

TESIS DOCTORAL

Facultad de Odontología. Universidad de Granada



**IMPPLICACIONES BIOLÓGICAS DE LA INHIBICIÓN DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA 1 EN LA OSTEOINTEGRACIÓN:
ESTUDIO *IN VITRO* E *IN VIVO*.**

Andrea Cirera Estadella

Noviembre de 2018

Directores:

Pablo Galindo Moreno

Universidad de Granada

Javier Gil Mur

Universidad Politécnica de Cataluña

Pablo Sevilla Sánchez

Escuela Universitaria Salesiana de Sarriá

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Andrea Cirera Estadella
ISBN: 978-84-1306-086-6
URI: <http://hdl.handle.net/10481/54750>

TESIS DOCTORAL

Facultad de Odontología. Universidad de Granada



El trabajo de investigación que se expone en la siguiente tesis doctoral titulada “IMPLICACIONES BIOLÓGICAS DE LA INHIBICIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA 1 EN LA OSTEINTEGRACIÓN: ESTUDIO *IN VITRO* E *IN VIVO*” ha sido realizado bajo nuestra dirección por la Licenciada Dña Andrea Cirera Estadella.

Una vez publicados los artículos correspondientes en las revistas del área, se considera oportuno, y así lo aprueban los directores de la tesis, su presentación para permitir a la doctorando aspirar al grado de Doctor ante el Tribunal que en su día se asigne.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, se expide la presente en Granada a 3 de noviembre de 2018.

Directores:

Pablo Galindo Moreno

Profesor Catedrático

Departamento de Estomatología

Universidad de Granada

Javier Gil Mur

Profesor Catedrático

Departamento de Estomatología

Universidad Internacional de Cataluña

Pablo Sevilla Sánchez

Profesor Titular

Departamento de Mecánica

Esc. Univ. Salesiana de Sarriá

A mis padres,
A mi hermana.

*Cuando llegue la inspiración,
que me encuentre trabajando.*

Pablo Picasso (1881-1973)

Pintor y escultor español

AGRADECIMIENTOS

Durante estos últimos cinco años han sido muchas las personas que me han ayudado a la realización de este proyecto. Redactar estas líneas es la parte que me hace más ilusión y me emociona pensar que por fin estoy escribiéndolas. Gracias a todos por permitir que este viaje haya sido posible.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias al profesor Dr. Pablo Galindo Moreno, director de esta tesis y amigo. Cuando pienso en cómo empezó todo, me viene a la cabeza la insistencia de mi padre en que escribiera a universidades extranjeras para ir a conocer otras facultades y aprender. Qué suerte tuve cuando Pablo respondió un e-mail a una desconocida y me invitó a pasar un mes en el Departamento de Periodoncia de la Universidad de Michigan. Gracias por brindarme tal oportunidad y cambiar mi rumbo profesional. Muchas gracias, Pablo, por contagiarme tu ilusión y empaparme de conocimientos, por ser mi mentor y por ayudarme a crecer no sólo profesionalmente sino como persona.

En segundo lugar, quiero darle las gracias al profesor Dr. Javier Gil Mur, codirector de este trabajo. Gracias por tu entusiasmo y optimismo Javier, por haberme invitado a trabajar duro en la Universidad Politécnica de Catalunya, aún recuerdo, cuando nos conocimos en el II Congreso de la SCOI en Santiago de Compostela. Gracias por hacer posible el desarrollo de un proyecto al que no le han faltado obstáculos, y por tu generosidad.

Mi agradecimiento es absoluto al profesor Dr. Pablo Sevilla Sánchez, codirector de tesis, compañero y amigo. Gracias por tu paciencia, por haberme apoyado y comprendido. Sobran las palabras, Pablo, sabes muy bien que ha sido una suerte haber trabajado a tu lado durante el dificultoso camino que conlleva la elaboración de una tesis doctoral.

Quiero agradecer también a la profesora Dra. M^a Cristina Manzanares Céspedes por su insuperable ayuda, por haberme tendido la mano generosamente y haberme cuidado durante los últimos y más difíciles meses. Gracias por tus aportaciones para culminar mi proyecto.

A la empresa Klockner, especialmente a la persona de D. Alejandro Padrós, por haber creído en este proyecto, y haberlo hecho posible con tan generoso mecenazgo, sin el cual este trabajo hubiera sido inviable. Le agradezco a esta empresa el esfuerzo denodado por contribuir al desarrollo de la investigación odontológica de alto nivel en nuestro país. Es a través del convenio de cátedra de investigación que Klockner y Universidad de Granada establecieron en 2016, el modo de que este estudio haya sido totalmente financiado y, por lo tanto, realizable.

Igualmente quiero dar las gracias al equipo del Grupo de Biomaterials, Biomecànica i Enginyeria de Teixits de la UPC. Muchas gracias Mónica Ortiz por tu ayuda, por los buenos momentos (y no tan buenos) que hemos pasado en el laboratorio y por tu confianza; gracias a los profesores Dres. José María Manero, M^a Pau Ginebra y Miquel Punset por su contribución y por haberme permitido utilizar su equipamiento. De igual manera le agradezco a Eva Sánchez, del laboratorio de Anatomía Humana y Embriología de la Universidad de Barcelona, su apoyo, por siempre haber estado ahí cuando te he necesitado y por tus sabios consejos.

Este trabajo no hubiera sido posible sin la impecable labor del profesor Dr. Jordi Franch, del Departamento de Cirugía de la Facultad de Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona, a quien agradezco su implicación, lectura crítica y profesionalidad. También a su equipo, gracias a Albert Barba y a Katrin Rappe por vuestra asistencia durante la parte más dura del ensayo *in vivo*.

Gracias también a los doctores Ricardo Fernández y Allinson Olaechea, por su colaboración de forma desinteresada durante las fases quirúrgicas.

A los profesores Dres. Miguel Padial, Paco O'Valle, Andrés Catena y Elena Sánchez, gracias por vuestro afecto, especialmente durante el duro año de Máster de Investigación en Granada.

A todos mis amigos. A Aina, Marta, Sara y Patri, mis amigas de facultad y compañeras de vida, gracias por hacerme ver las cosas más fáciles. A Angi, Maria y Zita, por ser mis amigas confidentes, gracias por vuestro apoyo y por escucharme siempre que lo he necesitado.

Y, para terminar, el agradecimiento más profundo e intenso es a mi familia. A mis padres, Rafael y Conxita, porque vuestro apoyo total y absoluto ha sido el que me ha dado fuerzas para seguir durante estos años. Mamá y papá, gracias por haberme enseñado a ser perseverante y constante. A mi hermana Paula, por su paciencia y bondad, gracias por ser la mejor hermana. A mis abuelos y a mis tíos. Y a los que ya no están, a mis abuelos maternos y a mi madrina Joana, sé que estáis orgullosos. Este trabajo es para vosotros, os quiero.

Conflicto de interés

Esta Tesis Doctoral obtuvo íntegra financiación para su realización de la empresa Klockner S.A, a través del convenio de Cátedra de Investigación que dicha empresa estableció con la Universidad de Granada en el año 2016. A pesar de que la autora de esta tesis y todos sus directores muestran su gratitud por dicho mecenazgo, declaran no tener ningún conflicto de interés en lo relativo a los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral.

ÍNDICE GENERAL

1	Resumen	1
1.1	Introducción	1
1.2	Objetivos	1
1.3	Material y métodos.....	2
1.4	Resultados	3
1.5	Conclusiones.....	3
2	Summary.....	5
2.1	Introduction.....	5
2.2	Objectives.....	5
2.3	Materials and methods	6
2.4	Results.....	7
2.5	Conclusions.....	7
3	Introducción.....	9
3.1	Osteointegración	9
3.2	El proceso de remodelación ósea.....	11
3.3	El factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1).....	16
3.4	Biofuncionalización de superficies de implantes dentales	20
3.5	Biomateriales sintéticos: fosfatos de calcio	25
3.6	Biofuncionalización de superficies con péptidos inhibidores de TGF- β 1.....	29
4	Justificación.....	35
5	Hipótesis	37
6	Objetivos.....	39
6.1	Objetivo general	39
6.2	Objetivos específicos	39
7	Materiales y métodos.....	41
7.1	Materiales y métodos del estudio 1 <i>in vitro</i>	41
7.2	Materiales y métodos del estudio 2 <i>in vitro</i>	48
7.3	Materiales y métodos estudio 3 y 4 <i>in vivo</i>	53
8	Resultados.....	73
8.1	Resultados del estudio 1 <i>in vitro</i>	73
8.2	Resultados del estudio 2 <i>in vitro</i>	81
8.3	Resultados del estudio <i>in vivo</i>	89

9	Discusión.....	129
9.1	Discusión de los resultados del primer estudio.....	129
9.2	Discusión de los resultados del segundo estudio.....	132
9.3	Discusión de los resultados del tercer estudio.....	135
9.4	Discusión de los resultados del cuarto estudio.....	138
10	Conclusiones	145
11	Bibliografía	147
12	Indicios de calidad	163
12.1	Publicación de artículo científico.....	163
12.2	Premio a la Mejor Comunicación Oral de Investigación Básica. Congreso SECIB 2014. 163	
12.3	Artículo científico enviado del estudio 3 a COIR	164
13	Anexos	165
13.1	Protocolo del estudio <i>in vivo</i>	165
13.2	Aprobación del Comité de Ética del estudio <i>in vivo</i> en modelo animal.....	165
13.3	Aprobación de la Financiación de Tesis Doctoral. Cátedra Universidad de Granada y Klockner®.....	165
13.4	Premio Mejor Comunicación Oral de Investigación Básica.....	165
13.5	Artículos científicos.....	165
13.6	Certificado de Originalidad de Tesis Doctoral	165

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	12
Osteoclastos activos expresando fosfatasa alcalina tártraro resistente.	
Figura 2.....	13
Neoformación ósea sobre línea cementante de una partícula de hueso bovino anorgánico en modelo experimental humano.	
Figura 3.....	14
Fenómeno de osteoconducción sobre hueso humano en histología teñida con técnica de tricrómico de Masson.	
Figura 4.....	18
Ruta de señalización de TGF- β y SMADs.	
Figura 5.....	31
Representación gráfica de carga neta y punto isoelectrico de p144.	
Figura 6.....	31
Representación gráfica de hidrofobicidad por aminoácido de P144.	
Figura 7.....	32
Representación gráfica de carga neta y punto isoelectrico de P17.	
Figura 8.....	32
Representación gráfica de hidrofobicidad por aminoácido de P17.	
Figura 9.....	56
Diseño del estudio experimental <i>in vivo</i> .	

Figura 10.....	58
Fase quirúrgica 1.	
Figura 11.....	59
Radiografías postoperatorias de la primera fase quirúrgica.	
Figura 12.....	59
Aspecto clínico dos semanas después de la primera fase quirúrgica.	
Figura 13.....	61
Imágenes clínicas de las exodoncias de las raíces distales.	
Figura 14.....	62
Imágenes clínicas de la segunda fase quirúrgica.	
Figura 15.....	62
Cierre del colgajo por primera intención mediante sutura reabsorbible Vycril®.	
Figura 16.....	63
Radiografías postoperatorias a la cirugía de colocación de implantes y de biomateriales.	
Figura 17.....	65
Radiografías de las hemimandíbulas el día del sacrificio.	
Figura 18.....	68
Tratamiento de imágenes con ImageJ para la cuantificación de los parámetros morfométricos cuantificados.	
Figura 19.....	70
Proceso de tratamiento de imágenes de biomateriales para la cuantificación mediante ImageJ.	

Figura 20.....	73
Resultados de Western Blot de fosforilación de SMAD2.	
Figura 21	75
Gráfico de expresión de osteocalcina en células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas a las 6 horas, 24 horas, 2 días y 4 días de cultivo.	
Figura 22.....	77
Gráfico de expresión de Colágeno tipo I en células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas a las 6 horas, 24 horas, 2 días y 4 días de cultivo.	
Figura 23.....	78
Gráfico de expresión de RUNX2 en células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas a las 6 horas, 24 horas, 2 días y 4 días de cultivo.	
Figura 24.....	79
Gráfico de expresión de BMP2 en células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas a las 6 horas, 24 horas, 2 días y 4 días de cultivo.	
Figura 25.....	80
Gráfico de actividad de ALP en células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas a los 7 días, 14 días y 21 días.	
Figura 26.....	81
Western Blot de p-SMAD2 producida por las células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas.	
Figura 27	84
Expresión genética de Col1alpha1, RUNX2, ALP y OC de células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas en superficies de titanio.	
Figura 28	85
Actividad de fosfatasa alcalina en células humanas mesenquimales cultivadas en superficies de Ti con diferentes tratamientos después de 7, 14 y 21 días de cultivo.	

Figura 29.....	86
Producción de osteocalcina en células humanas mesenquimales cultivadas en superficies de Ti con diferentes tratamientos después de 7, 14 y 21 días de cultivo.	
Figura 30.....	88
Expresión genética de fibronectina, Col1alpha1, Alpha-SMA, MMP2, MMP3 y MMP9 de células 3T3/NIH fibroblásticas en superficies de Ti con diferentes tratamientos.	
Figura 31.....	92
Imágenes sumativas (<i>stitching</i>) representativas de BS-SEM de los implantes 2 semanas después de la colocación.	
Figura 32.....	93
Imágenes representativas de BS-SEM. Áreas enmarcadas en la figura 31A.	
Figura 33.....	94
Imágenes representativas de BS-SEM. Áreas enmarcadas en la figura 31B y C.	
Figura 34.....	95
Imágenes sumativas (<i>stitching</i>) representativas de BS-SEM de los implantes 4 semanas después de la colocación.	
Figura 35.....	96
Imágenes representativas de BS-SEM, provenientes de lo enmarcado en la figura 34A (implante control).	
Figura 36.....	97
Imágenes representativas de BS-SEM (implante biofuncionalizado con péptido p17). Áreas enmarcadas en la figura 34B.	

Figura 37	97
Imágenes representativas de BS-SEM. Implante biofuncionalizado con péptido P17. Área enmarcada en la figura 34B.	
Figura 38	97
Imágenes representativas de BS-SEM. Implante biofuncionalizado con péptido P17. Área enmarcada en la figura 34B.	
Figura 39	98
Imágenes representativas de BS-SEM. (implante biofuncionalizado con péptido P144) Áreas enmarcadas en la figura 34C.	
Figura 40	99
Imágenes sumativas (<i>stitching</i>) representativas de BS-SEM de los implantes 8 semanas después de la colocación	
Figura 41.....	100
Imágenes representativas A y B de BS-SEM (Implante control). Áreas enmarcadas en la figura 40A.	
Figura 42.....	101
Imágenes representativas de BS-SEM (Implante biofuncionalizado con péptido P17). Área enmarcada en la figura 40B.	
Figura 43.....	102
Imágenes representativas de BS-SEM de una muestra de implante biofuncionalizado con P17.	
Figura 44.....	103
Imagen representativa de BS-SEM (Implante biofuncionalizado con péptido P144). Área enmarcada en la figura 40C.	

Figura 45.....	104
Muestras del grupo control (A) y del grupo biofuncionalizado con P144 (B).	
Figura 46.....	105
Muestra del grupo biofuncionalizado con P144 2 semanas después de la implantación.	
Figura 47	106
Muestra del grupo biofuncionalizado con P144 2 semanas después de la implantación.	
Figura 48	107
Muestra del grupo control 4 semanas después de la implantación.	
Figura 49	108
Muestra del grupo biofuncionalizado con P17 4 semanas después de la implantación.	
Figura 50.....	109
Muestra de implante biofuncionalizado con P17 4 semanas después de la implantación.	
Figura 51.....	110
Muestra de implante biofuncionalizado con P144 4 semanas después de la implantación.	
Figura 52.....	110
Magnificaciones 20x y 50x de la figura 51B	
Figura 53.....	111
Muestra del grupo control 8 semanas después de la implantación.	
Figura 54.....	112
Muestra de implante biofuncionalizado con P17 8 semanas después de la implantación	

Figura 55	112
Muestra de implante biofuncionalizado con P17 8 semanas después de la implantación.	
Figura 56	113
Muestra de implante biofuncionalizado con P144 8 semanas después de la implantación	
Figura 57.....	113
Muestra de implante biofuncionalizado con P144 8 semanas después de la implantación	
Figura 58.....	117
Resultados histológicos después de 2 semanas de la inserción del injerto óseo.	
Figura 59	118
Resultados de BS-SEM 2 semanas después de la colocación del injerto.	
Figura 60	120
Resultados histológicos después de 4 semanas de la inserción del injerto óseo del grupo control.	
Figura 61.....	121
Resultados histológicos después de 4 semanas de la inserción del injerto óseo del grupo experimental.	
Figura 62.....	123
Serie 1. Resultados histológicos después de 4 semanas de la inserción del injerto óseo.	
Figura 63.....	124
Serie 2. Resultados histológicos después de 4 semanas de la inserción del injerto óseo, áreas enmarcadas en la figura 61 de la muestra del grupo biofuncionalizado con P144	

Figura 64	125
Resultados de BS-SEM 4 semanas después de la colocación del injerto	
Figura 65.....	126
Resultados histológicos después de 8 semanas de la inserción del injerto óseo.	
Figura 66	128
Resultados de BS-SEM 8 semanas después de la colocación del injerto	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	45
Secuencias de primers de ADN utilizadas en el ensayo qPCR.	
Tabla 2.....	51
Secuencias de primers de ADN utilizadas para el ensayo qPCR.	
Tabla 3.....	91
Resultados cuantitativos de los parámetros histomorfométricos analizados.	
Tabla 4.....	115
Porcentaje de hueso formado (NBV) a las 2, 4 y 8 semanas después de la colocación del injerto. K: grupo control; KP: grupo experimental con péptido.	
Tabla 5.....	116
Porcentaje de crecimiento óseo (NBV/TVol) a las 2, 4 y 8 semanas después de la colocación del injerto. K: grupo control; KP: grupo experimental con péptido.	

ABREVIATURAS

%	Porcentaje
(R-) SMAD	Receptor de señalización de TGF- β (Small Mothers Against Decantaplegic)
'	minutos
μl	Microlitros
ADN	Ácido desoxiribonucleico
alfa-SMA	Actina de músculo liso alfa
ALP	Fosfatasa alcalina
APTES	3-aminopropiltriétoxissilano
ARN	Ácido ribonucleico
B/N	Blanco y negro
BCA	Ácido bis-bicinchinónico
BCP	Fosfato cálcico bifásico
BF	Área de hueso periimplantario (Bone Fraction)
BIC	Contacto hueso-implante (Bone to Implant Contact)
BMP	Proteínas morfogenéticas del hueso (Bone Morphogenetic Proteins)
BMP2	Proteína morfogenética de hueso tipo 2
BS-SEM	Microscopio electrónico de barrido
CaP	Fosfato de calcio
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementario
cm³	Centímetros cúbicos
CO₂	Dióxido de carbono
Col1a1	Colágeno tipo I alfa 1
CP-Ti	Titanio comercialmente puro
d	Días
DIEA	N,N-diisopropiletilamina
DMF	Solución dimetil formamida
e	Eritrocito
ECM	Matriz extracelular

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FBS	Suero Bovino Fetal
FN	Fibronectina
h	Horas
HA	Hidroxiapatita
HBTU	N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-yl) uronio hexafluorofosfato
HCl	Ácido clorhídrico
HEPES	ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazineetanesulfónico
IB	Hueso entre espiras (Interthread Bone)
IGF	Factor de crecimiento de la insulina
ih	Cabeza del implante (Implant head)
is	Superficie del implante
K	Grupo control MaxResorb
Kg	Kilogramos
KP	Grupo experimental MaxResorb funcionalizado con péptido P144
l	Litro
mARN	Ácido ribonucleico mensajero
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	milimolar
mm	Milímetros
MMA	Metacrilato de metilo
MMP	Metaloproteasas de matriz
MP144	Péptido modificado 144
ms	Milisegundos
n	Tamaño de la muestra
NaCl	Cloruro sódico
NaF	Fluoruro sódico
NBV	Porcentaje de hueso neoformado
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros

NP-40	Tergitol [®] Tipo NP-40
OC	Osteocalcina
°C	Grados Celsius
OH-	Grupo hidroxil negativo
Ost	Osteocitos
P144	Péptido 144
P17	Péptido 17
P2	Segundo premolar inferior
P3	Tercer premolar inferior
P4	Cuarto premolar inferior
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Cortical preexistente
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
pH	Potencial hidrógeno (medida de acidez o alcalinidad)
PI	Callo periimplantario
PMMA	polimetilmetacrilato
PR	Reacción perióstica
p-SMAD	SMAD fosforilada
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
RANKL	ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B
RGD	Ácido arginilglicilaspártico
ROI	Región de interés (Region of Interest)
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción inversa
RUNX2	Factor de transcripción 2 relacionado con runt
SARA	Anclaje de las SMAD para activación del receptor
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
seg	Segundos
SiC	Carburo de silicio

TBS	Solución salina tamponada tris (Tris-Buffered Saline)
TCPS	Pocillo sin titanio (Tissue Culture Polystyrene)
TGFR1	Receptor celular de TGF tipo 1
TGFR2	Receptor celular de TGF tipo 2
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TGFβ-1	Factor de crecimiento transformante beta 1
TV	Volumen total
UV	Ultravioleta
V	Voltios
V	velocidad
WB	Hueso fibroreticular (Wooven bone)
WD	Distancia de trabajo (working distance)
β-TCP	Fosfato tricálcico beta
μg	Microgramo
μU	Microunidades

1 Resumen

1.1 Introducción

En los últimos años se han publicado diversos estudios con resultados contradictorios en cuanto a la fisiopatología y el papel exacto de los factores de crecimiento en la osteointegración de los implantes dentales. La ruta de señalización de estos factores es compleja y el desarrollo de agentes estimuladores o inhibidores influye en la respuesta celular de los componentes de la remodelación ósea.

El factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) juega un papel relevante en la reacción del huésped hacia el implante, pero se ha relacionado con una formación excesiva de tejido fibrótico y fracaso de implantes. El tratamiento o funcionalización de las superficies de titanio más atractivas para las poblaciones celulares encargadas de la remodelación ósea puede dar lugar a una respuesta biológica más específica y predecible.

La biofuncionalización de la superficie de los implantes dentales mediante péptidos inhibidores de TGF- β 1 podría ser una estrategia para mejorar la osteointegración de los implantes e incluso acelerar el período de cicatrización.

1.2 Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es evaluar las implicaciones biológicas de la acción de dos péptidos inhibidores de TGF- β 1 en la osteointegración mediante estudios *in vitro* e *in vivo*. Para ello, se realizaron dos estudios *in vitro* con el objetivo conocer si la inhibición de TGF- β 1 promueve la diferenciación osteoblástica y determinar la acción de los péptidos en superficies de CP-Ti biofuncionalizadas.

Seguidamente, se desarrolló un estudio *in vivo* con doble objetivo. En primer lugar, evaluar la osteointegración de implantes dentales biofuncionalizados con los péptidos y comparar los cambios histomorfométricos e histológicos; en segundo lugar, valorar la osteointegración de biomateriales sintéticos biofuncionalizados con el péptido 144 en alvéolos post-extracción.

1.3 Material y métodos

Estudio 1: Se cultivaron células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas para la realización de Western Blot y cuantificación de la proteína SMAD2-fosforilada; se llevó a cabo la técnica de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR) para la determinación de osteocalcina, colágeno tipo I, RUNX2 y BMP2; y el análisis de la actividad de fosfatasa alcalina (ALP).

Estudio 2: Se cultivaron células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas, NIH/3T3 fibroblásticas y células mesenquimales humanas para realización de Western Blot, ensayo de qPCR de expresión de genes de osteoblastos (colágeno tipo I, RUNX2, ALP y osteocalcina) y fibroblastos (fibronectina, colágeno tipo I alfa I, actina de músculo liso alfa, metaloproteasas de matriz tipo 2, 3 y 9) y determinación de la actividad de ALP y osteocalcina, respectivamente, en superficies de CP-Ti biofuncionalizadas con el péptido P144.

Estudio 3: Se realizó la hemisección de los premolares inferiores de cada hemimandíbula de seis perros Beagles y se extrajeron cada una de las raíces mesiales de dichos premolares, a la vez que se endodonciaban las raíces distales remanentes. Ocho semanas después, se colocaron un total de 36 implantes (1: control; 2: implante biofuncionalizado con P17; 3: implante biofuncionalizado con P144) en los lechos quirúrgicos cicatrizados. Los animales fueron sacrificados 2, 4 y 8 semanas después de la cirugía de colocación de implantes. Se obtuvieron cortes vestibulo-linguales de las secciones óseas con los implantes insertados y se procesaron las muestras para análisis histomorfométrico mediante BS-SEM e histología.

Estudio 4: Ocho semanas después de las extracciones de las raíces mesiales, y previamente a la colocación de los implantes que serían objeto del estudio 3, se extrajeron las raíces distales de premolares endodonciadas y se colocaron injertos óseos sintéticos en los alvéolos post-extracción (1: control [Fosfato tricálcico bifásico] ; 2: Fosfato tricálcico bifásico biofuncionalizado con P144). En concordancia al estudio 3, los animales fueron sacrificados 2, 4 y 8 semanas después de la cirugía. Se obtuvieron cortes vestibulo-linguales de los alveolos injertados y se procesaron las muestras para análisis histomorfométrico mediante histología y BS-SEM.

