIÓN

Debido a sus excelentes propiedades mecánicas y resistencia a la corrosión, el Ti es uno de los metales más utilizados en la fabricación de implantes dentales y ortopédicos, mismos que están destinados para el tratamiento de diversas afecciones del sistema musculoesquelético como trauma, osteoporosis, cáncer de hueso, lesiones articulares o de columna vertebral. A pesar de que la sobrevivencia de los implantes es mayor al 90% dentro de los primeros 10 años (4), pueden existir una serie de eventos que desencadenen complicaciones e incluso la pérdida del implante, siendo las causas más comunes procesos infecciosos o una deficiente oseointegración. Si bien existen otros metales empleados como el acero inoxidable o las aleaciones a base de Co-Cr, el Ti resulta ser el material de elección para estos propósitos, ya que existe una aposición directa del hueso, posee un bajo módulo elástico en comparación con el de las aleaciones Co-Cr, posee una baja densidad y principalmente una alta resistencia a la corrosión, éste último, producto de la formación de una capa pasiva de óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) que se forma al entrar en contacto con el ambiente. Esta capa de  $\text{TiO}_2$  es amorfa y alcanza grosores aproximados que van de los 0.5 a los 10 nm, actuando como un interface que evita la liberación de partículas metálicas a los tejidos adyacentes que pudieran desencadenar reacciones inmunológicas adversas; además, al ser una cobertura porosa, facilita el depósito de iones de calcio y fosfatos del medio, mejorando así el proceso de oseointegración, esto supone que la biocompatibilidad del titanio depende más de las características superficiales que del metal en bulto *per se*.

Tan pronto un implante es colocado, es cubierto por una capa compuesta por proteínas del plasma sanguíneo y componentes celulares, mismos que propician una cicatrización de la herida y por tanto la integración del implante. Con la finalidad de optimizar la interacción tejido-implante, se han desarrollado mecanismos por los cuales sea posible promover la diferenciación osteoblástica a partir de modelos *in vitro* e *in vivo*. De tal manera, el diseño de superficies que mimeticen un entorno fisiológico como lo es la MEC, resulta ser la clave para la integración del implante con los tejidos circundantes. En la actualidad, existe una variedad de modificaciones de superficie que tienen como meta mejorar la integración de los implantes a base de Ti. Por ejemplo, estudios han demostrado que los cambios topológicos (75) la dureza (76) y la química superficial (12,77) propician una mejor adhesión, distribución, proliferación y diferenciación celular para la adecuada regeneración del tejido.

Además de lo previamente planteado, una estrategia empleada para mejorar la interacción tejido-implante se basa en la funcionalización a partir de la adición de secuencias peptídicas. El uso de secuencias cortas acarrea importantes ventajas contrario al uso de proteínas, por ejemplo, en su mayoría estas secuencias cortas provienen de la estructura completa de la proteína, siendo capaces de llevar a cabo funciones específicas que posee la proteína completa, además son de fácil síntesis, son químicamente más estables (pH y temperatura) y de asequible producción. Ejemplo de ello son los péptidos derivados de proteínas como la vitronectina (45), laminina (14) o BMP-2 (58) los cuales han demostrado tener la capacidad de promover proliferación y diferenciación osteogénica al funcionalizar superficies de Ti.

Como hemos mencionado, la biocompatibilidad de los materiales recae de manera primordial en las características fisicoquímicas de la superficie, determinando de esta manera la respuesta celular. Para este estudio, recurrimos a células aisladas de la lámina propia de la mucosa oral (hOMSC) las cuales, han demostrado un potencial de diferenciación hacia tejido óseo, cartílago, adiposo y neurogénico (78–80). En este proyecto, se utilizaron películas de TiO<sub>2</sub> sintetizadas por *magnetron sputtering*, cuyo proceso de caracterización ha sido llevado a cabo en trabajos anteriores realizados por Almaguer-Flores (43) y Silva-Bermúdez (42), en ellos, se demostró mediante estudios de XPS y XRD su composición química y estructura amorfa de estas películas delgadas, depositas bajo las mismas condiciones de síntesis utilizadas para depositar las películas delgadas de TiO<sub>2</sub> empleadas en el presente estudio. Además, se comprobó la diferenciación osteogénica, donde el TiO<sub>2</sub> amorfo mostró una mejor adhesión celular y una diferenciación osteogénica de las MSC en comparación con las superficies de TiO<sub>2</sub> cristalino.

El proceso de oseointegración requiere un primer contacto entre célula-superficie, para ello es imprescindible la evaluación de la adhesión y la manera en que las células se encuentran distribuidas sobre el sustrato en cuestión. La evaluación llevada a cabo demostró que las superficies cubiertas con CAP-p15 promovieron una mayor tasa de adhesión a las 24 horas de cultivo, mostrando una morfología estrellada con la presencia de estructuras citoplasmáticas como filopodios y microvellosidades, a diferencia de aquellas presentes en el grupo control en donde se aprecia que la morfología adquirida por las hOMSC resulta en una apariencia redondeada. Estos resultados concuerdan con lo observado por Al-Jarsha *et al* (51), en donde se llevó a cabo la inmovilización física de la proteína BMP-7,

demostrando que la funcionalización de superficies de Ti con dicha molécula propició un aumento significativo en cuanto la adhesión y proliferación celular posterior a las 24 horas de cultivo. En otro estudio realizado por Trino *et al.* (12) se demostró que a partir de la funcionalización de superficies de Ti con péptidos derivados de la proteína de la matriz dentinaria 1 (DMP1) la unión de las secuencias ESQES y QESQSEQDS a las superficies tuvieron un efecto positivo en cuanto a la adhesión y proliferación de células troncales mesenquimales.

