

Biofuncionalización de titanio con Laminina 332 para mejorar sellado biológico de implantes dentales.

CARLOS EDUARDO FAJARDO ESCOLAR

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA- MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
BOGOTÁ DC - AGOSTO - 2020**

HOJA DE IDENTIFICACIÓN

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Maestría en Ciencias Odontológicas
Título:	Biofuncionalización de titanio con Laminina 332 para mejorar sellado biológico de implantes dentales.
Grupo(s) de Investigación	Unidad de Investigación Básica Oral Instituto UIBO Grupo Inmunología Celular y Molecular Universidad El Bosque INMUBO
Línea de investigación:	Biotecnología
Tipo de investigación:	Maestría /Grupo
Estudiante:	Carlos Eduardo Fajardo Escolar
Director:	Dra. Sandra Janneth Perdomo Lara. Bióloga PhD.
Codirectores:	Dr. José Francisco Ibla G. Químico.
Asesores y Análisis Estadístico	Dr. Andrés Cardona M. Bacteriólogo y laboratorista Clínico Msc.

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

TIANA CIAN LEAL	Presidente del Claustro
CAMILO ALBERTO ESCOBAR JIMÉNEZ	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL GALVIS	Rector(a)
RITA CECILIA PLATA DE SILVA	Vicerrector(a) Académico
FRANCISCO JOSÉ FALLA CARRASCO	Vicerrector Administrativo
MIGUEL OTERO CADENA	Vicerrectoría de Investigaciones.
CRISTINA MATIZ MEJÍA	Secretaria General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA TOVAR	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA MARIA ESCOBAR JIMENEZ	Director Área Bioclínica
ALEJANDRO PERDOMO RUBIO	Director Área Comunitaria
FRANCISCO PEREIRA MANRIQUE	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología
MARIA CONSUELO ROMERO	Director(a) Programa de Maestría en Ciencias Odontológicas
ANGELA VICTORIA FONSECA BENITEZ	Coordinador(a) Programa de Maestría en Ciencias Odontológicas

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a la curiosidad que me motiva cada día a ser dinámico, versátil, un “odontólogo renacentista”. A mis padres por guiarme y apoyarme en todas mis decisiones, A mi esposa y mi adorada hija motivos para ser cada instante una mejor persona.

AGRADECIMIENTOS

De manera interminable doy las gracias a la Dra. Sandra Janneth Perdomo Lara. Por evocar valores como el respeto, empatía, responsabilidad, voluntad, solidaridad, amor y gratitud. Por enseñarme que el destino de ser Docente es entender que todos los alumnos llegaran a un mismo fin cruzando el camino de forma diferente.

Ama tu ritmo y ritma tus acciones
bajo tu ley, así como tus versos;
eres un universo de universos
y tu alma una fuente de canciones.

(Ruben Dario,2010)

Extiendo mis agradecimientos a los Dr. Andrés Cardona M y Dr. José Francisco Ibla, ya que sin ellos este proyecto no habría sido posible.

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

TABLA CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	9
4. JUSTIFICACIÓN	10
5. SITUACIÓN ACTUAL	12
6. OBJETIVOS	15
6.1 Objetivo general	15
6.2 Objetivos específicos	15
7. METODOLOGÍA	16
7.1. Tipo de estudio	16
7.2. Población y muestra	16
7.3. Materiales y métodos	16
7.4 Plan de análisis estadístico	24
8. RESULTADOS	25
9. DISCUSIÓN	41
10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
11. BIBLIOGRAFÍA	49

LISTADO DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Secuencia de cebadores utilizados para evaluar expresión génica. Datos y diseños de tabla por Carlos Fajardo.	23
Tabla 2. Valores de parámetros de rugosidad antes y después de solución PH. Datos y diseños de tabla por Carlos Fajardo.	27
Tabla 3. Valores de parámetros de rugosidad en superficies funcionalizadas. Datos y diseños de tabla por Carlos Fajardo.	29
Tabla 4. Composición elemental de las superficies de titanio con APTES y glutaraldehído (GA) y con la proteína laminina 332. Datos y diseños de tabla por Carlos Fajardo.	33

LISTADO DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representación esquemática ataque químico solución piraña (PH). Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.	17
Figura 2. Representación esquemática de la Silanización de la superficie de titanio. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.	18
Figura 3. Esquema del tratamiento e inmovilización de Laminina 332. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.	19
Figura 4. Flujo experimental esquemático de la evaluación de adhesión celular. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.	23
Figura 5. Evaluación de rugosidad antes y después de tratamiento PH. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.	26
Figura 6. Comparación de parámetros Ra y Rq antes y después de tratamiento PH. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.	27
Figura 7. Gráfico bidimensional intensidades de píxeles de imágenes SEM. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.	28
Figura 8. Representación esquemática de perfiles de rugosidad. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.	29
Figura 9. Comparación de parámetros Ra y Rq antes y después de funcionalización. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.	29
Figura 10. Evaluación de rugosidad antes y después de Funcionalización. Datos y diseños de grafica por Carlos Fajardo.	30
Figura 11. Composición elemental antes y después de tratamiento PH. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.	32
Figura 12. Viabilidad celular y toxicidad de las células CAL-27. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.	34
Figura 13. Fotografía de microscopía de fluorescencia para viabilidad celular. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.	35
Figura 14. Imágenes SEM de células CAL-27. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.	37
Figura 15. Perfil de secreción de citocinas células CAL-27 con y sin laminina 332. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.	39
Figura 16. Análisis de expresión génica (RT-qPCR). Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.	40

RESUMEN

Biofuncionalización de titanio con Laminina 332 para mejorar sellado biológico de implantes dentales.

Objetivos: El Sello Biológico (SB) en implantes dentales es esencial para preservar las estructuras periimplantares tanto tejidos blandos como duros. La enfermedad periimplantar afecta cada vez más la práctica clínica odontológica. Mejorar el SB es importante para aumentar la longevidad de las restauraciones sobre implantes. Manteniendo la estética y la funcionalidad a lo largo del tiempo.

El objetivo de este estudio fue evaluar el comportamiento de queratinocitos CAL-27 en superficies de implantes bio funcionalizadas con Laminina 332.

Metodología: Se estandarizó el proceso de bio-funcionalización, se evaluó la rugosidad de superficie parámetros Ra,Rt,Rz,Rq,Rv,Rsk y Rku, microscopía electrónica de barrido (SEM),composición elemental de superficie,viabilidad y morfología celular, secreción de citocinas con citometría de flujo y expresión génica con RT-qPCR.

Resultados: los resultados de rugosidad mostraron valores positivos ($p<0,05$) en parámetros Ra,Rq y valores negativos en Rsk, Rsu,Rv después del tratamiento con solución piraña (PH). Una vez funcionalizados con laminina 332 valores menores en Ra,Rq y valores positivos de Rsk,Rku,Rv. la composición elemental mostró una variación en porcentajes de Ti,C,N,O durante los procesos, mostrando con el acoplamiento de laminina 332 aumentos en contenido de N y C correspondientes a la fijación proteica. Viabilidad celular positiva en superficies con laminina 332 a la 0,24,48h con una unión uniforme y fina con un número significativamente mayor de células. La secreción de citocinas y la expresión génica mostraron unos aumentos significativos ($p<0,05$) de IL-1a, IL-8,MCP-1, EGF, FGF,TGF VEGF.

Conclusiones: Las superficies de titanio funcionalizadas con Laminina 332 in vitro potencializan de manera significativa la superficie, la adhesión celular, y la expresión de un perfil celular y molecular reparativo.

Palabras claves: Sellado Biológico, Laminina 332, Queratinocito, implantes dentales, cicatrización.

ABSTRACT

Biofunctionalization of titanium with Laminin 332 to improve biological sealing of dental implants.

Objective: The Biological Seal (SB) in dental implants is essential to preserve the peri-implant structures, both soft and hard tissues. Peri-implant disease increasingly affects clinical dental practice. Improving SB is important to increase the longevity of implant restorations. Maintaining aesthetics and functionality over time.

The objective of this study was to evaluate the behavior of CAL-27 keratinocytes on surfaces of bio-functionalized implants with Laminin 332.

Methodology: The biofunctionalization process was standardized, the surface roughness parameters Ra, Rt, Rz, Rq, Rv, Rsk and Rku, scanning electron microscopy (SEM), surface composition, cell viability and morphology, cytokine secretion with flow cytometry, and gene expression with RT-qPCR.

Results: The roughness results showed positive values ($p < 0.05$) in Ra, Rq parameters and negative values in Rsk, Rsu, Rv after treatment with piranha (PH) solution. Once 332 lower values in Ra, Rq and positive values of Rsk, Rku, Rv were functionalized with laminin. The elemental composition showed a variation in percentages of Ti, C, N, O during the processes, showing with the coupling of laminin 332 increases in N and C content corresponding to protein binding. Positive cell viability on surfaces with laminin 332 at 0.24.48h with a uniform and fine binding with a significantly higher number of cells. Cytokine secretion and gene expression showed significant increases ($p < 0.05$) in IL-1a, IL-8, MCP-1, EGF, FGF, TGF VEGF.

Conclusions: Laminin 332 functionalized titanium surfaces in vitro significantly enhance surface, cell adhesion, and expression of a reparative cellular and molecular profile.

Key words: Biological Sealing, Laminin 332, Keratinocyte. dental implants, healing.

1. INTRODUCCIÓN

Los implantes dentales son en la actualidad la mejor alternativa protésica para la rehabilitación oral en diferentes escenarios clínicos. Basados en el proceso de oseointegración definido por Branemark *et al*, 1977, como “La conexión estructural funcional y directa la cual se logra sólo si la mucosa peri-implantaria cicatriza muy rápidamente en la región marginal, sellando a las estructuras de soporte más profundas”. Entender el comportamiento de los tejidos periimplantares (epitelio, tejido conectivo) es de gran importancia para el manejo de estos en el momento quirúrgico y estabilizarlos en el tiempo con los recursos protésicos de elección. Mantener un sellado biológico (SB) es sinónimo de éxito sobre implantes dentales, entendiendo este como el proceso de adhesión por parte de los queratinocitos y la posición paralela y ligeramente oblicua de las fibras colágeno sobre la superficie del implante o del aditamento protésico. Comportándose como el primer sistema de defensa de la mucosa peri-implantar. Sin embargo, las características y arquitectura de estos tejidos son diferentes a las que encontramos alrededor de los dientes. En una revisión histológica (Atsuta *et al*, 2016) describe las diferencias y la labilidad que se encuentra en el SB de los implantes dentales. Consecuencias de una adhesión disminuida significativamente a una tercera parte en la zona apical del epitelio periimplantar (PIE) y a una proyección de fibras conectivas paralelas o parcialmente oblicuas a la superficie del implante sin inserción de estas. A pesar de estas diferencias con las superficies dentales, el SB en implantes dentales existe y podría ser mejorado.

A nivel del PIE, estructura transmucosa que se comporta similar al epitelio de unión dental. Provee el inicio del SB y la primera línea de defensa alrededor de los implantes dentales gracias a la adhesión del epitelio. Diferentes mecanismos de adhesión a superficie que involucran los hemidesmosomas y proteínas como las integrinas - lamininas que juegan un papel primordial en este proceso. No obstante puede ser mucho menos resistente al reto bacteriano.

Diferentes técnicas se han desarrollado para mejorar el SB. Dentro de las cuales podemos encontrar tratamientos de superficie con anodización laser (Nevins *et al*, 2008), donde se evidencia una inserción de fibras conectivas a la superficie del implante a nivel del cuello. El Recubrimiento de aleación de titanio con laminina 332 también se ha observado que mejora la adhesión y proliferación de queratinocitos además de la generación de mayor número de hemidesmosomas *in vitro* (Tamura *et al*, 1997; P. Koidou *et al* 2018).

Con el objetivo de mejorar el SB en implantes dentales se desarrolló una biofuncionalización de las superficies de cortes de implantes dentales en titanio con laminina 332 fuertemente ligada y relacionada con la adhesión epitelial. Donde se estandarizó un protocolo de fijación de esta proteína y se evaluó la viabilidad celular, la señalización y el crecimiento de queratinocitos en la superficie de los implantes. Por lo tanto, el propósito de este estudio fue observar el comportamiento de queratinocitos en cortes de implantes dentales biofuncionalizados con laminina 332.

2. MARCO TEÓRICO

Las estructuras entre los implantes dentales y tejidos blandos permiten la formación de un SB con la capacidad de proteger las estructuras subyacentes mediante el cierre de la vía de comunicación entre el microambiente oral y el hueso alveolar. La evaluación de la integridad de esta interface en la detección temprana de las patologías periimplantarias podría prevenir la pérdida ósea a futuro. Además, la calidad de la interface proporciona un componente estético que responde a las necesidades de restauración.

Los tejidos mucosos o blandos peri-implantarios son el epitelio y el tejido conectivo presentes alrededor del cuello de los implantes. La definición de oseointegración para Branemark *et al*, 1977 “Es la conexión estructural funcional y directa la cual se logra sólo si la mucosa peri-implantaria cicatriza muy rápidamente en la región marginal, sellando a las estructuras de soporte más profundas”

La formación de la barrera provista por mucosa alrededor del implante dental se caracteriza por el cambio gradual de un coágulo a tejido de granulación seguido por la formación de una barrera epitelial y la maduración del tejido conectivo (Berglundh *et al*, 2007).

La mucosa que rodea los implantes forma un sello biológico comparable al epitelio de unión (JE) de los dientes. Esta unión peri-implante se compone de tres tipos de epitelio: *epitelio peri-implantar* (PIE), *epitelio del surco peri-implantar* (PISE), y *el epitelio oral* (OE). El PIE realiza una función de unión epitelial similar a la JE, y se forma del OE completamente de 2-3 semanas después de la implantación. Morfológicamente, PIE está compuesto de una capa fina de 3-4 células, y tiene inmunoglobulinas, neutrófilos, linfocitos y células plasmáticas, en un amplio espacio intercelular que protegen al tejido subyacente a factores exógenos nocivos. Al inicio de la formación del tejido peri-implantar la mucosa oral entra en contacto tanto con el pilar como con el cuerpo del del implante inmediatamente después de la colocación, después en su proceso de cicatrización en contacto se realiza sólo con el cuerpo del implante debido a la resorción ósea que ocurre alrededor del mismo debido a la inflamación que se genera en la interfaz implante-pilar. El PIE tiene una capacidad menor funcional de sellado comparado con el JE, a pesar de tener estructuras epiteliales muy similares. (Atsuta *et al*, 2016).

2.1 ARQUITECTURA SUPRACRESTAL, ESTRUCTURA EPITELIO, TEJIDO CONECTIVO HE IMPLANTE DENTAL:

La interacción entre el epitelio y la superficie de los implantes dental o de sus aditamentos protesicos aún no es totalmente clara. Las investigaciones han demostrado que la interacción entre la superficie de titanio de los implantes dentales y las células epiteliales se da mediante un mecanismo de anclaje biológico formado por hemidesmosomas y una estructura colagenosa o lámina basal de grosor menor a 200 nm. La lámina basal está formada de colágeno tipo IV y los hemidesmosomas funcionan como placas de anclaje que sujetan las células epiteliales a la lámina basal (Atsuta *et al*, 2016).

Se ha encontrado la presencia de laminina o enzimas que actúa como agente molecular adhesivo entre las células epiteliales y los diversos estratos que forman la lámina basal. La lámina basal presenta la lámina lúcida en contacto con la membrana de las células epiteliales, seguida por la lámina densa y por una estructura de glucosaminoglucanos (>200nm) llamada cuerpo lineal. Estos glucosaminoglucanos (mucopolisacáridos) que están en contacto con el implante dental tienen propiedades adhesivas y forman de por sí el anclaje biológico y representan la barrera que resiste los traumatismos que puedan presentarse a este nivel (Atsuta *et al*, 2016).

Tanto el JE como el PIE tienen una verdadera membrana basal hacia el tejido conectivo de la encía (lámina basal externa, EBL) y una sencilla (lámina basal interna, IBL) contra el esmalte. La EBL contiene las mismas estructuras observadas en las membranas basales típicas, a saber, lámina lúcida contra los queratinocitos basales y la lámina densa hacia el estroma de tejido conectivo. El IBL difiere significativamente de una membrana basal típica en términos de su composición de proteínas. Todas las proteínas clásicas de la zona de la membrana basal, incluyendo laminina 111, laminina 511, colágeno de tipo IV y VII, y perlecan, están ausentes en la IBL (Hormia *et al*, 1998). La principal proteína de adhesión celular identificada hasta el momento en la IBL es la laminina 332, que también se presenta en la EBL (Hormia *et al*, 1998, 2001; Oksonen *et al*, 2001). Sin la presencia de fibroblastos, los queratinocitos continúan expresando laminina 332, pero depositan laminina 111 y colágeno de tipo IV (Smola *et al*, 1998), imitando la situación en la zona de IBL. Recientes investigaciones han demostrado que en JE murino, las células basales en la IBL expresan 10 veces más niveles transcripcionales de laminina 332 que las EBL en el epitelio oral (Kinumatsu *et al*, 2009). La expresión de laminina 332 es estimulada por varios factores de crecimiento y citocinas, incluyendo

TGF β 1, factor de necrosis tumoral- α , factor de crecimiento de queratinocitos, EGF, y el interferón- γ (Kainulainen *et al*, 1998;. Amano *et al*, 2004).

Muchos de estos factores se expresan constitutivamente en la JE y puede, por lo tanto, ser responsable de la abundancia de la laminina 332 en el IBL (Li *et al*, 2005; Ghannad *et al*, 2008). Curiosamente, 2 proteínas que no se encuentran comúnmente en otras membranas , a saber, el colágeno tipo VIII y versicano, también se han informado de que se presente en la interfaz de JE-diente (Salonen *et al*, 1991; Abiko *et al* , 2001). Además, otras proteínas también pueden estar presentes, tales como la tenascina-C (Ghannad *et al*, 2008).

En general, los queratinocitos basales incluyendo las células epiteliales de la JE, interactúan con los dominios LG C-terminal de la cadena α 3 de laminina 332 a través de integrinas α 3 β 1 y α 6 β 4. La integrina α 6 β 4 es una proteína importante de los hemidesmosomas, donde se une a laminina 332 (Litjens *et al*, 2006). Esta unión no sólo es compatible con la forma de adhesión de los queratinocitos basales, también mantiene la proliferación celular (Murgia *et al*, 1998). En el IBL, la α 6 β 4 integrina co-localiza con laminina 332 (Hormia *et al*, 1992, 2001), lo que sugiere que su interacción es el principal mecanismo que sostiene el JE unido al tejido mineralizado. Intracelularmente, se une integrina α 6 β 4 a la proteína plectina a un complejo que acomula B180 y B230 (Hormia *et al*, 2001;. Litjens *et al*, 2006), interacciones que apoyan la estabilidad mecánica de los hemidesmosomas.