1.4 Resultados

Estudio 1: Las células tratadas con TGF- β 1 y los péptidos inhibidores P17 y P144 no mostraron fosforilación de la SMAD2, lo cual quiere decir que esta inhibida la ruta de señalización de esta proteína. Las células tratadas con P17 y P144 mostraron mayor expresión de los marcadores osteoblásticos respecto a los grupos control.

Estudio 2: Las superficies de CP-Ti biofuncionalizadas con P144 inhibieron la fosforilación de la SMAD2, en concordancia con los resultados obtenidos en la experimentación anterior. Las superficies biofuncionalizadas con P144 muestran una expresión reducida de marcadores de diferenciación fibroblástica y un incremento de los marcadores de expresión osteoblástica y de la producción de ALP y OC.

Estudio 3: Los implantes biofuncionalizados con los péptidos P17 y P144 mostraron mayor BIC, BF e IB en tiempos menores de cicatrización que los implantes control. Entre estos dos péptidos, P17 tuvo un comportamiento de respuesta biológica más precoz e intensa que el péptido P144.

Estudio 4: La biofuncionalización con péptido P144 de fosfatos tricálcico bifásico demostró, en modelo animal, una mayor formación de hueso en tiempos tempranos de cicatrización, mostrando un mayor poder osteoinductor, mayor formación de líneas osteoides y mayor densidad trabecular y neovascular.

1.5 Conclusiones

Los resultados de los estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que los péptidos P17 y P144 inhiben a TGF- β 1 y generan una respuesta acelerada de los procesos de maduración celular y de osteointegración alrededor de superficies colocadas en entornos óseos.

2 Summary

2.1 Introduction

In recent years, several studies have been published with contradictory results regarding the pathophysiology and the exact role of growth factors in the osseointegration of dental implants. The signaling pathway of these factors is complex and the development of stimulatory or inhibitory agents may influence the cellular response of the components of bone remodeling.

Transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) plays an important role in host reaction to the implant, but has been linked to excessive fibrotic tissue formation and implant failure. The surface treatment or biofunctionalization of dental implants to be more attractive for bone remodeling cell populations can result in a more specific and predictable biological response.

The biofunctionalization of the surface of dental implants with TGF- β 1 inhibitor peptides could be a strategy to improve the osseointegration of implants and even accelerate its healing period.

2.2 Objectives

The main objective of this research is to evaluate the biological implications of the action of two TGF- β 1 inhibitory peptides in the osseointegration through *in vitro* and *in vivo* studies. Two *in vitro* studies were carried out in order to know whether the inhibition of TGF- β 1 promotes osteoblastic differentiation and determine the peptides action on biofunctionalized CP-Ti surfaces.

Next step was to perform an *in vivo* study with double objective. First, to evaluate the osseointegration of biofunctionalized dental implants with the inhibitory peptides and to compare histomorphometric and histological changes; secondly, to analyze the osseointegration of the biofunctionalization of a synthetic biomaterial in post-extraction alveolar sockets.

2.3 Materials and methods

Study 1: Pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells were cultured for the Western Blot test and quantification of the phosphorylated-SMAD2 protein; a real-time polymerase chain reaction (qPCR) was carried out to determine osteoblastic markers: osteocalcin, type I collagen, RUNX2 and BMP2 and ALP activity.

Study 2: Pre-osteoblastic MC3T3-E1, NIH/3T3 and human mesenchymal stem cells were cultured for Western blot test, qPCR of osteoblastic markers (type I collagen, RUNX2, ALP and OC) and fibroblastic markers (fibronectin, alpha I type I collagen, actin alpha-smooth muscle, type 2, 3 and 9 matrix metalloproteinases) and determination of ALP and OC activity, respectively, in biofunctionalized CP-Ti surfaces with P144 peptide.

Study 3: The hemisection of three mandible premolars of each hemimandible of six Beagle dogs was carried out and mesial roots were extracted, meanwhile the root canal treatment of the remnants distal roots was done. Eight weeks later, a total of 36 implants were inserted (1: control implant; 2: P17 biofunctionalized implant; 3: P144 biofunctionalized implant) in the healed surgical sites. Animals were sacrificed 2, 4 and 8 weeks after implant surgery. Sections were obtained and samples were processed and submitted to BS-SEM and histology for histomorphometrical analysis.

Study 4: Eight weeks after mesial roots extractions, and previously to the implant surgery object of study 3, extractions of distal roots were carried out and synthetic bone grafts were inserted in the fresh extraction sockets (1: control bone graft [biphasic tricalcium phosphate]; 2: P144 biofunctionalized biphasic tricalcium phosphate bone graft). Animals were sacrificed 2, 4 and 8 weeks after surgery. Sections were obtained and samples were processed and submitted to histology and BS-SEM for histomorphometrical analysis. In concordance with the study 3, animals were sacrificed 2, 4 and 8 weeks after surgery. Sections were obtained and samples were processed and submitted to histology and BS-SEM for histomorphometrical analysis.

2.4 Results

Study 1: Cell groups treated with TGF- β 1 and P17 and P144 inhibitory peptides did not show SMAD2 phosphorylation, meaning that the TGF- β 1 signaling route has been inhibited. Those cells treated with P17 and P144 show a higher expression of osteoblastic markers with respect to control group.

Study 2: P144 biofunctionalized CP-Ti surfaces inhibit the phosphorylation of SMAD2, in concordance with the results obtained in the previous experiment. P144 biofunctionalized CP-Ti surfaces show a reduced expression of fibroblastic markers and an increased expression of osteoblastic markers and ALP and OC activities.

Study 3: Implants biofunctionalized with peptides P17 and P144 showed higher values of BIC, BF and IB at early healing times than control implants. Between these peptides, P17 showed an earlier and more intense biological response than P144 peptide.

Study 4: The biofunctionalization with peptide P144 of biphasic tricalcium phosphate demonstrated, in an animal model, a higher bone formation at early healing times, showing greater osteoinductive potential, higher osteoid line formation and more trabecular density and neovascularization.

2.5 Conclusions

Our *in vitro* and *in vivo* results suggest that P17 and P144 peptides inhibit TGF- β 1 and elicit an accelerated response of the processes of cell maturation and osteointegration around surfaces placed in bony environment.

3 Introducción

Desde mis comienzos en esta profesión, siempre me llamó la atención el peso específico que la Implantología iba adquiriendo en la rehabilitación integral de nuestros pacientes. El desarrollo científico en esta área de conocimiento es vertiginoso y basta con analizar la oferta formativa de la odontología en todo el planeta para ver que esta ciencia focaliza la línea de avance de nuestra profesión. Siempre ha sido mi inquietud poder contribuir de alguna manera al progreso de la ciencia que motiva mi vida profesional y por eso decidí integrarme en un colectivo de profesionales muy inquietos en la innovación y desarrollo de esta área específica de conocimiento. Es por ello que mi trabajo de tesis tratará de aportar un grano de arena más en el desarrollo de la implantología, concretamente en los parámetros que rigen los procesos de osteointegración temprana.

3.1 Osteointegración

Los implantes dentales endoóseos se utilizan desde hace años para reemplazar la pérdida de dientes. El concepto de “*osteointegración*” fue introducido por Branemark et al en 1969 y definido por Albrektsson et al 1981 como “una conexión directa funcional y estructural entre el hueso vivo y la superficie de un implante sometido a carga” (Albrektsson et al. 1981).

A pesar de los altos índices de éxito conseguidos en el campo de la implantología, actualmente, el empeño en la mejora del uso de los implantes dentales en situaciones clínicas cada vez más desafiantes está dando lugar a la necesidad de seguir perfeccionando el diseño del implante y las propiedades de su superficie (Schouten et al. 2009). La optimización de la respuesta biológica inicial del hueso después de la colocación del implante es el objetivo más importante (Davies 2003).

El requisito para el éxito de la colocación de implantes dentales es la obtención de estabilidad primaria en el hueso circundante (Albrektsson et al. 1981). El éxito clínico de los implantes dentales se consigue mediante el logro de una conexión hueso-

implante fuerte y duradera (Buser 1991; Ronod et al. 2003). El establecimiento de la interfase mecánicamente estable es la base para la prevención del desarrollo de una capa intermedia de tejido fibroso (Shalabi et al. 2006).

La osteointegración se ve influenciada por seis factores principales, definidos por Albrektsson et al 1981. Estos factores son el material del implante, la geometría, el diseño macroscópico y microscópico, el estado del hueso receptor, la técnica quirúrgica y las condiciones de carga (Albrektsson et al. 1981).

Originariamente, el éxito del implante dependía de dos factores clave: la estabilidad primaria del implante y el período de curación postoperatorio temprano. Ambos influenciaban el establecimiento de contacto entre el implante y el hueso adyacente. (Albrektsson et al. 1981).

Durante la osteointegración, las células progenitoras osteoblásticas migran hacia la superficie del implante, se diferencian e inician el proceso de formación ósea: es el fenómeno conocido como osteogénesis por contacto (Davies 2003). La osteogénesis también se define como la combinación de reclutamiento y migración de células osteogénicas (osteoconducción) y formación ósea por estas células en la superficie del implante. Se trata de un mecanismo multifactorial, en el que participan múltiples componentes, entre ellos la osteopontina, el colágeno y el fosfato cálcico. Es por ello que, basados en esta compleja interacción entre implante y hueso, la calidad del lecho receptor del implante juega un papel importante (Lutz et al. 2012).

El titanio tiene una alta capacidad osteointegradora comparado con otros biomateriales. Puede lograr altos niveles de anclaje óseo gracias a su biocompatibilidad y excelentes propiedades mecánicas (Elkhidir et al. 2018). Por ello, la investigación actual sobre implantes se centra en la mejora de la interacción entre el implante y el hueso mediante la modificación de la superficie de los implantes dentales (Barros et al. 2009; Novaes et al. 2010).

El éxito indiscutible de los implantes dentales endoóseos está impulsando la necesidad de seguir perfeccionando el diseño del implante y la optimización de la respuesta de curación biológica después de la colocación del implante (Davies 2003).

El diseño topográfico de la superficie de titanio puede afectar de manera notable a la capacidad osteointegrativa y aumentar el nivel de atracción y difusión celular. Las propiedades biológicas también influyen significativamente en las reacciones celulares hacia la superficie del implante (Elkheldir et al. 2018). Además, las respuestas de cicatrización ósea también se pueden estimular utilizando factores de crecimiento (Gruber et al. 2002). Entre estos factores se encuentra el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Gombotz et al. 1993).

3.2 El proceso de remodelación ósea

El hueso es un tejido vivo dinámico que cambia durante toda la vida. Igual que otros tejidos conectivos del cuerpo, el hueso comprende células incrustadas en una abundante matriz extracelular. A diferencia de la mayoría de los otros tejidos conectivos, la matriz extracelular se mineraliza para otorgar funciones fisiológicas únicas (Davies 2007).

El hueso proporciona soporte y protección de tipo locomotor, y un depósito dinámico de proteínas y minerales. El constante remodelado del tejido óseo aporta un mecanismo para la curación sin cicatrices y la regeneración del tejido óseo dañado; además, desempeña un papel relevante en el equilibrio de calcio y fósforo de los fluidos corporales, a través del control endocrino.

La remodelación ósea se consigue a través de la reabsorción de la actividad osteoclástica y la actividad sintética de los osteoblastos. Estos dos tipos de poblaciones celulares son responsables del “*turnover*” o remodelación ósea constante.

Para entender el proceso de unión del implante al hueso hay que comprender los mecanismos que forman parte de la fisiología ósea. El fenómeno biológico de unión ósea entre el biomaterial y el hueso es tan antiguo como la remodelación ósea normal por sí misma y está formado por dos fases principales:

La superficie ósea modificada por los osteoclastos

La unidad de reabsorción creada por los osteoclastos en el hueso y la síntesis de la matriz inicial ocurren durante la formación de hueso nuevo ("*novi bone formation*"). Las lagunas de Howship que pueden observarse cerca de los osteoclastos son concavidades creadas por la actividad reabsortiva de estas células (Figuras 1A y 1B). Esta reabsorción ósea comprende la disolución de la matriz inorgánica y la degradación enzimática de los componentes orgánicos. El resultado es la creación de una matriz ósea no mineralizada, que será la superficie receptora tridimensional donde se depositará el hueso nuevo a partir del antiguo.

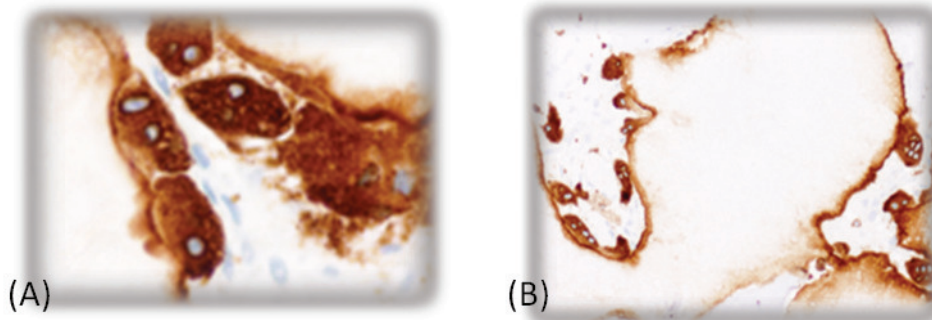


Figura 1: Osteoclastos activos expresando fosfatasa alcalina tártraro resistente (TRAP) 1 (A), obtenidas mediante análisis de inmunohistoquímica, sobre una superficie ósea, creando una unidad de remodelación (B). Imágenes cedidas de muestras histológicas tomadas por el Profesor Pablo Galindo Moreno.

1) Elaboración y maduración de la interfase de línea cementante

Las líneas cementantes representan una matriz extracelular altamente conservada que sirve de anclaje del tejido óseo nuevo. Estas líneas son secretadas por una matriz mineralizada no colagenosa sintetizada por los osteoblastos y se invaginan y enclavan a partir de la actividad osteoclástica. Por tanto, las líneas cementantes desempeñan un papel crítico en el establecimiento de la interfase entre el hueso antiguo y el hueso nuevo (Davies 2003). La presencia de líneas cementantes como interfase durante la

remodelación ósea en el hueso (fibrorreticular, laminar, compacto o esponjoso) es crítica (Figura 2).

El proceso de *formación ósea de novo* está compuesto por una cascada de acontecimientos, que son los siguientes:

- a. Adsorción de proteínas óseas no colagénicas a la superficie sólida: osteopontina y sialoproteínas.
- b. Iniciación de la mineralización por parte de las proteínas adsorbidas: nucleación de calcio y fosfato para iniciar la mineralización.
- c. Maduración: crecimiento de matriz con estructura cristalina.
- d. Creación de matriz con fibras de colágeno.

La mineralización de la matriz con fibras de colágeno, como última fase, es lo que otorga la estabilidad del implante al hueso antes de ser cargado. Este proceso de remodelación ósea se aplica a los biomateriales y, del mismo modo, a la osteointegración. La unión al hueso se consigue gracias a la interdigitación de las líneas cementantes con la superficie del biomaterial, del mismo modo que ocurre durante la remodelación ósea natural (Davies et al. 2014).

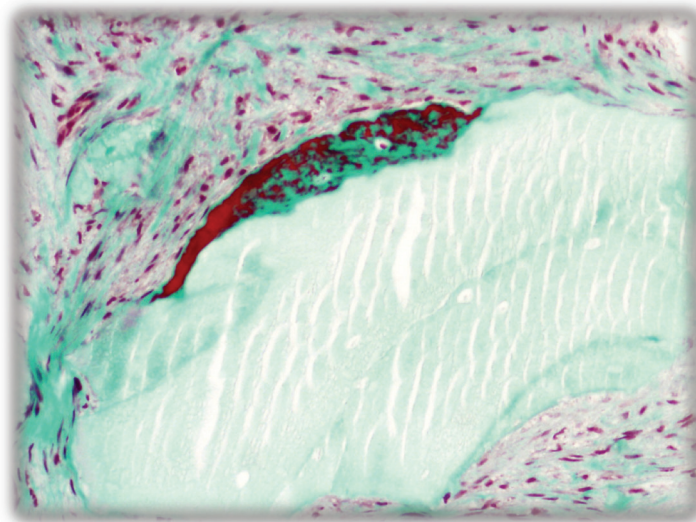


Figura 2: Neoformación ósea sobre línea cementante de una partícula de hueso bovino anorgánico en modelo experimental humano. Imagen cedida de muestras histológicas tomadas por el Profesor Pablo Galindo Moreno.

3.2.1 Osteoconducción

El término *osteoconducción* se refiere al reclutamiento y la migración de células osteogénicas a la superficie del implante después de la formación del coágulo (Davies 2003). En nuestro campo, la superficie de titanio del implante actúa como andamiaje a través del cual se produce dicha migración celular, con la consiguiente remodelación y aposición ósea.

Por tanto, la síntesis de tejido óseo requiere la cascada migratoria de células osteogénicas, y la diferenciación de estas poblaciones celulares en células maduras secretoras. Este proceso incluye la migración de células perivasculares a la superficie de hueso reabsorbido. Durante la curación peri-implantaria, al igual que en una fractura, las células osteogénicas migrarán a través del coágulo de sangre y alcanzarán la superficie del implante, donde los osteoblastos iniciarán la síntesis de la matriz extracelular (Figura 3).

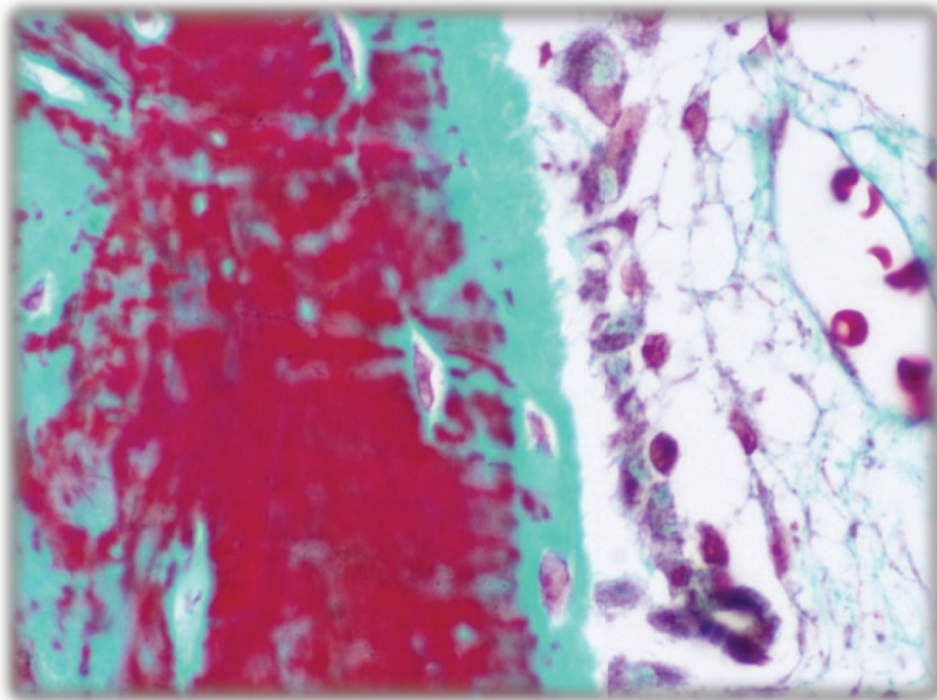


Figura 3: Fenómeno de osteoconducción sobre hueso humano en histología teñida con técnica de tricrómico de Masson. Se aprecia el hueso vital en rojo, donde se ha aposicionado matriz osteoide (en verde) formada por osteoblastos activos con morfología cuboide. Imagen cedida de muestras histológicas tomadas por el Profesor Pablo Galindo Moreno.

No obstante, los verdaderos directores de orquesta durante el proceso de remodelación ósea son los osteocitos. Los osteocitos son las células óseas más abundantes del esqueleto adulto y pueden actuar como sensores mecánicos dirigiendo las funciones osteoblásticas y osteoclásticas para mantener la homeostasis ósea (Bonewald 2016; Tsourdi et al. 2018). Descienden de las células mesenquimales y se encargan de regular el metabolismo del calcio y el fosfato.

Las funciones de los osteocitos engloban el control de la mineralización, la homeostasis del calcio y el fosfato, mielopoyesis y hematopoyesis, etc. Es por ello que los osteocitos pueden ser los responsables de enfermedades y desórdenes óseos metabólicos, de corazón, de riñón y del músculo (Bonewald 2016).

Los osteocitos se disponen mediante una red dendrítica para interconectarse entre ellos, con los vasos sanguíneos y con las células óseas restantes. Así, el remodelado de la matriz ósea llevada a cabo por los osteoblastos y osteoclastos se regula directamente a través de ellos. Sus lagunas y canaliculos, por tanto, contribuyen a la resistencia a la fractura y a al mantenimiento de la calidad ósea.

Algunos estudios en ratones han demostrado que son los osteocitos la fuente principal de RANKL requerido para la formación de osteoclastos durante la remodelación ósea del tejido óseo esponjoso (Xiong et al. 2015).

Se conocen dos tipos de tejido óseo en cuanto a su arquitectura y forma: el hueso cortical o compacto y el hueso trabecular o esponjoso. La clasificación de Leckholm y Zarb (1985) se basa en la proporción de estos dos tipos de estructuras de tejido óseo para definir la calidad de un lecho receptor para la colocación de un implante. Esta clasificación los divide en cuatro tipos, siendo el tipo IV considerado conceptualmente el de peor calidad debido a su baja proporción de hueso cortical. Sin embargo, desde un punto de vista biológico, el hueso trabecular es el más rico en células osteogénicas de la médula ósea. La importancia de estas células mesenquimales progenitoras radica en el hecho de que proporcionarán la migración de los osteoblastos a la superficie del implante, además favorecer la angiogénesis y le llegada de células endoteliales. Por tanto, el hueso trabecular ofrece una remodelación ósea peri-implantaria mayor comparada a la del hueso cortical.

Otras células que también son protagonistas durante la remodelación ósea en la superficie peri-implantaria son las plaquetas. Esta población celular acude durante la coagulación liberando citoquinas y factores de crecimiento para acelerar la cicatrización. Esta cascada de coagulación está formada por el coágulo y la adherencia de fibrina. Gracias a la retención de la fibrina alrededor del implante durante los primeros días después de la inserción, las células osteogénicas llegarán a la superficie del implante para empezar la síntesis de tejido óseo.

3.3 El factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1)

La familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es un grupo de citoquinas multifuncionales que juegan un papel fundamental en la cicatrización y reparación de tejidos. TGF- β está compuesto por una familia de factores de crecimiento polipeptídicos multifuncionales involucrados en la embriogénesis (crecimiento y diferenciación celular), inflamación, regulación de la respuesta inmune, adhesión celular y migración, formación de matriz extracelular, angiogénesis y cicatrización de heridas (Skaleric et al. 1997; Saito et al. 1999). Sin embargo, los conocimientos sobre la función exacta de TGF- β en el hueso son contradictorios y en parte desconocidos.

TGF- β está formado por cinco isoformas, de las cuales las β 1, β 2 y β 3 se expresan en tejidos de mamíferos (Saito et al. 1999). Concretamente, el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) es la isoforma más común en los tejidos humanos (Tatakis et al. 2000). Se ha sugerido que tiene un efecto regulador en la fisiología del hueso (Wikesjö et al. 1998; Tatakis et al. 2000). También se relaciona la presencia de TGF- β 1 con la patogénesis y el diagnóstico de la enfermedad periodontal (Skaleric et al. 1997) y que su expresión está relacionada con la angiogénesis (Steinsvoll et al. 1999; Saito et al. 1999).

TGF- β 1 juega un papel relevante en la reacción del huésped hacia el implante (Aspenberg et al. 1996). Sin embargo, existen muchos interrogantes en cuanto al papel de TGF- β 1 en la regeneración ósea. TGF- β 1 tiene efectos significativos en la regulación

durante los procesos de inflamación y ha sido relacionado con procesos celulares de cicatrización de heridas (Cornelini et al. 2003). Además, se expresa en las células del tejido conectivo, endotelial y hematopoyético (Ezquerro et al. 2003).

TGF- β juega diversos papeles en cicatrización de heridas, enfermedades fibróticas, regulación de cáncer, y osificación endocondral (Kusafuka et al. 2001). Además, TGF- β modula la formación de matriz extracelular estimulando la acción de los fibroblastos e inhibiendo la degradación de la matriz extracelular (Takata et al. 2000).

Se ha sugerido que TGF- β acopla la actividad osteoblástica y osteoclástica (Mohammad et al. 2009), además de inhibir la diferenciación osteoblástica terminal (Alliston et al. 2001). También existen estudios que muestran que TGF- β inhibe la expresión de la fosfatasa alcalina y la osteocalcina, entre otros marcadores de diferenciación y función osteoblástica (Noda 1989; Centrella et al. 1994).

La señalización extracelular llevada a cabo por la superfamilia de TGF- β está implicada en diversos procesos celulares, así como en la regulación de la diferenciación mesenquimal (Alliston et al. 2001). Las células mesenquimales pueden diferenciarse a tejido óseo, cartilaginoso, adiposo muscular, dependiendo de las señales recibidas del entorno celular. Por un lado, las BMPs estimulan la diferenciación osteoblástica; por el otro, TGF- β puede inhibir la progresión de la diferenciación osteoblástica y adiposa (Centrella et al. 1994).