Es importante resaltar, que la biofuncionalización con CAP-p15 además de fomentar un incremento en la adhesión y proliferación celular, induce un estado de diferenciación hacia fenotipo mineralizante. Una de las técnicas empleadas es la tinción de alizarina roja, tinción ampliamente útil que nos permite la identificación de depósitos ricos en calcio producidos por células diferenciadas. Nuestros resultados señalan que, tanto de manera cualitativa como cuantitativa, existe una clara presencia de nódulos ricos en calcio principalmente en superficies tratadas con CAP-p15 a diferencia del grupo control, esta clara tendencia se mantiene hasta el día 14 de cultivo. Se sabe que superficies de TiO<sub>2</sub> son capaces de inducir la diferenciación osteogénica. En estudios publicados por Fernández-Lizárraga (40) y Silva-Bermúdez (42) se ha comprobado el potencial innato de las películas de TiO<sub>2</sub> para inducir la diferenciación hacia un fenotipo mineralizante. Sin embargo, la inmensa mayoría de las publicaciones recurren a la adición de inductores de la osteogénesis para llevar a cabo sus ensayos. En nuestro trabajo queda de manifiesto que aun sin inductores de la osteogénesis ( $\beta$ -glicerofosfato y ácido ascórbico) la biofuncionalización de superficies de TiO<sub>2</sub> con CAP-p15 promovió un mayor número de nódulos de calcio en cultivo celular.

Cuando un implante es colocado, su superficie queda expuesta a una serie de interacciones físicas y bioquímicas, por tanto, los tratamientos en la superficie se encuentran destinados a mejorar la oseointegración. La modificación química a partir de la adición de secuencias peptídicas juega un papel determinante en la diferenciación celular a través de cambios en la rugosidad y química de las superficies. La química superficial de superficies de TiO<sub>2</sub> tratadas con péptidos bioactivos, tienen en general buena respuesta en cuanto a la velocidad y aumento en el número de tejido óseo formado. De acuerdo con Zhou *et al.* (81) la funcionalización con un péptido derivado de la fibrina (BFP-1) en nanotubos de TiO<sub>2</sub> tuvo gran impacto en la producción de ALP dentro de las primeras dos semanas de cultivo celular. ALP es una enzima imprescindible dentro del proceso de mineralización, su función se encuentra asociada a hidrólisis de monoésteres de fosfato a pH básico, suministrando

de esta forma, los grupos fosfato necesarios para la nucleación de los cristales de apatita. Esto se ha visto en péptidos como PPFEGCIWN o DN3 (14,82) los cuales además de promover una mayor adhesión dentro de las primeras 24 horas, también incitan una alta actividad de ALP y una alta expresión de marcadores asociados a la mineralización. Los resultados presentados en este trabajo indican que CAP-p15 promueve una mayor actividad de esta enzima desde el día 3 de cultivo celular a diferencia del grupo control.

La formación ósea, es un proceso complejo que requiere varios patrones de expresión génica estrechamente regulados. A nivel de RNAm la funcionalización con CAP-p15 induce la diferenciación de osteoprogenitores en las hOMSC a partir de la identificación de genes asociados a fenotipo mineralizante como RUNX2, BSP, BMP-2 y OCN. El factor de transcripción RUNX2 mostró una sobreexpresión en superficies tratadas con el péptido en etapas tempranas, la importancia del gen que codifica para RUNX2 se basa en su capacidad para inducir la diferenciación de osteoprogenitores para promover un fenotipo mineralizante (83,84). Como podemos constatar en la figura 13, desde el día 3 de cultivo, se aprecia un ligero aumento en las superficies tratadas con CAP-p15, teniendo un pico máximo de expresión, que decae a partir de la segunda semana de cultivo. La importancia de este factor de transcripción se vincula a la inducción de la expresión de genes asociados a osteoblastos maduros como COL 1, ON, OPN, OCN y BSP necesarias para la maduración ósea, es decir, el paso de preosteoblasto a osteoblasto maduro. La sialoproteína ósea (BSP), es un importante biomarcador en estadios tempranos de diferenciación osteogénica, debido a su capacidad de actuar como un potente nucleador de cristales de hidroxiapatita, unión y diferenciación celular, tuvo un aumento en su expresión respecto al tiempo, mientras que en el caso de OCN, éste mostró una sobreexpresión a los 7 días de cultivo celular, alcanzando un pico máximo a los 14 días, esto como resultado del inicio del proceso de maduración de la matriz (85). En cuanto a la expresión de BMP-2, ésta tuvo un incremento sostenido a lo largo de los días de cultivo celular, mostrando un pico máximo de expresión a los 14 días en contraparte con el grupo control, lo cual es congruente con lo reportado por Ghosh-Choudhury (86). BMP-2 es un potente inductor de la formación ósea a través de la estimulación de diferenciación osteoblástica. A nivel proteína, la funcionalización de TiO<sub>2</sub> con la secuencia derivada de CAP induce un aumento en la expresión de los marcadores evaluados. Los resultados indican que la funcionalización con CAP-p15 induce la sobre regulación de estas proteínas asociadas al proceso de mineralización en cultivo celular. Moléculas como RUNX2, están fuertemente asociadas con la diferenciación de células troncales, conduciendo a un fenotipo osteogénico,

promoviendo la diferenciación y expresión de genes osteoblásticos clave como la BSP, OPN y COL1.