Durante la migración coronal de las células directamente adheridas al diente o células DAT, los hemidesmosomas son desensamblados para permitir el movimiento celular. Aunque la regulación de este proceso en JE no se entiende completamente, se cree que comienza con la fosforilación de la integrina B4 en su dominio citoplásmico, que conduce a una disociación entre la integrina B4 y plectina (Litjens *et al*, 2006;. Wilhelmsen *et al*, 2007). La comprensión de cómo los queratinocitos migran en el IBL es también un reto, ya que el único ligando "certificado" de la matriz extracelular ECM que está constantemente presente en ese lugar es la laminina 332, cuya etapa de procesamiento proteolítico sigue siendo desconocido.

Las integrinas son una familia heterodimérica de glicoproteínas que actúan como receptores de adhesión celular que se unen a los ligandos de la matriz extracelular, tales como laminina fibronectina y colágeno. Las integrinas contienen dos tipos de cadenas distintas, la subunidad α (alfa) y la subunidad β (beta), que se unen de forma no covalente. Dentro de la célula, los dominios citoplásmicos de las integrinas están asociados con proteínas del citoesqueleto. Las integrinas pueden activarse mediante la unión de ligando o a través de procesos intracelulares. Las integrinas median la

información de la matriz extracelular (ECM) en la célula en un proceso de dos vías que regula la expresión génica, proliferación celular, y la migración celular (Kinumatsu *et al*, 2009).

2.2 UNIÓN DENTOGINGIVAL

La importancia de los tejidos dentogingivales y los diversos componentes funcionales de las propiedades de barrera se comprenden bastante bien. La unión dentogingival, la interfaz entre el implante dental y la encía que juega un papel en la homeostasis del tejido y la protección de los tejidos blandos subyacente del medio oral, es una adaptación de la mucosa oral que comprende los componentes del tejido epitelial y conectivo.

El epitelio está dividido en tres compartimentos funcionales, a saber, el epitelio oral, surcular y el epitelio de unión mientras que el tejido conectivo se divide en los componentes superficiales y profundos (Nanci y Bosshardt, 2006). Estas estructuras de la membrana basal son similares en composición a otras membranas basales con colágeno de tipo IV y laminina siendo los dos componentes principales. Una lámina basal interna se encuentra entre el epitelio y la superficie del implante o del aditamento protésico y actúa como una interfaz a través del cual el epitelio de unión está unido a la superficie del implante (Gould *et al*, 1981), esta lámina basal es una matriz extracelular especializada que contiene laminina (laminina 332), una proteína de la matriz que media la adhesión celular y regula la polarización y la migración de los queratinocitos (Frank y Carter, 2004).

El epitelio de unión juega un papel fundamental en el sellado de tejidos periodontales desde el entorno oral y por lo tanto su integridad es esencial para mantener la mucosa peri-implantaria sana. No hay duda de que los tejidos peri-implantares forman un sello biológico entre el medio ambiente oral, el hueso y la superficie del implante (Cochran *et al*, 1994, 1997). Este sello es frágil y cuando se someten a la exposición bacteriana o trauma mecánico, debido a la ausencia de fibras del ligamento periodontal, la destrucción del tejido periimplantar puede ser un proceso más rápido y más devastador que en el tejido periodontal (Salcetti *et al*, 1997, Maksoud 2003). Mejorar la unión formada por los tejidos blandos periimplantares, especialmente el de la interfase de tejido conectivo a titanio, puede ser un factor importante en la supervivencia y éxito de los implantes dentales. A este respecto, se han propuesto varios métodos para mejorar la calidad de la interfaz de tejidos blandos incluyendo características de diseño micro y macro de la porción transmucosa del implante (Glauser *et al*, 2005).

En el caso de los dientes naturales, la inserción de tejido conectivo es apical a la JE y resiste a la invasión física de bacterias, proporcionando una fuerte inserción entre las fibras del ligamento periodontal y el cemento, a través de fibras de colágeno tipo III. Sin embargo, alrededor de un implante hay muchas fibras de colágeno tipo V resistente a la colagenasa que podría funcionar como una barrera mecánica para la invasión bacteriana, sin embargo, como el tejido conectivo alrededor de los implantes está generalmente en una condición inflamatoria crónica lo que impide que su estructura intercepte o defienda al tejido ante el reto bacteriano. Además, los patrones de orientación de las fibras y la fijación del epitelio al implante y el diente son fundamentalmente diferentes a causa de la ausencia de cemento y ligamento periodontal alrededor de los implantes. La orientación de las fibras en el tejido conectivo alrededor de los dientes naturales es perpendicular a la superficie de la raíz, en los implantes dentales estas corren paralelas a la superficie. Este débil sellado de tejido conectivo alrededor del implante puede acelerar la recesión horizontal (S. Groeger y J. Meyle, 2019).

La función de tejido conectivo alrededor de los implantes y el diente no es sólo para cumplir la función de protección, sino también para el suministro de nutrientes (Atsuta *et al*, 2016). Sin embargo, el PIE está también en desventaja en comparación con la JE por su limitado aporte de nutrientes. Mientras que el tejido periodontal tiene un amplio flujo de sangre desde el ligamento periodontal, el periostio y el tejido conectivo, el suministro de sangre al tejido peri-implante de tejidos blandos es principalmente del tejido conectivo. Además, el tejido blando alrededor del implante depende del hueso alveolar para su suministro de sangre en ausencia de otros tejidos periodontales de soporte.

Tete *et al*, (2009) investigaron la mucosa peri-implantar y evaluaron la orientación de las fibras de colágeno alrededor de los cuellos de implantes dentales bajo microscopía electrónica de barrido y microscopía de luz polarizada, encontraron que las fibras de colágeno de la mucosa periimplantar mostraron una orientación paralela o en paralelo-oblicua a la superficie del implante para todas las muestras, independientemente del material utilizado.

También (Allegrini *et al*, 2008) no encontró diferencia en cuanto a la profundidad del surco y la fijación del epitelio de unión. La orientación de las fibras de colágeno fue similar para ambos tipos de implantes, siguiendo una dirección desde el periostio y la cresta alveolar hacia el epitelio oral. Se observaron menos fibroblastos y más fibras de colágeno en la zona supracrestal de tejido conectivo alrededor de los implantes con una superficie lisa que alrededor de los dientes (Moon *et al*, 1999). Sin embargo, muy cerca de la superficie del implante el número de fibroblastos fue alto y fueron interpuestos entre fibrillas delgadas de colágeno y orientado paralelamente a la superficie del

implante (Moon *et al*, 1999). La rugosidad de la superficie no parece tener una influencia en el número de fibroblastos (Abrahamsson *et al*, 2002).

Inmediatamente después de la colocación del implante, un coágulo ocupa la interfase implante-mucosa. Numerosos neutrófilos se infiltran en la coagulación de la sangre y a los 4 días se establece un sello de la mucosa inicial. En los próximos días, la zona con los leucocitos disminuye y se limita a la parte coronal, mientras que los fibroblastos y colágeno dominan la parte apical de la interfase implante-tejido. Entre 1 y 2 semanas de cicatrización, el epitelio de unión peri-implantar es de aproximadamente 0,5 mm apical del margen de la mucosa. A las 2 semanas, el epitelio de unión peri-implantar comienza a proliferar en la dirección apical. Después de 2 semanas, la mucosa peri-implantar es rica en células y vasos sanguíneos. A las 4 semanas de cicatrización, el epitelio de unión alrededor del implante migra más apical y ocupa el 40% del total del área de tejidos blandos periimplantar. El tejido conectivo es rico en colágeno, fibroblastos y está bien organizado. La migración apical del epitelio de unión se completa entre 6 y 8 semanas y los fibroblastos forman una capa densa sobre la superficie de titanio. De 6 a 12 semanas, la maduración del tejido conectivo se produce y el epitelio de unión peri-implantar ocupa alrededor del 60% del área de tejido blando periimplantar. Más lejos de la superficie del implante, el número de vasos sanguíneos es bajo y los fibroblastos se encuentran entre las fibras de colágeno delgadas en una posición principalmente paralelo a la superficie del implante (Atsuta *et al*, 2016).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los procesos patológicos, como la mucositis periimplantaria y la periimplantitis, se han diagnosticado en los tejidos alrededor de los implantes en función sometidos a carga (Dreks J *et al*, 2015). De acuerdo con el Sexto Taller Europeo sobre Periodoncia, "las enfermedades periimplantares son de naturaleza infecciosa. La mucositis periimplantaria se describe como una lesión inflamatoria que reside en la mucosa, mientras que la peri-implantitis también afecta el hueso de soporte". Los estudios epidemiológicos en implantología se ven afectados por variables metodológicas debido a los diseños de implantes, donde varía el tipo de conexión su diseño y forma; como también por las diferentes clasificaciones de la enfermedad periimplantaria y un pobre consenso de diagnóstico de las estructuras peri-implantares. Los estudios han reportado tasas de prevalencia de mucositis y periimplantitis muy diferentes. (Dreks J *et al*, 2015) describió una prevalencia de mucositis periimplantaria y periimplantitis entre el 19 y 65% y del 1 al 47%, respectivamente. Los meta-análisis han estimado prevalencias medias ponderadas de la mucositis periimplantaria y periimplantitis del 43% (IC: 32-54%) y 22% (IC: 14-30%), respectivamente.

El tejido periimplantar forma un sellado biológico entre el medio oral, el hueso y la superficie del implante (Cochran *et al*, 1994;1997). Este sellado es frágil, y susceptible a cambios inducidos por agregados bacterianos o traumas mecánicos, debido a la cantidad de superficie del epitelio de unión o epitelio "peri-implantar" y a la ausencia de inserción de fibras del ligamento periodontal; por tal motivo la destrucción del tejido periimplantar puede ser más rápida y devastadora que en tejidos periodontales (Salcetti *et al*, 1997;Maksoud, 2003). Mejorar la formación del sello biológico entre los tejidos peri-implantares, especialmente la interfase epitelio- tejido conectivo implantes, podría ser un factor importante en la supervivencia y éxito de los implantes dentales (Rompen *et al*, 2006).

Teniendo en cuenta que cualquier cambio en el material de los implantes dentales, como en los diseños estructurales y propiedades de superficie pueden modular la respuesta biológica este estudio plantea la utilización de la molécula de adhesión celular laminina 332 para inducir y mejorar la formación de tejido periimplantar a la superficie de los implantes en un modelo tridimensional *in vitro*.

4. JUSTIFICACIÓN

El uso cada vez mayor de implantes dentales para la rehabilitación oral de los pacientes hace prioritaria la búsqueda de mejorar, aumentar la adhesión epitelial y estabilizar los tejidos blandos periimplantares. De esta forma aumentar el éxito de esta terapia, a través de consolidar de manera efectiva un sellado biológico, que impida el acceso bacteriano a las estructuras subyacentes o que proteja aumentando la resistencia mecánica al trauma.

Poco se conoce sobre los procesos de resorción ósea en los implantes dentales y el por qué se genera. Mejorar las condiciones protectoras periimplantarias pueden tener efectos coadyuvantes importantes en la estabilidad de los tejidos mejorando el comportamiento de las restauraciones a largo plazo.

El desarrollo de estructuras en la superficies de implantes dentales que permitan la integración selectiva de tejidos blandos podría significar un efecto preventivo para el desarrollo de la enfermedad periimplantar o una terapia importante para la resolución de estadios más avanzados de esta en implantes ya integrados. Extrapolar este efecto en los dientes naturales podrías ser una innovación en el manejo de la enfermedad periodontal.

Las enfermedades periimplantares son de naturaleza infecciosa. La mucositis periimplantaria se describe como una lesión inflamatoria que reside en la mucosa, mientras que la peri-implantitis también afecta los tejidos de soporte. Los estudios epidemiológicos en implantología se ven afectados por variables metodológicas debido a: los diseños de implantes diferentes, las diferentes definiciones de la enfermedad periimplantaria y un pobre consenso de diagnóstico de las estructuras peri-implantares. Los estudios han reportado tasas de prevalencia de mucositis y periimplantitis muy diferentes. Esta contradicción podría generar dificultad en la comprensión de la distribución global de estas condiciones. Determinar el pronóstico de una enfermedad o condición es una nueva valoración evolutiva y un proceso dinámico. Por lo tanto, en los casos de enfermedad peri-implantar, el control periódico es deseable. El pronóstico puede cambiar con el tiempo y la inflamación puede aparecer o reaparecer después del diagnóstico y tratamiento inicial.

Por tal motivo, optimizar las estructuras entre tejidos blandos y superficies de implantes dentales o aditamentos protésicos mejora el pronóstico de los tratamientos restaurativos. Estrategias para mejorar la durabilidad y la función de los implantes dentales de titanio incluyen: la modificación y diseño de la superficie del implante dental. El componente adhesivo principal de las membranas

basales epiteliales es la laminina 332 que interactúa con los hemidesmosomas, junto con la expresión de receptores tales como integrina $\alpha 6 \beta 4$ hacen una unión estable que puede ser extrapolable a la superficie de implantes dentales. Además de su potencial de migración a nivel de células epiteliales. Por tal motivo la integración de la proteína laminina 332 a la superficie del implante, podrían guiar un mejor selle biológico, aumentando la respuesta a la inflamación por bacterias, disminuyendo así la prevalencia, extensión y severidad de la enfermedad periimplantaria.

5. SITUACIÓN ACTUAL

Se han propuesto varios métodos para mejorar la calidad de la interfaz de tejidos blandos incluyendo características micro y macro de diseño de la porción trans mucosa del implante (Glauser *et al*, 2005). Dentro de estos, se ha evaluado la influencia del tipo de material, el efecto de la topografía de la superficie y la modificación de la superficie. Las células epiteliales y los fibroblastos gingivales tienen diferentes afinidades por las proteínas adhesivas de la matriz extracelular y por lo tanto puede mejorar la capacidad del epitelio y componentes del tejido conectivo en la mucosa alrededor del implante para conectar a los implantes con modificación de superficie. Actualmente, muchos implantes dentales incorporan una superficie rugosa como parte de su diseño micro. Muchas de estas superficies son capaces de absorber las proteínas y por lo tanto actuar como un reservorio o vehículo para las proteínas de fijación, factores de crecimiento u otros agentes biológicos que pueden ser de ayuda para la integración del tejido blando o duro.

Los tejidos mucosos o blandos peri-implantarios son el epitelio y el tejido conectivo presentes alrededor del cuello de los implantes. La definición de oseointegración para Branemark "Es la conexión estructural funcional y directa la cual se logra sólo si la mucosa peri-implantaria cicatriza muy rápidamente en la región marginal, sellando a las estructuras de soporte más profundas" (Branemark PI *et al*, 1969).

La formación de la barrera provista por mucosa alrededor del implante dental se caracteriza por el cambio gradual de un coágulo a tejido de granulación seguido por la formación de una barrera epitelial y la maduración del tejido conectivo (Berglundh *et al*, 2007). Recientes estudios *in vivo* han demostrado que la micro texturización de la superficie del implante se puede utilizar para controlar la respuesta del tejido blando (Glauser *et al*, 2005; Schüpbach y Glauser, 2007, Nevins *et al*, 2008).

La micro texturización compleja de la superficie del implante dental induce la unión del epitelio a través de hemidesmosomas junto con una interdigitación mecánica de la capa de células más interna con los poros abiertos de la superficie del implante, en cuanto al tejido conectivo se han observado fibrillas de colágeno orientadas funcionalmente hacia la superficie del implante bajo microscopía de luz polarizada, lo que indica que se ha formado selle biológico (Schüpbach y Glauser, 2007).

Nevins *et al*, 2008 empleando un protocolo de una sola fase quirúrgica utilizando implantes con microcanales 'laser-Lok' en el cuello (Biohorizons Implant Systems, Birmingham AL, EE.UU.) observó

bajo el microscopio de luz que las células del epitelio de unión estaban en estrecho contacto con la superficie del implante, y que el área microtexturizada de los implantes estaban cubiertas con tejido conectivo.

La microscopía de luz polarizada y microscopía electrónica de barrido de la zona de estudio mostraron fibras de colágeno orientadas funcionalmente dirigidas e insertadas a los micro canales de la superficie del implante dental (Nevins *et al* 2008). Los microcanales Laser-Lok consisten de microestructuras precisas tridimensionales que se forman por una técnica de ablación por láser controlado por ordenador. El fundamento y dimensiones de los microcanales se basaron en una serie anterior de estudios *in vitro* mediante el cual el efecto de las superficies fueron investigados con respecto a la unión, propagación, la orientación, y el crecimiento de tipos de celulares como fibroblastos y osteoblastos (Soboyejo *et al*, 2002; Ricci *et al*, 2008, Grew *et al*, 2008).

El Recubrimiento de aleación de titanio con laminina 332 también se ha observado que mejora la inserción de las células epiteliales y hemidesmosomas *in vitro* (Tamura *et al*, 1997). Sin embargo hasta la fecha se han realizado pocos estudios que investiguen el efecto de la modificación de la superficie de los implantes dentales con el recubrimiento de lamininas para evaluar el mejoramiento de la adhesión de tejido epitelial. Koidou *et al* 2018 realizaron un estudio de biofuncionalización con péptidos de proteína laminina 332 y ameloblastina sobre discos de titanio grado II. Demostrando un mayor crecimiento de queratinocitos y un mayor desarrollo de hemidesmosomas.

Estudios inmunohistológicos han demostrado que las 5 subunidades de integrina $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$ y $\beta 4$ son expresadas por células epiteliales, independientemente de si el tejido implicado es saludable, inflamado o se encuentra en proceso de cicatrización. Así, las células epiteliales expresan principalmente las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ y $\alpha 6\beta 4$ tanto *in vivo* como *in vitro*. La laminina es una glicoproteína que hace parte de la lámina basal y posee sitios de unión a integrinas. La polimerización de varias moléculas de laminina causa la formación de una red, que se localiza principalmente en la lámina lúcida. Se ha descrito, que la laminina se sintetiza en cultivos de células epiteliales.

Recientes investigaciones han demostrado que las células de la lámina basal interna en el epitelio de unión murino, expresan 10 veces más de laminina 332 que la lámina basal externa en el epitelio oral (Komatsu *et al*, 2009). La expresión de la laminina 332 es estimulada por varios factores de crecimiento y citocinas, incluyendo el factor de crecimiento tumoral β -1 (TGF β 1), factor de necrosis tumoral- α (TNF α), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento epidermal (EGF) e interferón γ (IFN- γ) (Kainulainen *et al*, 1998; Amano *et al*, 2004).