En los últimos años se ha investigado sobre la identificación y caracterización de los receptores de TGF- β y sus efectores de señalización celular. El sistema de señalización consiste en una familia de receptores tipo quinasa y una familia de sustratos receptores o proteínas SMAD, que van hacia el núcleo, donde pueden actuar como factores de transcripción. El ligando TGF- β ensambla un complejo receptor que activa a las SMADs, que activa a varios complejos que regulan la transcripción. Esta ruta se representa en la Figura 4 (Massagué & Wotton 2000).

La ruta de señalización de TGF- β implica la fosforilación del receptor SMAD (o R-SMAD). Concretamente, la ruta de señalización de TGF- β 1 está mediada por la SMAD2 y la SMAD3. Cuando el receptor tipo I de TGF- β (TGF- β R1) es fosforilado, se enlaza con

el correspondiente R-SMAD a través del anclaje SMAD para la activación del receptor (SARA) (Lin et al. 1995) y fosforila el residuo de serina de la R-SMAD. La fosforilación induce un cambio conformacional del R-SMAD y su disociación del complejo receptor y de SARA (Souchelnytskyi et al. 2001).

Se conoce que los miembros de la superfamilia TGF- β enlazan con los receptores tipo I y tipo II tipo quinasa serina/treonina, los cuales inician señales intracelulares a través de la activación de proteínas. Los receptores reguladores Smads (R-Smads) se anclan a la membrana celular mediante la interacción con las proteínas unidas a la membrana, incluyendo el anclaje Smad para la activación del receptor (SARA) (Miyazono et al. 2000).

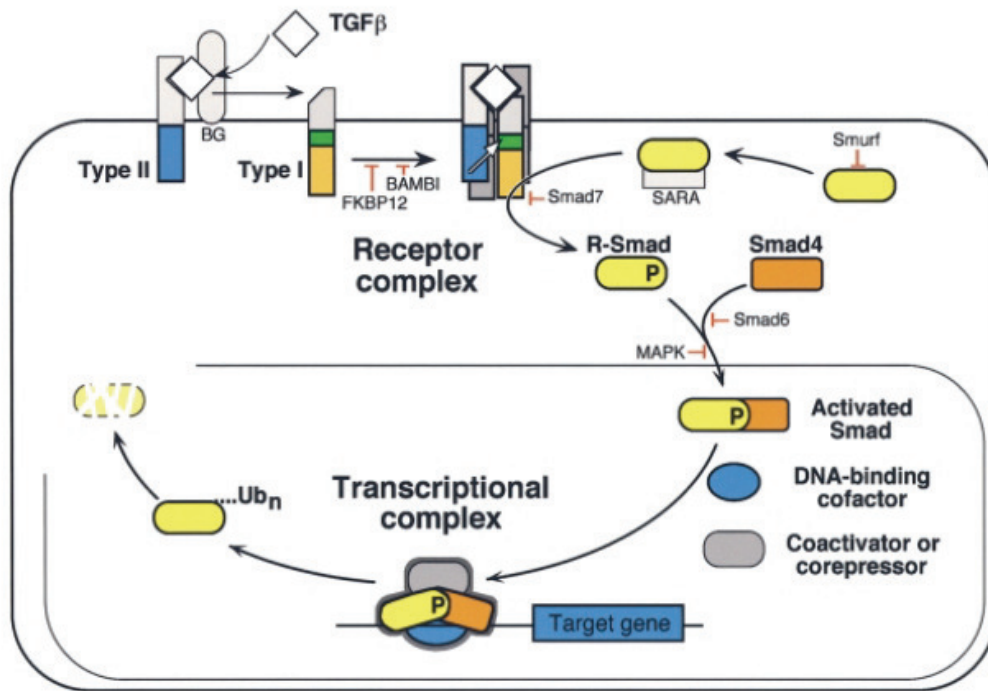


Figura 4: Ruta de señalización de TGF- β y SMADs. (Tomada de Massagué & Wotton 2000).

3.3.1 TGF- β 1 y formación ósea

En los últimos años, diversos estudios han intentado evaluar los efectos de TGF- β 1 *in vitro* e *in vivo*, obteniendo resultados muy diferentes (Schouten et al. 2009; Mohammad et al. 2009). La habilidad de TGF- β 1 para inhibir la expresión de los genes

osteoblásticos ha sido documentada. Sin embargo, el mecanismo de esta inhibición no se conoce con exactitud.

Existen diferentes estudios experimentales *in vivo* que reportan una correlación negativa entre la presencia de TGF- β 1 y la formación ósea (Aspenberg et al. 1996; Tieline et al. 2002); otros resultados *in vivo* han mostrado que la inserción de implantes dentales con TGF- β 1 añadido a su superficie daba lugar a la formación de una capa de tejido fibrótico alrededor de la superficie (Nikolidakis et al. 2009).

En el estudio *in vitro* de Mohammad et al (2009), la inhibición farmacológica de TGF- β 1 resultó en el incremento de la masa ósea y el volumen de hueso trabecular, así como el incremento de la concentración mineral y módulo elástico de la matriz ósea (Mohammad et al. 2009). Además, la inhibición de TGF- β 1 dio lugar a un incremento en el número de osteoblastos y de la tasa de formación ósea, además de una disminución del número de osteoclastos. Así, se obtienen tanto las actividades anabólicas como anticatabólicas para la mejora de la calidad ósea. Estos resultados *in vitro* sugieren que la inhibición de la ruta de señalización de TGF- β 1 podría ser una utilidad terapéutica en las enfermedades óseas caracterizadas por una calidad y masa óseas bajas, y propensión a las fracturas.

TGF- β 1 se considera un inhibidor potente de la diferenciación osteoblástica. En el estudio *in vitro* en células MC3T3-E1 desarrollado por Takeuchi et al (2010) (Takeuchi et al. 2010)(Takeuchi et al. 2010)(Takeuchi et al. 2010)(Takeuchi et al. 2010)(Takeuchi et al. 2010)(Takeuchi et al. 2010)(Takeuchi et al. 2010)(Takeuchi et al. 2010)(Takeuchi et al. 2010)(Takeuchi et al. 2010), se observó que la inhibición de TGF- β 1 mejoraba potencialmente la diferenciación osteoblástica. Además, la inhibición de TGF- β 1 suprime el crecimiento de las células del mieloma (Takeuchi et al. 2010).

En el estudio de Skaleric et al se encontraron concentraciones significativamente superiores de TGF- β 1 en los tejidos gingivales y fluidos de bolsas periodontales profundas (Skaleric et al. 1997). TGF- β 1 tiene efectos significativos en la regulación de procesos inflamatorios y se ha relacionado con procesos celulares de cicatrización de heridas tanto de tejidos blandos como de tejidos duros (Tyler et al. 1999).

Cornelini et al llevaron a cabo un estudio en el cual analizaron los tejidos alrededor de implantes fracasados; se encontró una expresión mayor de TGF- β 1 alrededor de los implantes fracasados, con diferencias significativas (Cornelini et al. 2003).

Tieline et al realizaron un estudio *in vivo* en fémures de rata. Colocaron implantes que contenían 50 μ g TGF- β 1; a las tres semanas, observaron mediante análisis histológico tejido mesenquimal rico en fibroblastos en aquellos implantes cargados con TGF- β 1 (Tieline et al. 2002).

Nikolidakis et al estudiaron el efecto de TGF- β 1 en la cicatrización ósea temprana alrededor de implantes colocados en el cóndilo femoral en ocho cabras. Cada animal recibió tres implantes: implante control, implante cargado con 0,5 μ g TGF- β 1 e implante cargado con 1.0 μ g TGF- β 1. A las seis semanas después de la colocación, se observó que los implantes cargados con TGF- β 1 presentaban una capa de tejido fibroso intermedio, con diferencias significativas. Los implantes que obtuvieron mayor BIC fueron los implantes control, mientras que los implantes del tercer grupo, el que contenía mayor cantidad de TGF- β 1, mostraron el contacto óseo menor. Por lo tanto, se concluyó que una dosis baja de TGF- β 1 tiene una influencia negativa en la osteointegración de implantes dentales en el hueso trabecular durante el periodo de cicatrización temprana (Nikolidakis et al. 2009).

3.4 Biofuncionalización de superficies de implantes dentales

El titanio es el material utilizado para la fabricación de implantes dentales debido a su alta resistencia, dureza y durabilidad. Para ofrecer biofuncionalidad a los metales, es necesaria la modificación de su superficie, ya que la biofuncionalidad no se puede desarrollar durante los procesos de fabricación de los implantes, tales como la fundición, el mecanizado o el tratamiento térmico. La modificación de la superficie de los implantes es un proceso que cambia la composición, estructura y morfología del material, conservando sus propiedades mecánicas (Hanawa 2011).

El concepto de *biofuncionalización* se basa en hacer parecer el cuerpo extraño insertado (el implante) similar al entorno biológico; conseguir que el implante se

parezca al lecho receptor, para evocar una respuesta mejorada de tejido duro durante la osteointegración y lograr así una optimización de la curación ósea durante el período de cicatrización temprano (Morra 2007).

En el campo de la implantología bucal, los implantes dentales requieren ofrecer biocompatibilidad con el tejido óseo para lograr que se osteointegren. El diseño de la superficie del implante puede tener una influencia notable en la osteoconducción, ya que puede modular la respuesta celular. Es durante la fase de liberación de citoquinas y factores de crecimiento cuando la biofuncionalización de la superficie del implante adopta protagonismo, con el objetivo de orquestar las señales entre los receptores, las células y los factores de crecimiento. Por ello, las características de la superficie de titanio son trascendentales para la respuesta biológica del tejido receptor.

La modificación de la superficie de titanio de los implantes dentales ha sido estudiada y aplicada con la finalidad de mejorar las propiedades biológicas de la superficie, lo que favorece el mecanismo de osteointegración (Meng et al. 2016). El planteamiento de este enfoque es hacer que la superficie del implante sea lo más atractiva posible para atraer a las células osteoprogenitoras: la migración de estas células hasta la superficie del implante y su posterior diferenciación en osteoblastos, encargados de la formación ósea en la superficie del implante (Davies 2003).

Actualmente, existen situaciones clínicas comprometidas que están dando lugar a que las investigaciones científicas centren sus estudios en la mejora de la interfase hueso-implante (van Steenberghe et al. 2002). La modificación de la superficie de los implantes dentales es una estrategia para superar estos escenarios clínicos comprometidos (Le Guéhennec et al. 2007). Así, la idea de la biofuncionalización es permitir la adhesión celular controlada a través de diseños modificando la superficie del implante (Lutz et al. 2012). La biofuncionalización de la superficie de los implantes dentales, por tanto, suscita una perspectiva desafiante de investigación actual en el campo de la implantología.

Los cambios en las propiedades topográficas, físicas y químicas de las superficies de los implantes pueden llegar a proporcionar el ambiente adecuado para que el entorno

biológico natural sea estimulado y maximizado. Las estrategias terapéuticas tienen como diana la aceleración del proceso de osteointegración, para así lograr un acortamiento en los tiempos de cicatrización, carga inmediata y éxito a largo plazo (Aparicio et al. 2011).

3.4.1 Modificación de la superficie de titanio

En su tratado sobre la modificación de superficies de titanio para su biofuncionalización (*Avances tecnológicos en implantología oral: hacia los implantes dentales inteligentes*), publicado por el Profesor Gil, se plantean dos tipos de estrategias para modificar las superficies:

- Modificación fisicoquímica
- Modificación bioquímica

La modificación fisicoquímica comprende la alteración de la composición y la morfología de la superficie, la energía superficial o la carga superficial. La modificación bioquímica induce cambios en los componentes de la superficie, actuando sobre el comportamiento celular para que se produzca una reacción celular específica, como la adhesión, la migración o la diferenciación.

El objetivo de la modificación bioquímica de la superficie es la inmovilización de componentes biofuncionales: proteínas, enzimas o péptidos. Estas moléculas serán las encargadas de inducir reacciones en el tejido vivo, de modo que la interacción entre el material y el huésped estará más controlada.

Los métodos para anclar biomoléculas en la superficie de los implantes son dos:

- Adsorción física
- Enlace químico covalente

Adsorción física

Posteriormente a la colocación del implante en un lecho biológico, se produce una adsorción de las proteínas en la superficie mediante enlaces débiles. Estos enlaces dependen en gran medida de las características de la superficie y de las condiciones biológicas del entorno. Es por ello que la adsorción no es un método controlado, ya que las proteínas pueden ser adsorbidas de forma inespecífica, o pueden ser inactivadas biológicamente, dando lugar a una caracterización y funcionalidad de la superficie poco predecibles.

Enlace químico covalente

Este método controla mejor la orientación de las moléculas bioactivas, inmovilizándolas mediante unión covalente a la superficie de titanio. Se trata de una unión que provocará una reacción más específica y activa en el huésped. La creación de un enlace covalente entre la superficie y la molécula inmovilizada con alta estabilidad bajo las duras condiciones biológicas de los entornos *in vivo* hacen que esta técnica sea más precisa.

La unión química mediante enlaces covalentes es un proceso más desafiante que la adsorción física, ya que la primera ofrece un enlace estable, específico y fuerte entre las moléculas orgánicas y el sustrato inorgánico (Sevilla et al. 2016).

Esta técnica de modificación de superficie engloba diversos pasos de tratamiento químico del titanio: entre ellos, la oxidación controlada para generar grupos de enlace; la unión de grupos amino y carboxil mediante procesos químicos; la silanización y finalmente la inmovilización del péptido.

Se han descrito numerosas técnicas de modificación de superficies de los metales y algunas de ellas han sido comercializadas. La modificación del diseño de las superficies de los implantes comprende desde los implantes mecanizados, modificaciones topográficas y químicas, modificación de la rugosidad de la superficie, pulverización con plasma de titanio (Yang et al. 2005), anodización electroquímica (Kim & Ramaswamy 2009), hasta recubrimientos con fosfatos de calcio.

Un tratamiento de modificación de superficies de implantes muy interesante es la modificación de superficie mediante la adición de moléculas bioactivas (Hanawa 2011). La revisión de Meng et al (Meng et al. 2016) sobre tipos de revestimiento de superficies de titanio con biomoléculas concluyó que este tratamiento parecía promover la formación ósea peri-implantaria, dando lugar a una osteointegración mejorada durante las primeras etapas de cicatrización. El estudio analizó tratamientos con factores de crecimiento como las BMPs, TGF- β 1, péptidos y matriz extracelular (ECM), entre otros.

La inmovilización de moléculas biofuncionales comprende los factores de formación ósea como las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), o biomoléculas como el colágeno o péptidos a las superficies metálicas. Estas técnicas tienen el objetivo de mejorar la biocompatibilidad de las superficies de titanio con tejidos duros. Estos revestimientos actúan como mediadores locales de la adhesión celular y como factores de estimulación para el crecimiento y la proliferación celular alrededor del implante. La conservación de la función biológica de las proteínas es el requisito más importante para la obtención de estas propiedades (Hanawa 2011).

Este abordaje terapéutico mediante inmovilización de moléculas biológicas, como los factores de crecimiento y las proteínas de adhesión, tiene como objetivo inducir una respuesta celular específica, que promoverá y acelerará la osteointegración. Para ello, hay que tener en cuenta propiedades como la estabilidad química, la solubilidad en fluidos biológicos y el coste.

Existen estudios que han mostrado las interacciones que se dan entre los receptores de la membrana celular y las proteínas de adhesión (o péptidos sintéticos) derivados de la matriz ósea, como por ejemplo el colágeno tipo I o la fibronectina (Reyes et al. 2007). También se han desarrollado superficies biofuncionalizadas con péptidos RGD (Arg-Gly-Asp): los resultados de inmovilización de estos péptidos han sido favorables en regeneración ósea y han mejorado la osteoconducción (Bagno et al. 2007).

La superficie de titanio también puede ser revestida con agentes óseos estimuladores, como por ejemplo los factores de crecimiento (Le Guéhennec et al. 2007). Estos factores comprenden los miembros de la familia de TGF- β , en concreto TGF- β 1, las

proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y los factores de crecimiento de la insulina (IGF-1, IGF-2) (Le Guéhennec et al. 2007).

Las propiedades de la superficie de los implantes son un factor fundamental para la respuesta de cicatrización biológica. Por tanto, la modificación de la superficie de titanio representa una herramienta para mejorar la respuesta biológica en la dirección deseada.

La biofuncionalización de superficies mediante la inmovilización covalente de oligopéptidos es un método que tiene el objetivo de dirigir la respuesta biológica celular, como por ejemplo el reclutamiento y diferenciación de una población celular concreta, o la actividad antimicrobial; en definitiva, métodos para mejorar la longevidad de los implantes.

3.5 Biomateriales sintéticos: fosfatos de calcio

El hueso, de forma similar a otros tejidos calcificados, está compuesto por matriz orgánica e inorgánica. La matriz orgánica está formada por proteínas colágenas y no colágenas; la fase inorgánica o mineral está constituida principalmente por hidroxiapatita cálcica: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Legeros 2002).

Los biomateriales de fosfatos de calcio ofrecen excelentes propiedades que los convierten en materiales de elección en los tratamientos de implantología y regeneración ósea. Por su similitud en su composición al hueso mineral, han sido a lo largo de los años biomateriales con altos índices de éxito. Los injertos de fosfatos de calcio son una alternativa predecible al uso de otros tipos de biomateriales, como los injertos autólogos, aloinjertos o xenoinjertos.

3.5.1 Propiedades de los biomateriales

Las tres propiedades más importantes de un biomaterial son las siguientes:

- Bioactividad: habilidad del material para formar hueso en la superficie del biomaterial y promover la función y expresión celular, promoviendo la formación de una interfase fuerte entre el hueso y el biomaterial. Este enlace con el tejido óseo debe ser directo, fuerte y adherente (Legeros 2002).
- Osteoconducción: habilidad para proporcionar un andamio apropiado o superficie a partir de la cual las células formarán hueso.
- Osteoinducción: capacidad para generar una respuesta celular que forme hueso e inducir la diferenciación de células osteoprogenitoras.

Urist et al (Urist et al 1965) definieron la osteoconducción como la propiedad de un material para soportar el crecimiento de un tejido, el crecimiento de células osteoprogenitoras y el desarrollo de la formación ósea. Las dos características principales de la osteoconducción son una composición química y una geometría arquitectónica apropiadas.

Los fosfatos de calcio (CaPs) poseen propiedades osteoconductoras gracias a su bioactividad y biocompatibilidad (Wang & Nancollas 2008). Esta osteoconducción permite el anclaje, proliferación, migración y diferenciación de las células osteoprogenitoras para la formación de hueso nuevo en aposición directa al biomaterial. La superficie del injerto de CaP adsorbe las proteínas del medio y son éstas las que inducen a los osteoblastos para migrar y diferenciarse para la producción de matriz mineralizada (Owen et al. 2017).

Los biomateriales de fosfatos cálcicos, especialmente los fosfatos β -tricálcicos y la hidroxiapatita, permiten la fijación, proliferación, migración y expresión fenotípica de células óseas que formarán la aposición directa de hueso nuevo en el biomaterial.

Los biomateriales de fosfatos cálcicos son útiles en ingeniería tisular para la regeneración de tejidos duros (Legeros 2002; Cuzmar et al. 2015; Sadowska et al. 2018). De hecho, la geometría tridimensional de estos biomateriales es crucial para permitir la concentración de proteínas endógenas en circulación y así promover la osteogénesis (Diez-Escudero et al. 2017).

3.5.2 Tipos de fosfatos cálcicos

Según su composición, los fosfatos cálcicos comercializados se pueden clasificar en:

1. Hidroxiapatita (HA)
2. Fosfato β -tricálcico: β -Ca₃(PO₄)₂
3. Fosfato cálcico bifásico: mezcla de hidroxiapatita y fosfato β -tricálcico
4. Fosfato cálcico con déficit de apatita

Nery et al (Nery et al. 1975) en 1975 fueron los primeros en reportar la aplicabilidad del fosfato tricálcico como sustituto óseo en defectos óseos creados en animales. Más tarde, el concepto “fosfato cálcico bifásico” o BCP fue introducido por Moore et al (Moore et al. 1987). El fosfato cálcico bifásico fue creado para mejorar las propiedades biológicas de los materiales biocerámicos, las ya comentadas bioactividad, bioresorbabilidad, osteoconducción e osteoinducción, y así mejorar la formación de tejido óseo (Lobo et al. 2010).

Los diferentes tipos de biomateriales de CaP se han utilizado como materiales para reemplazo de hueso, gracias a su similitud química a la fase mineral inorgánica del hueso natural. Se han desarrollado diversas composiciones sintéticas variando la ratio HA/ β -TCP con el objetivo de estimular las propiedades biológicas del hueso natural.

3.5.3 Fosfato cálcico bifásico

Los fosfatos cálcicos bifásicos (BCP) se han convertido en el tipo de fosfato cálcico de elección en cuanto a composición, ya que ofrecen una matriz apropiada para vehiculizar las moléculas osteoinductivas y optimizar la regeneración ósea. El comportamiento biológico del injerto sintético de hueso se ve influenciado por las características de su nanosuperficie, las estructuras y propiedades de la capa del biomaterial (França et al. 2014). La combinación bifásica ofrece un balance excelente para lograr una estabilidad a largo plazo del injerto y una formación de hueso nuevo sin reducción de volumen (Owen et al. 2017).

Los BCP se han utilizado como una alternativa de fabricación sintética a los injertos de hueso autólogos en cirugías ortopédicas y maxilofaciales. Estos biomateriales han demostrado ser seguros, efectivos y biocompatibles como material de andamio para la formación de hueso nuevo y como alternativa a los injertos autólogos, aloinjertos o xenoinjertos (Owen et al. 2017).

Stein et al mostraron que los beneficios clínicos de los BCP eran comparables a los del hueso autógeno esponjoso en defectos infraóseos periodontales, concluyendo que los biomateriales BCP son una alternativa adecuada a los materiales de injerto convencionales (Stein et al. 2009). Bouwman et al 2010 expusieron las propiedades osteoconductoras de los materiales de BCP histomorfométricamente e histológicamente en un estudio de elevación de seno maxilar mediante injerto óseo. La maduración ósea se evidenció por la presencia de hueso laminar (Bouwman et al. 2010).

En referencia a la respuesta celular, los materiales de BCP provocan reacciones a las células óseas similares a las provocadas por el hueso. Daculsi et al 2003 investigaron la remodelación ósea dos meses después de colocar el injerto, y observó reabsorción osteoclástica en el hueso artificial y formación ósea a expensas del biomaterial. La arquitectura de los injertos óseos se diseña con el fin de capturar las células madre mesenquimales e inducir su fenotipo hacia líneas celulares osteogénicas (Daculsi et al. 2003).

El crecimiento óseo ocurre alrededor y a expensas de la reabsorción de los gránulos de BCP. Los acontecimientos en la interfase entre el hueso y el biomaterial de CaP representan un proceso dinámico, incluyendo procesos físico-químicos, interacciones de cristales y proteínas, colonización de tejidos y células, remodelación ósea, contribuyendo a la formación compacta de dicha interfase. Los procesos implican un crecimiento óseo mineralizado y bien organizado a expensas del hueso artificial.

La característica principal de los injertos bioactivos es que forman una unión directa con el hueso hospedador, que resulta en una interfase fuerte comparado con otros materiales bioinertes que forman una interfase fibrosa (Daculsi 1998; Raymond et al. 2018; Sadowska et al. 2018).

La reabsorción y la bioactividad de los BCP se pueden controlar mediante la variación de la ratio β -TCP/HA. El equilibrio ideal entre las fases de HA y β -TCP puede mejorar la resistencia mecánica y mejorar el comportamiento biológico del andamiaje del biomaterial (LeGeros et al. 2003). Esta reabsorción biológica de este tipo de biomaterial depende de la solubilidad de los constituyentes del material y de su morfología, incluyendo la porosidad y la estructura porosa (Kamitakahara et al. 2008). Se han propuesto diversas ratios de HA/ β -TCP para mejorar las propiedades de los fosfatos bifásicos.

Inicialmente, los estudios de Ellinger et al y Yamada et al (Ellinger et al. 1986; Yamada et al. 1997) indicaron que la ratio ideal para los BCPs como sustitutos óseos es 60% HA y 40% de β -TCP. Lee et al 2008 testaron un BCP macroporótico (MBCP) para el procedimiento de elevación de seno maxilar y demostraron *in vivo* que esa esta ratio tiene la forma porosa requerida para los intercambios biológicos de crecimiento óseo y mineralización. Además, obtuvieron los mismos resultados predecibles cuando injertaron el biomaterial sintético solo que cuando se combinó con hueso autógeno. Sin embargo, las últimas revisiones de los estudios han mostrado que, independientemente de la ratio, los BCP aumentan la tasa y la calidad de regeneración ósea comparado con los defectos control (Ebrahimi et al. 2017).

Otros factores que pueden afectan a la reabsorción y respuesta biológica de los biomateriales son la técnica quirúrgica, el trauma quirúrgico y la duración del procedimiento quirúrgico (Ebrahimi et al. 2017).

3.6 Biofuncionalización de superficies con péptidos inhibidores de TGF- β 1

Con el objetivo de mejorar la osteointegración de los implantes tanto a corto como largo plazo, la biofuncionalización de las superficies de titanio se centra en dos aspectos básicos. En primer lugar, conocer las interacciones entre el implante y el tejido del receptor para entender la respuesta celular y desarrollar una estrategia; en

segundo lugar, el desarrollo de superficies biomiméticas para atraer a las células que se encargarán de promover la osteointegración.