La BMP-2, es una molécula asociada a estadios tempranos de biomineralización, capaz de inducir la diferenciación de los osteoblastos y la formación de hueso mostrando un patrón similar al de la BSP, con una expresión proteica máxima en el día 3 de cultivo y posterior declive hasta el día 14. La regulación del proceso de biomineralización permite que a medida que ciertos marcadores son altamente expresados en ciertos estadios, otros muestran una menor proporción en su expresión, por ejemplo, BMP-2 y BSP mostraron una alta expresión en la primera semana de cultivo a diferencia de OCN, por otro lado, OCN fue altamente expresada después de que BMP-2 disminuyera su expresión. Estos resultados son similares a un estudio realizado por Choi et al (87) en donde obtuvieron patrones similares utilizando células derivadas del ligamento periodontal. En el caso de moléculas como la OCN, su expresión está en relación con la remodelación ósea, por lo tanto, la expresión temprana y tardía de este gen en superficies tratadas con CAP-p15, revela su papel no sólo en la formación ósea sino también en la maduración de la matriz, esto lo podemos relacionar con los resultados obtenidos a partir de la tinción de alizarina roja, en donde a los 14 días se aprecia una matriz mineralizante madura.

Este comportamiento se ha observado en péptidos como RGD. El aumento de la proliferación celular como podemos observar en este trabajo podría motivar una rápida confluencia y por tanto inducir una rápida diferenciación y mineralización sobre superficies de TiO<sub>2</sub>.

Con base en los resultados obtenidos a partir de su análisis *in silico* en trabajos previos (18), CAP-p15 se presenta como un péptido de naturaleza acídica, capacidad que comparte con otros péptidos como ESQES/QESQSEQDS provenientes de la DMP1 usados en la funcionalización de superficies de Ti, y que al igual que nuestra secuencia promovieron la nucleación de apatitas y una mejor respuesta celular. Sin embargo, en su caso particular, estas moléculas fueron ancladas a superficies de titanio utilizando unión covalente a partir de 3-(4-aminofenil) ácido propiónico (APPA) y 3-ácido mercaptopropiónico (MPA) utilizando concentraciones de 1 mg/mL (12). Otro ejemplo de péptido de naturaleza acídica es la secuencia Ln2-P3 proveniente de la laminina cuya adsorción física tuvo un impacto positivo en la adhesión y expresión de marcadores de diferenciación osteoblástica (82).

En este proyecto, demostramos que la funcionalización de superficies de TiO<sub>2</sub> a partir de la adsorción física del péptido CAP-p15 a una concentración de 1 µg/mL, ha tenido la

capacidad de actuar como una molécula que dirige la nucleación de apatitas (73) así como promover los procesos de adhesión, proliferación y diferenciación de las hOMSC, sin necesidad de ser anclada de manera covalente a dichas superficies

La adsorción física de CAP-p15 a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  resulta eficaz para llevar a cabo la promoción de proliferación y diferenciación celular. Sin embargo, se necesitan llevar a cabo más estudios que corroboren este mismo efecto en modelos más complejos.

Hoy en día el mecanismo por el cual CAP-p15 actúa sobre la diferenciación hacia un fenotipo mineralizante es desconocido; sin embargo, los resultados mostrados en este trabajo concluyen un claro efecto positivo en cuanto a proliferación, adhesión y diferenciación. Se ha demostrado que algunos péptidos son capaces de inducir señales intracelulares una vez que son reconocidos por la superficie celular, por ejemplo el péptido DN3 (PPFEGCIWN) derivado de la laminina, es capaz de unirse al receptor transmembranal  $\alpha 3\beta 1$  activando mecanismos intracelulares capaces de acelerar los procesos de adhesión y diferenciación celular (14) , otro ejemplo es la activación de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  reconocida por el hexapéptido GFOGER derivado de la colágena (se une de manera selectiva a la integrina) el cual, es crucial en la inducción de señales intracelulares que activan la diferenciación y la mineralización de la matriz extracelular (88). Por tanto, el siguiente paso para este proyecto se propondría a investigar el mecanismo por el cual CAP-p15 es capaz de incrementar la expresión de genes y de proteínas asociadas al proceso de mineralización.

## X. CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluó el efecto de la funcionalización de superficies de óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) con CAP-p15 sobre la diferenciación de células troncales derivadas de la mucosa oral (hOMSC) a través de una serie de ensayos que nos permitieron evaluar procesos tempranos en la interacción célula-sustrato, como adhesión y proliferación, hasta procesos más complejos como la diferenciación a partir de la identificación de marcadores asociados a ella.

La adsorción de la secuencia aminoacídica CAP-p15 a superficies de  $\text{TiO}_2$  favoreció la adhesión celular posterior a las 24 h. Cabe mencionar que este ensayo se realizó sin la presencia de SFB, esto con la finalidad de constatar que dichos procesos se debían principalmente al efecto de la adsorción de CAP-p15 sin la intervención de proteínas propias de este suplemento. Además, los sustratos funcionalizados promovieron un incremento en la proliferación celular en comparación con sustratos prístinos.