Muchos de estos factores se expresan constitutivamente en el epitelio de unión y pueden, por lo tanto, ser responsables de la abundancia de la laminina 332 en la lámina basal interna (Li *et al*, 2005; Ghannad *et al*, 2008). La función de la laminina 332 en la lámina basal interna puede variar en función del procesamiento de la molécula, y en algunas circunstancias puede regular también la formación de tejido de granulación. En general, los queratinocitos basales, incluyendo las células epiteliales del epitelio de unión, interactúan con los dominios LG globulares en C-terminal de la cadena $\alpha 3$ de laminina 332 vía $\alpha 3\beta 1$ y $\alpha 6\beta 4$ integrinas (Aumailley *et al*, 2003). La integrina $\alpha 6\beta 4$ es una proteína de matriz extracelular que cumple un papel importante en la formación y estabilización de los complejos de adhesión celular denominados hemidesmosomas, y media la interacción de queratinocitos basales a laminina -332 (Litjens *et al*, 2006).

En la lámina basal interna, $\alpha 6\beta 4$ integrina co-localiza con laminina 332 (Hormia *et al*, 1992; 2001), lo que sugiere que su interacción es el principal mecanismo que sostiene unido el epitelio de unión a los tejidos mineralizados. Intracelularmente la integrina $\alpha 6\beta 4$ se une a plectina un componente de los hemidesmosomas a un complejo que se acumula y reclutan a las proteínas BP180 (Collagen XVII) y BP230 (Hormia *et al*, 2001; Litjens *et al*, 2006) las cuales cumplen un papel crítico role en el mantenimiento de la unión entre los elementos extracelulares involucrados en la adhesión epidermal y en la estabilidad mecánica de los hemidesmosomas.

La activación de la laminina 332 regulan la adhesión de las células del epitelio de unión a la superficie de esmalte y posiblemente podría cumplir esta función en los implantes dentales. Sin embargo, estos mecanismos parecen estar poco desarrollados en el epitelio peri-implantar (Atsuta *et al*, 2016).

La inmovilización de proteínas en superficies metálicas previamente silanizadas ha demostrado ser exitosa, además de ser una de las técnicas más utilizadas por su alta reproducibilidad en la funcionalización de superficies metálicas. Por lo tanto, en este trabajo se propone la funcionalización de superficies de titanio con la proteína laminina 332 que permita por una parte, un enlace covalente directo con las biomoléculas, y la adhesión de células epiteliales orales .

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Obtener superficies de titanio biofuncionalizadas con laminina 332 para mejorar el sellado biológico de la superficie de implantes dentales.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Estandarizar la biofuncionalización de implantes dentales con laminina 332.
- Caracterizar desde un punto de vista físico, químico y topográfico las superficies de titanio funcionalizadas
- Caracterizar la respuesta biológica in vitro de queratinocitos orales sobre las superficies de titanio biofuncionalizadas.

7. METODOLOGÍA

7.1 TIPO DE ESTUDIO:

Estudio experimental in vitro.

7.2 POBLACIÓN Y MUESTRA:

- Cortes de Implantes dentales Superficie (Phibo® superficie Avantblast® P. I. Mas d'en Cisa Gato Pérez, 3-9 08181 Sentmenat Barcelona | Spain) biofuncionalizada + Laminina 332

7.3 MATERIALES Y MÉTODOS:

Se realizaron 36 cortes de implantes dentales titanio grado 2 (**Phibo®** superficie **Avantblast®** P. I. Mas d'en Cisa Gato Pérez, 3-9 08181 Sentmenat Barcelona | Spain). Dimensiones 3 mm de longitud x 3.6 mm de diámetro. Se lavaron en ultrasonido durante 30 minutos en agua destilada y se esterilizaron en autoclave.

7.3.1 Bio-funcionalización de la superficie de titanio:

Para la biofuncionalización de las superficies de titanio se utilizó la técnica descrita por Schickle *et al*, 2015 modificada. Para esto, se lavaron los cortes de titanio con etanol/acetona 1:1 en sonicación 40 Khz durante 20 minutos, y posteriormente con agua desionizada destilada estéril. Se dejaron secar a temperatura ambiente.

7.3.2 Limpieza y activación de las superficies de Titanio:

- Ataque químico con solución piraña:

Para obtener una superficie limpia y activada, se realizó un ataque químico sumergiendo las muestras durante 1 hora en una solución de piraña (PH) que consiste es una mezcla de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) con una proporción de 1 H_2SO_4 :1 H_2O_2 (Fig. 1). Antes del ataque químico, las superficies de los implantes de titanio deben estar limpias y completamente libres de solventes orgánico que hayan sido usados en lavados previos. Después del tratamiento con solución PH las muestras se lavaron 3 veces con abundante agua desionizada, y dos veces con acetona y se

secaron a 80°C durante 15 minutos. Este tratamiento se utilizó para generar grupos hidroxilo sobre la superficie del Titanio como tratamiento previo a la silanización.

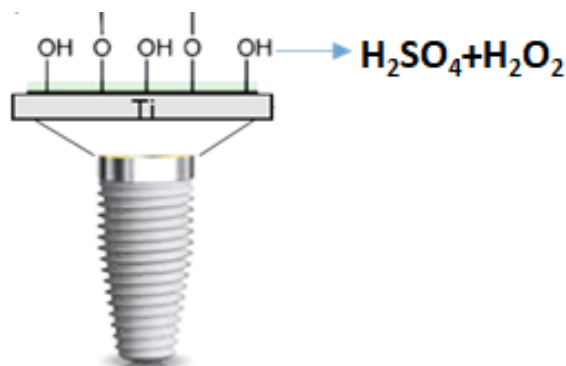


Figura 1. Representación esquemática del ataque químico con la solución piraña y generación de los grupos hidroxilo realizado sobre implantes de Titanio. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.

7.3.3 Silanización de las superficies de titanio activadas y funcionalización de la proteína laminina 332

Para la silanización de las superficies de titanio se utilizó el método de silanización en fase líquida, mediante el cual se busca hidrolizar los grupos alcoxi del silano para que los grupos silanol resultantes se unan con los grupos hidroxilo presentes sobre la superficie del titanio. Para esto, los cortes de titanio se sumergieron con solución APTES (3-Aminopropil)triethoxisilano - Sigma Aldrich®) 5% en tolueno (Sigma-Aldrich®) a 120°C por 3 horas en reflujo condensador (Figura 2.). Los cortes se lavaron con tolueno puro dos veces por 20 minutos en sonicación y dos veces con agua (destilada-desionizada) DDE. Posteriormente, se curaron a 105°C por 10 minutos, se entrecruzan con glutaraldehído al 5% por 1 hora y se lavaron tres veces con agua DDE. En este paso, la condensación del APTES da lugar a oligómeros de siloxano los cuales reaccionan para formar enlaces siloxano ramificados (-Si-O-Si-) o una cadena de silanos polimerizada, y cuando entran en contacto con grupos hidroxilo presentes sobre la superficie del titanio forman enlaces muy estables de -Si-O-Metal. Los siloxanos se enlazan covalentemente a los grupos OH- presentes sobre el titanio (Figura. 3). La laminina 332 humana utilizada en esta investigación fue obtenida de la casa comercial Abcam referencia (ab42326). La proteína se disolvió en tampón fosfato salino (PBS) 0,1M pH 7.0 a una concentración de 10 nM. Una vez obtenida la solución de laminina 332, las muestras se sumergieron en ésta durante 16 horas. Después las muestras se sacaron de las soluciones y se lavaron 2 veces con PBS (Figura 3).

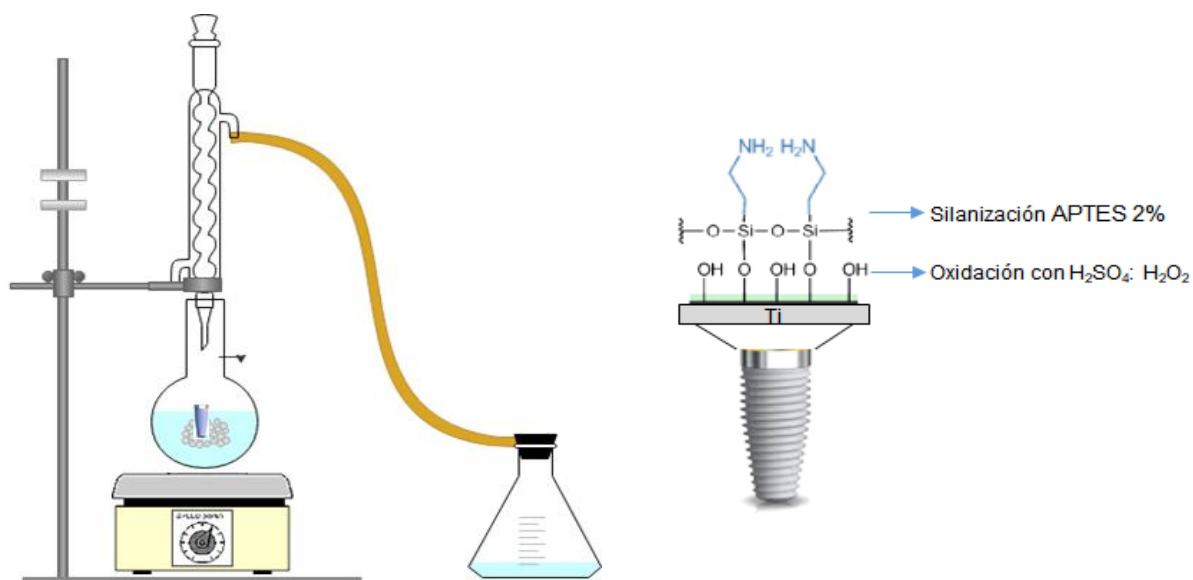


Figura 2. Representación esquemática de la silanización de la superficie de titanio. **A.** Sistema de reflujo condensador. **B.** Funcionalización de la superficie de titanio activada utilizando conectores (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES) al 5%. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.

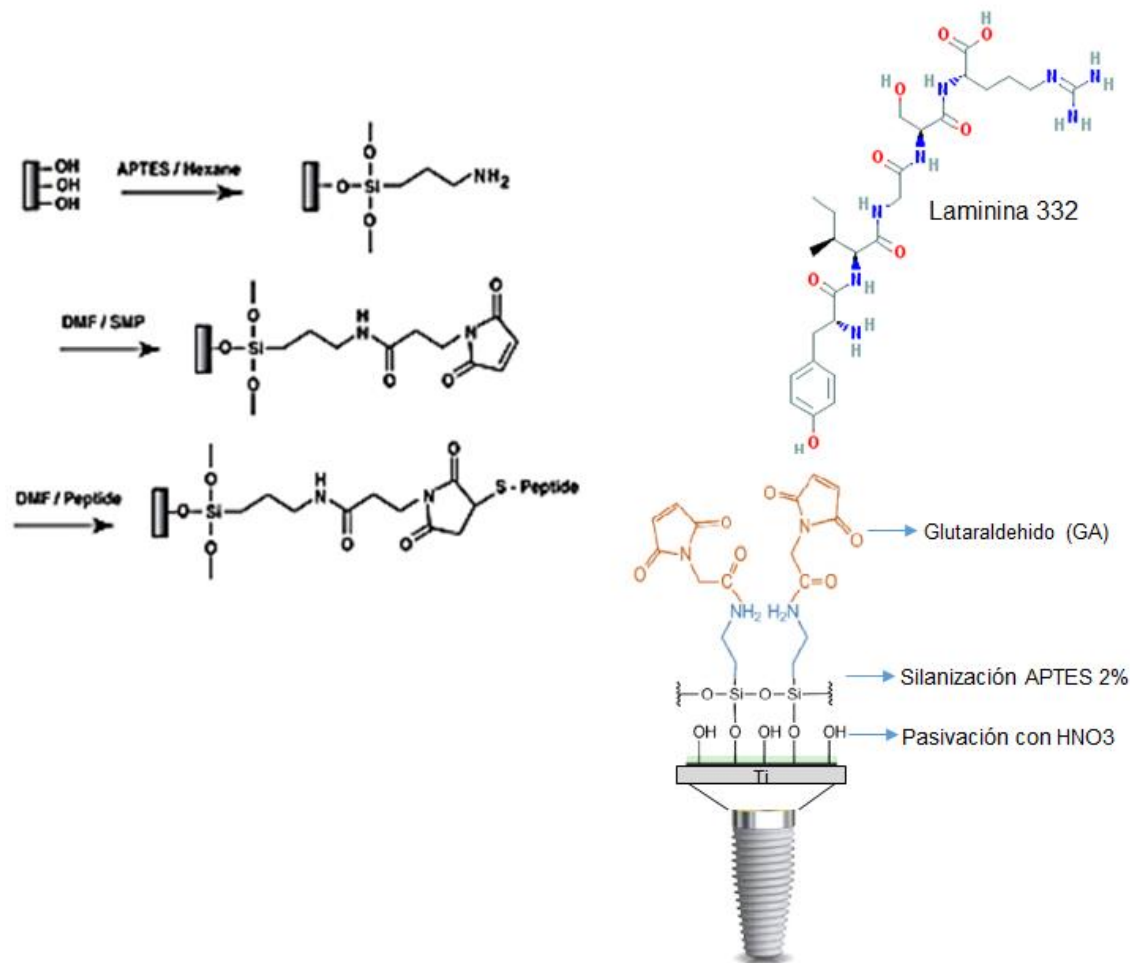


Figura 3. Esquema del tratamiento e inmovilización de laminina sobre la superficie de titanio modificada: Se describen los pasos de oxidación con solución piraña (PH) silanización, entrecruzamiento con glutaraldehído (GA) y unión covalente de la proteína. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.

7.3.4 Caracterización de las superficies de Titanio por Microscopía electrónica de barrido (SEM):

Las muestras de titanio funcionalizadas con APTES+glutaraldehído (GA)+ laminina 332, y las superficies funcionalizadas con células CAL-27 se procesaron para microscopía electrónica de barrido (SEM; SEM JSM-IT100 JEOL, Tokyo, Japan), para esto se llevaron a secado en punto crítico (Samdri – 795. Tousimis) y recubrimiento con oro previa lectura en SEM. Se evaluaron las diferentes modificaciones de las superficies: control sin tratamiento, GA, laminina 332. Se utilizó espectroscopía de rayos X dispersiva de energía (EDS) para analizar la composición elemental de la superficie.

7.3.5 Caracterización de la topografía de las superficies de titanio

La rugosidad de los implantes de titanio se midió sobre las imágenes obtenidas por SEM utilizando el plugin SurfCharJ.class de ImageJ, tanto para la superficie sin tratar como en la superficie tratada con la solución PH y funcionalizada con proteínas. Se calcularon los parámetros de rugosidad de 6 cortes de cada grupo de acuerdo con el estándar ISO 4287/2000 y se obtuvieron las mediciones de la rugosidad media (Ra), la media de la raíz cuadrática de la rugosidad (Rq), curtosis del perfil evaluado (Rku), sesgo del perfil evaluado (Rsk), valle más bajo (Rv), pico más alto (Rp) y altura total del perfil (Rt). Los parámetros más importantes para definir la rugosidad fueron:

-Ra (Media aritmética de las desviaciones del perfil): es la media aritmética del valor absoluto de las distancias desde la línea media al perfil R (Yi) dentro de la longitud de muestra. Ra se calcula en nm y es el parámetro habitualmente elegido para cuantificar de forma general la rugosidad de una superficie y se denota con la fórmula:

$$Ra = \frac{1}{a_z} \int_0^{a_z} |y(x) - m| dx$$

-Rq (Media de la raíz cuadrada de las desviaciones del perfil): es el valor medio de la raíz cuadrada de las desviaciones del perfil respecto a la línea media, dentro de la longitud de muestra. Este parámetro es más sensible que Ra a los valores extremos debido a la operación cuadrática. Rq tiene un significado estadístico ya que está asociado a la desviación estándar de la distribución de las alturas del perfil, y se denota con la fórmula:

$$Rq = \sqrt{\frac{1}{l} \int_0^l Z^2(x) dx}$$

7.3.6 Viabilidad celular y adhesión epitelial a las superficies de titanio funcionalizadas con Laminina 332.

En el presente estudio se utilizaron los queratinocitos orales humanas (CAL-27). Las células se mantuvieron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino y 1% de penicilina/estreptomicina/anfotericina B (SFB; Lonza EE. UU.) A 37 ° C en 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

La adhesión de las células epiteliales CAL-27 se realizó en cajas de 96 pozos. Para esto, las células CAL-27 se co-cultivaron en los cortes de titanio con y sin revestimiento superficial (n = 3 para cada grupo) Las células se cultivaron durante 4, 24 y 48 horas. Al final de cada punto de tiempo, las células no adheridas se lavaron con PBS. Las células restantes en el disco fueron transferidas a un nuevo pozo de 96 con fondo en V. Las células se separaron del corte de titanio mediante digestión enzimática con 50 µl de tripsina-EDTA (Sigma Aldrich) durante 5 minutos. Los fragmentos de titanio se retiraron después de lavar con 50 µl de tripsina-EDTA fresco y se tiñeron con, 100 µl de solución de colorante de ADN Hoechst 33342 2,5 µg/ml y Calceína AM (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.) durante 10 mins (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.). Después de la tinción durante 10 minutos, las células se centrifugaron para eliminar la tinción no unida, se lavaron y resuspendieron con 100 µl de PBS, transferido a un nuevo y se observaron en el microscopio de fluorescencia Zeiss (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemania).

Este procedimiento permite la identificación de las células vivas cuando estas son incubadas en presencia de la calceína modificada por el metabolismo de las esterasas intracelulares.

7.3.7 Citometría de flujo para citocinas:

Para evaluar la concentración de citocinas liberadas en el sobrenadante celular, se utilizó el Kit *LEGEND 8 plex* (Biolegend) y el citómetro de flujo BD accuri C6.. Después de 4 , 24 y 48 horas de cultivo, los sobrenadantes celulares se centrifugaron durante 5 minutos a 500 × g, se dividieron en alícuotas de 200 µl y se almacenaron a -80 ° C hasta que se realizó el análisis de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ensayo se realizó para tres implantes por tiempo de cultivo. Para realizar el ensayo se calculó el volumen de perlas (35,76µL) y preparación de mezcla en tubos

Eppendorf colocando 25µL de la muestra y 25µL de buffer incubados en agitación durante 2h en cuarto refrigerado. Se agregaron los anticuerpos de detección (12.5µL) para las citocinas IL-1B, IL-1a, IL-8, IL-6, RANTES, MCP-1, MIP-1a y TNF-a y se incubaron durante 1 hora. Finalmente la reacción se reveló con Estreptavidina - ficoeritrina (SAPE) incubado a 30 minutos y se realizó el lectura en el citómetro de flujo y analizado con el software de análisis de datos LegendPlex™ (BioLegend, EE. UU.).