El proceso de biofuncionalización de superficies de titanio es complejo. El titanio puede ser funcionalizado mediante péptidos, proteínas o polímeros. Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre las características de las proteínas que se adsorben en la superficie del implante (Imamura et al. 2007). La inmovilización de biomoléculas como proteínas, polisacáridos u oligopéptidos en sustratos sintéticos como el titanio es una misión desafiante en el campo de la implantología. Asimismo, la sujeción de estas biomoléculas que poseen propiedades físicas y químicas diversas es el aspecto más delicado de la biofuncionalización.

La modificación bioquímica de las superficies de titanio utilizando péptidos bioactivos puede alterar la adhesión de células específicas en la superficie, alterando su tasa de diferenciación, reduciendo los tiempos de cicatrización, e incrementando la estabilidad a largo plazo del implante (Chen et al. 2013).

La formación de tejido fibrótico entre la superficie del implante y el lecho receptor mandibular o maxilar da lugar a una *fibrointegración* del implante y a la pérdida del mismo. Esta reacción se caracteriza por una baja estabilidad del implante y mala vascularización de los tejidos peri-implantarios. Al ser TGF- β 1 uno de los principales mediadores de la respuesta fibrótica, está asociado con patologías relacionadas con inflamación crónica afectando a diversos órganos y tejidos. El grupo de investigación formado por Borrás-Cuesta et al. de la Universidad de Navarra desarrollaron una serie de péptidos que inhiben la ruta de señalización de TGF- β 1. Estos péptidos derivan de una región idéntica del receptor tipo III de TGF- β 1 humano y de rata, y que bloquean a TGF- β 1 *in vitro* (Ezquerro et al. 2003). Estos péptidos están situados cerca del extremo N-terminal de una proteína de superficie, una posición que los hace accesibles para la interacción con otras moléculas de interés, y son capaces de unirse a esta citoquina (Dotor et al. 2007).

3.6.1 Biofuncionalización de superficies con péptidos inhibidores de TGF- β 1: P144

P144 es un péptido lineal de 14 aminoácidos derivado del receptor tipo III del TGF- β 1 que se encuentra en el citoesqueleto de múltiples tipos celulares. P144 interacciona con TGF- β 1 en la región donde la citoquina conecta con su receptor, bloqueando así la ruta de señalización celular (Ezquerro et al. 2003; Serratì et al. 2009).

Las figuras 5 y 6 representan las características físico-químicas del péptido P144.

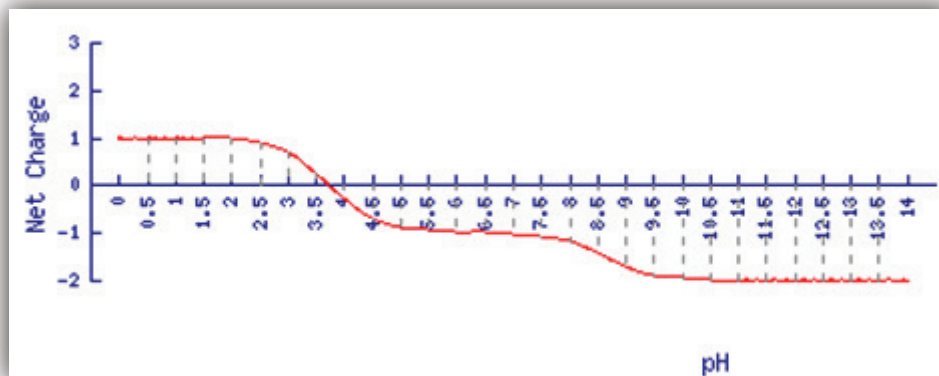


Figura 5. Carga neta y punto isoeléctrico de p144. https://www.genscript.com/ssl-bin/site2/peptide_calculation.cgi

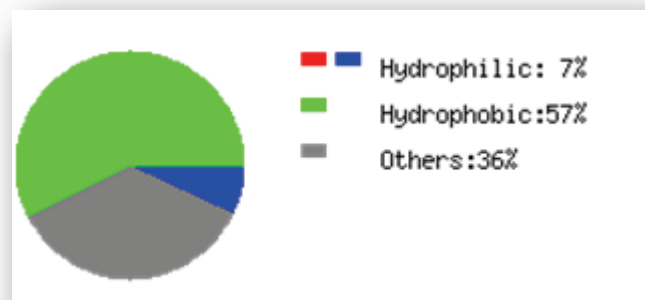


Figura 6. Hidrofobicidad por aminoácido de P144. https://www.genscript.com/ssl-bin/site2/peptide_calculation.cgi

3.6.2 Biofuncionalización de superficies con péptidos inhibidores de TGF- β 1: P17

P17 se identificó como un péptido inhibidor usando una biblioteca de fagos aleatoria de 15 meros. P17 ha demostrado tener alta afinidad de unión con TGF- β 1 y tuvo la máxima eficacia bloqueando la ruta de señalización de la citoquina *in vitro* e *in vivo* (Dotor et al. 2007b; Serrati et al. 2009).

Las características físico-químicas del péptido p17 se representan en las siguientes figuras 7 y 8:

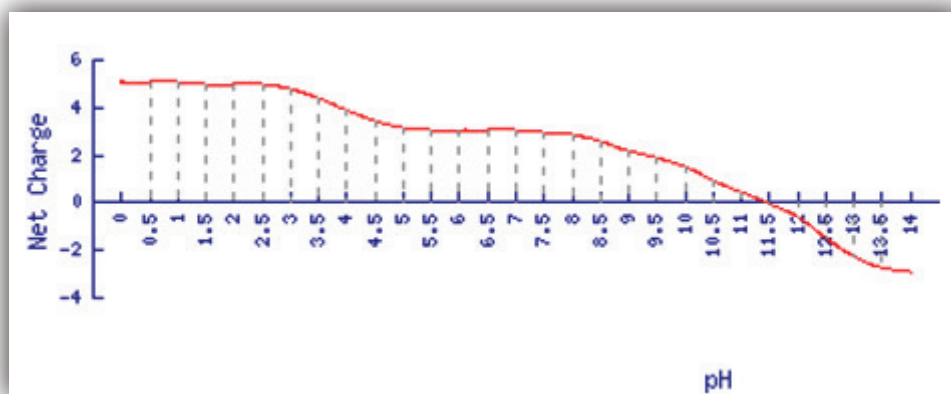


Figura 7. Carga neta y punto isoeléctrico de P17. https://www.genscript.com/ssl-bin/site2/peptide_calculation.cgi

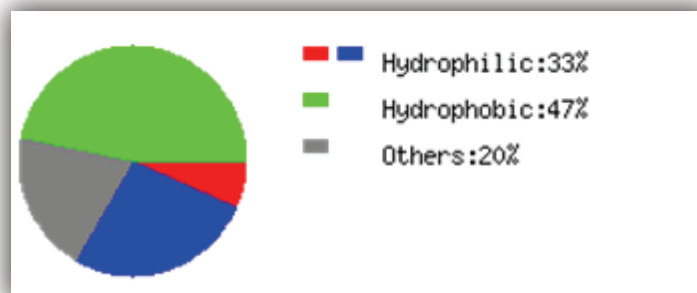


Figura 8. Hidrofobicidad por aminoácido de P17. https://www.genscript.com/ssl-bin/site2/peptide_calculation.cgi

Ambos péptidos, p17 y p144, inhiben a TGF- β 1 en la zona donde éste interacciona con el receptor tipo 3 (R3-TGF- β 1), de modo que bloquean la interacción y la subsiguiente secuencia de eventos de señalización del factor de crecimiento.

Se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo* que demuestran que estos péptidos inhiben la ruta de señalización de TGF- β 1, reduciendo la fibrogénesis. Además, los estudios en ratas muestran una reducción de la fibrosis en el hígado (Ezquerro et al. 2003). Concretamente, el péptido P144 se encuentra en la fase II de estudios clínicos sobre tratamiento de fibrosis en esclerosis sistémica (Santibañez et al. 2011). Por otra parte, algunos estudios han mostrado que el péptido P144 puede mejorar la eficacia de la inmunoterapia antitumoral en las líneas celulares del melanoma (Llopiz et al. 2009) y que puede actuar como inmunomodulador en la respuesta celular de los tumores, induciendo la producción de citoquinas en el melanoma que redireccionan la respuesta celular en contra de los tumores (Díaz-Valdés et al. 2011).

Más adelante, se desarrolló una técnica para inmovilizar covalentemente oligopéptidos en las superficies de titanio (Sevilla et al. 2016b). Estos péptidos fueron inmovilizados en las superficies de titanio utilizando un proceso de biofuncionalización que conserva su actividad biológica. Este método de biofuncionalización fue creado por el grupo de investigación de los Doctores Gil y Sevilla et al en la Universidad Politécnica de Catalunya (Sevilla et al. 2016b, 2017). Como hemos visto, TGF- β 1 desempeña funciones diversas, entre ellas favorecer la reacción fibrótica de los tejidos. Al ser TGF- β 1 un potente reactor de efectos biológicos, el control de sus funciones puede ser de gran importancia para influenciar en los procesos en los que participa.

Esta estrategia abre nuevas perspectivas en el campo de la biofuncionalización de superficies para la cicatrización de tejidos duros.

El objetivo actual de la implantología es desarrollar superficies con diseños topográficos estandarizados y controlados. Este enfoque tiene como pilar el entendimiento de las interacciones entre proteínas, células y tejidos, con las superficies de los implantes. La biofuncionalización con agentes estimuladores o inhibidores en la región peri-implantaria pueden responder a situaciones clínicas difíciles de baja cantidad y calidad óseas.

3.6.3 Biofuncionalización de fosfatos cálcicos

Los materiales bioactivos permiten el anclaje de células y su diferenciación directamente en la superficie para la unión íntima con el hueso recién formado, creando una interfase única y fuerte (Legeros 2002).

Los fosfatos cálcicos poseen una alta afinidad para las proteínas, convirtiéndolos en materiales ideales para péptidos bioactivos, factores de crecimiento o células mesenquimales. Esta propiedad osteoinductiva se asocia a una geometría específica del biomaterial de CaP (Diez-Escudero et al. 2017).

En el último siglo, la investigación animal ha sido la base para el desarrollo de nuevos biomateriales para la ingeniería tisular (Ebrahimi et al. 2017). Se ha demostrado que los materiales biocerámicos de BCP son osteoconductivos y que además ofrecen la posibilidad de adquirir características osteoinductivas por medio del control de sus propiedades físicoquímicas.

La biofuncionalización de los biomateriales permite aprovechar sus propiedades físico-químicas para inducir una respuesta ósea controlada y dirigida a mejorar las propiedades del biomaterial. El principal inconveniente de estos biomateriales es el tiempo de espera entre su colocación y la formación de hueso suficientemente compacto para la colocación de implantes.

En la constante búsqueda de la mejora de los procesos de remodelación ósea tras la aplicación de biomateriales, una de las estrategias planteadas podría ser biomimetizar la superficie de biomateriales sintéticos de origen no natural, lo que permitiría suplementar las propiedades físico-químicas de los mismos en aras de ayudar a una más rápida cicatrización de los tejidos dañados o regenerados en nuestros pacientes. Es por ello que esta tesis complementa su investigación en un apartado en el cual se evalúa la actividad biológica de un fosfato tricálcico bifásico en un modelo animal, experimentación que en nuestro conocimiento no ha sido desarrollada previamente.

4 Justificación

El tratamiento con implantes dentales es, desde hace décadas, una terapia predecible con una alta tasa de éxito en los pacientes total o parcialmente edéntulos. Hoy en día, en la mayoría de casos se logra la osteointegración del implante en el lecho receptor, pero todavía existen muchas situaciones clínicas en las que no se consigue esta unión al hueso. A estos casos se les atribuyen múltiples factores etiológicos, como una baja calidad ósea, infecciones postoperatorias tempranas, o una producción de tejido fibroso alrededor del implante o fibrointegración.

En los últimos años se han publicado diversos estudios con resultados contradictorios en cuanto a la fisiopatología y el papel exacto de los factores de crecimiento en la osteointegración. La ruta de señalización de estos factores es compleja y el desarrollo de agentes estimuladores o inhibidores que influyan en la respuesta celular de los componentes de la remodelación ósea es el reto actual de los estudios de investigación.

El tratamiento o funcionalización de las superficies de titanio ha generado un adelanto en la mejora de la osteointegración de los implantes en los últimos años. El desarrollo de superficies más atractivas para las poblaciones celulares encargadas de la remodelación ósea puede dar lugar a una respuesta biológica más específica y predecible desde el momento de la inserción del implante en el hueso. Esta reacción del huésped es altamente dependiente del diseño microscópico y componentes de la superficie del implante, de modo que la monitorización de la señalización celular se está convirtiendo en el objetivo de implantología moderna.

Por otro lado, la biofuncionalización de las superficies también puede ser una estrategia no solo en los casos de fracaso de implantes, sino también en la aceleración de los tiempos de carga de los mismos. La necesidad de la aceleración de la osteointegración de los implantes nace del deseo del acortamiento de las fases de cicatrización, que hoy en día enlentecen la fase protésica de las rehabilitaciones orales.

Los péptidos inhibidores de TGF- β 1, P17 y P144, han sido inmovilizados en superficies de titanio con el objetivo de desarrollar una superficie biofuncionalizada que favorezca la osteointegración de los implantes dentales. Asimismo, el propósito de esta biofuncionalización también es la disminución de los casos de fracaso por fibrointegración y el acortamiento entre las fases quirúrgicas y protésicas.

La escasa evidencia científica sobre la influencia de TGF- β 1 en la osteointegración de los implantes, así como los últimos hallazgos sobre el uso de péptidos inhibidores de TGF- β 1, justifican la realización de este trabajo. En primer lugar, se pretende evaluar *in vitro* los efectos de la inhibición de TGF- β 1 mediante estos péptidos en células tanto medios de cultivo como en superficies de titanio. En segundo lugar, se pretende evaluar en un modelo animal, *in vivo*, el efecto de la biofuncionalización de superficies tanto de implantes dentales como en biomateriales de regeneración ósea, mediante análisis histomorfométrico, histológico y ultraestructural, a tiempos cortos de cicatrización.

5 Hipótesis

La hipótesis cierta de este estudio es que la inhibición de la acción biológica del factor de crecimiento TGF- β 1 a través de la utilización de los péptidos inhibidores de TGF- β 1 p17 y p144, muestra respuesta biológica en términos de aceleración de la cicatrización en el entorno óseo y favorece la osteointegración de elementos externos introducidos en dicho entorno, durante los momentos tempranos de la cicatrización ósea.

La hipótesis nula de este estudio es que la inhibición de la acción biológica del factor de crecimiento TGF- β 1 a través de la utilización de los péptidos inhibidores de TGF- β 1 p17 y p144, NO muestra respuesta biológica en términos de aceleración de la cicatrización en el entorno óseo NI favorece la osteointegración de elementos externos introducidos en dicho entorno, durante los momentos tempranos de la cicatrización ósea.

6 Objetivos

6.1 Objetivo general

Evaluar si la inhibición de la acción biológica del factor de crecimiento TGF- β 1 a través de la utilización de los péptidos inhibidores de TGF- β 1 p17 y p144, acelera la cicatrización temprana ósea en relación a la osteointegración de superficies de titanio y biomateriales de regeneración ósea, tanto en modelo *in vitro* como *in vivo*.

6.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la acción de los péptidos P17 y P144 sobre TGF- β 1 en células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas. Conocer si la inhibición de TGF- β 1 tiene efectos positivos sobre estas células y si promueve la diferenciación osteoblástica (*Estudio 1*).
2. Determinar la acción del péptido P144 biofuncionalizado en superficies de titanio sobre células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas. Valorar la respuesta en marcadores osteoblásticos y fibróticos (*Estudio 2*).
3. Evaluar la osteointegración de implantes dentales biofuncionalizados con los citados péptidos inhibidores de TGF- β 1 (*Estudio 3*).
4. Comparar los cambios histológicos e histomorfométricos de implantes biofuncionalizados con ambos péptidos en modelo animal respecto a los no biofuncionalizados (*Estudio 3*).
5. Valorar la osteointegración de biomateriales de regeneración ósea sintéticos (fosfato tricálcico bifásico) biofuncionalizados con el péptido inhibidor de TGF- β 1 p144, en la cicatrización de alvéolos post-extracción. Comparar las características histológicas de los tejidos duros y los cambios histomorfométricos de los injertos óseos biofuncionalizados respecto a los no biofuncionalizados (*Estudio 4*).

7 Materiales y métodos

7.1 Materiales y métodos del estudio 1 *in vitro*

Realizamos un ensayo *in vitro* controlado y aleatorizado. Los materiales para desarrollar el experimento fueron los siguientes:

7.1.1 Células

La línea celular MC3T3-E1 pre-osteoblástica ha sido obtenida de calota de ratón C57BL/6.

1 vial de 1 millón de células MC3T3-E1 fue adquirido de ATCC[®], EEUU.

7.1.2 Cultivo celular

El medio de cultivo utilizado para las células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas fue el α MEM (Gibco, Life Technologies, EEUU).

Los productos químicos utilizados durante el cultivo de las células fueron los siguientes:

- Penicilina-estreptomocina, líquido (Gibco, Life Technologies, EEUU)
- L-Glutamina-200 mM, líquido (Gibco, Life Technologies, EEUU)
- HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfónico (Gibco, Life Technologies, EEUU)
- Suero Bovino Fetal (FBS), certificado, origen EEUU (GIBCO, Life Technologies, EEUU)
- Tampón fosfato salino (PBS), (Gibco, Life Technologies, EEUU)
- RLT Buffer (Gibco, Life Technologies, EEUU)
- 0,05% EDTA-Tripsina (Gibco, Life Technologies, EEUU)
- TGF- β 1 recombinante humano (Prospec, Israel)

7.1.3 Péptidos

Los péptidos utilizados en el ensayo son:

- P17, cuya secuencia es NH₂-KRIWFIPRSSWYERA-OH.

- P144, cuya secuencia es NH₂-TSLDASIIWAMMQN-OH.

Contribuidos por el Dr. Javier Dotor, de Digna Biotech® (España).

Los péptidos fueron entregados en forma de sal acética liofilizada.

7.1.4 Métodos experimentales

Los métodos experimentales para desarrollar el ensayo fueron los siguientes:

- Determinación de la inhibición de TGF- β 1 mediante la medición de respuesta de proteína SMAD2-fosforilada presente en las muestras de cultivo: Western Blot.
- Determinación de la expresión de proteínas codificadoras de genes en remodelación ósea: Real Time qPCR.
- Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina (ALP).

7.1.4.1 Western Blot

El procedimiento para determinar la expresión de la proteína SMAD2-fosforilada o p-SMAD2 fue el Western Blot. Para ello:

Se cultivaron células pre-osteoblásticas MC3T3-E1 de ratón en pase 4 en medio de cultivo Alpha-MEM suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de L-glutamina, 2% de HEPES y 10% de FBS. Se incubaron a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa. Se procedió al cambio del medio de las células cada 48 horas, se lavó con PBS estéril (tampón fosfato salino) antes de introducir el nuevo medio, y así sucesivamente hasta alcanzar la cantidad necesaria de células.

Se tripsinizaron las células usando 2 ml de tripsina y se incubaron durante 5 minutos. Después, se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos y se introdujeron 3 ml de nuevo medio. A continuación, se procedió al recuento total de células.

Se cultivaron 1.000.000 células en cada placa de Petri de 60mm de diámetro con medio sin FBS. Después de 24 horas, se realizaron los medios a suministrar a cada condición.

- Control: 0,5 ml de medio sin suero.
- TGF- β 1: 0,5 ml de medio sin suero con 7,5 ng de TGF- β 1. Se incubó durante 30 minutos y se añadió.
- TGF- β 1 + P17: 0,5 ml de medio sin suero con 7,5 ng de TGF- β 1 y 300 μ g de P17. Se incubó durante 30 minutos y se añadió.
- TGF- β 1 + P144: 0,5 ml de medio sin suero con 7,5 ng de TGF- β 1 y 300 μ g de P144. Se incubó durante 30 minutos y se añadió.
- P17: 0,5 ml de medio sin suero con 300 μ g de P17. Se incubó durante 30 minutos y se añadió.
- P144: 0,5 ml de medio sin suero con 300 μ g de P144. Se incubó durante 30 minutos y se añadió.

Se incubaron las placas durante 30 minutos. Posteriormente, las muestras se limpiaron con PBS dos veces y se lisaron con 300 μ l RIPA buffer en hielo, añadiendo previamente 80 μ l de inhibidor de proteasas. El RIPA es a base de 50mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 50mM NaF, 1mM inhibidor de proteasa/fosfatasa. Se introdujeron en el congelador durante 5 minutos. A continuación, las muestras se recogieron con el raspador, se introdujeron en eppendorfs y se guardaron en el congelador a -80°C.

Las células se descongelaron y se centrifugaron a 12000 rpm durante 12 minutos. Después, se recogió el sobrenadante y se procedió al ensayo de ácido bis-bicinchinónico (BCA) para la cuantificación de la concentración de proteína presente: Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, EEUU).

Después de la cuantificación de proteína, 60 μ g de proteína fueron extraídos de cada muestra y mezclados con tampón cargado SDS-PAGE + agente reductor hasta 1x concentración final. Las mezclas fueron movidas y calentadas a 96°C durante 5 minutos para abrir la proteína.

El gel de resolución SDS-PAGE fue preparado y vertido entre las placas de vidrio (Bio Rad, EEUU). Una vez el gel de resolución fue polimerizado, el gel de apilamiento se

preparó y vertió en el gel de resolución usando el peine Mini-Protean para formar vías en el gel. El gel se dejó polimerizar durante 20 minutos.

El Recombinant Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad, EEUU) fue cargado en la primera vía del gel. Una vez los geles fueron cargados, se sumergieron en el tampón de electroforesis y la electroforesis se ejecutó a 120 V utilizando el aparato Mini-Protean Tetracell (Bio-Rad, EEUU) hasta que las muestras atravesaran toda la vía.

La membrana adsorbente de PVDF (polifluoruro de vinilideno) (Immobilon-P, Millipore, EEUU) fue inmersa brevemente en metanol, y luego en el tampón de transferencia durante 5-10 minutos. A continuación, el gel y la membrana PVDF fueron ensamblados en el casete del aparato de Tetracell e inmersos en el tampón de transferencia. La potencial de transferencia proteica fue de 60 V durante una noche a 4°C.

Las membranas se bloquearon introduciéndolas una hora en BSA al 5% en TBS (Tris-Buffered Saline) conteniendo 0,1% Tween 20 (TBST). Posteriormente fueron incubadas durante 3 horas con el anticuerpo de actina músculo liso anti-alfa-liso (1:2000) (Santa Cruz Biotechnology, EEUU) para crear un control de proteína, y a continuación incubadas con anticuerpo anti-fosfo-SMAD2 (1:1500) (Cell Signaling Technology, EEUU). Después, fueron lavadas tres veces con TBST e incubadas durante una hora con anticuerpo secundario de anti-conejo peroxidasa (1:20.000).

Después del último lavado con TBST (3 veces cada uno durante 5 minutos), las bandas de proteína fueron reveladas con un sistema químicolumínico de detección (Lumi Light Plus, Roche GmbH, Mannheim, Germany) y un analizador de imagen luminiscente (Fujifilm LAS1000 Pro).

7.1.4.2 PCR cuantitativa o a tiempo real: qPCR

Se cultivaron células pre-osteoblásticas MC3T3-E1 de ratón en pase 4 en medio de cultivo Alpha-MEM suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de L-glutamina, 2% de HEPES y 10% de FBS. Se incubaron a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa. Se procedió al cambio del medio de las células cada 48 horas, se lavó con PBS estéril antes de introducir el nuevo medio, hasta alcanzar la cantidad de células necesarias.

Las proteínas codificadoras de genes que fueron evaluadas con la qPCR son: beta-actina, osteocalcina (OC), factor de transcripción 2 relacionado con runt (RUNX2), colágeno tipo I alfa 1 (Col1a1), proteína morfogenética de hueso tipo 2 (BMP2).

Las secuencias de *Primers* de ADN de las proteínas codificadoras de gen se representan en la tabla 1:

Beta-actin Mouse Forward	5'-ctaaggccaaccgtgaaaag-3'
Beta-actin Mouse Reverse	5'-accagaggcatacagggaca-3'
Osteocalcin Mouse Forward	5'-agactccggcgctacctt-3'
Osteocalcin Mouse Reverse	5'-ctcgtcacaagcagggttaag-3'
RUNX2 Mouse Forward	5'-gccagggcgtatttcaga-3'
RUNX2 Mouse Reverse	5'-tgctggctcttcttactgag-3'
Col1alpha1 Mouse Forward	5'-catgttcagctttgtggacct-3'
Col1alpha1 Mouse Reverse	5'-gcagctgacttcagggatgt-3'
BMP2 Mouse Forward	5'-cggactgcggtctcctaa-3'
BMP2 Mouse Reverse	5'-ggggaagcagcaactaga-3'

Tabla 1: Secuencias de primers de ADN utilizadas en el ensayo qPCR.

Los tiempos seleccionados para la PCR fueron 6 horas, 1 día, 2 días y 4 días. Cada condición se dividió en tres pocillos. En total, 72 pocillos en 4 placas. Cada pocillo contenía 40.000 células.