En cuanto a los resultados de diferenciación, estos indican que la biofuncionalización con CAP-p15 es una estrategia viable para promover la diferenciación hacia un fenotipo mineralizante, incrementando la actividad enzimática de ALP, así como la expresión de otros marcadores asociados a la formación y maduración de mineral como RUNX2, BSP, BMP-2 y OCN, tanto a nivel génico como a nivel proteína.

Si bien el mecanismo exacto por el cual CAP-p15 actúa aún no ha sido estudiado, se requiere realizar más estudios para una mayor comprensión de las propiedades de las superficies funcionalizadas y su influencia en la osteogénesis. Por lo que como trabajo futuro se propone lo siguiente:

- Realizar estudios de tribocorrosión, esto debido a que los implantes dentales se encuentran en un ambiente hostil y por tanto están sujetos a una serie de factores mecánicos, físicos, químicos y biológicos que pueden llegar a afectar la capa de  $\text{TiO}_2$  y por tanto hacer al metal del cuerpo del implante susceptible a un proceso de corrosión.
- Evaluar el efecto del péptido a partir de un anclaje covalente a sustratos. La adsorción física depende de interacciones iónicas o fuerzas de Van Der Waals por tanto, su anclaje al sustrato puede tornarse débil. El anclaje covalente por otro lado garantizaría la estabilidad de la secuencia.

- Evaluar el efecto de la biofuncionalización sobre superficies de implantes. Si bien el uso de superficies atómicamente planas como los nano recubrimientos depositados sobre superficies de Si (100) utilizados en este proyecto nos permiten tener un primer acercamiento, se necesitan estudios llevados a cabo en materiales usados en clínica.
- Realizar estudios que permitan conocer las posibles vías de señalización involucradas. Como mencionamos, los mecanismos exactos que se activan en presencia de CAP-p15 aún se desconocen.
- Realizar estudios sobre modelos *in vivo*.

## XI. PRODUCTOS ACADÉMICOS

### Publicaciones como primer autor

- **Ureiro-Cueto G** et al. Characterization of aTiO<sub>2</sub> surfaces functionalized with CAP-p15 peptide. *J Biomed Mater Res.* 2024;1-13. doi:10.1002/jbm.a.37676
- **Ureiro-Cueto G** et al. Amorphous titanium oxide (aTiO<sub>2</sub>) thin films biofunctionalized with CAP-p15 induce mineralized-like differentiation of human oral mucosal stem cells (hOMSCs). *Biomed Mater.* 2024 Jul 4;19(5). doi: 10.1088/1748-605X/ad5bab.
- **Ureiro-Cueto G** et al. Assessing the impact of CAP-p15 functionalization on the bioactivity of rough TiO<sub>2</sub>-coated 316L stainless steel surfaces. *En proceso editorial*

### Agradecimientos en artículos

- Juárez-Gallegos, Julieta et al. "Characterization of pulp calcifications and changes in their composition after treatments with citric acid and ethylenediaminetetraacetic acid solutions." *Microscopy research and technique.* vol. 86,1 (2023): 41-52. doi:10.1002/jemt.24255

### Participaciones en congresos

#### Como ponencia

- "TiO<sub>2</sub> surface biofunctionalization with CAP-p15 peptide". **Guadalupe del Carmen Ureiro Cueto**. Segundo Encuentro Académico en línea de la IADR División Mexicana de la International Association for Dental Research, 2021. Idioma inglés
- "TiO<sub>2</sub> surface biofunctionalization with CAP-p15 peptide" **Guadalupe del Carmen Ureiro Cueto**. IADR Hatton competition, Chengdu, China, 2022. Categoría Senior-basic science. Idioma inglés

- *"Effect of aTiO<sub>2</sub> surfaces functionalized with a novel peptide derived from cementum attachment protein on osteogenic differentiation of human oral mucosal stem cells"*  
**Guadalupe del Carmen Ureiro Cueto.** 2° Congreso Estatal de Estudiantes de Ciencia e Ingeniería de Materiales (CEECIM), CDMX, 2023. Idioma inglés
- *"Effect of aTiO<sub>2</sub> surfaces functionalized with a novel peptide derived from cementum attachment protein on osteogenic differentiation of human oral mucosal stem cells"*  
**Guadalupe del Carmen Ureiro Cueto.** 31<sup>st</sup> International Materials Research Congress. Cancún, México, 2023. Idioma inglés

### **Premios y distinciones**

- Primer lugar del concurso Hatton de la división mexicana de la IADR 2021 con el proyecto titulado: "*TiO<sub>2</sub> surface biofunctionalization with CAP-p15 peptide*" en la categoría Senior- basic science.
- Mención honorífica con el proyecto titulado: "*Effect of aTiO<sub>2</sub> surfaces functionalized with a novel peptide derived from cementum attachment protein on osteogenic differentiation of human oral mucosal stem cells*" en el 2° Congreso Estatal de Estudiantes de Ciencia e Ingeniería de Materiales (CEECIM), CDMX, 2023.