7.3.8 Análisis de expresión génica

Para evaluar la respuesta de cicatrización los queratinocitos orales (CAL-27) unidos a la superficie de los implantes de titanio se evaluó la expresión de los genes que codifican para los factores de crecimiento EGF, VEGF, TGF- β y FGF a, por RT-qPCR. Por lo tanto, después de 4, 24 y 48 horas de cultivo, las muestras con las células adheridas en un tubo de 1,5 ml que contenía 400 µl de buffer de lisis (Zymo Research Corp.) y se almacenaron a -80 ° C hasta el día del análisis. Para la extracción de ARN, se utilizó el Quick-RNA™ Miniprep Kit (Zymo Research) y siguiendo las especificaciones del fabricante. El ARN obtenido se cuantificó usando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fischer Scientific) a 260/280 nm. Después de la cuantificación de ARN, se sintetizó el DNAc y la PCR en tiempo real utilizando el kit Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs-NEB). El análisis de qPCR para cuantificar la expresión de los genes TGFb, FGF2, EGF, VEGF (Tabla 1) se realizó preparando una mezcla que consta de 5.0 µl de mezcla maestra × qPCR (Sybr green) y 0.5 µl de mezcla de cebadores y 2 µl de RNA (10 ng/µL). Se cuantificó la expresión génica utilizando un sistema de detección de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Se utilizó el gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como *housekeeping*. La expresión de los factores de crecimiento en relación con la expresión de GAPDH se determinó mediante la fórmula $2^{-\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = Ct \text{ Muestra} - Ct \text{ GAPDH}$. El análisis de expresión génica se realizó para 3 implantes por cada tiempo de adhesión celular.

Nombre del Gen	Iniciador Directo	Iniciador Reverso
TGFb	AAGTTCAAGCAGAGTACAC	TATCGCCAGGAATTGTTG
FGF2	GCATTACACCACTACAA	CCAACTCGTAACAATCCAT
EGF	GGACCACCTGATGAATATC	CCATAACCATCTGCTCTG
VEGF	AATGAAGGAAGAGGAGACT	GGTGATTTAGCAGCAAGA
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC

Tabla 1. Secuencia de cebadores utilizados para evaluar expresión génica. Datos y diseños de tabla por Carlos Fajardo.

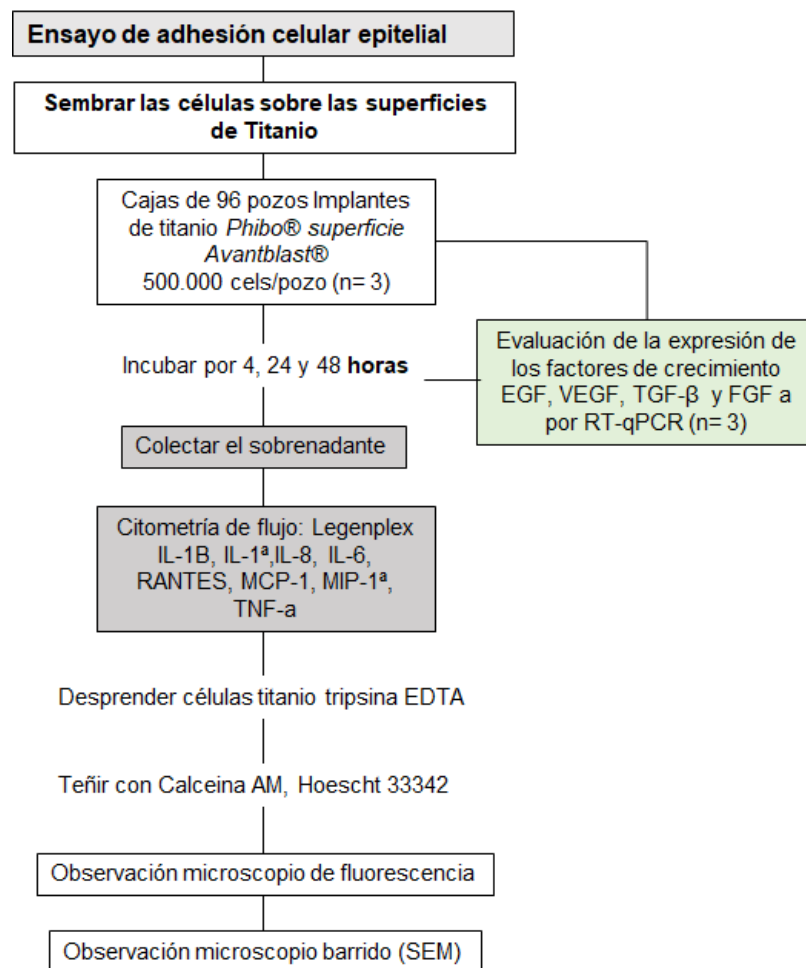


Figura 4. Flujo experimental esquemático de la evaluación de adhesión de células epiteliales a las superficies de titanio con modificación de superficie. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.

7.4 Plan de análisis estadístico

Todas las mediciones cuantitativas se realizaron por triplicado, y cada punto de datos representa la media $\pm$ DE (desviación estándar). La significación estadística entre el control y el grupo experimental se determinó mediante una prueba t de 2 colas no apareada con varianza desigual. Además, los datos que incluyen más de dos grupos se analizaron con ANOVA unidireccional y prueba post hoc. Los niveles de significancia se establecieron en $p < 0.05$

8. RESULTADOS

8.1 Caracterización fisicoquímica de las superficies durante el proceso de bio-funcionalización

a) Rugosidad superficial

La rugosidad de las superficies de titanio después del tratamiento con solución piraña (H_2SO_4 y H_2O_2) es una de las propiedades físicas que influye en las interacciones entre superficie/molécula y superficie/célula. Por lo tanto es importante evaluar si el tratamiento con la solución PH influye sobre la rugosidad de las superficie del implante, y si estos cambios pueden o no tener influencia sobre la funcionalización de las proteínas y la respuesta celular. Las imágenes y valores de los parámetros de rugosidad de las superficies de titanio tratados con PH fueron obtenidos por microscopía de barrido utilizando el programa ImageJ Plugin *SurfChar.class plugin* (Figura 5). La medición de los valores R en toda la superficie proporciona valores de rugosidad de acuerdo con el estándar ISO 4287/2000.

En este estudio, se seleccionaron los siguientes parámetros de amplitud para el análisis de rugosidad de la superficie de los implantes de Titanio. estos son: Ra, Rt, Rq y Rku.

Tanto el valor de Ra y Rq obtenido del análisis de la rugosidad para las muestras tratadas con la solución PH fue significativamente superior ($p < 0,05$) al de las muestras sin tratamiento del implante comercial Phibo® superficie Avantblast® (Figura 6 - tabla 2). Estos resultados se deben al ataque químico generado por la solución PH, los cuales generan una erosión que cambia la morfología y el área de la superficie.

Además, se observaron valores negativos de Rsk, Rsu y Rv en el implante tratado con PH comprado con el control sin tratamiento ($p < 0,05$) lo que sugiere que la superficie tratada está formada por valles, mientras que la superficie sin tratar contiene principalmente picos y asperezas. Por lo tanto, una superficie sesgada negativamente es buena para fines de lubricación. La distribución de la rugosidad encontrada en el tratamiento con PH podría proporcionar una distribución homogénea del silano y posteriormente de la proteína.

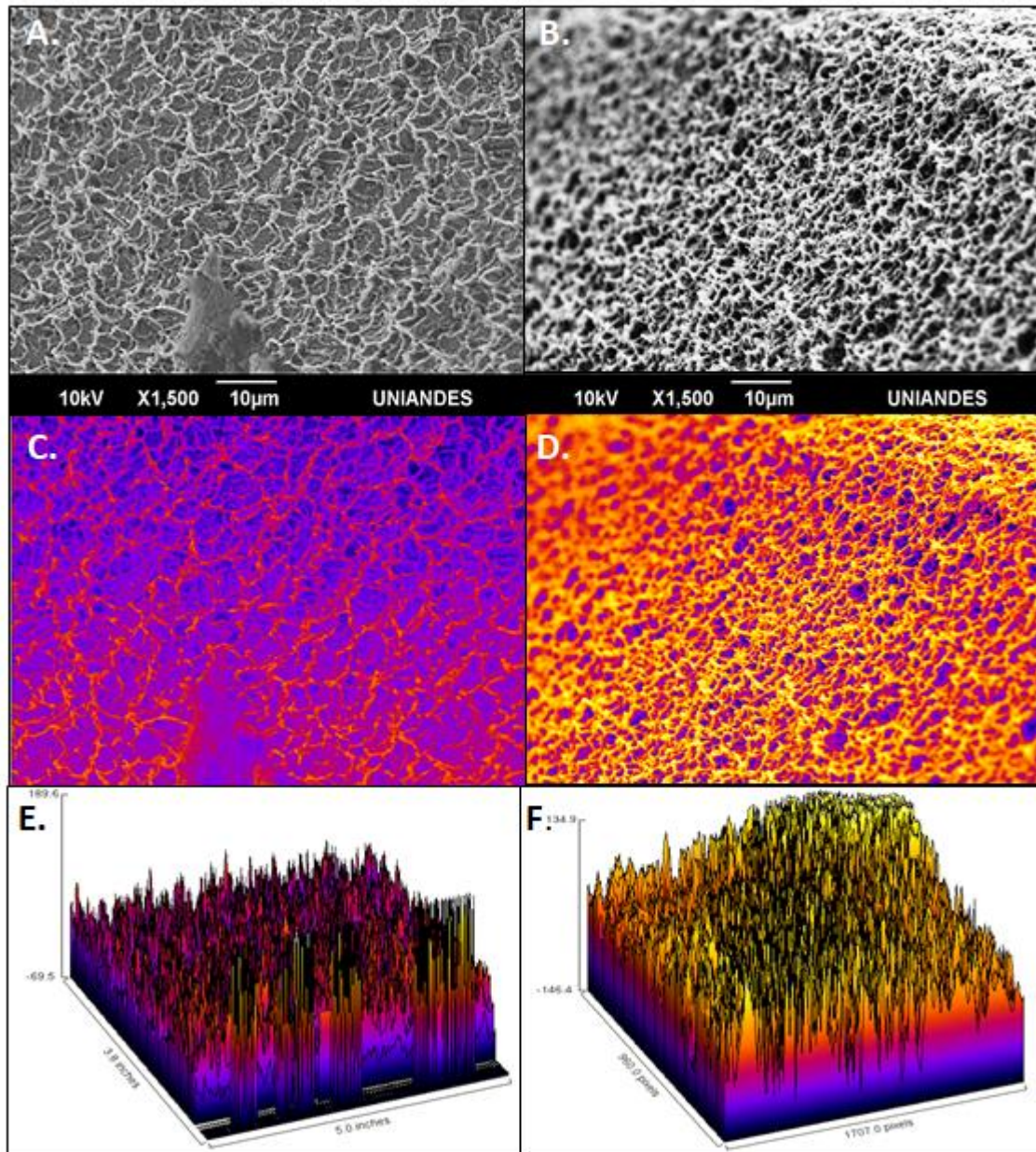


Figura 5. Evaluación de rugosidad de la superficie de los implantes de Titanio **A.** Microfotografía de microscopía de barrido (X1,500) donde se observa la superficie del implante Phibo® superficie Avantblast® sin ningún tipo de tratamiento. **B.** Microfotografía de microscopía de barrido (X1,500) donde se observa la superficie del implante Phibo® superficie Avantblast® tratada con la solución PH H_2SO_4 : H_2O_2 . **C y D.** Imágenes de gradientes de la topografía de las superficies. **E y F** se muestra los perfiles tridimensionales representativos de las superficies sin tratar y tratada respectivamente. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.

<i>Muestra / Parámetros</i>	<i>Rq (nm)</i>	<i>Ra (nm)</i>	<i>Rsk</i>	<i>Rku</i>	<i>Rv</i>	<i>Rp</i>	<i>Rt</i>	<i>Rc</i>
<i>Piraña (H₂SO₄ y H₂O₂)</i>	39,94 ± 3,5	69,97 ± 3,9	- 0,21 ± 0,007	- 0,52 ± 0,02	- 91,16 ± 0,7	245,92 ± 2,8	237 ± 7,1	12,83 ± 0,15
<i>Ti. Sin tratamiento</i>	16,17 ± 1,1	12,63 ± 0,9	0,22 ± 0,001	0,65 ± 0,13	62,83 ± 5,5	183,59 ± 9,7	128,5 ± 7,7	124,5 ± 2,5

Tabla 2. Valores de los parámetros de rugosidad determinados sobre superficies de titanio antes y después del tratamiento con la solución PH. Datos y diseños de tabla por Carlos Fajardo.

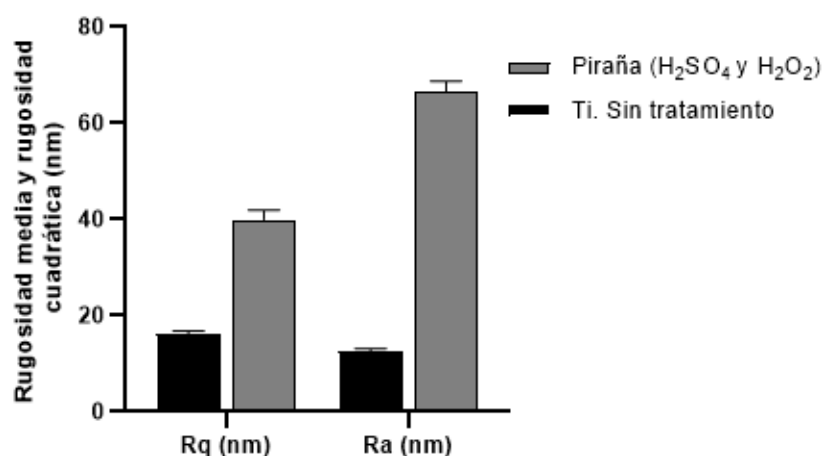


Figura 6. Comparación de los valores de Ra y Rq los parámetros de rugosidad determinados sobre superficies de Titanio antes y después del tratamiento con la solución PH. Los valores representados en la gráfica presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.

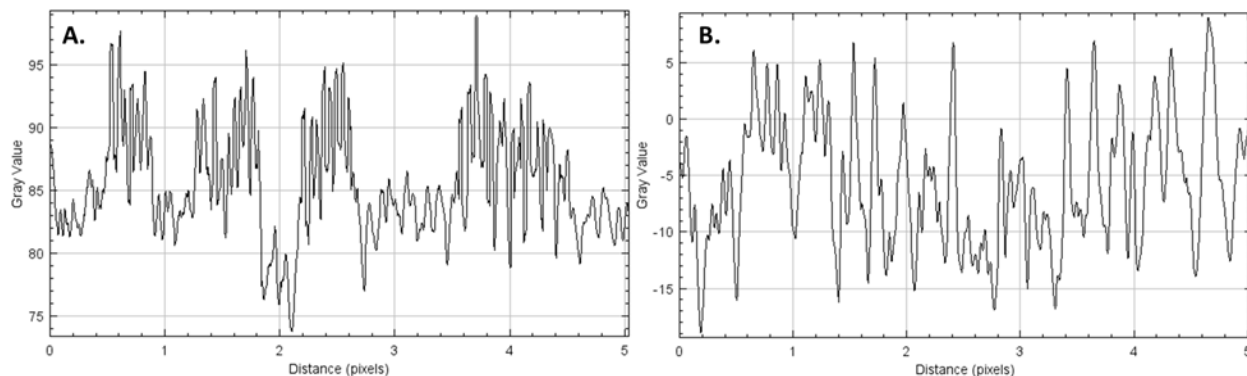


Figura 7. Gráfico bidimensional de las intensidades de píxeles de las imágenes de SEM; el eje X representa la distancia a lo largo de la línea y el eje Y es la intensidad de píxel. **A.** Implante Phibo® superficie Avantblast® sin ningún tipo de tratamiento. **B.** Superficie del implante Phibo® superficie Avantblast® tratada con la solución PH. Los valores negativos de en la escala de grises indican la profundidad del píxel la imagen y por ende mayor rugosidad de la superficie. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.

Como consecuencia de una mayor rugosidad, el índice de área superficial (SAI) en las muestras tratadas con PH, fue mayor que el reportado para las muestras sin tratar, lo cual podría afectar a la cantidad de biomoléculas inmovilizadas sobre la superficie y en consecuencia influir en la respuesta celular, como ha sido demostrado en otros estudios.

Por otra parte, el valor de Ra para las muestras biofuncionalizadas con Ti + APTES+GA fue similar al encontrado en la muestras tratadas con solución PH, sin embargo, el valor de Rq no mostró cambios con respecto a la superficie tratada con PH.

Tanto el valor de Ra y Rq obtenido del análisis de la rugosidad para las muestras funcionalizadas con la proteína laminina 332 fue menor a las modificaciones de las superficies con APTES y glutaraldehído y al de las muestras con tratamiento PH ($p < 0,05$) (Figura 8-9 - tabla 3). Estos resultados se deben al proceso de funcionalización que puede aumentar considerablemente la superficie de contacto.

Adicionalmente, se observaron valores negativos de Rsk, Rku y Rv en el implante tratado con PH y Ti + APTES+GA lo que sugiere que la superficie conserva la morfología y patrones de rugosidad formada por valles, mientras que la superficie con la laminina 332 funcionalizada presentó valores positivos ($p < 0,05$) (Tabla 3). El aumento de estos valores en la superficie con la proteína sugieren mayor área de contacto que probablemente favorece la adhesión celular (Figura 10).

Muestra / Parámetros	Rq (nm)	Ra (nm)	Rsk	Rku	Rv	Rp	Rt	Rc
Ti +APTES+GA+ Laminina	19,26 ± 3,2	16,10 ± 1,5	0,35 ± 0,6	0,93 ± 0,78	-33,4 ± 2,3	41,10 ± 1,6	74,52 ± 0,3	0,19 ± 0,9
Ti +APTES+GA	33,18 ± 2,6	27,07 ± 2,9	- 0,007 ± 0,1	- 0,40 ± 0,12	7,93 ± 1,6	232,4 ± 3,8	224,4 ± 0,3	111,0 ± 0,5
Piraña (H ₂ SO ₄ y H ₂ O ₂)	39,94 ± 3,5	69,97 ± 3,9	- 0,21 ± 0,007	- 0,52 ± 0,02	- 91,16 ± 0,7	245,92 ± 2,8	237 ± 7,1	12,83 ± 0,15

Tabla 3. Valores de los parámetros de rugosidad determinados sobre superficies de titanio funcionalizadas con APTES+GA (glutaraldehído) y funcionalizadas con la proteína. Datos y diseños de tabla por Carlos Fajardo.