- Control: 1 ml de medio sin suero.
- TGF- β 1: 1 ml de medio sin suero con 5 ng de TGF- β 1. Se incubó durante 30 minutos y se añadió.
- TGF- β 1 + P17: 1 ml de medio sin suero con 5 ng de TGF- β 1 y 200 μ g de P17. Se incubó durante 30 minutos y se añadió.
- TGF- β 1 + P144: 1 ml de medio sin suero con 5 ng de TGF- β 1 y 200 μ g de P144. Se incubó durante 30 minutos y se añadió.
- P17: 1 ml de medio sin suero con 200 μ g de P17. Se incubó durante 30 minutos y se añadió.

- P144: 1 ml de medio sin suero con 200 μ g de P144. Se incubó durante 30 minutos y se añadió.

El día de la preparación de las condiciones, pasadas las 6 primeras horas, se lisaron las células de la primera placa con RLT buffer. Se aspiró el medio, se enjuagó con 0,5 ml de PBS y se introdujeron 0,3 ml de RLT buffer. Se rascó y se introdujo en eppendorfs y en el congelador a -80°C para su conservación.

A las 24 horas, se cambió el medio de las placas correspondientes a los días 2 y 4 y se procedió al lisado de la placa de las 24h, realizando el procedimiento ya descrito.

A las 48 horas, se cambió el medio de la placa de los 4 días y se lisó la placa del tercer grupo (2 días).

El protocolo que se siguió para la PCR es el siguiente: 1) extracción mRNA, 2) cuantificación espectrofotométrica de RNA, 3) transcripción inversa (RT) y 4) reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El mRNA se recogió y se purificó usando el RNEasy Plus Minikit (Qiagen, Alemania), siguiendo el protocolo del kit. La cuantificación de RNA se llevó a cabo midiendo la absorbancia con un espectrofotómetro Infinite® 200 PRO NanoQuant (Tecan, Suiza) usando la placa de Tecan's Nanoquant y el software the i-control™-microplaca.

Durante la transcripción inversa, la enzima transcriptasa inversa se utilizó para la transcripción a cDNA de doble cadena de las moléculas de mRNA. Para realizar la transcripción inversa de las muestras, se usó el kit de QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen, Alemania).

El resultante cDNA se amplificó utilizando el método QuantiFast SYBR Green. Este procedimiento requiere el tinte de la doble cadena de DNA en la reacción en cadena de la polimerasa, que se une a la nueva doble cadena de DNA sintetizada y le otorga fluorescencia. La amplificación de los genes se realizó con el sistema StepOne™ Real-Time PCR. El software v2.2.1 se utilizó siguiendo el protocolo de amplificación siguiente:

- 95 °C 10 min.
- 40 ciclos de:
 - 95 °C 30 seg.
 - 55 °C 1 min.

- 72 °C 1 min.
- Curva de fusión/disociación
 - 55° a 95°C.

7.1.4.3 Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP)

Se cultivaron células pre-osteoblásticas MC3T3-E1 de ratón en pase 4 en medio de cultivo Alpha-MEM suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de L-glutamina, 2% de HEPES y 10% de FBS. Se incubaron a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa. Se procedió al cambio del medio de las células cada 48 horas, se lavó con PBS estéril antes de introducir el nuevo medio, hasta alcanzar la cantidad de células necesarias.

Se tripsinizaron las células con 3 ml de TripLE y se incubaron durante 5 minutos a 37°C. Se depositó en un falcón y se introdujo medio nuevo. Se centrifugó durante 5 minutos. A continuación, se vació el contenido, quedando el bloque de células enganchado al falcón. Se introdujo medio nuevo y se procedió a la contabilización celular mediante Cámara de Neubauer.

Se introdujeron 20.000 células en cada pocillo de una placa de 48 pocillos, junto con 900 µl de medio correspondiente, 10 ng/ml de TGF-β1 en los grupos correspondientes. Se utilizaron las 6 mismas condiciones y los tiempos seleccionados fueron 7 días, 14 días y 21 días. Para ello, a la semana 1, 2 y 3, se extrajo el medio celular de la placa correspondiente, se limpió con PBS y se congeló a -80°C.

Para determinar la cantidad de proteína presente, se utilizó el kit Pierce® BCA Protein Assay (Thermo Scientific, EEUU). La medición de la actividad de ALP fue realizada mediante el Alkaline Phosphatase Assay Kit (Colorimetric) de Abcam (UK), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método utiliza el fosfato p-nitrofenil (Pnpp) como sustrato fosfatasa que se vuelve amarillo ($\lambda_{max} = 405 \text{ nm}$) cuando es defosforilado por la ALP y puede detectar entre 10-250 µU de ALP en las muestras.

7.2 Materiales y métodos del estudio 2 *in vitro*

Esta parte del trabajo se lleva a cabo desde la experimentación inicial que realizó uno de mis directores de Tesis, el doctor Pablo Sevilla Sánchez, en cuanto a la funcionalización de superficies de titanio, mediante el anclaje de péptidos inhibidores de TGF- β 1 a dichas superficies. Complementamos su trabajo realizando un ensayo *in vitro* controlado y aleatorizado. Los materiales para desarrollar el experimento fueron los siguientes:

7.2.1 Células

Se utilizaron tres tipos celulares para este estudio:

- Células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas de calota de ratón C57BL/6.
- Células NIH/3T3 fibroblásticas de calota de ratón C57BL/6.
- Células mesenquimales humanas

Los productos químicos utilizados durante el cultivo de las células fueron los mismos que los relatados previamente en la misma sección del estudio 1.

7.2.2 Superficies de titanio y grupos de estudio

Se utilizaron barras de 10mm de diámetro de titanio comercialmente puro (CP-Ti) de grado 2 (Ti) (Nagoya, Japón) y obleas de CP-Ti de 60mm de diámetro y 1 mm de espesor (Goodfellow, Gran Bretaña), según el método experimental desarrollado. En estas superficies se biofuncionalizó el péptido P144 según la técnica de biofuncionalización desarrollada por Sevilla et al (Sevilla et al. 2016b).

Para el ensayo de qPCR se utilizaron tres grupos de estudio:

- Grupo control de superficie de titanio sin biofuncionalizar
- Grupo de superficie de titanio con APTES + ácido malónico.
- Superficie de titanio biofuncionalizada con APTES + ácido malónico + MP144

Para los experimentos de determinación de la actividad de fosfatasa alcalina (ALP) y producción de osteocalcina (OC) se utilizaron los siguientes grupos de estudio:

- Grupo control de superficies de titanio sin biofuncionalizar

- Superficie del pocillo sin titanio (*Tissue Culture Polystyrene*) (TCPS)
- Superficie de titanio funcionalizada con MP144

7.2.3 Péptido

El péptido utilizado en este ensayo fue el péptido MP144 (H-KGGGGGGTSLDASIIWAMMQN-OH). La cadena KGGGGGG actúa anclaje del péptido a la superficie y como espaciador para mejorar la interacción con TGF- β 1.

7.2.4 Métodos experimentales

Los métodos experimentales para desarrollar el ensayo fueron los siguientes:

- Determinación de la inhibición de TGF- β 1 mediante la medición de respuesta de proteína SMAD2-fosforilada presente en las muestras de cultivo: Western Blot.
- Determinación de la expresión de proteínas codificadoras de genes de osteoblastos y fibroblastos: Real Time qPCR.
- Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina (ALP) y producción de osteocalcina (OC).

7.2.4.1 Western blot de SMAD2

El procedimiento para determinar la expresión de la proteína SMAD2-fosforilada o p-SMAD2 fue el Western Blot. Se utilizaron obleas de CP-Ti de 60mm de diámetro y 1 mm de espesor (Goodfellow, Gran Bretaña).

Las condiciones fueron las siguientes:

- Control: CP-Ti sin funcionalizar en 1,5 ml de medio sin suero y 0,7ng/ml de TGF- β 1. Se incubó durante 30 minutos y se añadió.
- MP144: CP-Ti funcionalizado con MP144 sumergido en 1,5 ml de medio sin suero con 0,7ng/ml de TGF- β 1. Se incubó durante 30 minutos y se añadió.

- No TGF- β 1: CP-Ti funcionalizado con MP144 sumergido en 1,5 ml de medio sin suero sin TGF- β 1.
- MP144 en solución: CP-Ti sin funcionalizar con 200ug/ml de MP144 en solución.

Se cultivaron células pre-osteoblásticas MC3T3-E1 de ratón en pase 4 en medio de cultivo Alpha-MEM suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de L-glutamina. Cuando se formaron el número suficiente de células, 500.000 células se transfirieron a cada una de las placas de petri de 6cm donde estaban alojadas las diferentes obleas de titanio. Después de 24 horas de adhesión celular, se añadió 0,7ng/ml de TGF- β 1 sin suero a las superficies de CP-Ti con las diferentes condiciones y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, el medio se transfirió a las células y se incubó a 37°C durante una hora.

A continuación, se procedió a la separación de proteínas y análisis de la proteína SMAD2-fosforilada como se ha descrito previamente.

7.2.4.2 PCR cuantitativa o a tiempo real: qPCR

Se utilizaron barras de 10mm de diámetro de titanio comercialmente puro (CP-Ti) de grado 2 (Ti) (Nagoya, Japón). La expresión de proteínas codificadoras de genes de los osteoblastos se determinó con las células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas. Se cultivaron 40.000 células en cada pocillo con las diferentes condiciones de ensayo. El pocillo de poliestireno sin titanio fue utilizado como grupo de control. El medio de cultivo utilizado fue el alfa-MEM suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de L-glutamina y 0,5ng/ml de TGF- β 1. Adicionalmente, 10% de suero fetal bovino (FBS) y factores osteogénicos (10 mmol/l de fosfato β -glicerol, 50 μ g/ml de ácido ascórbico y 50 μ mol/l de dexametasona) se añadieron el segundo día de cultivo. Las células MC3T3-E1 fueron recolectadas después de 2, 7, 14 y 21 días de cultivo.

Los genes que fueron evaluados con la qPCR en los osteoblastos fueron: osteocalcina (OC), factor de transcripción relacionado con run 2 (RUNX2), colágeno tipo I alfa 1 (Col1a1) y fosfatasa alcalina (ALP).

La expresión de genes fibroblásticos se determinó utilizando células NIH/3T3. Se cultivaron 40.000 células en cada pocillo que contenía las diferentes superficies de CP-Ti. El pocillo de plástico sin titanio fue utilizado como grupo control. Los experimentos se realizaron por triplicado. Las células se cultivaron con D-MEM suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de L-Glutamina y 0,5ng/ml de TGF- β 1. Después de un día de cultivo, se añadió 10% FBS al medio y el medio se cambió cada día. Las células fueron recolectadas los días 1, 3 y 7 utilizando la solución tampón RLT del kit RNEasy de Qiagen.

Los genes que fueron evaluados con la qPCR en los fibroblastos fueron: fibronectina (FN), colágeno tipo I alfa 1 (Col1a1), actina de músculo liso alfa (alfa-SMA), y metaloproteasas de matriz tipo 2, 3 y 9 (MMP2, MMP3 y MMP9).

Las secuencias de *primers* de ADN utilizadas para el estudio se indican en la tabla 2.

Alpha-SMA Mouse Forward	5'-cccaccagagtggagaa-3'
Alpha-SMA Mouse Reverse	5'-acatagctggagcagcgtct-3'
Beta-actin Mouse Forward	5'-ctaagccaaccgtgaaaag-3'
Beta-actin Mouse Reverse	5'-accagaggcatacagggaca-3'
ALP Mouse Forward	5'-cggatcctgacaaaaacc-3'
ALP Mouse Reverse	5'-tcatgatgtccgtggtcaat-3'
Osteocalcin Mouse Forward	5'-agactccggcgtacctt-3'
Osteocalcin Mouse Reverse	5'-ctcgtcacaagcagggtaag-3'
RUNX2 Mouse Forward	5'-gccaggcgtatttcaga-3'
RUNX2 Mouse Reverse	5'-tgcctggcttcttactgag-3'
Col1alpha1 Mouse Forward	5'-catgttcagcttgggacct-3'
Col1alpha1 Mouse Reverse	5'-gcagctgacttcagggatgt-3'
MMP2 Mouse Forward	5'-taacctggatccgtcgt-3'
MMP2 Mouse Reverse	5'-ttcagtaataagcaccttgaa-3'
MMP3 Mouse Forward	5'-ttgttcttgatgagtcagc-3'
MMP3 Mouse Reverse	5'-gatttgcgcaaaagtgc-3'
MMP9 Mouse Forward	5'-acgacatagacggcatcca-3'
MMP9 Mouse Reverse	5'-gctgtggttcagttggtg-3'
Fibronectin Mouse Forward	5'-cggagagagtgccctacta-3'
Fibronectin Mouse Reverse	5'-cgatattggtgaatcgaga-3'

Tabla 2: Secuencias de primers de ADN utilizadas para el ensayo qPCR.

El método de qPCR fue el mismo descrito en el estudio 1 *in vitro* (ver sección 6.1.4.2.).

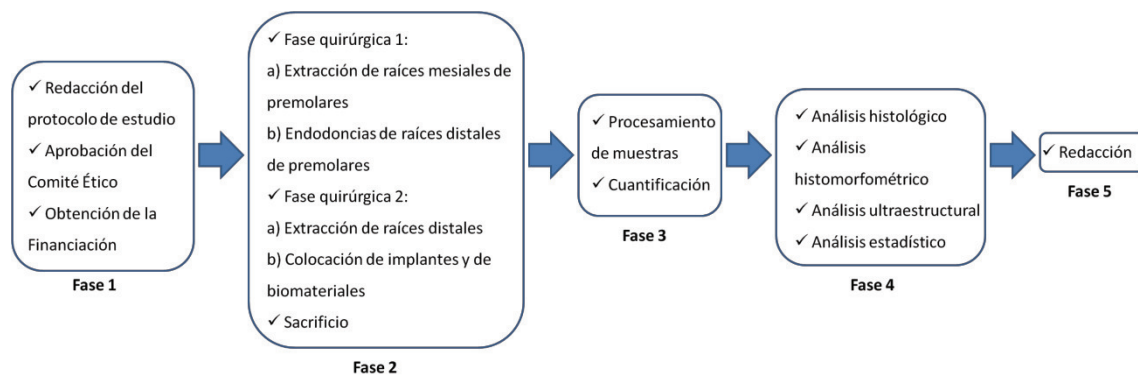
7.2.4.3 Actividad de fosfatasa alcalina (ALP) y producción de osteocalcina (OC)

Se utilizaron barras de 10mm de diámetro de titanio comercialmente puro (CP-Ti) de grado 2 (Ti) (Nagoya, Japón). Se utilizaron células mesenquimales humanas en las diferentes superficies de CP-Ti y el grupo control sin titanio en el pocillo de poliestireno. Las células se recolectaron después de 7, 14 y 21 días de cultivo. En cada condición experimental se cultivaron 10.000 células en Advance-MEM con 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de L-Glutamina, 0,5ng/ml de TGF- β 1 y factores osteogénicos (10 mmol/l de fosfato β -glicerol, 50 μ g/ml de ácido ascórbico y 50 μ mol/l de dexametasona).

La medición de la actividad de ALP fue realizada mediante el Alkaline Phosphatase Assay Kit (Colorimetric) de Abcam (UK), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia y la curva patrón se determinaron utilizando un espectrofluorómetro Infinite 200 Pro (Tecan, Suiza). De manera similar, la medición de la producción de OC se determinó utilizando el kit Osteocalcin Human Direct ELISA de Invitrogen (Life Technologies, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.3 Materiales y métodos estudio 3 y 4 in vivo

Tras haber confirmado la biocompatibilidad de los péptidos y su acción *in vitro*, el siguiente paso fue probar su viabilidad mediante experimentación *in vivo* en modelo animal. Las fases para la realización del estudio experimental *in vivo* se muestran en el cronograma siguiente:



Cronograma de las fases del estudio experimental *in vivo*.

7.3.1 Descripción del tipo de implante y superficies

Se utilizó el implante VEGA (Klockner®, Barcelona, España) fabricado con titanio comercialmente puro de grado IV. Este tipo de implante posee un tratamiento de granallado y pasivado ácido. Las dimensiones de los implantes fueron de 3,5 mm de diámetro y 8 mm de longitud. Todos los implantes (n=36) presentaban sistema de reducción de plataforma y el hexágono interno era de 2,05 mm. Los tres grupos de estudio fueron los siguientes:

1. Implante VEGA (Klockner®, España) o grupo control: n=12.
2. Implante VEGA (Klockner®, España) biofuncionalizado con péptido P17: n=12.
3. Implante VEGA (Klockner®, España) biofuncionalizado con péptido P144: n=12.

7.3.2 Descripción del biomaterial de regeneración ósea

El hueso sintético Maxresorb[®] (Botiss Biomaterials, Klockner[®]) es un fosfato cálcico bifásico homogéneo compuesto por un 60% de Hidroxiapatita y un 40% de fosfato-tricálcico beta (β -TCP). Los grupos de estudio fueron los siguientes:

1. Hueso sintético Maxresorb[®]: n=12.
2. Hueso sintético Maxresorb[®] con péptido P144 inhibidor de TGF- β 1: n=12.

7.3.3 Proceso de biofuncionalización

7.3.3.1 Biofuncionalización de los implantes

Se adquirió Dimetilformamida, NaOH, 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES), ácido malónico, N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-yl) uronio hexafluorofosfato (HBTU), isopropanol, N,N-diisopropiletilamina (DIEA) y el kit de Kaiser Test, proporcionados por la empresa Sigma-Aldrich (St Luis, Minesota, EEUU), así como acetona, etanol y tolueno anhidro, adquiridos de la empresa Panreac S.A (Barcelona, España).

Los péptidos p17 y p144 fueron fabricados mediante síntesis de péptidos en fase sólida (Lloyd-Williams et al 1997) en un sintetizador múltiple de péptidos automático APEX 396 (AAPPTec LLC) y amablemente cedidos por Digna Biotech (Madrid, España) en un estado liofilizado. Los péptidos fueron disueltos en dimetil formamida (Sigma-Aldrich, St Louis, Minesota, EEUU) a una concentración de 0,2 mmol/l.

Para poder anclar los péptidos a la superficie de titanio de los implantes, éstos fueron sometidos a un proceso de cuatro pasos (Sevilla et al. 2011, 2017). Inicialmente, los implantes se sumergieron en NaOH 5mol/l a 60°C durante 24 horas (Paso 1) para formar una gran cantidad de grupos OH⁻ en la superficie de titanio. A continuación, los implantes fueron lavados en agua destilada durante 30 minutos tres veces, enjuagados con acetona y secados con N₂ (Gil et al. 2002). Después de esta activación, los implantes fueron silanizados (paso 2) mediante inmersión en una solución de APTES de 30mmol/l en tolueno anhidro a 70°C durante 1 hora con agitación y atmósfera de

nitrógeno. Posteriormente, los implantes fueron sonicados en tolueno anhidro durante 15 minutos y lavados con etanol, isopropanol, agua destilada y acetona y secados con N₂. El tercer paso consistió en anclar un *crosslinker* (ácido malónico) como entrecruzante en la superficie silanizada con APTES sumergiendo los implantes en una solución de dimetilformamida conteniendo ácido malónico 10mM, 30 mM de O-benzotriazol-N, N, N', N'-tetrametil-uronio-hexafluoro-fosfato (HBTU) y 100 mM de diisopropiletilamina (DIEA) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Luego, los implantes fueron lavados en dimetilformamida pura dos veces. Como último paso, la inmovilización de p17 y p144 en la superficie del titanio se logró mediante la inmersión durante toda la noche de los implantes en una solución dimetil formamida (DMF) conteniendo 0,2mmol/l de los péptidos p17 y p144 a temperatura ambiente. Finalmente, los implantes fueron lavados en DMF pura y etanol dos veces y secados con N₂. La presencia de los péptidos en la superficie de los implantes fue confirmada a través del Test de Kaiser. Los implantes fueron almacenados en un ambiente seco para la posterior esterilización e implantación. Los implantes fueron esterilizados mediante inmersión en etanol al 70% durante 10 minutos y enjuagados con suero fisiológico salino (PBS) estéril tres veces.

7.3.3.2 Biofuncionalización del biomaterial

Se procedió a la dilución del péptido P144 en solución salina tamponada con fosfato estéril: 50 mg de P144 en 5 ml de solución salina (10mg/ml de concentración). A continuación, se añadieron 0,5ml de la mezcla a 2mg de Maxresorb® y se mezcló justo antes de introducir el injerto en los alvéolos. La concentración del péptido en el biomaterial fue de 10mg/cc.

7.3.4 Modelo animal y criterio de selección

La investigación se realizó en una muestra de seis perros Beagle machos de un año de edad y con un peso entre 12-15kg. El estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética (CEEHA 3256 DMAH 8890) de la Comisión de Experimentación Animal

(Direcció General de Polítiques Ambientals de la Generalitat de Catalunya). Todos los procedimientos fueron desarrollados según las guías European Community Guidelines (Directive 2010/63/EU).

Antes de la primera cirugía, los animales fueron aclimatados al medio local durante dos semanas, en tres habitáculos con espacio adecuado para dos animales cada uno y debidamente aclimatados. Todos los perros fueron monitorizados por dos veterinarios acreditados en experimentación animal durante todo el estudio hasta el día del sacrificio.

7.3.5 Procedimientos quirúrgicos

Las cirugías fueron llevadas a cabo en las instalaciones quirúrgicas de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona (Barcelona, España).

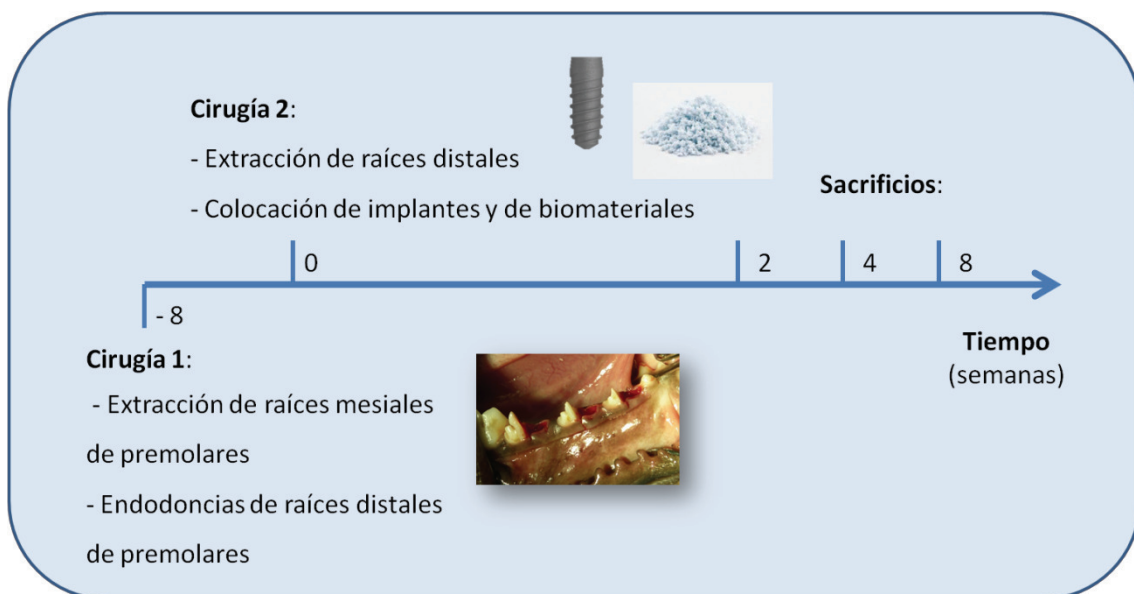


Figura 9: Diseño del estudio.

Para los procedimientos quirúrgicos, los perros fueron preanestesiados usando una inyección intramuscular de medetomidina y metadona. La anestesia fue inducida por inyección endovenosa de propofol y diazepam y mantenida por isoflorano inhalada en un portador de oxígeno. Durante la cirugía, todos los animales recibieron por vía endovenosa solución salina isotónica e inyección intravenosa de cefazolin. La anestesia local en mandíbula se realizó con articaína 4% 1:100.000 epinefrina mediante técnica infiltrativa en las mandíbulas.

El estudio constó de dos fases quirúrgicas:

7.3.5.1 Fase quirúrgica 1: Extracción de la raíz mesial de los 2º, 3º y 4º premolares mandibulares.

La primera cirugía consistió en la extracción de la raíz mesial de los 2º, 3º y 4º premolares mandibulares. Para ello, se hemiseccionaron el segundo, tercer y cuarto premolares (P2, P3 y P4) de cada hemimandíbula con una fresa diamantada y con refrigeración, y se exodonció la raíz mesial de cada premolar, siguiendo una técnica atraumática. Se realizó la endodoncia de la raíz distal de cada premolar seccionado con la obturación del conducto radicular mediante técnica de obturación termoplástica de un solo paso usando como cemento AHPlus® y como cono de gutapercha el sistema Thermafil® (Figura 10). Se pulieron los bordes cortantes de las coronas de los hemipremolares. Se suturó con polyglactina reabsorbible Vycril© 4/0.