### **Estancia internacional de investigación**

Estancia Internacional de investigación durante el séptimo semestre de doctorado, en el Instituto de Biomateriales (**Lehrstuhl Biomaterialien**) en la Friedrich-Alexander-Universität (FAU), Erlangen-Nürnberg, Alemania, como **investigador invitado** bajo la tutoría del Prof. Dr.-Ing. habil. Dr. h.c. **Aldo R. Boccaccini**.

## XII. REFERENCIAS

1. Ali S, Irfan M, Niazi UM, Rani AMA, Rashedi A, Rahman S, et al. Microstructure and Mechanical Properties of Modified 316L Stainless Steel Alloy for Biomedical Applications Using Powder Metallurgy. *Materials*. 2022 Apr 12;15(8):2822.
2. Bekmurzayeva A, Duncanson WJ, Azevedo HS, Kanayeva D. Surface modification of stainless steel for biomedical applications: Revisiting a century-old material. *Materials Science and Engineering: C*. 2018 Dec;93:1073–89.
3. Wang G, Li J, Lv K, Zhang W, Ding X, Yang G, et al. Surface thermal oxidation on titanium implants to enhance osteogenic activity and in vivo osseointegration. *Sci Rep*. 2016 Aug 22;6(1):31769.
4. Kupka JR, König J, Al-Nawas B, Sagheb K, Schiegnitz E. How far can we go? A 20-year meta-analysis of dental implant survival rates. *Clin Oral Investig*. 2024 Sep 21;28(10):541.
5. Gittens RA, Scheideler L, Rupp F, Hyzy SL, Geis-Gerstorfer J, Schwartz Z, et al. A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects. *Acta Biomater*. 2014 Jul;10(7):2907–18.
6. Gittens RA, Olivares-Navarrete R, Cheng A, Anderson DM, McLachlan T, Stephan I, et al. The roles of titanium surface micro/nanotopography and wettability on the differential response of human osteoblast lineage cells. *Acta Biomater*. 2013 Apr;9(4):6268–77.
7. Martinez MAF, Balderrama Í de F, Karam PSBH, de Oliveira RC, de Oliveira FA, Grandini CR, et al. Surface roughness of titanium disks influences the adhesion, proliferation and differentiation of osteogenic properties derived from human. *Int J Implant Dent*. 2020 Dec 25;6(1):46.
8. Choi WY, Lee JK, Choi DS, Jang I. Improved osseointegration of dental titanium implants by TiO<sub>2</sub> nanotube arrays with recombinant human bone morphogenetic protein-2: a pilot in vivo study. *Int J Nanomedicine*. 2015 Feb;1145.
9. Zheng H, Xu L, Jiao Y, Xia Y, Wu X, Lu K, et al. Fabrication and surface characterization of titanium dioxide nanotubes on titanium implants. *Front Mater*. 2023 Dec 14;10.
10. Alas GR, Agarwal R, Collard DM, García AJ. Peptide-functionalized poly[oligo(ethylene glycol) methacrylate] brushes on dopamine-coated stainless steel for controlled cell adhesion. *Acta Biomater*. 2017 Sep;59:108–16.
11. Oh S, Moon KS, Lee SH. Effect of RGD Peptide-Coated TiO<sub>2</sub> Nanotubes on the Attachment, Proliferation, and Functionality of Bone-Related Cells. *J Nanomater*. 2013 Jan 4;2013(1).
12. Trino LD, Bronze-Uhle ES, Ramachandran A, Lisboa-Filho PN, Mathew MT, George A. Titanium surface bio-functionalization using osteogenic peptides: Surface chemistry, biocompatibility, corrosion and tribocorrosion aspects. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018 May;81:26–38.
13. Cirera A, Sevilla P, Manzanares MC, Franch J, Galindo-Moreno P, Gil J. Osseointegration around dental implants biofunctionalized with TGFβ-1 inhibitor peptides: an in vivo study in beagle dogs. *J Mater Sci Mater Med*. 2020 Aug 21;31(8):62.
14. Kim S, Choi JY, Jung S, Kang H, Min BM, Yeo IS. A Laminin-Derived Functional Peptide, PPFEGCIWN, Promotes Bone Formation on Sandblasted, Large-Grit, Acid-Etched Titanium Implant Surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2019 Jul;34(4):838–44.