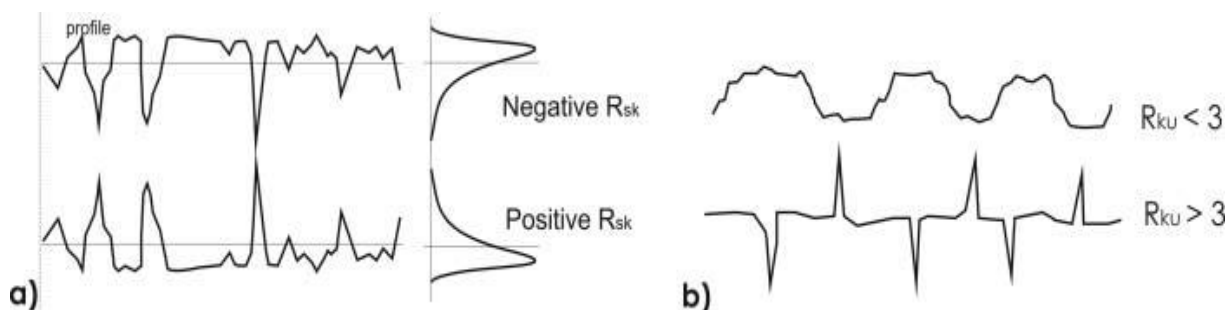


Figura 8. representación esquemática de los perfiles de rugosidad para (a) asimetría positiva y negativa (R_{sk}) y (b) curtosis inferior y superior a 3.) tomada de Sedlaček *et al.*, 2017. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.

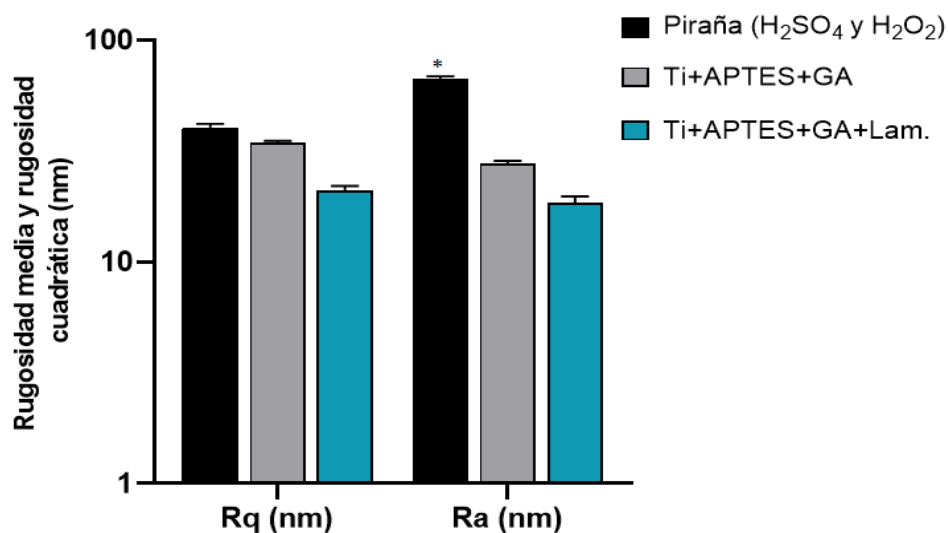


Figura 9. Comparación de los valores de Ra y Rq de los parámetros de rugosidad determinados sobre superficies de Titanio antes y después del proceso de funcionalización con APTES+GA y con la proteína laminina. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo. 332.

Los valores del tratamiento con Ti+APTES+GA+Laminina representados en la gráfica presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a los otras modificaciones de la superficie (* $p<0,05$).

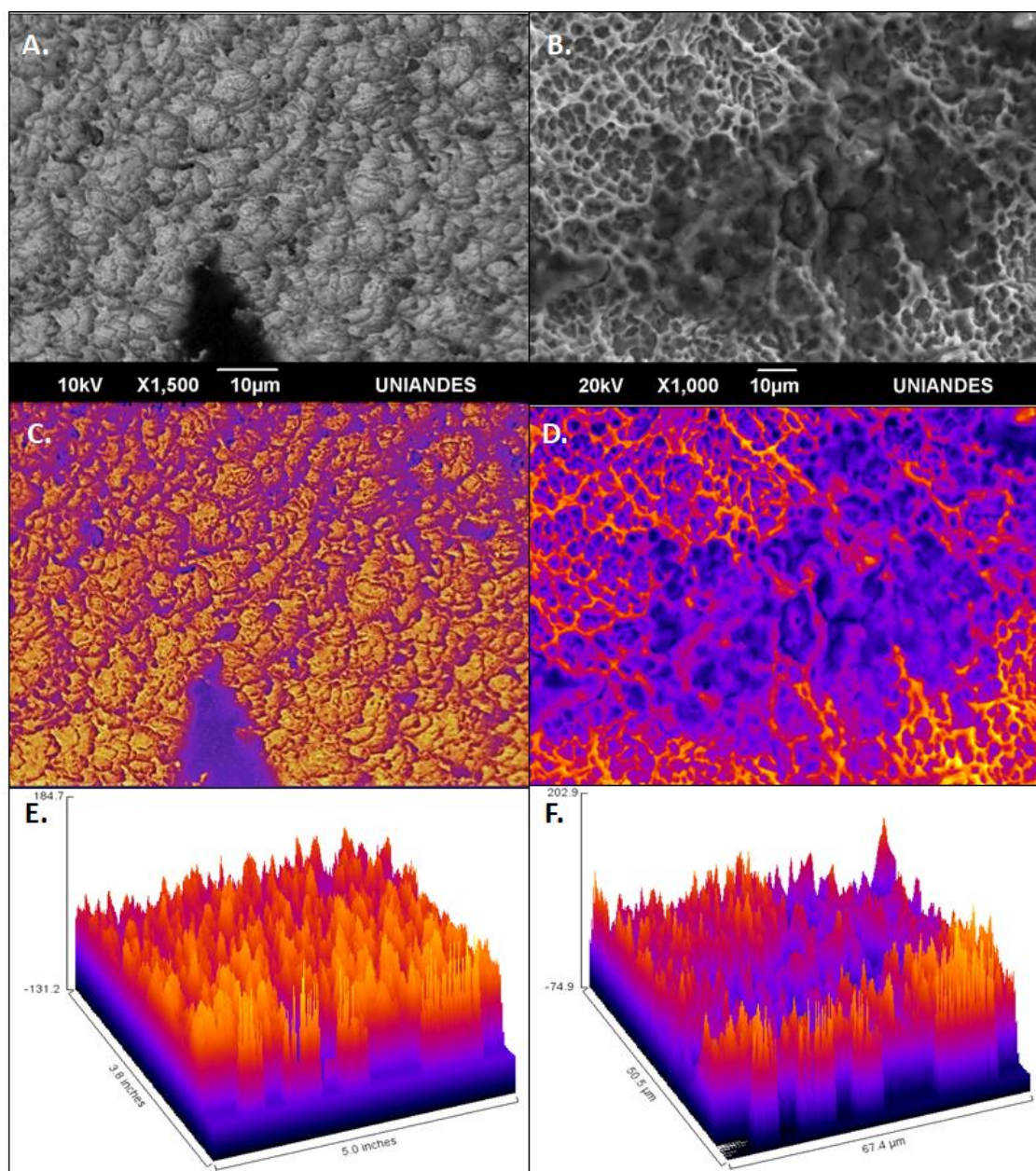
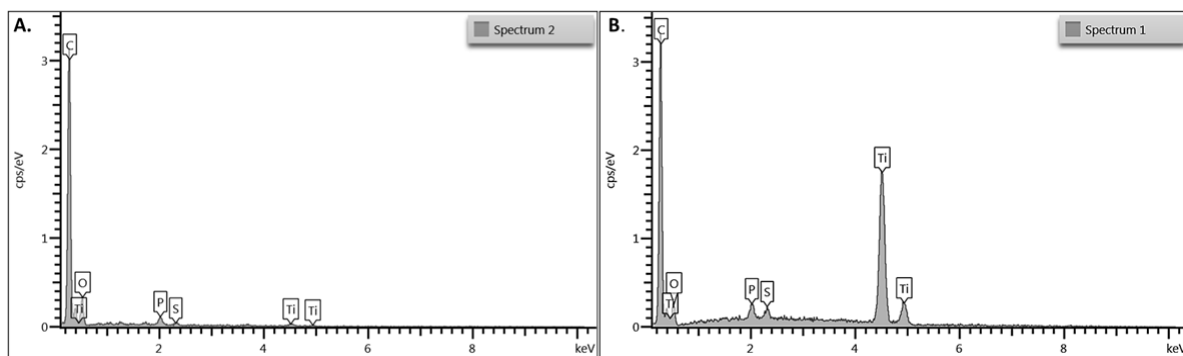


Figura 10. Evaluación de rugosidad de la superficie de los implantes de Titanio funcionalizados A. Microfotografía de microscopía de barrido (X1,500) donde se observa la superficie del implante Phibo® superficie Avantblast® sin ningún funcionalizada con Ti+APTES+GA. B. Microfotografía de microscopía de barrido (X1,500) donde se observa la superficie del implante Phibo® superficie Avantblast® funcionalizada con Ti+APTES+GA y laminina 332. C y D. Imágenes de gradientes de la topografía de las superficies. E y F se muestra los perfiles tridimensionales representativos de las superficies funcionalizadas respectivamente. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.

b) Microscopía electrónica de barrido SEM-EDS (Scanning Electron Microscopy - Energy Dispersive X-ray spectroscopy)

La superficie de titanio no tratado mostró altos contenidos de carbono (80,42%) y oxígeno (3,19%), así como bajos niveles de titanio (1,79%),(Figura 10). Este bajo nivel de titanio se explica por la capa de dióxido de titanio de 3-7 nm de espesor que cubre el implante. El alto contenido de carbono de la superficie sugiere contaminación de hidrocarburos orgánicos "normales", que ocurre inevitablemente cuando el titanio se expone al aire. Debido a que esta contaminación puede ejercer una influencia en el recubrimiento adicional de la superficie y, posteriormente, en las células sembradas, las muestras de titanio en nuestro estudio se limpiaron con una mezcla de ácido sulfúrico/peróxido de hidrógeno solución de piraña (PH) antes de realizar el recubrimiento con APTES y laminina 332. Este método permite la oxidación controlada de la superficie de titanio, creando condiciones estables para modificaciones adicionales (Nanci A *et al*, 1998; Pan J *et al*, 1996). El aumento en el contenido de titanio al 48,75%, así como la disminución asociada en el contenido de carbono al 45,52% después de la oxidación refleja una reducción en las impurezas orgánicas y la formación de una capa de óxido de titanio hidratada debido al tratamiento con solución de piraña (Figura 10). Otro efecto de este tratamiento fue el aumento de la rugosidad de la superficie, lo que promueve la adhesión y proliferación celular. Además de la disminución de la contaminación sobre la superficie, el tratamiento con PH se utilizó en este estudio para aumentar el número de grupos OH- debido a que esto favorece a una mayor cantidad de enlaces con el silano. Así, se observó que después del tratamiento con PH, un incremento considerable en el porcentaje general del pico de O (7,23%) (Figura 11). Este aumento puede deberse a cambios en la composición de la superficie debido a la disminución o aparición de nuevos enlaces. Por lo tanto es necesario analizar los espectros de alta resolución de este pico para determinar de qué manera actúan cada uno de estos tratamientos sobre la superficie.



C.

Elemento	Ti [%]	C [%]	N [%]	O [%]
Piraña (H_2SO_4 y H_2O_2)	48,75	45,52	1,2	7,23
Ti. Sin tratamiento	1,79	80,42	0,5	3,19

Figura 11. Composición elemental de las superficies de titanio oxidadas **A.** superficies no tratadas **B.** tratadas con con PH y según lo determinado por el análisis EDS. **C.** Composición elemental en porcentaje de las superficies evaluadas. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.

Además de la topografía de la superficie, la oseintegración de un implante puede afectarse por los recubrimientos proteicos bioactivos, en este trabajo para unir la proteína laminina 332 a la superficie de titanio se realizó la unión covalente a través de APTES y un enlazador de glutaraldehído debido a que se ha evidenciado que es efectivo en unir la mayor cantidad de proteínas en comparación con otros agentes de acoplamiento covalente (A Baranowski *et al*, 2016). Las muestras de titanio en las siguientes etapas de recubrimiento se evaluaron por SEM y mediante EDS. En el primer paso del proceso de acoplamiento covalente, se observó que la superficie de titanio tratada con APTES y GA presentó contenido de silicio y mayor contenido nitrógeno y titanio que la superficie no tratada, además, después de la adición del enlazador de glutaraldehído, el contenido de carbono aumentó debido al grupo pentilo adicional, y se observó contenido de silicio en la superficie debido a la presencia APTES (Tabla 4).

<i>Elemento</i>	Ti [%]	C [%]	N [%]	O [%]	Si [%]
<i>Ti. Sin tratamiento</i>	1,79	80,42	0,5	16,19	-
<i>Ti +APTES+GA</i>	20,6	27,64	4,5	19,36	8
<i>Ti +APTES+GA+ Laminina</i>	1,24	64,08	18,55	14,32	-

Tabla 4. Composición elemental de las superficies de titanio funcionalizadas con APTES y glutaraldehído (GA) y con la proteína laminina 332 según lo determinado por el análisis EDS. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.

En la etapa de acoplamiento final, donde la laminina 332 se acopló covalentemente al enlazador de glutaraldehído se detectó un aumento en el contenido de carbono y nitrógeno debido al esqueleto de carbono y los grupos N que contiene la proteína (Tabla 4).

8.2 Influencia de la laminina 332 inmovilizada sobre la respuesta de Queratinocitos

a. Viabilidad celular

El análisis de la viabilidad de los queratinocitos orales línea celular CAL-27 se realizó con el ensayo de lactato deshidrogenasa LDH sobre las superficies de titanio funcionalizadas APTES+GA y la proteína Laminina 332 a las 4 horas, 24 horas y 48 horas. Observamos que las superficie funcionalizada no ejercen ningún efecto tóxico en las células (Figura 12). Los porcentajes de células viables que se cultivaron en los implantes de Ti recubiertos con Laminina 332 fueron; $99,76 \pm 0,06\%$ para el tiempo 4 horas, $94,87 \pm 1,53 \%$ para las células cultivadas por 24 horas y $90,18 \pm 0,6 \%$ para las células cultivadas durante 48 horas, adicionalmente se observó bajo porcentaje de liberación de LDH en el sobrenadante del cultivo celular.

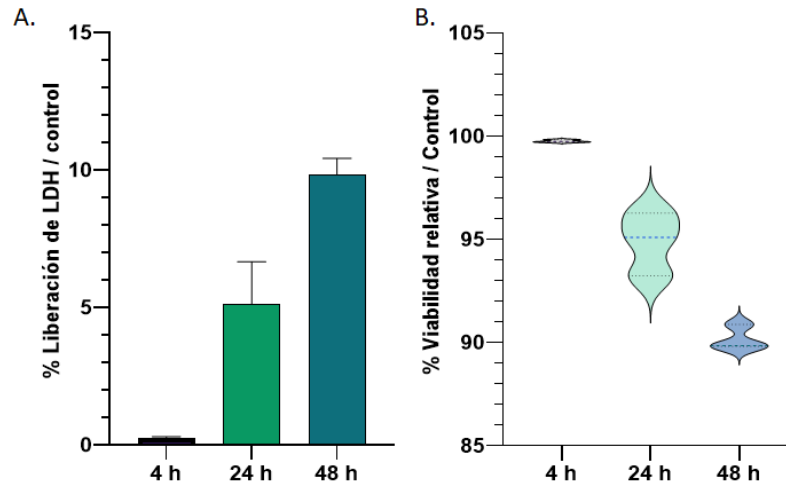


Figura 12. Viabilidad celular y toxicidad de las células CAL-27 cultivadas sobre los implantes de titanio funcionalizados con APTES+GA y la proteína Laminina 332 a las 4, 24 y 48 horas **A.** Porcentaje de liberación de lactato dehidrogenasa (LDH) al sobrenadante del medio de cultivo. **B.** Porcentaje de viabilidad relativa al control de las células CAL-27 cultivadas sobre los implantes de titanio funcionalizados. Todos los datos se representan como las medias $\pm$ SEM de tres cortes independientes. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.

La viabilidad celular es un requisito básico para otros procesos biológicos; unión inicial de las células a la superficie al material, proliferación, diferenciación y migración. Por esto evaluamos mediante el ensayo de liberación de calceína-AM y Hoechst 33342 la viabilidad por microscopía de fluorescencia a los diferentes puntos de tiempo después de la siembra celular (0, 24 y 48 horas) (Figura 13).

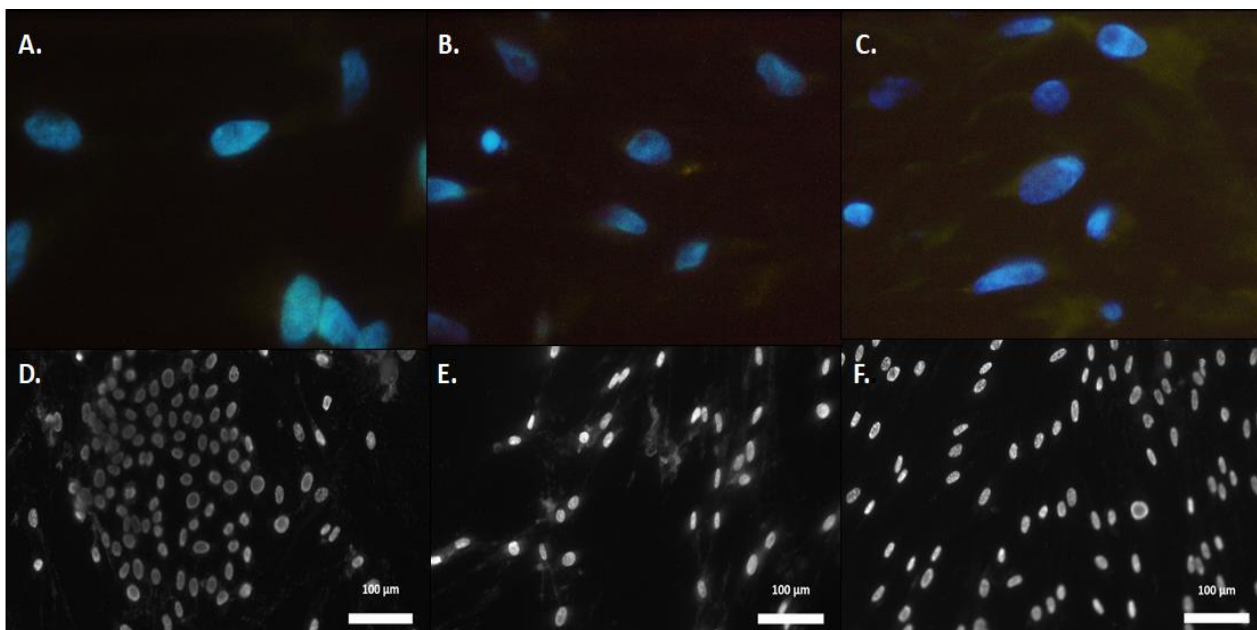


Figura 13. Fotografías de microscopía de fluorescencia de la viabilidad de las células CAL-27 sobre las superficies de titanio funcionalizadas con laminina 332. Las células se recogieron enzimáticamente de los implantes control (4 horas) y a las 24 y 48 horas. Las células teñidas se observaron por microscopía fluorescente. A, B y C Ensayos de viabilidad celular usando Calcein-AM y Hoechst 33342 después de 0, 24 y 48 horas de cultivo respectivamente. D, E y F. Tinción de los núcleos de las células con el colorante fluorescente Hoechst 33342 a 4, 24 y 48 horas de cultivo. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.