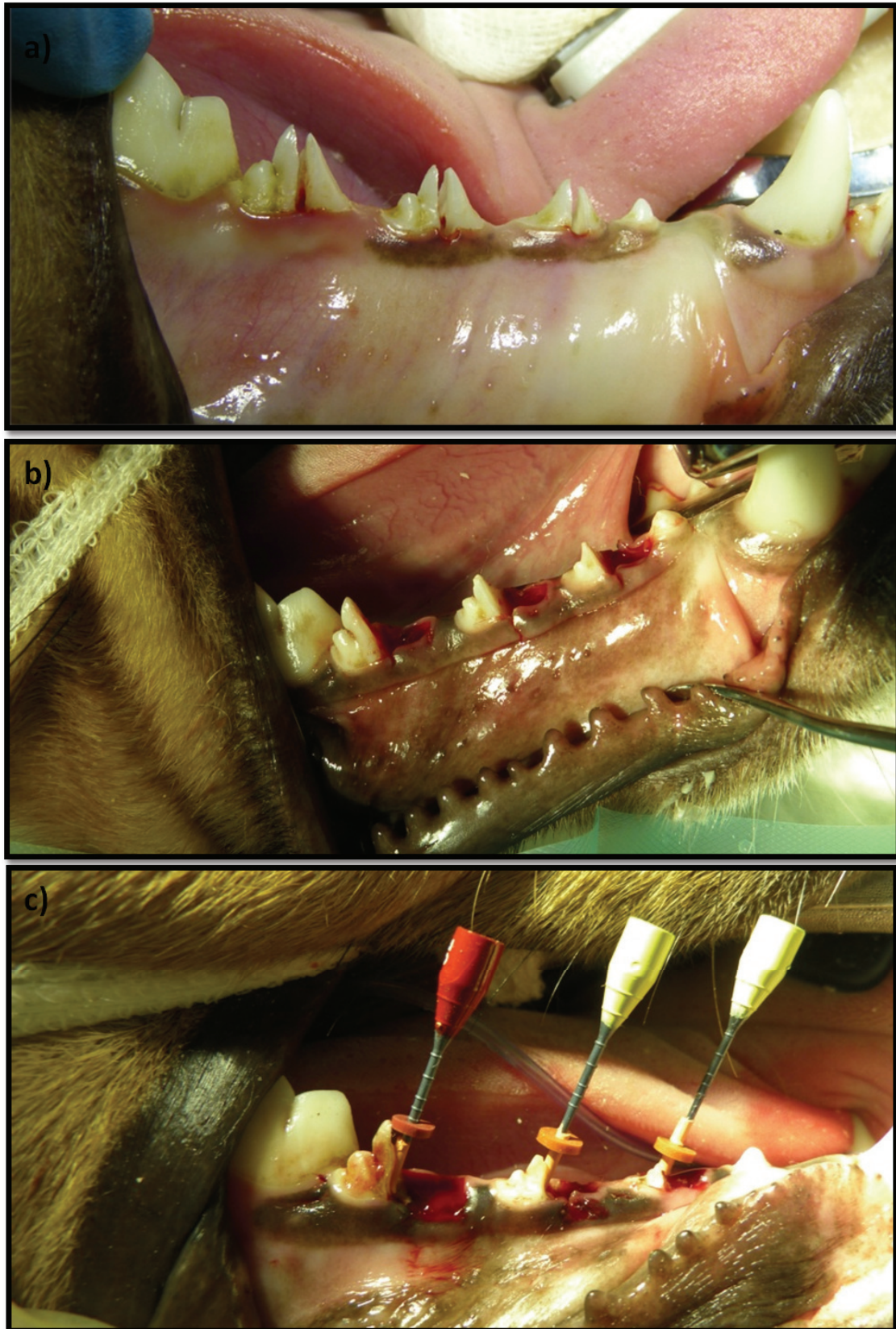


Figura 10: Fase quirúrgica 1. a) Hemisección de segundo, tercer y cuarto premolar inferior (P2, P3 y P4). b) Exodoncias de raíces mesiales de los premolares. c) Obturación de conductos de raíces distales de los premolares.

Seguidamente, se realizaron radiografías de cráneo de los animales para comprobar los tratamientos realizados (Figura 11). Inmediatamente después de la cirugía, todos los animales recibieron antiinflamatorios y analgésicos para el dolor postoperatorio (metadona y meloxicam).

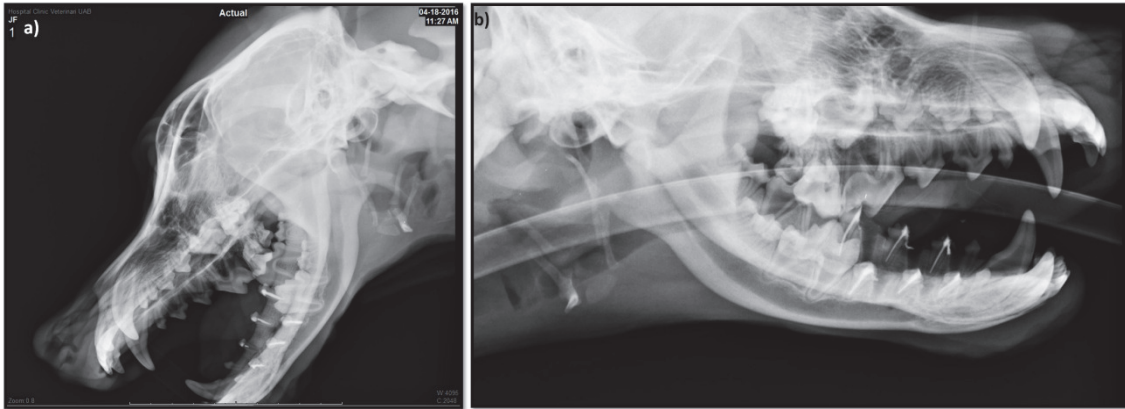


Figura 11: a) y b) Radiografías postoperatorias de la fase quirúrgica 1.

Todos los animales presentaron una cicatrización postoperatoria favorable; se inspeccionaron las heridas hasta que la sutura se reabsorbió completamente (Figura 12).



Figura 12: Aspecto clínico dos semanas después de la primera fase quirúrgica.

7.3.5.2 Fase quirúrgica 2: colocación de implantes y de biomateriales.

La segunda fase quirúrgica se realizó ocho semanas después de la primera. Se realizaron incisiones intrasulculares desde mesial del primer premolar hasta distal del primer molar con una hoja de bisturí del número 15C. Se elevaron colgajos mucoperiosticos con un periostotomo de Freer. Se insertaron tres implantes por hemimandíbula en el segmento óseo correspondiente a los alvéolos mesiales ya cicatrizados. Se realizó el lecho implantario siguiendo las instrucciones precisas del fabricante. Los implantes se colocaron yuxtacrestales junto con sus tornillos de cierre (Figura 14).

Previamente, se había realizado la exodoncia de las raíces distales endodonciadas siguiendo una técnica atraumática y legando los restos de tejido de granulación presentes en algunos alvéolos, para evitar que el acto quirúrgico influyera en los lechos implantarios, como se observa en la Figura 13. Tras haber colocado los implantes dentarios, seguidamente, en cada uno de los alvéolos se introdujeron 0,5cm³ del descrito biomaterial, vehiculizado en 0,5ml de suero fisiológico.

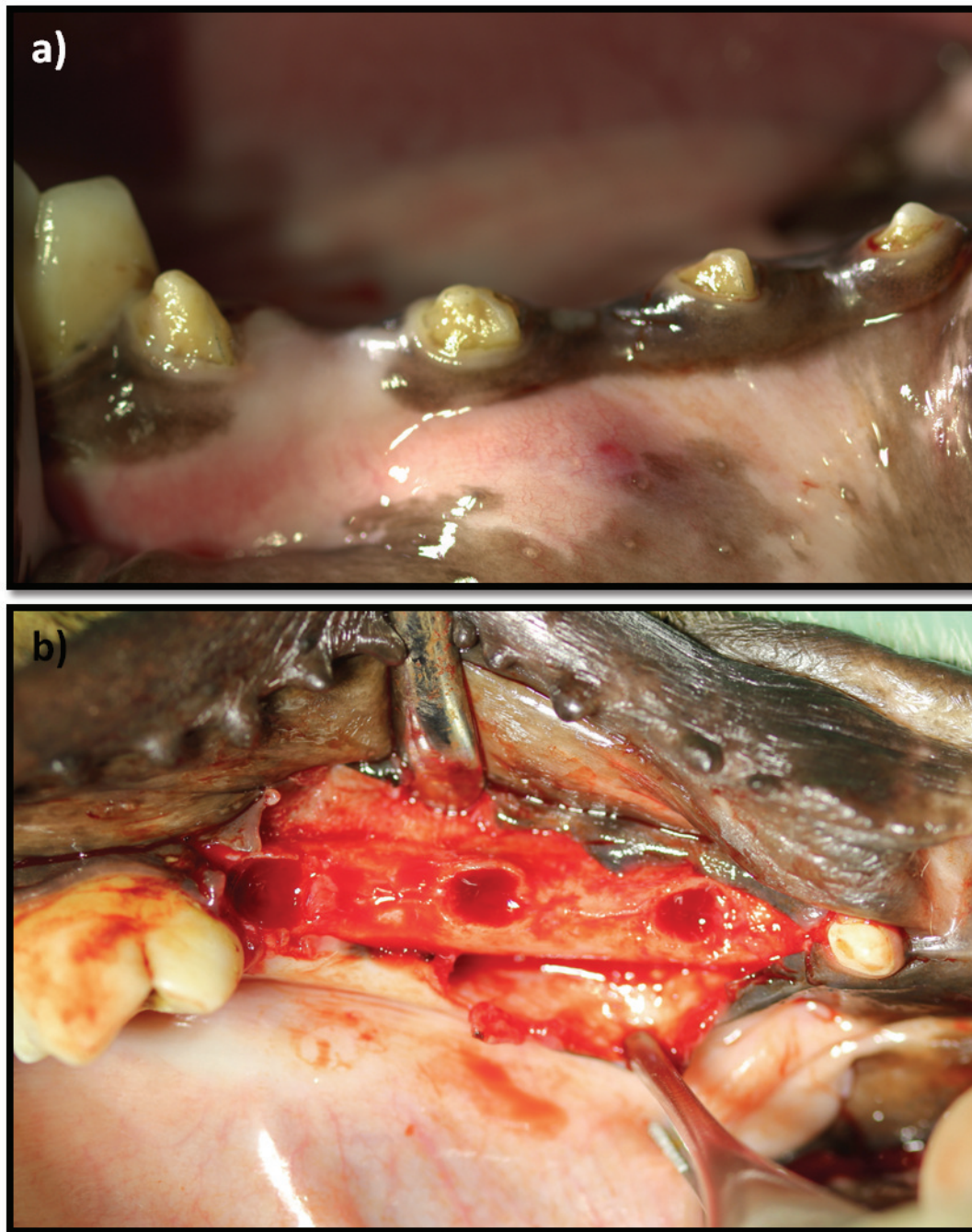


Figura 13: Imágenes clínicas de las exodoncias de las raíces distales. a) Imagen clínica preoperatoria de los premolares hemiseccionados. b) Exodoncias de las raíces distales de los premolares y aspecto clínico del hueso en el área de la raíz mesial ya cicatrizado.

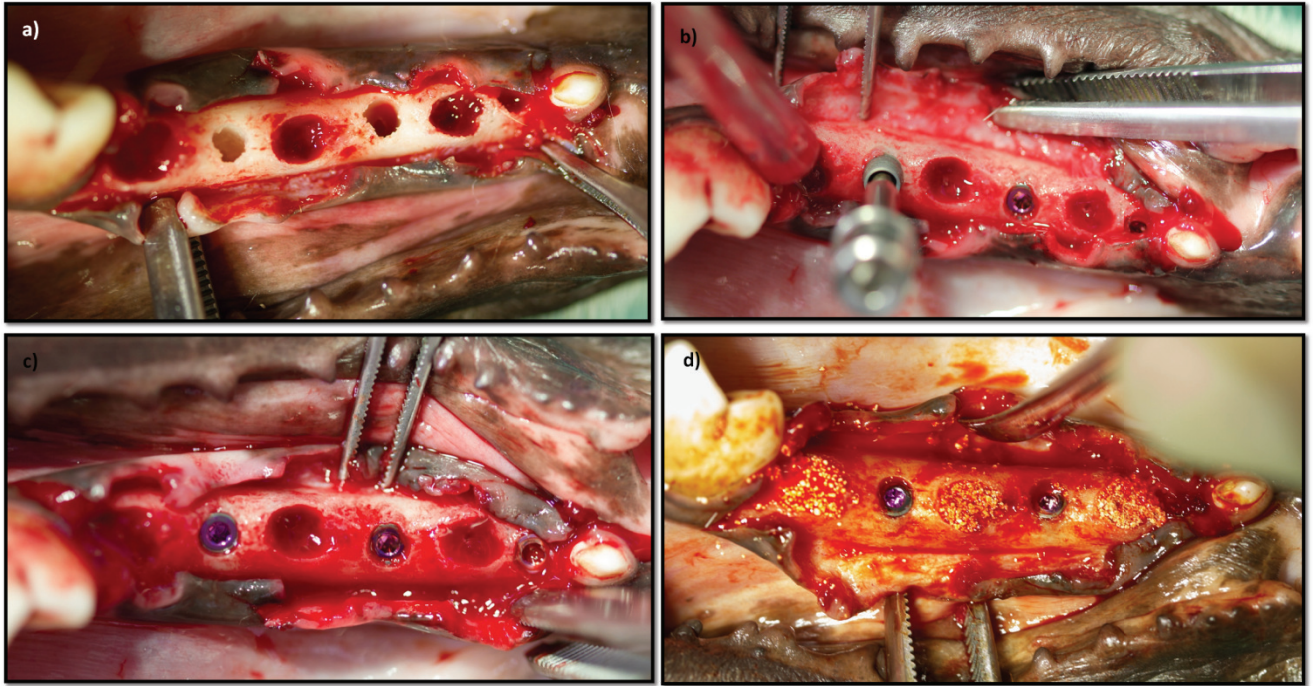


Figura 14: Imágenes clínicas de la segunda fase quirúrgica. a) Exodoncias raíces distales y fresado para colocación de implantes; b) Colocación de implantes; c) Implantes colocados en posición P2, P3 y P4; d) Regeneración con los tres biomateriales en los alvéolos post-extracción.

Los colgajos fueron adaptados utilizando una sutura libre de tensiones y mediante polyglactina reabsorbible Vycril® 4/0 (Figura 15). Se realizaron radiografías de las mandíbulas después de la cirugía (Figura 16).

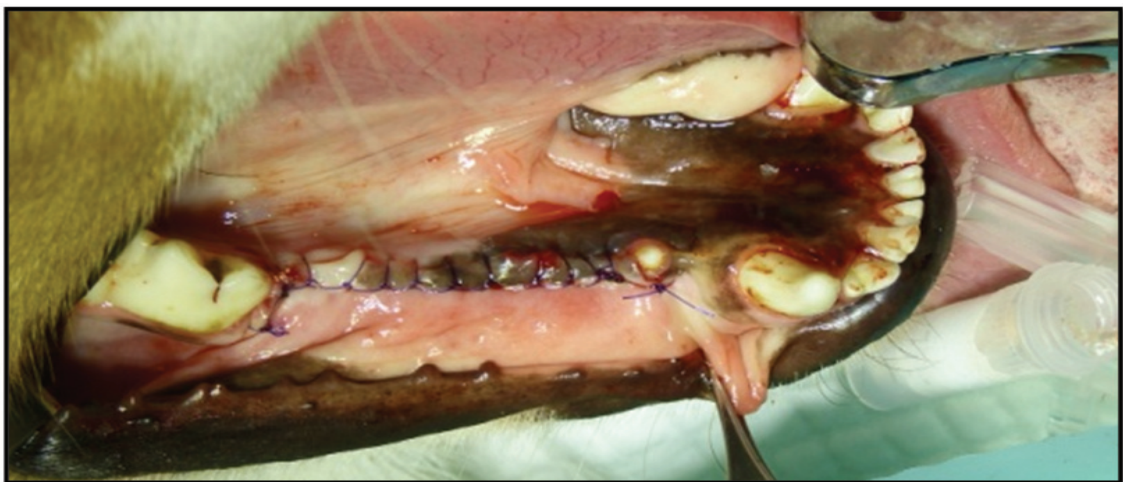


Figura 15: Cierre del colgajo por primera intención mediante sutura reabsorbible Vycril®.

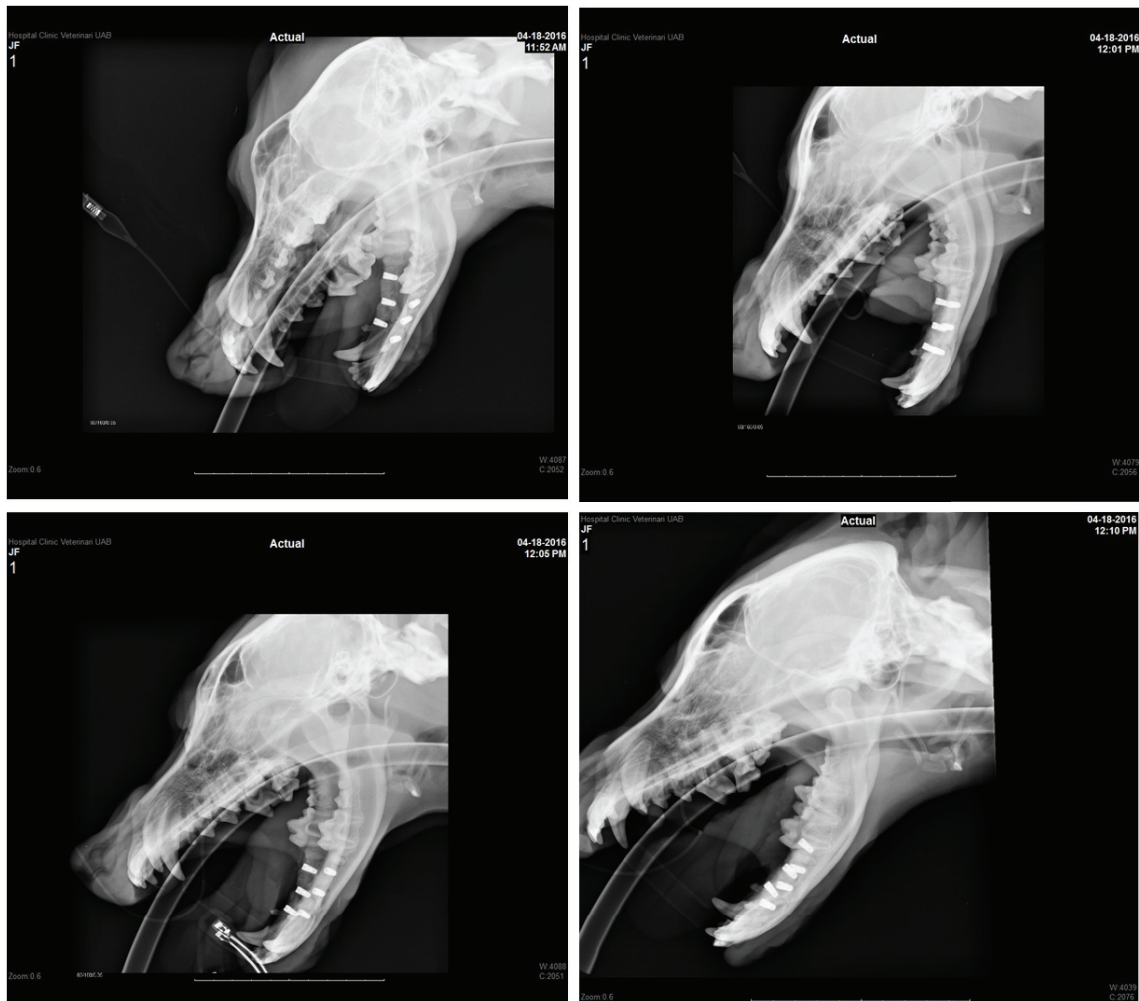


Figura 16: Radiografías postoperatorias a la cirugía de colocación de implantes y de biomateriales.

Posteriormente, todos los animales recibieron antiinflamatorios y analgésicos para el dolor postoperatorio (metadona y meloxicam), así como antibiótico profiláctico, intravenoso durante la cirugía y el postoperatorio (cefocevin). Durante el período postoperatorio también se administró medicación antiinflamatorio no esterooidal subcutáneamente a todos los animales durante los primeros 7 días para prevenir el dolor y la inflamación.

7.3.6 Sacrificio

Se sacrificaron dos animales en tres tiempos distintos: 2, 4 y 8 semanas después de la cirugía. El sacrificio se realizó mediante inyección intravenosa por sobredosis de pentobarbital sódico. Se preparó una sedación previa a la eutanasia de medetomidina por razones de bienestar animal.

El día del sacrificio, se realizaron radiografías de cada hemimandíbula (Figura 17).



Figura 17: Radiografías de las hemimandíbulas el día del sacrificio. a) Dos semanas posteriores a la colocación de implantes y biomateriales ; b) Cuatro semanas posteriores; c) Ocho semanas posteriores.

7.3.7 Procesamiento de las muestras

Para analizar los resultados, se extrajeron las mandíbulas y se procedió al corte de las mismas en seis bloques que contenían el fragmento óseo a analizar en este estudio. El procesamiento de los especímenes se realizó para obtener muestras histológicas cuantificables mediante tinción histológica. Para ello, las muestras fueron procesadas según el protocolo descrito por Donath y Breuner (Donath & Breuner 1982) de muestras sin descalcificar mediante el sistema de corte y pulido EXAKT (EXAKT, Alemania), utilizando el metacrilato de metilo (MMA) como medio de inclusión.

Las muestras fueron fijadas en formol inmediatamente tras su extracción. Tras dos semanas de fijación, las muestras se sometieron a un proceso de deshidratación que se llevó a cabo mediante la inmersión de dichas muestras en una serie de baños sucesivos de etanol en solución acuosa a diferentes concentraciones (30%, 50%, 75%, 96% y 100%) con agitación constante a 50 rpm.

Tras la deshidratación completa, se realizó el proceso de inclusión en resina PMMA (polimetilmetacrilato) Technovit 7200 VLC (Kulzer-Heraeus, Alemania) sumergiendo las muestras en soluciones de etano con concentraciones crecientes de resina MMA (30%, 50%, 75%, 100%) bajo agitación constante a 50 rpm.

Las muestras sumergidas en 100% de resina se mantuvieron en vacío para asegurar la correcta penetración de la resina en los tejidos y se solidificaron seguidamente mediante la utilización de un equipo de foto-polimerización EXAKT 520 (Exakt, Alemania) con unidad de control de luz blanca y UV.

Las muestras embebidas en resina de PMMA fueron cortadas mediante una sierra EXAKT modelo 300 con banda de diamante hasta alcanzar la zona de interés, correspondiente a la sección longitudinal del defecto en el plano sagital mandibular. Los cortes se realizaron bajo condiciones de refrigeración por irrigación continua de agua con el fin de prevenir y evitar el sobrecalentamiento y deterioro de los tejidos, bajo condiciones de máxima velocidad de rotación de la banda y mínima carga de avance. Los cortes obtenidos fueron pulidos hasta dejar la superficie completamente lisa y sin rallas. El pulido se hizo con papeles abrasivos de carburo de silicio (SiC) de

diferentes granulometrías (P800, P1200 y P4000) mediante la utilización de una pulidora Exakt 400 CS equipada con un sistema de control de paralelismo.

La superficie pulida fue adherida a una placa histológica de PMMA de EXAKT mediante la foto-polimerización de monómero Technovit 7210 VLC (Kulzer-Heraeus) con una lámpara de luz ultravioleta EXAKT 402. Ya fijada, se hizo otro corte con el fin de eliminar la máxima cantidad de tejido sobrante y reducir el grosor de la muestra.

Seguidamente, se volvió a pulir la muestra con papeles abrasivos de SiC con la pulidora Exakt modelo 400 CS con control de paralelismo hasta alcanzar un grosor final de alrededor de 50µm. El grosor de la muestra se controló realizando mediciones continuas con un micrómetro después de cada periodo de pulido para conocer en todo momento el grosor de la muestra.

Posteriormente, las muestras fueron teñidas con la tinción histológica Tricrómico de Masson-Goldner adaptada para plástico con el objetivo de identificar el tejido óseo del biomaterial injertado. Las muestras teñidas fueron escaneadas mediante un microscopio óptico Leica AF7000 (Leica Microsystems, Alemania) dotado con cámara de color y de un sistema motorizado de escaneo automático programable que permitió adquirir imágenes de toda la muestra a 5x aumentos.

7.3.8 Adquisición y cuantificación de imágenes

7.3.8.1 Análisis cuantitativo de las muestras de implantes dentales con microscopía electrónica de barrido (BS-SEM)

La observación con el BS-SEM fue realizada con el equipo Neon[®] 40 FIB/BS-SEM (Zeiss, Germany). Todas las muestras fueron pulverizadas con carbono para ser examinadas mediante el BS-SEM y almacenadas dos días antes a 37°C.

Las condiciones del BS-SEM fueron las siguientes: V = 15kV; WD = 8; apertura = 60µm; magnificación = 250x; velocidad = 3; resolución = 1024 x 768. El tipo de escaneo seleccionado fue el escaneo por línea. Cada línea se escaneó 20 veces y el valor de la velocidad de escaneo fue de 0,4 ms/línea. Se obtuvieron una media de cuarenta

imágenes por muestra (30' por muestra) y se desarrolló un proceso automático de "stitching" para obtener la imagen entera del implante a alta resolución.