15. Jurczak P, Witkowska J, Rodziewicz-Motowidło S, Lach S. Proteins, peptides and peptidomimetics as active agents in implant surface functionalization. *Adv Colloid Interface Sci.* 2020 Feb;276:102083.
16. Sevilla P, Cirera A, Dotor J, Gil FJ, Galindo-Moreno P, Aparicio C. In vitro cell response on CP-Ti surfaces functionalized with TGF- $\beta$ 1 inhibitory peptides. *J Mater Sci Mater Med.* 2018 Jun 23;29(6):73.
17. SIWAKUL P, SIRINNAPHAKORN L, SUWANPRATEEP J, HAYAKAWA T, PUGDEE K. Cellular responses of histatin-derived peptides immobilized titanium surface using a tresyl chloride-activated method. *Dent Mater J.* 2021 Jul 25;40(4):2020–307.
18. Ureiro-Cueto G, Rodil SE, Santana-Vázquez M, Hoz-Rodríguez L, Arzate H, Montoya-Ayala G. Characterization of  $\text{aTiO}_2$  surfaces functionalized with CAP-p15 peptide. *J Biomed Mater Res A.* 2024 Jan 29;
19. Marin E, Boschetto F, Pezzotti G. Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. *J Biomed Mater Res A.* 2020 Aug 31;108(8):1617–33.
20. Kandavalli SR, Wang Q, Ebrahimi M, Gode C, Djavanroodi F, Attarilar S, et al. A Brief Review on the Evolution of Metallic Dental Implants: History, Design, and Application. *Front Mater.* 2021 May 13;8.
21. Quinn J, McFadden R, Chan CW, Carson L. Titanium for Orthopedic Applications: An Overview of Surface Modification to Improve Biocompatibility and Prevent Bacterial Biofilm Formation. *iScience.* 2020 Nov;23(11):101745.
22. Narushima T, Ueda K, Alfirano. Co-Cr Alloys as Effective Metallic Biomaterials. In 2015. p. 157–78.
23. Stewart C, Akhavan B, Wise SG, Bilek MMM. A review of biomimetic surface functionalization for bone-integrating orthopedic implants: Mechanisms, current approaches, and future directions. *Prog Mater Sci.* 2019 Dec;106:100588.
24. Ma T, Ge X, Zhang Y, Lin Y. Effect of Titanium Surface Modifications of Dental Implants on Rapid Osseointegration. In: *Interface Oral Health Science 2016.* Singapore: Springer Singapore; 2017. p. 247–56.
25. Sultana N, Nishina Y, Nizami MZI. Surface Modifications of Medical Grade Stainless Steel. *Coatings.* 2024 Feb 20;14(3):248.
26. Brooks EK, Brooks RP, Ehrensberger MT. Effects of simulated inflammation on the corrosion of 316L stainless steel. *Materials Science and Engineering: C.* 2017 Feb;71:200–5.
27. Al Jabbari YS. Physico-mechanical properties and prosthodontic applications of Co-Cr dental alloys: a review of the literature. *J Adv Prosthodont.* 2014;6(2):138.
28. Mani G, Porter D, Collins S, Schatz T, Ornberg A, Shulfer R. A review on manufacturing processes of cobalt-chromium alloy implants and its impact on corrosion resistance and biocompatibility. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2024 Jun 30;112(6).
29. Oi LE, Choo MY, Lee HV, Ong HC, Hamid SBA, Juan JC. Recent advances of titanium dioxide ( $\text{TiO}_2$ ) for green organic synthesis. *RSC Adv.* 2016;6(110):108741–54.
30. Zwolak I. Vanadium carcinogenic, immunotoxic and neurotoxic effects: a review of *in vitro* studies. *Toxicol Mech Methods.* 2014 Jan 23;24(1):1–12.
31. Zaffe D, Bertoldi C, Consolo U. Accumulation of aluminium in lamellar bone after implantation of titanium plates, Ti-6Al-4V screws, hydroxyapatite granules. *Biomaterials.* 2004 Aug;25(17):3837–44.

32. Mouhyi J, Dohan Ehrenfest DM, Albrektsson T. The Peri-Implantitis: Implant Surfaces, Microstructure, and Physicochemical Aspects. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2012 Apr 22;14(2):170–83.
33. Tengvall P, Elwing H, Sjöqvist L, Lundström I, Bjursten LM. Interaction between hydrogen peroxide and titanium: a possible role in the biocompatibility of titanium. *Biomaterials*. 1989 Mar;10(2):118–20.
34. Albrektsson T, Wennerberg A. On osseointegration in relation to implant surfaces. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2019 Mar 28;21(S1):4–7.
35. T. A, C. J. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal*. 2001 Oct 1;10(0):S96–101.
36. Smeets R, Stadlinger B, Schwarz F, Beck-Broichsitter B, Jung O, Precht C, et al. Impact of Dental Implant Surface Modifications on Osseointegration. *Biomed Res Int*. 2016;2016:1–16.
37. Ochsenbein A, Chai F, Winter S, Traisnel M, Breme J, Hildebrand HF. Osteoblast responses to different oxide coatings produced by the sol–gel process on titanium substrates. *Acta Biomater*. 2008 Sep;4(5):1506–17.
38. Zhao X, Zhang X, Zhou Z, Meng F, Liu R, Zhang M, et al. Atomic layer deposited TiO<sub>2</sub> nanofilm on titanium implant for reduced the release of particles. *Front Bioeng Biotechnol*. 2024 Apr 26;12.
39. Wen X, Liu Y, Xi F, Zhang X, Kang Y. Micro-arc oxidation (MAO) and its potential for improving the performance of titanium implants in biomedical applications. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023 Nov 7;11.
40. Fernández-Lizárraga M, García-López J, Rodil SE, Ribas-Aparicio RM, Silva-Bermudez P. Evaluation of the Biocompatibility and Osteogenic Properties of Metal Oxide Coatings Applied by Magnetron Sputtering as Potential Biofunctional Surface Modifications for Orthopedic Implants. *Materials*. 2022 Jul 29;15(15):5240.
41. Lupi SM, Albin B, Rodriguez y Baena A, Lanfrè G, Galinetto P. Anatase Forming Treatment without Surface Morphological Alteration of Dental Implant. *Materials*. 2020 Nov 22;13(22):5280.
42. Silva-Bermudez P, Almaguer-Flores A, Garcia VI, Olivares-Navarrete R, Rodil SE. Enhancing the osteoblastic differentiation through nanoscale surface modifications. *J Biomed Mater Res A*. 2017 Feb 31;105(2):498–509.
43. Almaguer-Flores A, Silva-Bermudez P, Galicia R, Rodil SE. Bacterial adhesion on amorphous and crystalline metal oxide coatings. *Materials Science and Engineering: C*. 2015 Dec;57:88–99.
44. Kelly PJ, Arnell RD. Magnetron sputtering: a review of recent developments and applications. *Vacuum*. 2000 Mar;56(3):159–72.
45. Cho CB, Jung SY, Park CY, Kang HK, Yeo ISL, Min BM. A Vitronectin-Derived Bioactive Peptide Improves Bone Healing Capacity of SLA Titanium Surfaces. *Materials*. 2019 Oct 17;12(20):3400.
46. Schliephake H, Scharnweber D. Chemical and biological functionalization of titanium for dental implants. *J Mater Chem*. 2008;18(21):2404.
47. Decher G, Hong JD, Schmitt J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films*. 1992 Apr;210–211:831–5.