8.3 Respuesta de los queratinocitos orales (CAL-27) humanos unidos a las superficies de los implantes de titanio funcionalizados con laminina 332

a. Morfología celular

Los queratinocitos orales se unieron uniformemente a todos los implantes funcionalizados con y sin la proteína laminina 332 como lo muestran las imágenes SEM (figuras 14 (a) - (f)). En los implantes control sin tratamiento y con tratamiento de APTES+GA las células revelaron principalmente una forma alargada. En los implantes con laminina se observaron células con una red de extensiones celulares muy finas que ayudan a su fijación en la superficie localmente lisa donde se encuentra proteína (figuras (e), (f)). Los contactos célula-célula también fueron visibles después de 4 días de cultivo e todas las superficies (figuras 14 (a)-(b)). En los implantes Ti+APTES+GA, las células mostraron una morfología relativamente extendida y aplanada (figuras 14 (c), (d)). No se observó variabilidad en la morfología celular entre los diferentes implantes del mismo grupo. Se observó que

el tamaño de las células fue mayor en la muestra PH que en Ti+APTES+GA las silanizadas, Las diferencias en cada una de las superficies y en cuanto a la rugosidad observada, parece tener influencia sobre la extensión y morfología de las células. En la (Figura 13 (e) y(f)), se observa que el número de células sobre las superficies bio funcionalizadas con laminina 332 es significativamente mayor que sobre las superficies sin recubrimiento con proteína, y también es mayor comparada con la muestra control de titanio puro. Por otra parte, además de la presencia de laminina 332 inmovilizada sobre las superficies, hay otros parámetros que pueden influir en la respuesta de las células, como es el caso de la rugosidad encontrada en las superficies.

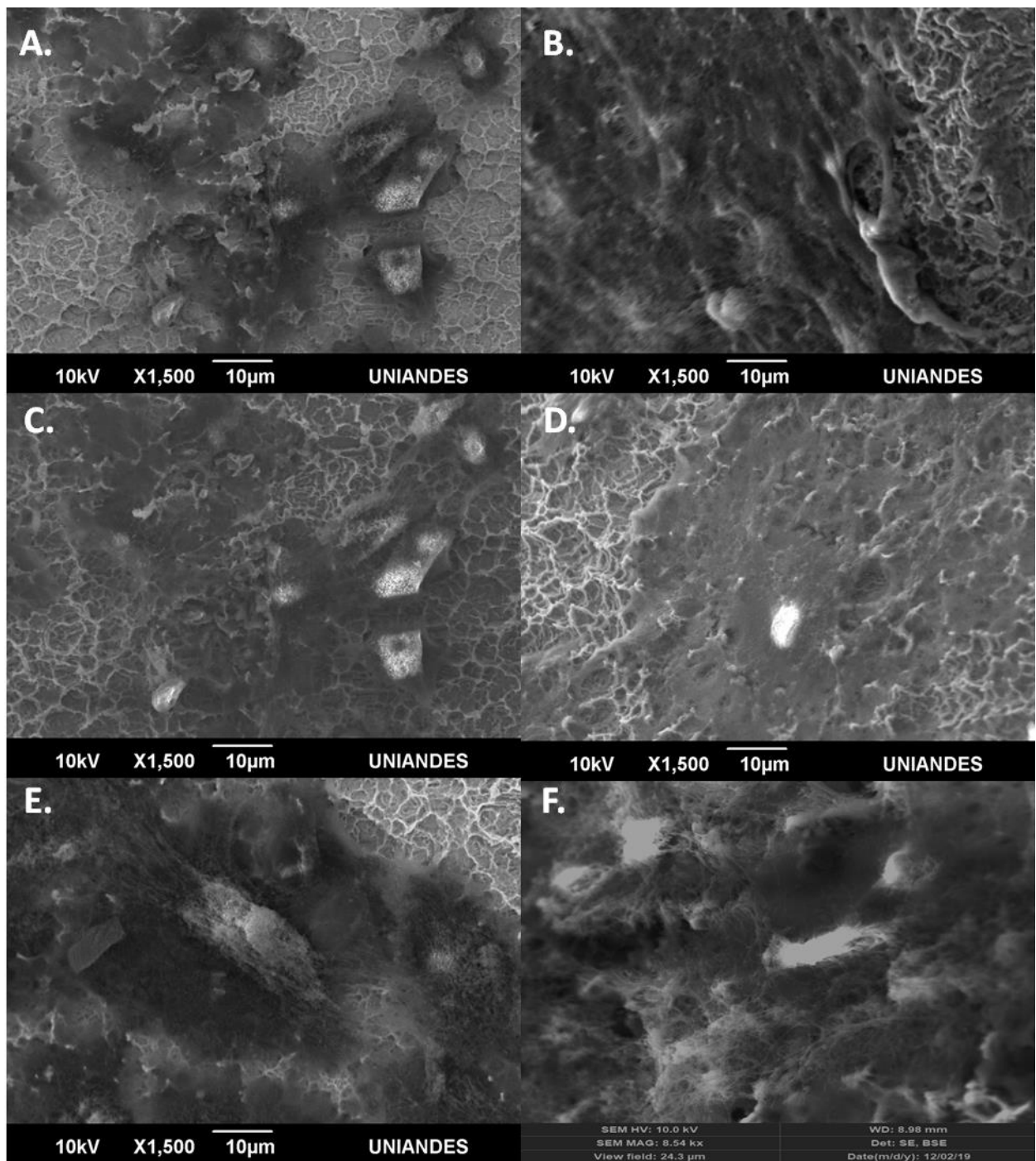


Figura 14. Imágenes SEM de los queratinocitos orales (CAL-27) unidos en: (a), (b) implantes control sin tratamiento; (c), (d) implantes recubiertos con APTES+GA; (e), (f) implantes con la proteína laminina 332 acoplada covalentemente después de 4 días de cultivo. Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.

8.4 de la superficie de titanio sobre la secreción de citoquinas por los queratinocitos orales (CAL-27)

Para comparar el perfil de citoquinas de los queratinocitos orales sobre las superficies de Ti, las células se cultivaron durante 24 y 48 horas y se determinaron las concentraciones de citocinas en los sobrenadantes mediante Legend Plex. La cinética de expresión de las citocinas fue muy similar entre las dos superficies, sin embargo, la superficie modificada con laminina 332 indujo niveles de más altos de la citocina proinflamatoria IL-1a ($p < 0,05$), IL-8 ($p < 0,05$) y de la quimioquina MCP-1 a las 24 horas de cultivo ($p < 0,05$) en comparación con las superficies tratadas (figura 15). A las 48 horas de cultivo se observó aumento no significativo de la IL-6 e IL-8 y aumento significativo de la quimioquina MCP-1 ($p < 0,05$) comparado con la superficie control sin tratamiento.

El mapa de calor basado en valores medios de las citocinas seleccionadas muestra la expresión de citocinas dependiente de la superficie (Figura 15). La cinética de las citocinas fue muy similar entre los tiempos evaluados, sin embargo se observaron mayores cambios a 24 horas de evaluación.

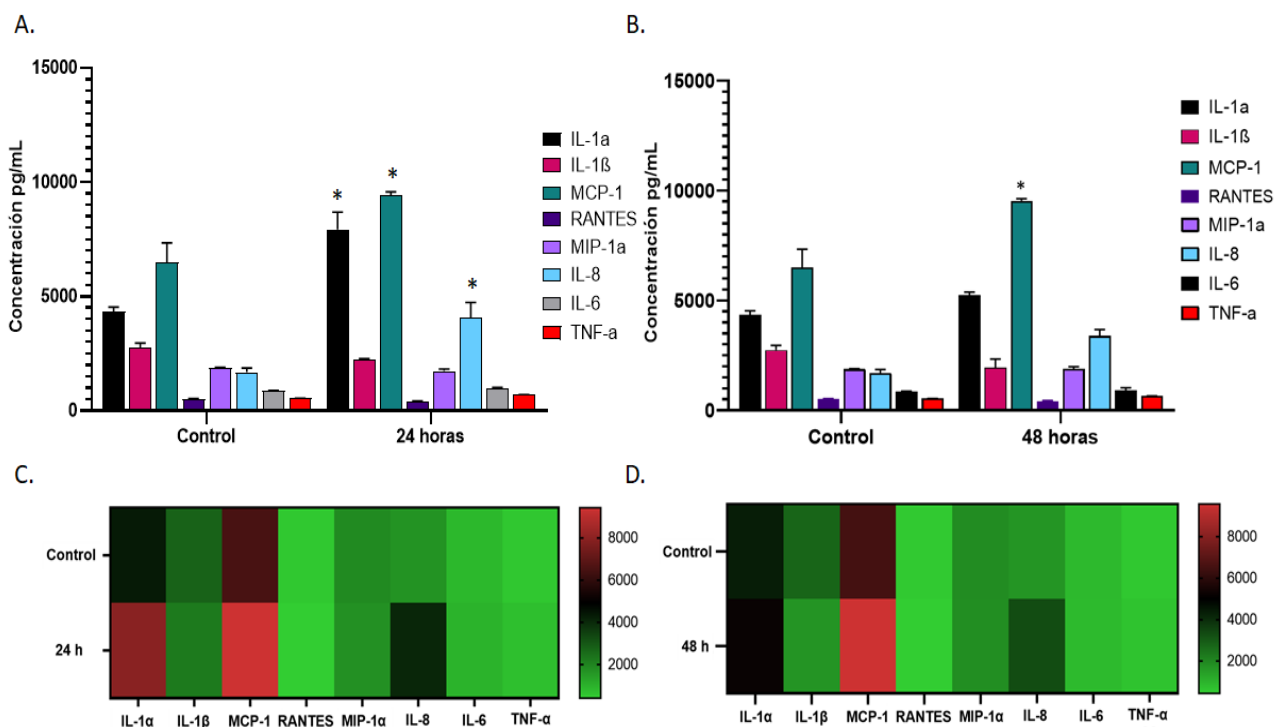


Figura 15. Perfil de secreción de citocinas de las células CAL-27 cultivadas sobre los implantes de titanio con y sin laminina 24 y 48 horas. **A.** Gráfica de barras de la concentración (pg/mL) de las 8 citocinas en los implantes control sin proteína y los implantes con laminina 332. Se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en IL-1α, MCP-1 e IL-8. **B.** Mapa de calor que representa los valores medios de las concentraciones de citoquinas en los sobrenadantes de células CAL-27 cultivadas sobre las superficies de Ti a diferentes tiempos. Para cada citocina, los valores se normalizaron y transformaron en códigos de color que representan más alto (rojo), intermedio (negro) o menor concentración (verde). Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.

8.5 Expresión génica

Debido a la importancia de la respuesta de cicatrización en los implantes dentales biofuncionalizados, elegimos evaluar la expresión transcripcional de los factores de crecimiento VEGF, FGF, TGFβ y EGF por PCR en tiempo real.

En la Figura. 16, se muestra los resultados del análisis de expresión génica (RT-qPCR) de los genes de factores de crecimiento necesarios para los procesos de adhesión y proliferación de los queratinocitos orales (CAL-27) sobre las superficies de titanio a 4, 24 y 48 horas. Estos incluyeron factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento transformante (TGF β) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Los resultados fueron

normalizados respecto a los niveles de expresión del gen endógeno de referencia GAPDH y son representados como la Expresión Relativa (ER) respecto a las células sembradas sobre la muestra de titanio puro sin ningún recubrimiento (Ti). La tendencia general observada fue que en el grupo de las superficies funcionalizadas con la proteína laminina 332 hubo una sobreexpresión de todos los genes evaluados siendo estadísticamente significativo ($p < 0,05$) (Figura 16) en concordancia con la mayor adhesión de las células y extensiones citoplasmáticas observada en esta superficie (Figura 14 e y f).

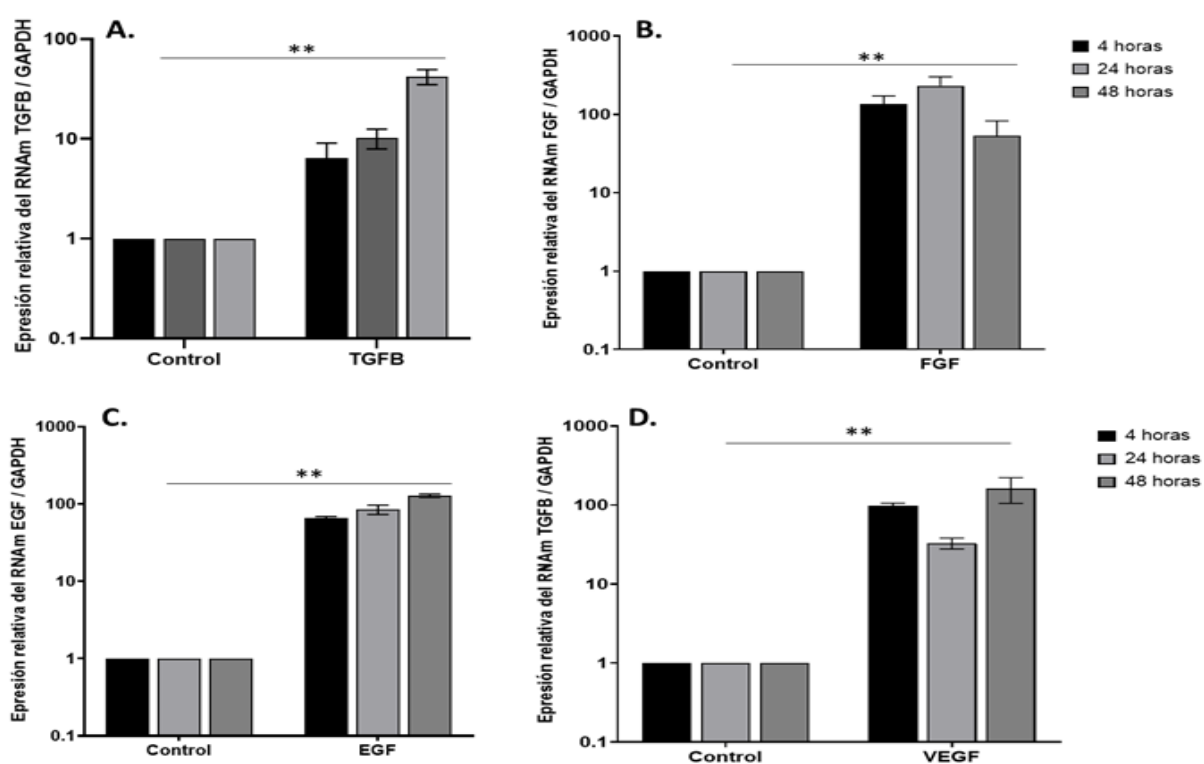


Figura 16. Análisis de expresión génica (RT-qPCR). (a) TGF- β control y con laminina 332. (b) FGF control y con laminina 332. (c) EGF control y con laminina 332. (d) VEGF control y con laminina 332. Con la proteína laminina 332 hubo una sobreexpresión de todos los genes evaluados siendo estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Datos y diseños de figura por Carlos Fajardo.

9. DISCUSIÓN

La barrera del tejido blando alrededor de un implante dental juega un papel crucial en el éxito de los mismos porque protege las estructuras subyacentes de tejido duro y proporciona un sellado biológico que evita las complicaciones asociadas a infecciones. Los infiltrados inflamatorios debido a la colonización bacteriana en la interfaz del implante pueden causar crecimiento epitelial descendente y posterior pérdida ósea periimplantaria (Berglundh *et al*,1992) . En los dientes naturales, el tejido blando se adhiere fuertemente al esmalte y al cemento en la superficie dental, proporcionando una defensa sólida para el hueso alveolar (Jiang Q *et al*,2014). Para mejorar este sellado biológico alrededor de los implantes dentales se han introducido varios procedimientos de modificación de la superficie de los implantes para mejorar el contacto hueso-implante, pero se ha realizado poca investigación sobre el sellado del tejido blando periimplantario. Sin embargo, en la actualidad se ha empezado a dar más importancia a los tejidos blandos periimplantares como proveedores de un sellado biológico y de salud de los tejidos periimplantares a largo plazo. Por lo tanto cualquier modificación de superficie y las propiedades físico-químicas a nivel de los implantes dentales pueden influenciar la adhesión celular y mejorar su capacidad para promover y/o acelerar los procesos de curación y restauración de los tejidos blandos después de la implantación.

Teniendo en cuenta lo anterior, en este trabajo se propuso la bio-funcionalización de superficies de titanio con laminina 332, como estrategia para mejorar el sellado biológico de implantes dentales. La laminina 332 es una molécula clave en la cicatrización de heridas de la mucosa y la formación de sellos en el epitelio de unión en la encía de forma natural y ha sido reportada como un excelente promotor de la adhesión de células epiteliales gingivales (Larjava H *et al*,2011; Zhang J *et al*, 2018) . Por eso, en este estudio se analizó la posibilidad de utilizar silanos como agentes de acoplamiento para formar un enlace covalente entre el titanio y poder funcionalizar la molécula de proteína.