La cuantificación se desarrolló utilizando los programas Photoshop (Adobe Systems, EEUU) e ImageJ (NIH, *National Institutes of Health*). Los parámetros morfométricos que se analizaron fueron los siguientes:

- "Bone to implant contact" (BIC)/Contacto hueso-implante: porcentaje de hueso directamente en contacto con la superficie del implante.
- "Peri-implant bone fraction" (BF)/Área de hueso peri-implantario. porcentaje de hueso peri-implantario en un área rectangular delimitada de 1,5x2mm situada a 2mm de la superficie del implante (Cardoso et al. 2014), (Manresa et al. 2014).
- "Interthread Bone" (IB)/Hueso entre espiras: porcentaje de hueso situado entre las espiras del cuerpo del implante. Para cuantificarlo, se delimitó el área de estudio con un polígono desde el cuello del implante hasta el ápice agrupando todas las espiras.

La cuantificación realizada de estos tres parámetros se representa en la Figura 18.

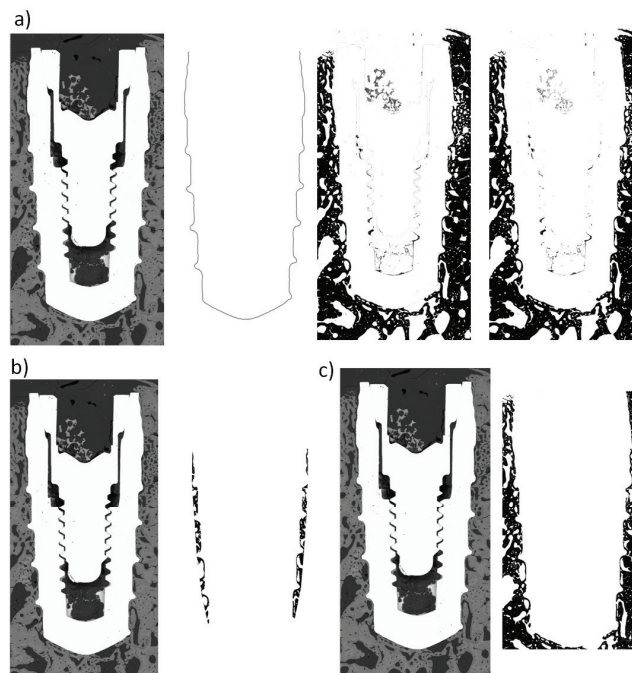


Figura 18: Tratamiento de imágenes con ImageJ para la cuantificación de los parámetros morfométricos cuantificados. a) BIC; b) IB; c) BF.

7.3.8.2 Análisis cuantitativo de las muestras de biomateriales mediante histología

Las imágenes obtenidas por microscopía óptica fueron tratadas y procesadas con software de análisis de imagen Photoshop (Adobe Systems, EEUU) y ImageJ (NIH, *National Institutes of Health*).

A partir de las imágenes adquiridas se llevó a cabo la cuantificación, que consistió en la análisis de la cantidad de tejido óseo neoformado en la zona del alvéolo post-extracción. Todas las muestras fueron tratadas y procesadas del mismo modo y utilizando el mismo protocolo, que ha sido desarrollado y adaptado para este estudio.

Se delimitó un área de defecto de forma manual, siguiendo el perímetro del alvéolo y abarcando toda la zona de implantación del biomaterial y la zona en la que el tejido óseo es neoformado y menos mineralizado, que se puede reconocer gracias a la tinción. Esta área marcada como defecto ha sido definida como la zona de interés (Rol: *Region of Interest*).

Tras la elección del área de interés, se realizó un tratamiento de imagen para cada muestra con el objetivo de distinguir claramente los diferentes tejidos implicados en la cuantificación: tejido óseo, biomaterial y otros tejidos (tejido blando, vacío, etc.). Una vez diferenciados, se segmentó la imagen para poder convertirla en binaria (B/N) y poder cuantificar así sólo el tejido de interés. La Figura 19 muestra en ejemplo del proceso seguido para cada una de las imágenes.

Para cada muestra analizada se cuantificaron los parámetros siguientes:

- % NBV: porcentaje de tejido óseo neoformado, dentro del área de interés correspondiente al espacio total del defecto (100%).
- % Biomat: porcentaje de biomaterial, se calcula midiendo la proporción de espacio ocupado por el biomaterial implantado dentro del área de interés correspondiente al espacio total del defecto (100%).
- % Otros: porcentaje de otros tejidos en el área de interés, que se calcula midiendo la proporción de espacio ocupado por tejido no óseo ni biomaterial, y que puede estar formado por tejido blando, grasa, u otros tejidos o componentes que no reaccionan con la tinción histológica escogida, o incluso espacio vacío a causa del procesado de las muestras.

- % TVol: espacio libre dentro de la región de interés en el que puede crecer el tejido óseo, por lo que corresponde al espacio disponible para el crecimiento o la formación de tejido óseo neoformado. Se calcula como el área de interés (100%) menos el área ocupada por el biomaterial (%Biomat).
- NBV/TVol: porcentaje de tejido óseo neoformado en el espacio disponible para el crecimiento (área de interés menos área del biomaterial), y se calcula mediante la relación que existe entre el porcentaje de tejido óseo neoformado (%NBV) y el espacio disponible para que crezca (%TVol).

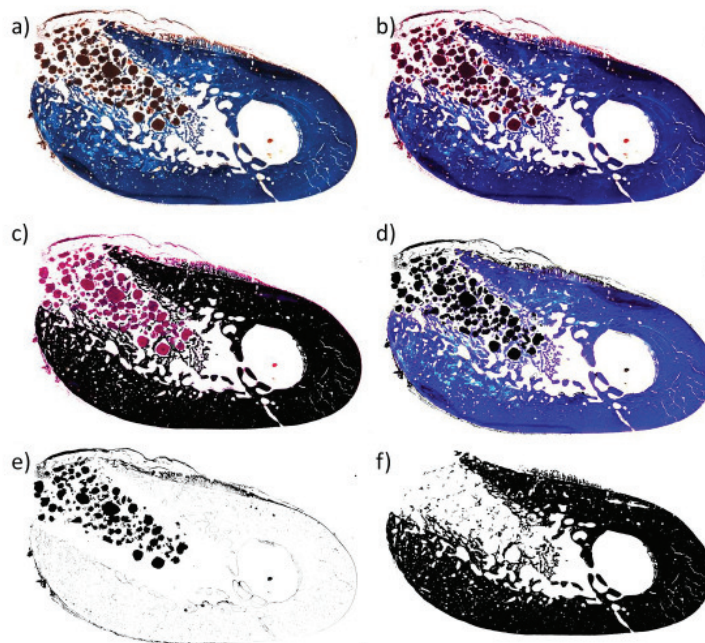


Figura 19: Proceso de tratamiento de imágenes de biomateriales para la cuantificación mediante ImageJ. a) Imagen original; b) Imagen contrastada; c) Segmentación del tejido óseo; d) Segmentación del biomaterial injertado; e) Binarización de imagen d); f) Binarización de imagen c).

7.3.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando un modelo lineal mixto (*linear mixed model*) en el cual el factor repetido fue el tiempo (2, 4 y 8 semanas) y el factor entre grupos el biomaterial, siendo la hemiarcada el covariado de no interés. Se utilizó una estructura de identidad escalada (*scaled identity*) para la matriz de covarianzas. Se analizó cada variable dependiente por separado. Para las variables de porcentaje se utilizó la transformación logit. Se usó la corrección de Bonferroni para controlar el efecto de las comparaciones múltiples, cuando fue necesario, porque el número de niveles del factor a comparar era mayor a 2. Las medias y el error estándar de la media se proporcionan después de ajustar la covariable sin interés. Todos los análisis se realizaron utilizando SPSS V20.0. Las figuras se basan en medias y errores típicos ajustadas por el modelo lineal mixto.

7.3.10 Análisis cualitativo

7.3.10.1 Análisis cualitativo de los implantes dentales

Para complementar nuestro estudio, se realizó un análisis histológico de las muestras de implantes dentales. Todas las muestras se pulieron hasta lograr un grosor apto para el microscopio: 50µm. Seguidamente, se procedió a la tinción con Tricrómico de Masson-Goldner para distinguir los tejidos presentes.

Se realizó la integración de las muestras a 5x con el microscopio Nikon 600 (Nikon, Japón), mediante proceso de cosido (*stitching*) para guiar el análisis histológico a mayores aumentos. Utilizamos el microscopio Leica DMD 108 (Leica Microsistemas S.L.U., España) para la observación a 10x, 20x y 50x aumentos para el análisis cualitativo de los tejidos y la identificación celular.

7.3.10.2 Análisis cualitativo de los biomateriales

El análisis cualitativo de las muestras de biomateriales implantados se realizó mediante microscopio óptico y microscopio electrónico de barrido (BS-SEM). Para ello, las muestras alternativas de los bloques cortados fueron re-procesadas para ser

observadas por medio de BS-SEM. Las muestras fueron pulidas mediante el mismo procedimiento descrito para las muestras de implantes dentales y se observaron en el microscopio SEM Jeol J-6510®.

8 Resultados

8.1 Resultados del estudio 1 *in vitro*

8.1.1 Western Blot

La proteína intracelular SMAD2 se fosforila cuando TGF- β 1 interacciona con los receptores celulares TGFR1 y TGFR2. Por tanto, la respuesta de p-SMAD2 es un método que se utiliza para comprobar si la señalización de TGF- β 1 ha sido producida. En nuestro estudio, SMAD2 se ha fosforilado, como se evidencia en la Figura 20 donde se observa la banda oscura en la columna del grupo tratado con TGF- β 1. Sin embargo, la intensidad de las bandas es muy baja, y en las demás columnas no se observan esta expresión. No obstante, se puede observar que en las muestras sin TGF- β 1 la p-SMAD2 es indetectable. La segunda fila es la β -actina, que se utilizó como control para comprobar que había la misma cantidad de proteína en cada pista de gel de la electroforesis. La intensidad de las bandas es similar en la β -actina, de modo que la cantidad total de proteína es similar y los resultados son comparables.

Por lo tanto, las muestras tratadas con TGF- β 1 y los péptidos inhibidores P17 y P144 no mostraron fosforilación de la SMAD2, indicando la efectividad de dichos péptidos en su acción de inhibición de TGF- β 1.

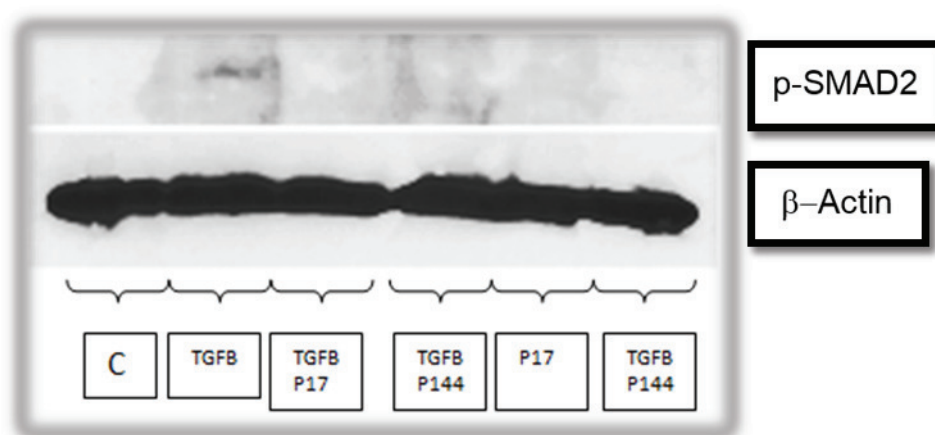


Figura 20. Resultados de Western Blot de fosforilación de SMAD2 producida por las células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas..

8.1.2 qPCR

Osteocalcina

Las células tratadas con TGF- β 1+P17 muestran la mayor expresión de osteocalcina a las 6 horas. El grupo tratado con TGF- β 1+P144 muestra el mismo nivel de expresión que el grupo tratado solamente con TGF- β 1, siendo inferior al grupo control. El grupo P17 y P144 muestran niveles bajos de expresión a las 6 horas.

A las 24h, la expresión de osteocalcina disminuye en el grupo control, mientras que las células tratadas con TGF- β 1+P17 muestran una expresión muy acentuada de esta proteína. El resto de grupos muestra una expresión inferior a la del grupo control.

A las 48h, el grupo control se mantiene, mientras que las células tratadas con TGF- β 1 + P17 disminuyen considerablemente la expresión de osteocalcina, igualando su concentración a los niveles de las células tratadas con TGF- β 1, TGF- β 1 + P144, P144. Sin embargo, el grupo tratado solamente con P17 incrementa levemente.

A los 4 días, el grupo control ve aumentada su expresión de osteocalcina, mientras que los demás grupos se muestran estables (Figura 21).

Por lo tanto, se observan niveles más elevados de osteocalcina en el grupo experimental tratado con TGF- β 1 + P17.

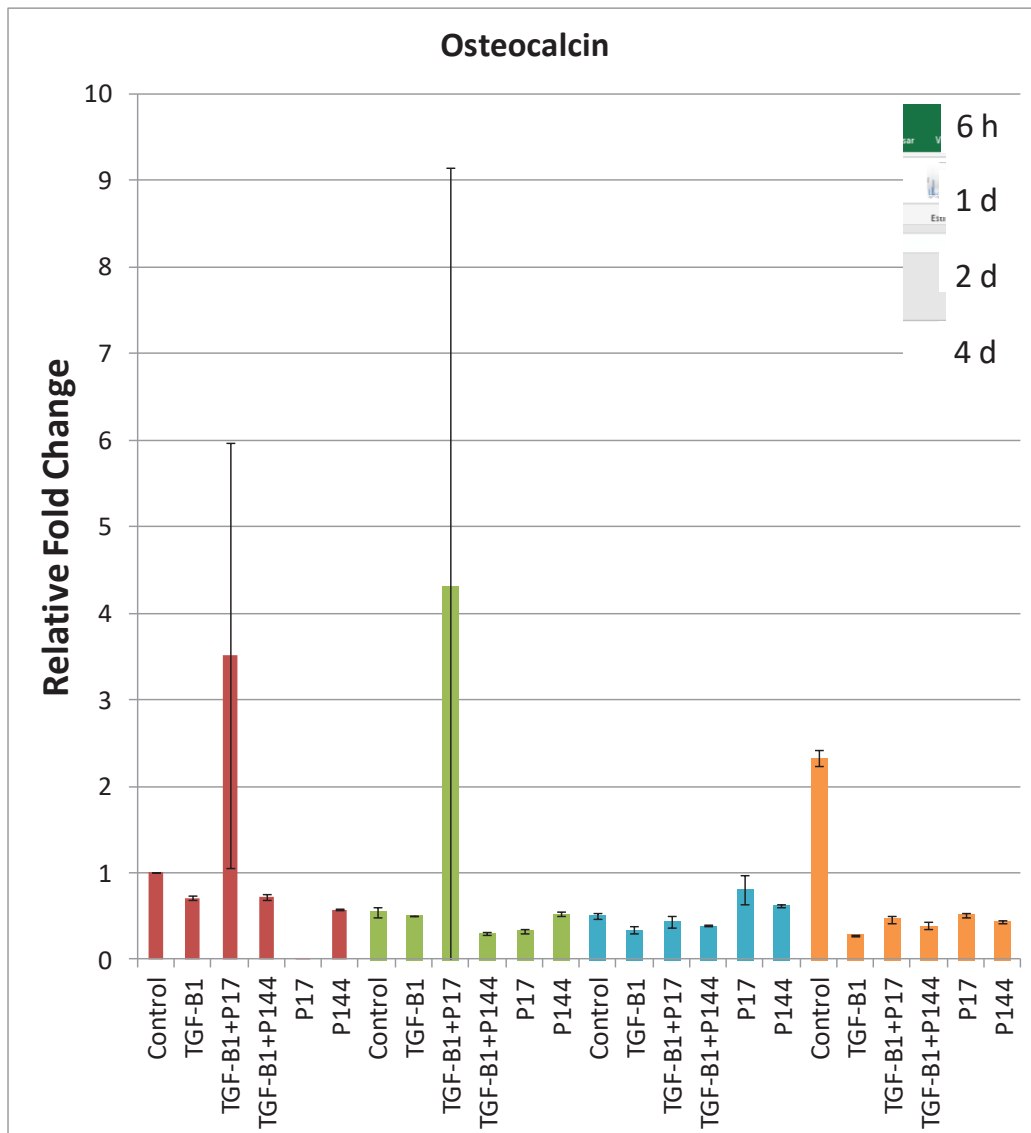


Figura 21: Gráfico de expresión de osteocalcina en células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas a las 6 horas, 24 horas, 2 días y 4 días de cultivo.

Colágeno

A las 6 horas, las células tratadas con P17 son las que muestran mayor expresión de colágeno, seguidas del grupo control. Los grupos tratados con TGF- β 1, TGF- β 1+P17, TGF- β 1+P144, P144 muestran valores similares, ligeramente inferiores a los del grupo control.

A las 24 horas, sin embargo, la expresión del grupo control disminuye a la mitad, mientras que los grupos TGF- β 1, TGF- β 1+P17 y TGF- β 1+P144 ven aumentada la expresión del colágeno, mayor que la del grupo control a las 4 horas. Los grupos P17 y P144 disminuyen ligeramente.

A las 48 horas, el grupo control se mantiene, el grupo TGF- β 1 disminuye, TGF- β 1+P17 aumenta y TGF- β 1+P144 se mantiene. Los grupos P17 y P144 disminuyen ligeramente.

A los 4 días, el grupo control aumenta considerablemente, así como los grupos TGF- β 1, TGF- β 1+P17 (duplicando la expresión del grupo control), TGF- β 1+144, que aumentan notablemente. Los grupos P17 y P144 también ven aumentada su expresión de colágeno al doble respecto a los dos días (Figura 22).

Por lo tanto, se observa una gran expresión de colágeno tipo I en los grupos tratados con los péptidos durante los 4 tiempos del experimento.

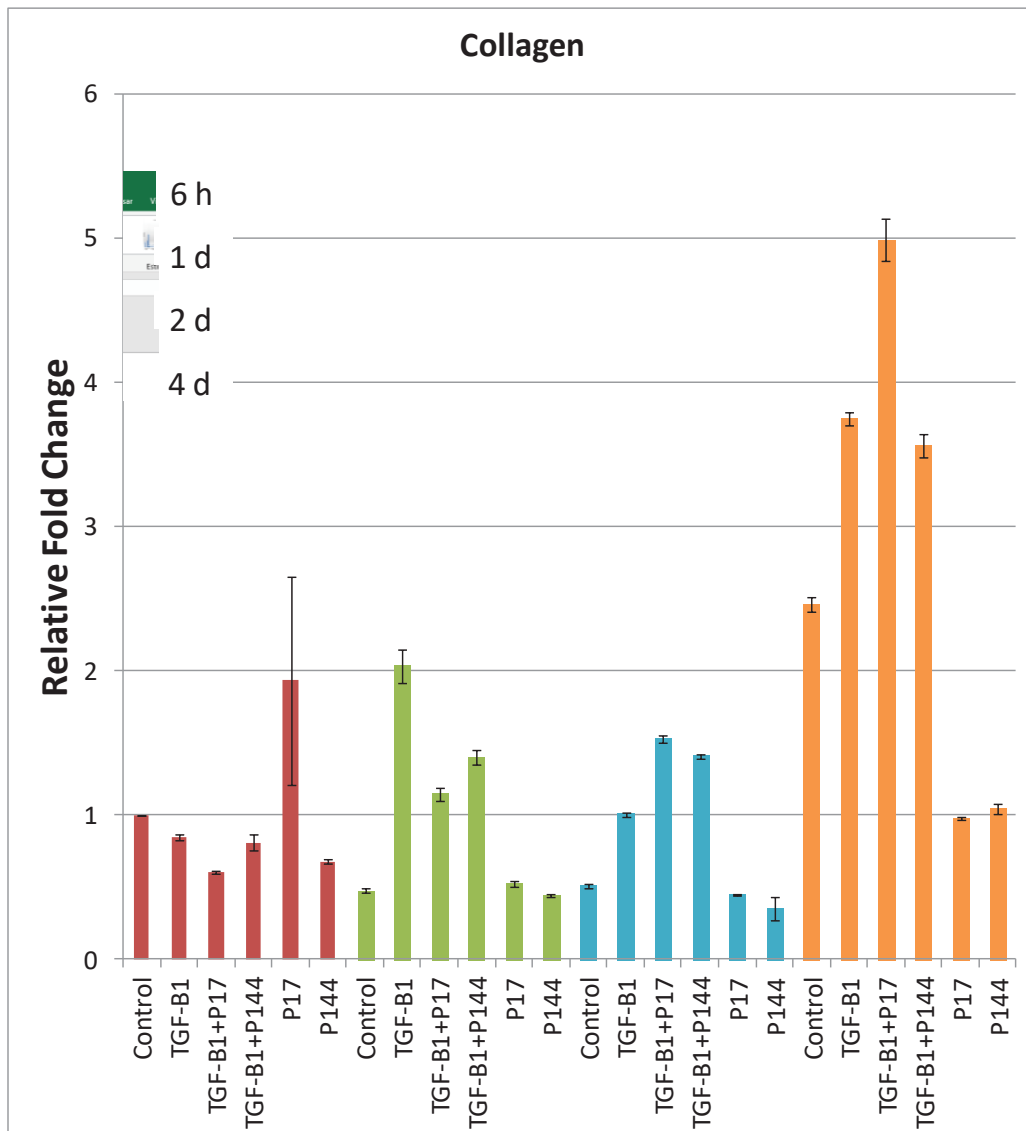


Figura 22. Gráfico de expresión de Colágeno tipo I en células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas a las 6 horas, 24 horas, 2 días y 4 días de cultivo.

Factor de transcripción 2 relacionado con Runt (RUNX2)

La expresión de RUNX2 a las 6 horas es mayor en los grupos TGF- β 1+P17 y TGF- β 1+144 que en el grupo control. El grupo tratado solamente con TGF- β 1 presenta menor expresión que el grupo control. P144 muestra los mismos niveles que las células tratadas con TGF- β 1.

A las 24 horas, el grupo control disminuye notablemente, igual que el grupo TGF-β1. TGF-β1+P17 y TGF-β1+P144 también disminuyen pero siguen expresando más RUNX2 que el grupo control.

A las 48 horas, el grupo control se mantiene y el grupo tratado con TGF-β1 aumenta la expresión de RUNX2. El grupo TGF-β1+P17 aumenta considerablemente la expresión RUNX2.

A los 4 días, el grupo control ve aumentada la expresión de esta proteína, pero siendo inferior a la mayor expresión de RUNX2 por parte de los grupos de estudio (Figura 22).

Por lo tanto, se observa que RUNX2 se expresa más en los grupos experimentales tratados con los péptidos, especialmente a las 6h y 2 días.

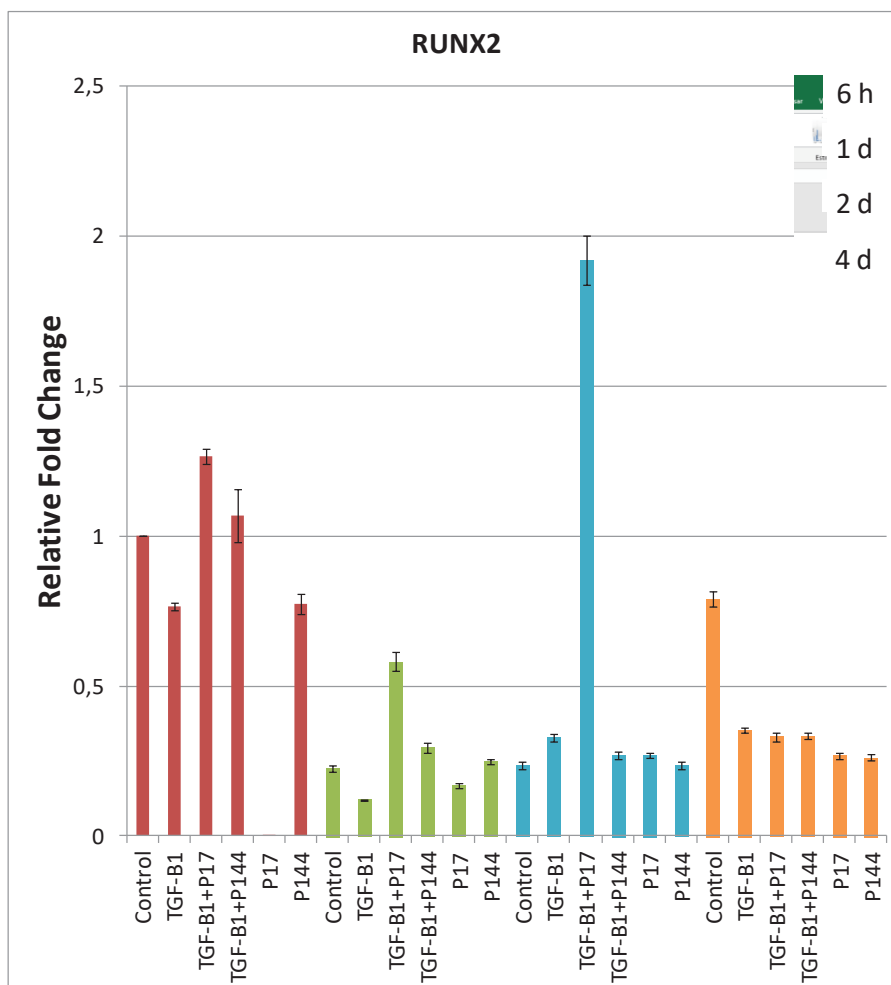


Figura 23: Gráfico de expresión de RUNX2 en células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas a las 6 horas, 24 horas, 2 días y 4 días de cultivo.