48. Halthur TJ, Claesson PM, Elofsson UM. Immobilization of Enamel Matrix Derivate Protein onto Polypeptide Multilayers. Comparative in Situ Measurements Using Ellipsometry, Quartz Crystal Microbalance with Dissipation, and Dual-Polarization Interferometry. *Langmuir*. 2006 Dec 1;22(26):11065–71.
49. Nawae S, Meesane J, Muensit N, Daengngam C. Layer-by-layer self-assembled films of silk fibroin/collagen/poly (diallyldimethylammonium chloride) as nucleating surface for osseointegration to design coated dental implant materials. *Mater Des*. 2018 Dec;160:1158–67.
50. Bae EB, Yoo JH, Jeong SI, Kim MS, Lim YM, Ahn JJ, et al. Effect of Titanium Implants Coated with Radiation-Crosslinked Collagen on Stability and Osseointegration in Rat Tibia. *Materials*. 2018 Dec 11;11(12):2520.
51. Al-Jarsha M, Moulisova V, Leal-Egana A, Connell A, Naudi KB, Ayoub A, et al. Engineered coatings for titanium implants to present ultra-low doses of BMP-7. *ACS Biomater Sci Eng*. 2018 Apr 22;acsbiomaterials.7b01037.
52. Enemchukwu NO, García AJ. 4.13 Peptide- and Protein-Modified Surfaces ☆. In: *Comprehensive Biomaterials II*. Elsevier; 2017. p. 200–20.
53. Gitelman A, Rapaport H. Bifunctional Designed Peptides Induce Mineralization and Binding to TiO<sub>2</sub>. *Langmuir*. 2014 Apr 29;30(16):4716–24.
54. Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*. 1984 May;309(5963):30–3.
55. Yang M, Zhang ZC, Liu Y, Chen YR, Deng RH, Zhang ZN, et al. Function and Mechanism of RGD in Bone and Cartilage Tissue Engineering. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021 Dec 15;9.
56. Kämmerer P, Heller M, Brieger J, Klein M, Al-Nawas B, Gabriel M. Immobilisation of linear and cyclic RGD-peptides on titanium surfaces and their impact on endothelial cell adhesion and proliferation. *Eur Cell Mater*. 2011 Apr 11;21:364–72.
57. Ryu JJ, Park K, Kim HS, Jeong CM, Huh JB. Effects of Anodized Titanium with Arg-Gly-Asp (RGD) Peptide Immobilized Via Chemical Grafting or Physical Adsorption on Bone Cell Adhesion and Differentiation. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2013;28(4):963–72.
58. Ma Y, Zhang Z, Liu Y, Li H, Wang N, Liu W, et al. Nanotubes Functionalized with BMP2 Knuckle Peptide Improve the Osseointegration of Titanium Implants in Rabbits. *J Biomed Nanotechnol*. 2015 Feb 1;11(2):236–44.
59. Bab I, Gazit D, Chorev M, Muhlrad A, Shteyer A, Greenberg Z, et al. Histone H4-related osteogenic growth peptide (OGP): a novel circulating stimulator of osteoblastic activity. *EMBO J*. 1992 May;11(5):1867–73.
60. Arzate H, Zeichner-David M, Mercado-Celis G. Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. *Periodontol 2000*. 2015 Feb 12;67(1):211–33.
61. Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol 2000*. 1997 Feb 23;13(1):41–75.
62. Saito M, Iwase M, Maslan S, Nozaki N, Yamauchi M, Handa K, et al. Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone*. 2001 Sep;29(3):242–8.