La biofuncionalización de las superficies es un proceso que incluye tratamientos físico-químicos dirigidos a obtener inmovilización de moléculas bioactivas como la Laminina 332. A este respecto, el ataque químico con la solución piraña (ácido sulfúrico (H_2SO_4) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2)) ha sido utilizado como tratamiento previo a la silanización en varios estudios (Middleton CA *et al*, 2007) tanto para limpiar los residuos orgánicos y como estrategia para hidroxilar la superficie con grupos OH- y hacerla altamente hidrofílica para fines de funcionalización (MacDonald DE *et al*,2004;Middleton CA *et al*, 2007) y para modular las interacciones entre la superficie del titanio y los tejidos que le rodean .

Las modificaciones a nivel de topografía, rugosidad y química superficial puede lograr un mejor comportamiento celular sobre las superficie de los implantes dentales ya que influye en las interacciones superficie/molécula y superficie/célula.

El aumento de la rugosidad que se observó en este estudio debido al ataque químico con la solución PH generó una erosión de la superficie cambiando tanto la morfología como el área, como ha sido reportada en otros estudios en donde utilizando ataques químicos con soluciones que contienen peróxido de hidrógeno observan cambios en la rugosidad de la superficie del Titanio (Liu *et al*,2002; L. Tack *et al*, 2015;S. Bronze-Uhle *et al*, 2019; A. Hasan *et al*, 2019). Fraioli *et al*, 2012 utilizando 65%V/V de HNO₃ (ácido nítrico) durante 1h generó mayor rugosidad y cambios en morfología de la superficie de titanio, sin embargo, afectó el proceso de silanización y posterior unión con las proteínas cambiando la arquitectura del implante dental.

Para comparar adecuadamente la nanoarquitectura de las superficies tratadas se utilizaron los parámetros de rugosidad establecidos Ra y Rq para medir la superficie a escala nanométrica (Mitik-Dineva N *et al*,2008) y definir si la modificación generada tiene un efecto significativo sobre el grado en que las células se adhieren.

De forma interesante, dentro de los primeros pasos de modificación de la superficie de titanio el ataque químico con solución PH mostró los valores más altos de parámetros de rugosidad Rq y Ra, lo que sugiere la generación de una superficie irregular que podría influir en la cantidad de biomoléculas inmovilizadas sobre la superficie y en consecuencia tener un efecto en la respuesta celular. Este comportamiento ha sido demostrado en otros estudios en donde el incremento de la rugosidad de la superficie lograda mediante granallado o pulverización con plasma de titanio dió como resultado mejor establecimiento mecánico del implante debido al crecimiento óseo en las cavidades (Le Guehennec L *et al*,2007) y aumento de la superficie de contacto que se traduce en una mayor capacidad de adhesión celular (V. Panayotov *et al*,2015). Koidou *et al* 2018, también encontraron un menor ángulo de contacto en la muestras de discos de titanio sometidos a ataques con ácidos (NaOH) determinando una mayor hidrofiliidad.

Por otra parte los valores negativos de Rsk encontrados en el tratamiento con PH se han asociado a superficies porosas que tienen morfología de valles profundos, mientras que el Rku negativo describe superficies también porosas con morfología de picos y valles (Sedlaček *et al*, 2017)

Adicionalmente, al comparar la superficie con tratamiento PH y la muestra recubierta con laminina se encontró que exhibe marcadas diferencias en la topografía, con una disminución cuantificable en

la rugosidad R_q de la superficie después de la inmovilización de laminina de $39,94 \pm 3,5$ a $19,26 \pm 3,2$ nm. La laminina es una proteína grande compuesta de 3 cadenas separadas con una masa molar total de 810 kDa (Timpl R *et al*, 1979), que ocupa un área y un volumen sobre las superficies (Yurchenco PD *et al*, 1985), además tiende a formar estructuras polimerizadas aumentando aún más su tamaño relativo. Estas características de la proteína, la relación entre el tamaño de la molécula inmovilizada y las características de textura tiene un gran impacto en la eficacia de la inmovilización (M. Woeppel *et al*, 2018).

En este sentido, se ha descrito que aumentar la rugosidad genera una mayor superficie de contacto, aumenta la energía superficial, y mejora la humectabilidad de las superficies, por tal motivo se decidió el uso de solución PH (I. Panayotov *et al*, 2015). El tratamiento con peróxido de hidrógeno aumenta la biocompatibilidad, la bioactividad y la conductividad a nivel óseo. El tratamiento de superficie también aumentó los niveles de Ti antes y después 1.79% - 48.75% respectivamente, lo que indica un aumento en la capa de TiO_2 . Los procesos de rugosidad aumentan el área de superficie efectiva en la interfaz, multiplicando la cantidad de grupos químicos accesibles al fluido de contacto, lo que a su vez mejora la hidrofobicidad / hidrofilia preexistente de la interfaz. En consecuencia, se ha demostrado que los tipos de interacciones que determinan la biocompatibilidad del implante se producen a diferentes escalas de rugosidad (Gittens RA *et al*, 2011; Faia-Torres AB *et al*, 2014; Grizon F *et al*, 2002). La escala de micras mejora el enclavamiento mecánico (Davies JE *et al*, 2013), y las interacciones proteicas están influenciadas por la morfología a nanoescala. Proteínas de diferentes tamaños moleculares, cargas y afinidades de superficie interactúan de manera diferente con topologías de nanoescala idénticas (Blanco EM *et al*, 2008).

Además de la topografía de la superficie, la integración de un implante puede verse notablemente afectada por los recubrimientos proteicos bioactivos (Graf H *et al*, 2008; Forsprecher J *et al*, 2001). La proteína bioactiva Laminina 332 puede promover la adhesión de las células epiteliales a través de interacciones mediadas por los motivos RGD y puede inducir un aumento en la deposición de la ECM al estimular la migración y adhesión de estas células (I Narimatsulkiru *et al*, 2019), en parte, por aumentar proporcionalmente el número de sitios activos para la unión de moléculas bioactivas y células.

Una de las razones principales para usar los tratamientos con la solución PH es eliminar los contaminantes que puedan estar presentes sobre la superficie, los cuales eventualmente pueden reducir la capacidad y eficiencia de los pasos posteriores de funcionalización, como la silanización con APTES y la inmovilización de la proteína. Por tanto es importante determinar los elementos químicos

presentes en la superficie después de estos tratamientos y antes de unir la proteína. En este trabajo, después de los tratamientos con la solución PH, se observó una disminución considerable del porcentaje del pico de C (80.42 ± 3.3 a 45.52) y un incremento considerable de los porcentajes de los picos de Ti (1.79 a 48.75 %) y O (3.19 a 7.23 %), lo que confirma que este tratamiento tiene la capacidad de reducir contaminantes e impurezas de la superficie.

A este respecto, Baranowski *et al*, (2016) con la finalidad de mejorar la osteointegración en la interfaz hueso-implante y reducir el micromovimiento y aflojamiento utilizó discos de titanio recubiertos con Sialoproteína ósea (BSP) y observó aumento en el contenido de Ti y O utilizando la limpieza con PH. Además observaron picos de nitrógeno en los implantes funcionalizados con la proteína (Baranowski *et al*, 2016). Además de la disminución de la contaminación sobre la superficie con el tratamiento con la solución PH. Este también se utilizó para aumentar la oxidación de la superficie por aumento de los grupos OH-s, lo que favorece una mayor cantidad de enlaces con el APTES (Schliephake H *et al*, 2008). En este sentido, después del tratamiento con PH, se observó un incremento en el porcentaje del pico de O. Adicionalmente, las concentraciones de Ti - C - O se modificaron de manera significativa en las diferentes etapas de la bio funcionalización, coincidiendo con un aumento en el contenido de carbono y nitrógeno debido al esqueleto de carbono y los grupos N que contiene la proteína. Comparable con los resultados de Koidou *et al* 2018, que refieren un aumento en las concentraciones de N - C una vez ensamblados los péptidos de laminina 332.

Los mecanismos de inmovilización de proteínas en superficies se rigen por una serie de propiedades superficiales que influyen en la permanencia, orientación y conformación de las proteínas inmovilizadas. Las propiedades fundamentales son la topología y la química. Estas dos propiedades en conjunto determinan la energía libre de superficie (SFE) y la carga, que a su vez controlan las fuerzas de interacción (hidrofóbicas / hidrofílicas y electrostáticas) entre las proteínas y la superficie. Por lo tanto, al manipular la topología y la química de la superficie es posible sintonizar las interacciones de la superficie con la proteína y lograr una bioactividad óptima (Stewart C *et al*, 2019).

La matriz extracelular es quien brinda el soporte necesario a las células para que puedan adherirse, comunicarse entre ellas e interactuar. Diferentes estudios han demostrado que la laminina-332 inicia la formación de hemidesmosomas y apoya la fijación estable de la epidermis a la dermis (Ogawa T *et al*, 2007). Además, también mejora la migración de queratinocitos durante la cicatrización de heridas (D'Alessio S *et al*, 2008), regulando el comportamiento celular al influir en la proliferación celular, supervivencia, morfología, migración y diferenciación (Nguyen BP *et al*, 2000).

Los resultados obtenidos para la línea de queratinocitos orales (CAL -27) a las 0h,24h y 48h sembradas sobre las superficies de titanio funcionalizadas con APTES+GA y la proteína Laminina 332 mostraron que estos tratamientos no comprometen la viabilidad celular lo que demostró que el proceso de bio funcionalización no es tóxico para las células. Resultados similares a los estudios de *Tack et al.*, donde las células mesenquimales sobre titanio funcionalizado mostraron una tasa de mortalidad del 2% (*Tack et al* 2015). *Koidou et al* 2018 también describió una mayor proliferación de queratinocitos en 1h,24h y 48h, también destaca una mayor producción de hemidesmosomas a las 24h y 48h.

Según nuestros resultados, las superficies de titanio funcionalizadas con laminina 332 tienen efecto sobre la expresión de citoquinas por parte de los queratinocitos gingivales., como lo demostrado por *Wachi et al.*, que los iones de titanio activan la expresión de citoquinas de las células epiteliales gingivales (*Wachi T et al*, 2015). En todos los procesos de cicatrización de heridas se presentan diferentes fases dirigidas a recuperar el tejido, estas fases comprenden: hemostasia, inflamación, proliferación celular y regeneración. Estas fases están reguladas por diferentes células, citocinas y factores de crecimiento. En este estudio se evaluó el efecto de la superficie de titanio funcionalizada sobre la secreción de citoquinas y factores de crecimiento por los queratinocitos orales (CAL-27). Las citoquinas con mayor expresión fueron IL-1 α , MCP-1 y IL-8 lo cual concuerda con el proceso de reclutamiento de neutrófilos polimorfonuclear y macrófagos a las 24 y 48 horas (*Eva Engelhardt et al* 1998) con una diferencia significativa con el grupo control.

Se ha descrito que la IL-1 derivada de queratinocitos es un importante iniciador de la cicatrización de heridas en respuesta a lesiones cutáneas (*Freedberg I et al*, 2001). Los queratinocitos son activados por la IL-1 autocrina se vuelven más migratorios y expresan queratinas asociadas con un estado hiperproliferativo (*Komine M et al*, 2001).

A través de la liberación de interleucina IL -1, los queratinocitos puede mejorar la liberación de factores de crecimiento como GM-CSF (*Werner S et al*, 2001), IL-6 o IL-8 (*McCawley LJ et al*, 1998) que a su vez estimulan formación de membrana basal, interacción necesaria para una cicatrización normal.

La IL-8 (CXCL8) juega un papel muy importante en el reclutamiento de neutrófilos en fase inflamatoria, participa en el proceso de angiogénesis y en los procesos de migración y proliferación celular del queratinocito, y diferentes estudios sustentan, que el queratinocito expresa IL-8 durante su fase de proliferación (*Krueger G et al*,1990; *Reusch MK et al*, 1990). *Hall PA*,1990. *Hein R*,1990). *Tonetti et al* 1994 describe la preferencia en localización de IL-8 en la superficie del epitelio de unión.

Tuchil *et al* 2018, demostró que la IL-8 aumenta la proliferación de queratinocitos de un 10 % a un 40% comparado con factores de crecimiento como el EGF. Adicionalmente, la IL-8 se expresa en las fases de hemostasia, inflamación y proliferación celular (Anisyah Ridiandries *et al*,2018), estando asociada en la cicatrización temprana y neo angiogénesis.

Por otra parte, MCP-1 (CCL2) es el principal quimioattractante y activador de monocitos/ macrofagos, se ha descrito que la deficiencia de MCP-1 en ratones está asociada a retraso en la angiogénesis, re-epitelización y síntesis de colágeno (Low QE *et al*. 2001).

Los resultados obtenidos en expresión génica mostraron una sobreexpresión estadísticamente significativa de: VEGF, FGF , TGFb y EGF que en conjunto con la baja secreción de IL-1B, IL-6, TNF-a podría estar asociada a un proceso no inflamatorio y se podría interpretar como un proceso reparativo ya que la IL-8 y MCP-1 jugarían un papel de proliferación de queratinocitos y en el reclutamiento de macrofagos M2 (H Terheyden *et al*,2011).

Adicionalmente, la cicatrización de heridas es un proceso complejo, multicelular que implica la coordinación de varios tipos de células, incluidos los queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y plaquetas. La migración, infiltración, proliferación y diferenciación de estas células culminará en una respuesta inflamatoria, la formación de tejido nuevo y finalmente cierre de la herida. Este complejo proceso se ejecuta y regula por una red de señalización compleja que implica factores de crecimiento , citoquinas y quimiocinas. De particular importancia en este proceso están; el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF-b), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el, factor de crecimiento endotelial vascular. Estos factores de crecimiento estimulan el crecimiento celular, la proliferación, la diferenciación celular.

EGF es una de las primeras moléculas de señalización aisladas, y recibió su nombre por su capacidad para acelerar la diferenciación epidérmica. EGF se une a su receptor, EGFR, causando la dimerización del receptor y la consiguiente activación de su quinasa citoplasmática (Lammers R *et al*, 1990). La quinasa activada inicia varias cascadas de transducción de señales de fosforilación de proteínas, lo que resulta en la activación de factores de transcripción que regulan la expresión de muchos genes . EGF promueve la supervivencia celular, la proliferación, la migración quimiotáctica, suprime la diferenciación terminal e inhibe la apoptosis (Takeuchi K *et al*, 2010). La sobre-expresión de EGF en este estudio respalda la adhesión de las células CAL-27 a la superficies con laminina 332.

VEGF es uno de los mediadores pro angiogénicos más importantes durante la cicatrización (Nissen NN *et al*, 1996). Se ha descrito, que VEGF normalmente se expresa en niveles bajos por los

queratinocitos epidérmicos al inicio del proceso de cicatrización (Kishimoto J *et al*, 2000), y evidencia más reciente sugiere que los queratinocitos también producen VEGF en etapas posteriores de curación (Willenborg S *et al*, 2012). La sobreexpresión de VEGF también juega un papel primordial en el proceso de angiogénesis y respalda la alta secreción de IL-8 como mediador de este proceso.

Nuestros resultados indicaron que la laminina 332 tiene un efecto en la expresión del RNAm de TGF- β . A este respecto, varios estudios han descrito que en el mantenimiento clínico a largo plazo de los implantes TGF- β cumple una función importante debido a que atrae fibroblastos, monocitos, y macrófagos al sitio de inflamación, además provoca una capacidad reducida de fagocitosis de granulocitos y macrófagos (Gabka CJ *et al*, 1995). Durante la formación de tejido nuevo, induce la expresión de integrinas que controlan la migración de queratinocitos a la superficie, estimulando la síntesis de colágeno (Kishi K *et al*, 1999). Schultze-Mosgau *et al.*, describieron que durante inserción de implantes dentales a superficies de titanio se aumentó de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$) la expresión de TGF- β 1, IL-1 β y VEGF en la mucosa periimplantaria. comparado con la encía humana no tratada la cual exhibió una expresión basal de estos factores (Schultze-Mosgau S *et al*, 2006).

Ensayos clínicos donde han investigado la expresión de citocinas en la región periimplantaria han informado niveles aumentados de IL-1 β , TGF- β 1 y VEGF en el curso de la inflamación (Bassi F *et al*, 2001).

Los datos *in vitro* muestran valores incrementados de IL-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral si el tejido se incubaba con implantes dentales (Shida J *et al*, 2000). En contraste, los niveles más altos de TGF- β 1 parecen tener influencia positiva en la integración exitosa del implante: la síntesis de la matriz extracelular y la proliferación de células epiteliales de la mucosa (Schierano G *et al*, 2001). En estudios *in vitro* han utilizado la aplicación tópica de TGF- β para mejorar la curación y cicatrización de heridas en piel (Ammann AJ *et al*, 1990). La demostración de los altos niveles de expresión de estos factores de crecimiento pudieron tener influencia sobre la adhesión de queratinocitos en las superficies de titanio funcionalizadas.

10. CONCLUSIONES.

- 1) Las muestras tratadas con PH mostraron un incremento en la rugosidad lo que produce un incremento en el área superficial. Además el tratamiento de limpieza y activación con solución (PH), son efectivos en términos de limpieza, ya que eliminan gran cantidad de carbono relacionado a los contaminantes atmosféricos.
- 2) La presencia de los picos correspondientes a silicio en los espectros obtenidos por EDS, confirman la eficiencia del método de silanización de las superficies de titanio propuesto.
- 3) Las superficies de titanio biofuncionalizadas con laminina 332 tienen un potencial beneficio biológico, mejorando de manera significativa la superficie de titanio promoviendo una mejor y rápida adhesión celular.
- 4) La laminina 332 en la superficie de los implantes promueve de manera significativa la secreción de las citoquinas IL-8 y MCP-1 coadyuvantes en el proceso de proliferación celular y adhesión.
- 5) Se observó la sobre-expresión de manera significativa de los factores de crecimiento FGF, TGF- β , EGF y VEGF indispensables en los procesos de reparación y cicatrización.