63. Foster BL. On the discovery of cementum. *J Periodontal Res.* 2017 Aug 6;52(4):666–85.
64. Pitaru S, Savion N, Hekmati H, Olson S, Narayanan SA. Molecular and cellular interactions of a cementum attachment protein with periodontal cells and cementum matrix components. *J Periodontal Res.* 1993 Nov 30;28(7):560–2.
65. Narayanan AS, Ikezawa K, Wu D, Pitaru S. Cementum Specific Components Which Influence Periodontal Connective Tissue Cells. *Connect Tissue Res.* 1995 Jan 7;33(1–3):19–21.
66. Handa K, Saito M, Tsunoda A, Yamauchi M, Hattori S, Sato S, et al. Progenitor Cells From Dental Follicle Are Able to Form Cementum Matrix In Vivo. *Connect Tissue Res.* 2002 Jan 6;43(2–3):406–8.
67. Arzate H, Olson SW, Page RC, Gown AM, Narayanan AS. Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *The FASEB Journal.* 1992 Aug;6(11):2990–5.
68. McAllister B, Narayanan AS, Miki Y, Page RC. Isolation of a fibroblast attachment protein from cementum. *J Periodontal Res.* 1990 Mar 30;25(2):99–105.
69. Montoya G, Arenas J, Romo E, Zeichner-David M, Alvarez M, Narayanan AS, et al. Human recombinant cementum attachment protein (hrPTPLa/CAP) promotes hydroxyapatite crystal formation in vitro and bone healing in vivo. *Bone.* 2014 Dec;69:154–64.
70. Montoya G. Estudio de cristales inducidos con el péptido de la proteína de adhesión del cemento radicular (CAP) en un sistema libre de células. [Ciudad de México]: UNAM; 2015.
71. 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). [Ciudad de México]: UNAM; 2014.
72. Cortez S. Péptido derivado de CAP para el tratamiento de la osteoporosis en un modelo animal. [Ciudad de México]: UNAM; 2017.
73. Ureiro GDC. 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. [Ciudad de México]: UNAM; 2020.
74. Lotz EM, Olivares-Navarrete R, Berner S, Boyan BD, Schwartz Z. Osteogenic response of human MSCs and osteoblasts to hydrophilic and hydrophobic nanostructured titanium implant surfaces. *J Biomed Mater Res A.* 2016 Dec;104(12):3137–48.
75. Metavarayuth K, Sitasuwan P, Zhao X, Lin Y, Wang Q. Influence of Surface Topographical Cues on the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Vitro. *ACS Biomater Sci Eng.* 2016 Feb 8;2(2):142–51.
76. d'Angelo M, Benedetti E, Tupone MG, Catanesi M, Castelli V, Antonosante A, et al. The Role of Stiffness in Cell Reprogramming: A Potential Role for Biomaterials in Inducing Tissue Regeneration. *Cells.* 2019 Sep 5;8(9):1036.
77. Hong Y, Yu M, Lin J, Cheng K, Weng W, Wang H. Surface hydroxyl groups direct cellular response on amorphous and anatase TiO<sub>2</sub> nanodots. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014 Nov;123:68–74.
78. Marynka-Kalmani K, Treves S, Yafee M, Rachima H, Gafni Y, Cohen MA, et al. The Lamina Propria of Adult Human Oral Mucosa Harbors a Novel Stem Cell Population. *Stem Cells.* 2010 May 1;28(5):984–95.

79. Ganz J, Shor E, Guo S, Sheinin A, Arie I, Michaelevski I, et al. Implantation of 3D Constructs Embedded with Oral Mucosa-Derived Cells Induces Functional Recovery in Rats with Complete Spinal Cord Transection. *Front Neurosci*. 2017 Oct 31;11.
80. Ganz J, Arie I, Ben-Zur T, Dadon-Nachum M, Pour S, Araidy S, et al. Astrocyte-Like Cells Derived From Human Oral Mucosa Stem Cells Provide Neuroprotection In Vitro and In Vivo. *Stem Cells Transl Med*. 2014 Mar 1;3(3):375–86.
81. Zhou C, Zhang D, Zou J, Li X, Zou S, Xie J. Substrate Compliance Directs the Osteogenic Lineages of Stem Cells from the Human Apical Papilla via the Processes of Mechanosensing and Mechanotransduction. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019 Jul 24;11(29):26448–59.
82. Choi J, Kim S, Jo S Bin, Kang HK, Jung SY, Kim SW, et al. A laminin-211-derived bioactive peptide promotes the osseointegration of a sandblasted, large-grit, acid-etched titanium implant. *J Biomed Mater Res A*. 2020 May 14;108(5):1214–22.
83. Zhang L, Liao X, Fok A, Ning C, Ng P, Wang Y. Effect of crystalline phase changes in titania (TiO<sub>2</sub>) nanotube coatings on platelet adhesion and activation. *Materials Science and Engineering: C*. 2018 Jan;82:91–101.
84. Arroyo R, López S, Romo E, Montoya G, Hoz L, Pedraza C, et al. Carboxy-Terminal Cementum Protein 1-Derived Peptide 4 (cemp1-p4) Promotes Mineralization through wnt/ $\beta$ -catenin Signaling in Human Oral Mucosa Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2020 Feb 15;21(4):1307.
85. Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD. In vitro osteogenesis assays: Influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathologie Biologie*. 2009 Jun;57(4):318–23.
86. Ghosh-Choudhury N, Harris MA, Feng JQ, Mundy GR, Harris SE. Expression of the BMP 2 Gene during Bone Cell Differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 1994;4(2–3):345–55.
87. Choi MH, Noh WC, Park JW, Lee JM, Suh JY. Gene expression pattern during osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells *in vitro*. *J Periodontal Implant Sci*. 2011;41(4):167.
88. Reyes CD, Petrie TA, Burns KL, Schwartz Z, García AJ. Biomolecular surface coating to enhance orthopaedic tissue healing and integration. *Biomaterials*. 2007 Jul;28(21):3228–35.