11. BIBLIOGRAFÍA.

- Abrahamsson, I., Zitzmann, N. U., Berglundh, T., Linder, E., Wennerberg, A., & Lindhe, J. (2002). The mucosal attachment to titanium implants with different surface characteristics: an experimental study in dogs. *Journal of clinical periodontology*, 29(5), 448-455.
- Agarwal, V., Subash, A., Nayar, R. C., & Rao, V. (2019). Is EGFR really a therapeutic target in head and neck cancers?. *Journal of surgical oncology*, 119(6), 685-686.
- Albrektsson, T., Brånemark, P. I., Hansson, H. A., & Lindström, J. (1981). Osseointegrated titanium implants: requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 52(2), 155-170.
- Amano, S., Akutsu, N., Ogura, Y., & Nishiyama, T. (2004). Increase of laminin 5 synthesis in human keratinocytes by acute wound fluid, inflammatory cytokines and growth factors, and lysophospholipids. *British Journal of Dermatology*, 151(5), 961-970.
- Ammann, A. J., Beck, L. S., DeGUZMAN, L. E. O., Hirabayashi, S. E., Pun Lee, W., McFATRIDGE, L. O. R. R. I. E., ... & Mustoe, T. A. (1990). Transforming Growth Factor- β Effect on Soft Tissue Repair. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 593(1), 124-134.
- Atsuta, I., Ayukawa, Y., Kondo, R., Oshiro, W., Matsuura, Y., Furuhashi, A., ... & Koyano, K. (2016). Soft tissue sealing around dental implants based on histological interpretation. *Journal of prosthodontic research*, 60(1), 3-11.
- Aumailley, M., El Khal, A., Knöss, N., & Tunggal, L. (2003). Laminin 5 processing and its integration into the ECM. *Matrix biology*, 22(1), 49-54.
- Bassi, F., Marchisella, C., Schierano, G., Gasser, E., Montrucchio, G., Valente, G., ... & Preti, G. (2001). Detection of platelet-activating factor in gingival tissue surrounding failed dental implants. *Journal of periodontology*, 72(1), 57-64.
- Berglundh, T., Abrahamsson, I., Welander, M., Lang, N. P., & Lindhe, J. (2007). Morphogenesis of the peri-implant mucosa: an experimental study in dogs. *Clinical oral implants research*, 18(1), 1-8.
- Berglundh, T., Lindhe, J., Marinell, C., Ericsson, I., & Liljenberg, B. (1992). Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog. *Clinical oral implants research*, 3(1), 1-8.
- Blanco, E. M., Horton, M. A., & Mesquida, P. (2008). Simultaneous investigation of the influence of topography and charge on protein adsorption using artificial nanopatterns. *Langmuir*, 24(6), 2284-2287.
- Brånemark, P. I., Breine, U., Adell, R., Hansson, B. O., Lindström, J., & Ohlsson, Å. (1969). Intra-osseous anchorage of dental prostheses: I. Experimental studies. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery*, 3(2), 81-100.

- Cochran, D. L., Hermann, J. S., Schenk, R. K., Higginbottom, F. L., & Buser, D. (1997). Biologic width around titanium implants. A histometric analysis of the implanto-gingival junction around unloaded and loaded non submerged implants in the canine mandible. *Journal of periodontology*, 68(2), 186-197.
- d'Alessio, S., Gerasi, L., & Blasi, F. (2008). uPAR-deficient mouse keratinocytes fail to produce EGFR-dependent laminin-5, affecting migration in vivo and in vitro. *Journal of cell science*, 121(23), 3922-3932.
- Davies, J. E., Ajami, E., Moineddin, R., & Mendes, V. C. (2013). The roles of different scale ranges of surface implant topography on the stability of the bone/implant interface. *Biomaterials*, 34(14), 3535-3546.
- Derks, J., & Tomasi, C. (2015). Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology. *Journal of clinical periodontology*, 42, S158-S171.
- Etter, T. H., Håkanson, I., Lang, N. P., Trejo, P. M., & Caffesse, R. G. (2002). Healing after standardized clinical probing of the perimplant soft tissue seal: a histomorphometric study in dogs. *Clinical oral implants research*, 13(6), 571-580.
- Faia-Torres, A. B., Guimond-Lischer, S., Rottmar, M., Charnley, M., Goren, T., Maniura-Weber, K., ... & Neves, N. M. (2014). Differential regulation of osteogenic differentiation of stem cells on surface roughness gradients. *Biomaterials*, 35(33), 9023-9032.
- Forsprecher, J., Wang, Z., Goldberg, H. A., & Kaartinen, M. T. (2011). Transglutaminase-mediated oligomerization promotes osteoblast adhesive properties of osteopontin and bone sialoprotein. *Cell adhesion & migration*, 5(1), 65-72.
- Frank, D. E., & Carter, W. G. (2004). Laminin 5 deposition regulates keratinocyte polarization and persistent migration. *Journal of cell science*, 117(8), 1351-1363.
- Gabka, C. J., Benhaim, P., Mathes, S. J., Scheuenstuhl, H., Chan, A., Fu, K. K., & Hunt, T. K. (1995). An experimental model to determine the effect of irradiated tissue on neutrophil function. *Plastic and reconstructive surgery*, 96(7), 1676-1688.
- Ghannad, F., Nica, D., Fulle, M. I. G., Grenier, D., Putnins, E. E., Johnston, S., ... & Häkkinen, L. (2008). Absence of $\alpha\beta 6$ integrin is linked to initiation and progression of periodontal disease. *The American journal of pathology*, 172(5), 1271-1286.
- Gittens, R. A., McLachlan, T., Olivares-Navarrete, R., Cai, Y., Berner, S., Tannenbaum, R., ... & Boyan, B. D. (2011). The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. *Biomaterials*, 32(13), 3395-3403.
- Glauser, R., Schüpbach, P., Gottlow, J., & Hämmerle, C. H. (2005). Periimplant soft tissue barrier at experimental one-piece mini-implants with different surface topography in humans: a light-microscopic overview and histometric analysis. *Clinical implant dentistry and related research*, 7, s44-s51.
- Gräber, H. G., Conrads, G., Wilharm, J., & Lampert, F. (1999). Role of interactions between integrins and extracellular matrix components in healthy epithelial tissue and establishment of a long

junctional epithelium during periodontal wound healing: a review. *Journal of periodontology*, 70(12), 1511-1522.

Graf, H. L., Stoeva, S., Armbruster, F. P., Neuhaus, J., & Hilbig, H. (2008). Effect of bone sialoprotein and collagen coating on cell attachment to Ticer® and pure titanium implant surfaces. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 37(7), 634-640.

Grew, J. C., Ricci, J. L., & Alexander, H. (2008). Connective-tissue responses to defined biomaterial surfaces. II. Behavior of rat and mouse fibroblasts cultured on microgrooved substrates. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 85(2), 326-335.

Grizon, F., Aguado, E., Hure, G., Baslé, M. F., & Chappard, D. (2002). Enhanced bone integration of implants with increased surface roughness: a long term study in the sheep. *Journal of dentistry*, 30(5-6), 195-203.

Hormia, M., Owaribe, K., & Virtanen, I. (2001). The dento-epithelial junction: cell adhesion by type I hemidesmosomes in the absence of a true basal lamina. *Journal of periodontology*, 72(6), 788-797.

Jiang, Q., Yu, Y., Ruan, H., Luo, Y., & Guo, X. (2014). Morphological and functional characteristics of human gingival junctional epithelium. *BMC oral health*, 14(1), 30.

JR, S. A., Allegrini, M. R. F., Yoshimoto, M., JR, B. K., Mai, R., Fanghanel, J., & Gedrange, T. (2008). Soft tissue integration in the neck area of titanium implants—an animal trial. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 59(5), 117-132.

Kainulainen, T., Häkkinen, L., Hamidi, S., Larjava, K., Kallioinen, M., Peltonen, J., ... & Oikarinen, A. (1998). Laminin-5 expression is independent of the injury and the microenvironment during reepithelialization of wounds. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 46(3), 353-360.

Kinumatsu, T., Hashimoto, S., Muramatsu, T., Sasaki, H., Jung, H. S., Yamada, S., & Shimono, M. (2009). Involvement of laminin and integrins in adhesion and migration of junctional epithelium cells. *Journal of periodontal research*, 44(1), 13-20.

Kishi, K., Nakajima, H., & Tajima, S. (1999). Differential responses of collagen and glycosaminoglycan syntheses and cell proliferation to exogenous transforming growth factor β 1 in the developing mouse skin fibroblasts in culture. *British journal of plastic surgery*, 52(7), 579-582.

Kishimoto, J., Ehama, R., Ge, Y., Kobayashi, T., Nishiyama, T., Detmar, M., & Burgeson, R. E. (2000). In vivo detection of human vascular endothelial growth factor promoter activity in transgenic mouse skin. *The American journal of pathology*, 157(1), 103-110.

Koidoua,b, Prokopios P. Argyrisc, Erik P. Skoea, Juliana Mota Siqueirad, Xi Chena, Lei Zhange, James E. Hinrichsb, Massimo Costalongab, Conrado Aparicioa. (2018). Peptide Coatings Enhance Keratinocyte Attachment towards Improving Peri-implant Mucosal Seal. *Biomater Sci*. 2018 June 25; 6(7): 1936–1945. doi:10.1039/c8bm00300a.

Lammers, R., Van Obberghen, E., Ballotti, R., Schlessinger, J., & Ullrich, A. (1990). Transphosphorylation as a possible mechanism for insulin and epidermal growth factor receptor activation. *Journal of Biological Chemistry*, 265(28), 16886-16890.

- Lang, N. P., Berglundh, T., & Working Group 4 of the Seventh European Workshop on Periodontology. (2011). Periimplant diseases: where are we now?—Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Journal of clinical periodontology*, 38, 178-181.
- Lang, N. P., Wetzel, A. C., Stich, H., & Caffesse, R. G. (1994). Histologic probe penetration in healthy and inflamed peri-implant tissues. *Clinical oral implants research*, 5(4), 191-201.
- Larjava, H., Koivisto, L., Häkkinen, L., & Heino, J. (2011). Epithelial integrins with special reference to oral epithelia. *Journal of dental research*, 90(12), 1367-1376.
- Larjava, H., Koivisto, L., Häkkinen, L., & Heino, J. (2011). Epithelial integrins with special reference to oral epithelia. *Journal of dental research*, 90(12), 1367-1376.
- Le Guéhennec, L., Soueidan, A., Layrolle, P., & Amouriq, Y. (2007). Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental materials*, 23(7), 844-854.
- Li, M., Firth, J. D., & Putnins, E. E. (2005). Keratinocyte growth factor-1 expression in healthy and diseased human periodontal tissues. *Journal of periodontal research*, 40(2), 118-128.
- MacDonald, D. E., Rapuano, B. E., Deo, N., Stranick, M., Somasundaran, P., & Boskey, A. L. (2004). Thermal and chemical modification of titanium–aluminum–vanadium implant materials: effects on surface properties, glycoprotein adsorption, and MG63 cell attachment. *Biomaterials*, 25(16), 3135-3146.
- Maksoud, M. A. (2003). Manipulation of the peri-implant tissue for better maintenance: a periodontal perspective. *Journal of Oral Implantology*, 29(3), 120-123.
- Middleton, C. A., Pendegrass, C. J., Gordon, D., Jacob, J., & Blunn, G. W. (2007). Fibronectin silanized titanium alloy: a bioinductive and durable coating to enhance fibroblast attachment in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 83(4), 1032-1038.
- Mitik-Dineva, N., Wang, J., Mocanasu, R. C., Stoddart, P. R., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P. (2008). Impact of nano-topography on bacterial attachment. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 3(4), 536-544.
- Moon, I. S., Berglundh, T., Abrahamsson, I., Linder, E., & Lindhe, J. (1999). The barrier between the keratinized mucosa and the dental implant: an experimental study in the dog. *Journal of clinical periodontology*, 26(10), 658-663.
- Murgia, C., Blaikie, P., Kim, N., Dans, M., Petrie, H. T., & Giancotti, F. G. (1998). Cell cycle and adhesion defects in mice carrying a targeted deletion of the integrin $\beta 4$ cytoplasmic domain. *The EMBO journal*, 17(14), 3940-3951.
- Nanci, A., & Bosshardt, D. D. (2006). Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontology* 2000, 40(1), 11-28.
- Narimatsu, I., Atsuta, I., Ayukawa, Y., Oshiro, W., Yasunami, N., Furuhashi, A., & Koyano, K. (2019). Epithelial and connective tissue sealing around titanium implants with various typical surface finishes. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5(10), 4976-4984.

- Nevins, M., Nevins, M. L., Camelo, M., Boyesen, J. L., & Kim, D. M. (2008). Human histologic evidence of a connective tissue attachment to a dental implant. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 28(2).
- Nissen, N. N., Polverini, P. J., Gamelli, R. L., & DiPietro, L. A. (1996). Basic fibroblast growth factor mediates angiogenic activity in early surgical wounds. *Surgery*, 119(4), 457-465.
- Nogueira-Filho, G., Iacopino, A. M., & Tenenbaum, H. C. (2011). Prognosis in implant dentistry: a system for classifying the degree of peri-implant mucosal inflammation. *Journal of the Canadian Dental Association*, 77(1), 25.
- Ogawa, T., Tsubota, Y., Hashimoto, J., Kariya, Y., & Miyazaki, K. (2007). The short arm of laminin γ 2 chain of laminin-5 (laminin-332) binds syndecan-1 and regulates cellular adhesion and migration by suppressing phosphorylation of integrin β 4 chain. *Molecular biology of the cell*, 18(5), 1621-1633.
- Oksanen, J., Sorokin, L. M., Virtanen, I., & Hormia, M. (2001). The junctional epithelium around murine teeth differs from gingival epithelium in its basement membrane composition. *Journal of dental research*, 80(12), 2093-2097.
- Panayotov, I. V., Vladimirov, B. S., Dutilleul, P. Y. C., Levallois, B., & Cuisinier, F. (2015). Strategies for immobilization of bioactive organic molecules on titanium implant surfaces—a review. *Folia medica*, 57(1), 11-18.
- Rompen, E., Domken, O., Degidi, M., Farias Pontes, A. E., & Piattelli, A. (2006). The effect of material characteristics, of surface topography and of implant components and connections on soft tissue integration: a literature review. *Clinical oral implants research*, 17(S2), 55-67.
- Salcetti, J. M., Moriarty, J. D., Cooper, L. F., Smith, F. W., Collins, J. G., Socransky, S. S., & Offenbacher, S. (1997). The clinical, microbial, and host response characteristics of the failing implant. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 12(1).
- Schierano, G., Bellone, G., Manzella, C., Preti, G., & Emanuelli, G. (2001). In vitro effect of transforming growth factor- β on adhesion molecule expression by human gingival fibroblasts cultured in the presence of a titanium abutment. *Journal of periodontology*, 72(12), 1658-1665.
- Schliephake, H., & Scharnweber, D. (2008). Chemical and biological functionalization of titanium for dental implants. *Journal of Materials Chemistry*, 18(21), 2404-2414.
- Schultze-Mosgau, S., Wehrhan, F., Wichmann, M., Schlegel, K. A., Holst, S., & Thorwarth, M. (2006). Expression of interleukin 1-beta, transforming growth factor beta-1, and vascular endothelial growth factor in soft tissue over the implant before uncovering. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 101(5), 565-571.
- Schupbach, P., & Glauser, R. (2007). The defense architecture of the human periimplant mucosa: a histological study. *The Journal of prosthetic dentistry*, 97(6), S15-S25.
- Sedlaček, M., Gregorčič, P., & Podgornik, B. (2017). Use of the roughness parameters S_{sk} and S_{ku} to control friction—A method for designing surface texturing. *Tribology Transactions*, 60(2), 260-266.
- Shida, J., Trindade, M. C. D., Goodman, S. B., Schurman, D. J., & Smith, R. L. (2000). Induction of interleukin-6 release in human osteoblast-like cells exposed to titanium particles in vitro. *Calcified tissue international*, 67(2), 151-155.

- Smola, H., Stark, H. J., Thiekötter, G., Mirancea, N., Krieg, T., & Fusenig, N. E. (1998). Dynamics of basement membrane formation by keratinocyte–fibroblast interactions in organotypic skin culture. *Experimental cell research*, 239(2), 399-410.
- Soboyejo, W. O., Nemetski, B., Allameh, S., Marcantonio, N., Mercer, C., & Ricci, J. (2002). Interactions between MC3T3-E1 cells and textured Ti6Al4V surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 62(1), 56-72.
- Stewart, C., Akhavan, B., Wise, S. G., & Bilek, M. M. (2019). A review of biomimetic surface functionalization for bone-integrating orthopedic implants: Mechanisms, current approaches, and future directions. *Progress in Materials Science*, 100588.
- Takeuchi, K., & Ito, F. (2010). EGF receptor in relation to tumor development: molecular basis of responsiveness of cancer cells to EGFR-targeting tyrosine kinase inhibitors. *The FEBS journal*, 277(2), 316-326.
- Tamura, R. N., Oda, D., Quaranta, V., Plopper, G., Lambert, R., Glaser, S., & Jones, J. C. R. (1997). Coating of titanium alloy with soluble laminin-5 promotes cell attachment and hemidesmosome assembly in gingival epithelial cells: potential application to dental implants. *Journal of periodontal research*, 32(3), 287-294.
- Tetè, S., Mastrangelo, F., Bianchi, A., Zizzari, V., & Scarano, A. (2009). Collagen fiber orientation around machined titanium and zirconia dental implant necks: an animal study. *The International journal of oral & maxillofacial implants*, 24(1), 52.
- Timpl, R., Rohde, H., Robey, P. G., Rennard, S. I., Foidart, J. M., & Martin, G. R. (1979). Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 254(19), 9933-9937.
- Tonetti, M. S. (1999). Determination of the success and failure of root-form osseointegrated dental implants. *Advances in dental research*, 13(1), 173-180.
- Weiner, S., Simon, J., Ehrenberg, D. S., Zweig, B., & Ricci, J. L. (2008). The effects of laser microtextured collars upon crestal bone levels of dental implants. *Implant dentistry*, 17(2), 217-228.
- Werner, S., & Smola, H. (2001). Paracrine regulation of keratinocyte proliferation and differentiation. *Trends in cell biology*, 11(4), 143-146.
- Wilhelmsen, K., Litjens, S. H., Kuikman, I., Margadant, C., van Rheenen, J., & Sonnenberg, A. (2007). Serine phosphorylation of the integrin $\beta 4$ subunit is necessary for epidermal growth factor receptor–induced hemidesmosome disruption. *Molecular biology of the cell*, 18(9), 3512-3522.
- Willenborg, S., Lucas, T., Van Loo, G., Knipper, J. A., Krieg, T., Haase, I., ... & Pasparakis, M. (2012). CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 120(3), 613-625.
- Woepfel, K. M., Zheng, X. S., & Cui, X. T. (2018). Enhancing surface immobilization of bioactive molecules via a silica nanoparticle based coating. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(19), 3058-3067.
- Yurchenco, P. D., Tsilibary, E. C., Charonis, A. S., & Furthmayr, H. (1985). Laminin polymerization in vitro. Evidence for a two-step assembly with domain specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 260(12), 7636-7644.

Zhang, J., Wang, H., Wang, Y., Dong, W., Jiang, Z., & Yang, G. (2018). Substrate-mediated gene transduction of LAMA3 for promoting biological sealing between titanium surface and gingival epithelium. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 161, 314-323.

Zitzmann, N. U., & Berglundh, T. (2008). Definition and prevalence of peri-implant diseases. *Journal of clinical periodontology*, 35, 286-291.