BMP2

El ciclo de corte de la qPCR fue demasiado alto debido a una baja expresión de esta proteína. Se atribuye este resultado al hecho de que BMP2 se expresa a tiempos más avanzados de cultivo (Figura 24):

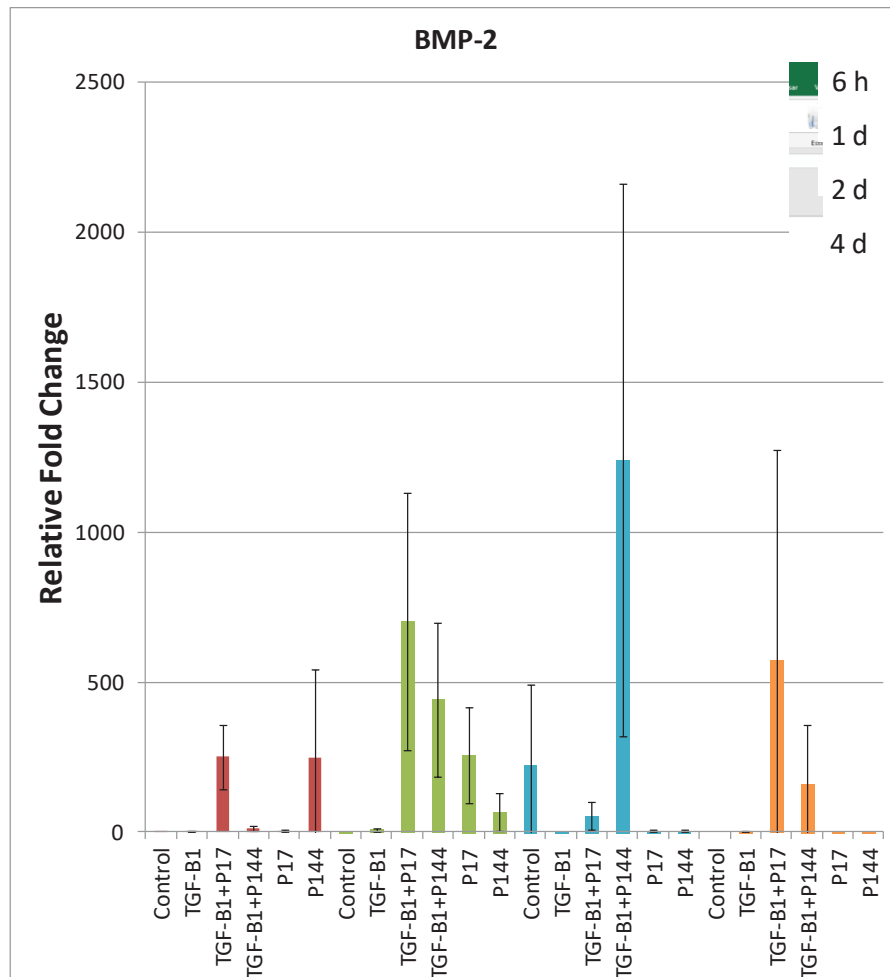


Figura 24: Gráfico de expresión de BMP2 en células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas a las 6 horas, 24 horas, 2 días y 4 días de cultivo.

8.1.3 Actividad de ALP

La actividad de la fosfatasa alcalina en células MC3T3-E1 a los 7 días muestra los valores más altos en el grupo tratado con P144, con diferencias significativas respecto al grupo control. El grupo tratado con P17 también muestra valores más elevados de actividad de ALP respecto al grupo control. El grupo tratado con TGF- β 1 muestra

valores inferiores, así como el grupo tratado con TGF- β 1+P17. El grupo TGF- β 1+P144 muestra valores similares al grupo control.

A las dos semanas de cultivo hay un descenso en la actividad de la ALP, excepto en el grupo tratado con P144, que muestra los valores más elevados, seguido del grupo P17, siendo ambos más elevados que el grupo control. Los grupos tratados con TGF- β 1 muestran menos actividad de ALP que el resto de grupos.

A las tres semanas se observa una disminución general de la actividad de ALP en todas las condiciones, siendo las más altas en los grupos tratados con P17 y P144 (Figura 25).

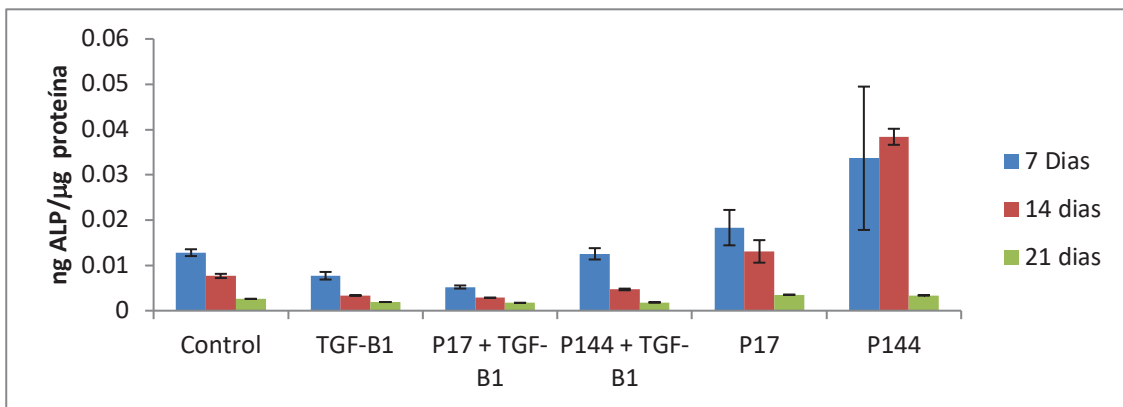


Figura 25: Gráfico de actividad de ALP (fosfatasa alcalina) en células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas a los 7 días, 14 días y 21 días.

8.2 Resultados del estudio 2 *in vitro*

8.2.1 Western Blot

Como ya se evidenció en el estudio 1 *in vitro*, la ruta de señalización de TGF- β implica la fosforilación del receptor SMAD (o R-SMAD). Concretamente, la ruta de señalización de TGF- β 1 está mediada por la SMAD2 y la SMAD3. La capacidad inhibitoria de las superficies de CP-Ti biofuncionalizadas se evaluó por medio de la cuantificación de los niveles relativos de SMAD2 fosforilada (p-SMAD2) en las células MC3T3-E1 a través del Western Blot (Figura 26).

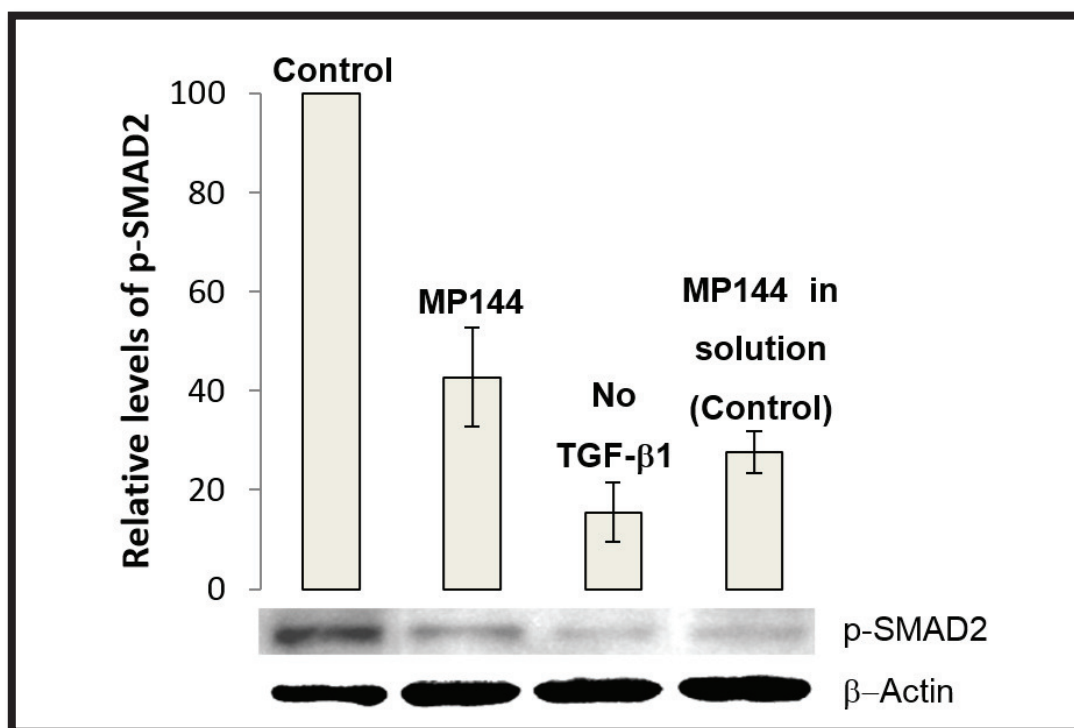


Figura 26: Western Blot de p-SMAD2 producida por las células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas. Se administró TGF- β 1 a las células en una concentración de 0.7 ng/ml. En la última columna, el péptido MP144 se administró a las células en solución a una concentración de 200 μ g/ml. El grupo sin administración de TGF- β 1 exógeno (No TGF- β 1) se utilizó como control negativo.

Las superficies de CP-Ti biofuncionalizadas con MP144 inhibieron aproximadamente el 57% de la producción de p-SMAD2 comparado con los controles positivos (superficie de CP-Ti no biofuncionalizada), indicando los efectos significativos de la superficie

tratada con el péptido como inhibidor de la actividad de TGF- β 1. Además, la administración exógena de 200 μ g/ml de péptido tuvo un efecto inhibidor potente. Cuando no se administra TGF- β 1 exógeno a las células, la señal de la p-SMAD muestra niveles normales en las células MC3T3-E1.

En referencia a la adhesión y proliferación celular de las células MC3T3-E1 cultivadas en las superficies biofuncionalizadas, no hubo diferencias significativas en cuanto al número de células adheridas, morfología celular o proliferación celular respecto a las otras superficies del experimento.

8.2.2 qPCR

Los resultados de qPCR de los genes evaluados son los siguientes:

8.2.2.1 Efectos de las superficies biofuncionalizadas en los osteoblastos

La Figura 27 muestra los resultados de la expresión genética mostrados por las células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas cultivadas en las superficies CP-Ti biofuncionalizadas: colágeno tipo I (col1alpha1), factor de transcripción relacionado con runt 2 (RUNX2), fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC).

Colágeno tipo I (colalpha1)

El pico de la expresión de colágeno en las superficies control se observa a los 14 días de cultivo, mientras que en las superficies con MP144 el pico más alto de colágeno se observa a los 7 días de cultivo. Estos resultados sugieren que las superficies de CP-Ti biofuncionalizadas con el péptido aceleran e incrementan notablemente la expresión de colágeno, que podría permitir una diferenciación osteoblástica prematura.

RUNX2

El pico de expresión de RUNX2 se obtiene invariablemente en todas las superficies testadas a los 14 días, siendo el grupo de CP-Ti funcionalizado con MP144 el que presenta los niveles más elevados de RUNX2. Las diferencias fueron estadísticamente significativas entre las superficies biofuncionalizadas y los dos grupos control.

Fosfatasa alcalina (ALP)

La expresión de ALP se observa incrementada a lo largo de los días del estudio, mostrando los valores más elevados a los 21 días de cultivo. Normalmente, el pico de ALP *in vitro* se observa entre los días 10 y 14. El modelo de células MC3T3-E1 utilizado para este estudio normalmente tiene una expresión tardía de ALP. Las superficies de MP144 mostraron los valores más elevados de expresión de ALP. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre los grupos.

Osteocalcina

El pico de expresión de OC se observa a las tres semanas de cultivo en todas las superficies del experimento. La expresión más elevada de OC se observó en las superficies biofuncionalizadas con MP144.

Estos resultados sugieren que las células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas incrementan la expresión de marcadores osteoblásticos cuando se cultivan en superficies biofuncionalizadas con péptidos inhibidores de TGF- β 1.

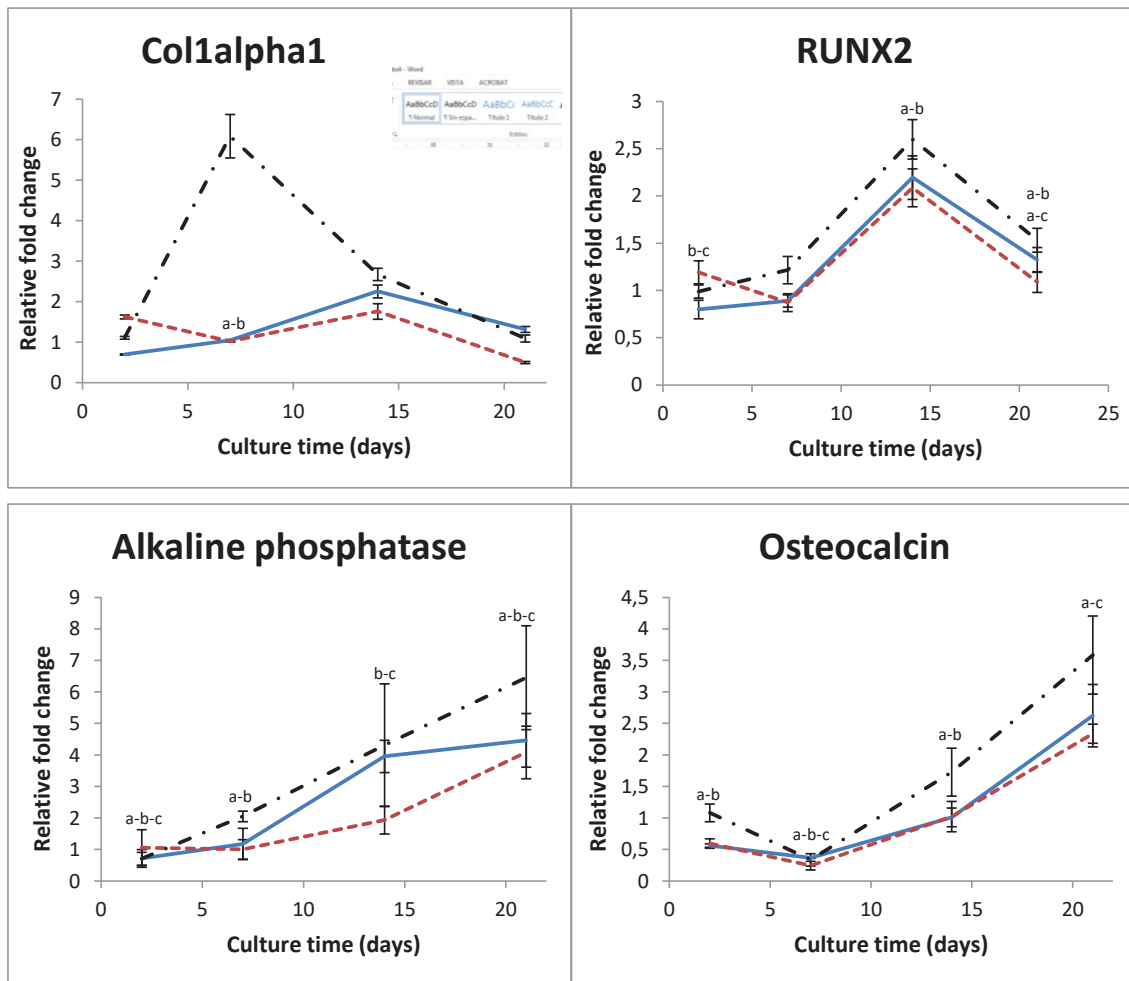


Figura 27: Expresión genética de Col1alpha1, RUNX2, ALP y OC de células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas en superficies de titanio (azul: Titanio; rojo: Ti+APTES+ácido malónico; verde: Ti+APTES+ácido malónico+MP144) cuantificadas mediante qPCR después de 2, 7, 14 y 21 días de cultivo. Las proporciones de los genes diana en relación con el gen constitutivo β -actina se expresaron en relación con el poliestireno de cultivo tisular después de 2 días de cultivo celular. Los grupos marcados con el mismo símbolo (a, b and c) indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre (a: Ti, b: Ti+APTES+ácido malónico y c: Ti+APTES+ácido malónico+MP144). Las comparaciones son entre grupos para el mismo tiempo de cultivo.

8.2.2.2 Efectos de las superficies biofuncionalizadas en células mesenquimales.

La actividad de fosfatasa alcalina (ALP) en los cultivos de células mesenquimales humanas se muestra en la Figura 28. A los 14 días de cultivo, las superficies de CP-Ti biofuncionalizadas con MP144 muestran mayor actividad de ALP que las superficies

control. La producción de osteocalcina (OC) en el mismo tipo de población celular y días de cultivo se presenta en la Figura 29. La producción de OC incrementa continuamente a lo largo de los días de cultivo. Las superficies biofuncionalizadas de CP-Ti con MP144 muestran mayor producción de OC a los 14 y 21 días comparado con las superficies CP-Ti control, aunque no con diferencias significativas después de los 21 días de cultivo.

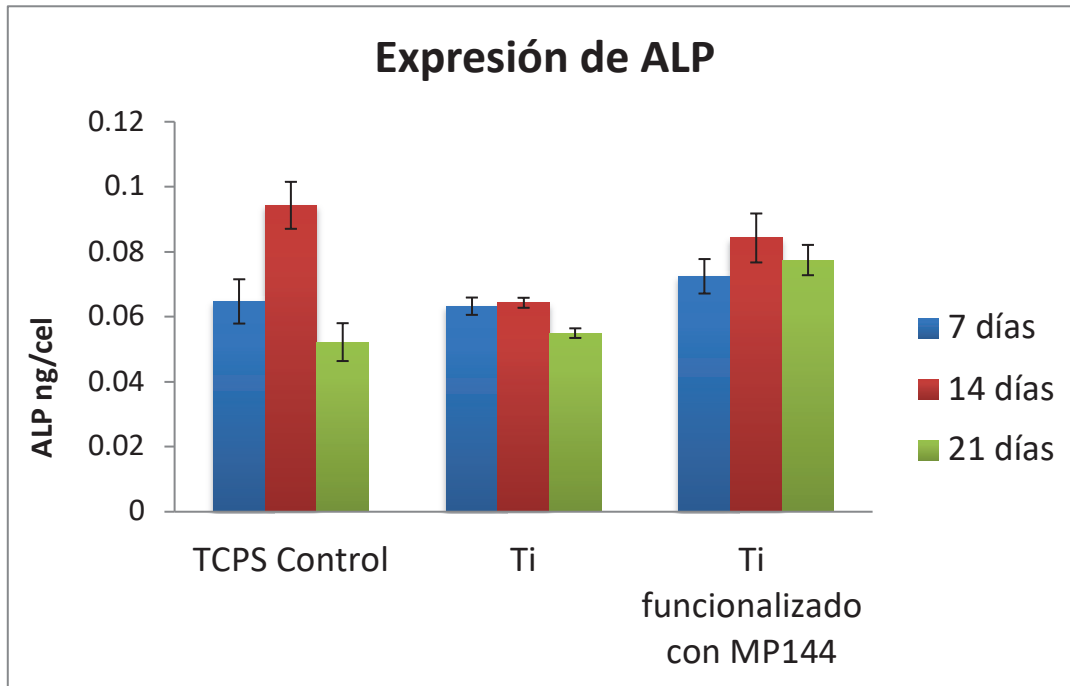


Figura 28: Actividad de fosfatasa alcalina en células humanas mesenquimales cultivadas en superficies de Ti con diferentes tratamientos después de 7, 14 y 21 días de cultivo. *: indica diferencias significativas con respecto al Ti en el mismo tiempo de cultivo.

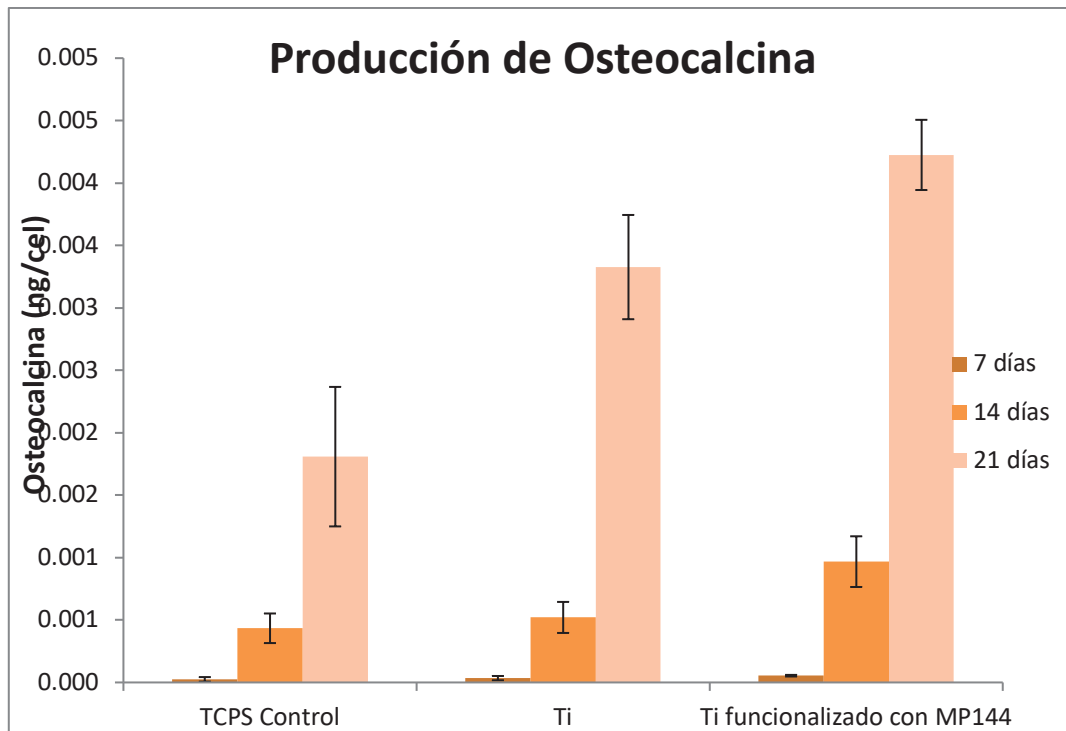


Figura 29: Producción de osteocalcina en células humanas mesenquimales cultivadas en superficies de Ti con diferentes tratamientos después de 7, 14 y 21 días de cultivo. *: indica diferencias significativas respect al Ti en el mismo tiempo de cultivo.

Estos resultados se correlacionan con los encontrados en la expresión de las células MC3T3-E1, confirmando la efectividad de las superficies biofuncionalizadas en la estimulación de la diferenciación osteoblástica.

8.2.2.3 Efectos de las superficies biofuncionalizadas en los fibroblastos.

La Figura 30 muestra los resultados de la expresión genética mostrados por las células NIH/3T3 fibroblásticas cultivadas en las superficies CP-Ti biofuncionalizadas: fibronectina (FN), colágeno tipo I alfa 1 (Col1a1), actina de músculo liso alfa (alfa-SMA), y metaloproteasas de matriz tipo 2, 3 y 9 (MMP2, MMP3 y MMP9, respectivamente).

Fibronectina

La expresión de fibronectina por parte de los fibroblastos muestra una evolución similar en los grupos control, mostrando la expresión más baja a los 3 días de cultivo. Sin embargo, en las superficies con MP144 se observa una disminución continua, expresando los valores más bajos de todos los grupos a los 7 días de cultivo.

Colágeno tipo I alfa I (Col1a1)

Las superficies CP-Ti biofuncionalizadas con MP144 muestran una disminución continua de la expresión de colágeno a lo largo del tiempo, de modo contrario a las superficies control. Se observa una disminución marcada de la expresión de colágeno en las superficies de MP144 a los 7 días de cultivo en comparación con los grupos control. Estos resultados demuestran el efecto inhibitorio de las superficies MP144 en la expresión de colágeno.

Actina de músculo liso alfa (α -SMA)

Los efectos de las superficies de CP-Ti con MP144 en la expresión de α -SMA por parte de los fibroblastos fueron muy diferentes a los de la expresión de colágeno. La expresión de α -SMA en las superficies biofuncionalizadas con el péptido se ve incrementada a tiempos cortos de cultivo pero bruscamente disminuida a los 7 días de cultivo, con valores significativamente menores respecto a las superficies control.

Metaloproteasas de matriz tipo 2, 3 y 9 (MMP2, MMP3 y MMP9)

Las superficies de Ti con MP144 no mostraron efectos significativos en la expresión de MMPs comparado con los grupos control, excepto por una marcada expresión de MMP2 a los 3 días de cultivo. Estos resultados sugieren que las superficies biofuncionalizadas no inducen la respuesta de matriz diferenciada mediada por los fibroblastos.

En conjunto, estos resultados sugieren que las superficies biofuncionalizadas con MP144 tienen una inhibición continua de la actividad fibroblástica que resulta en efectos significativos en comparación con las superficies control a los 7 días de cultivo.

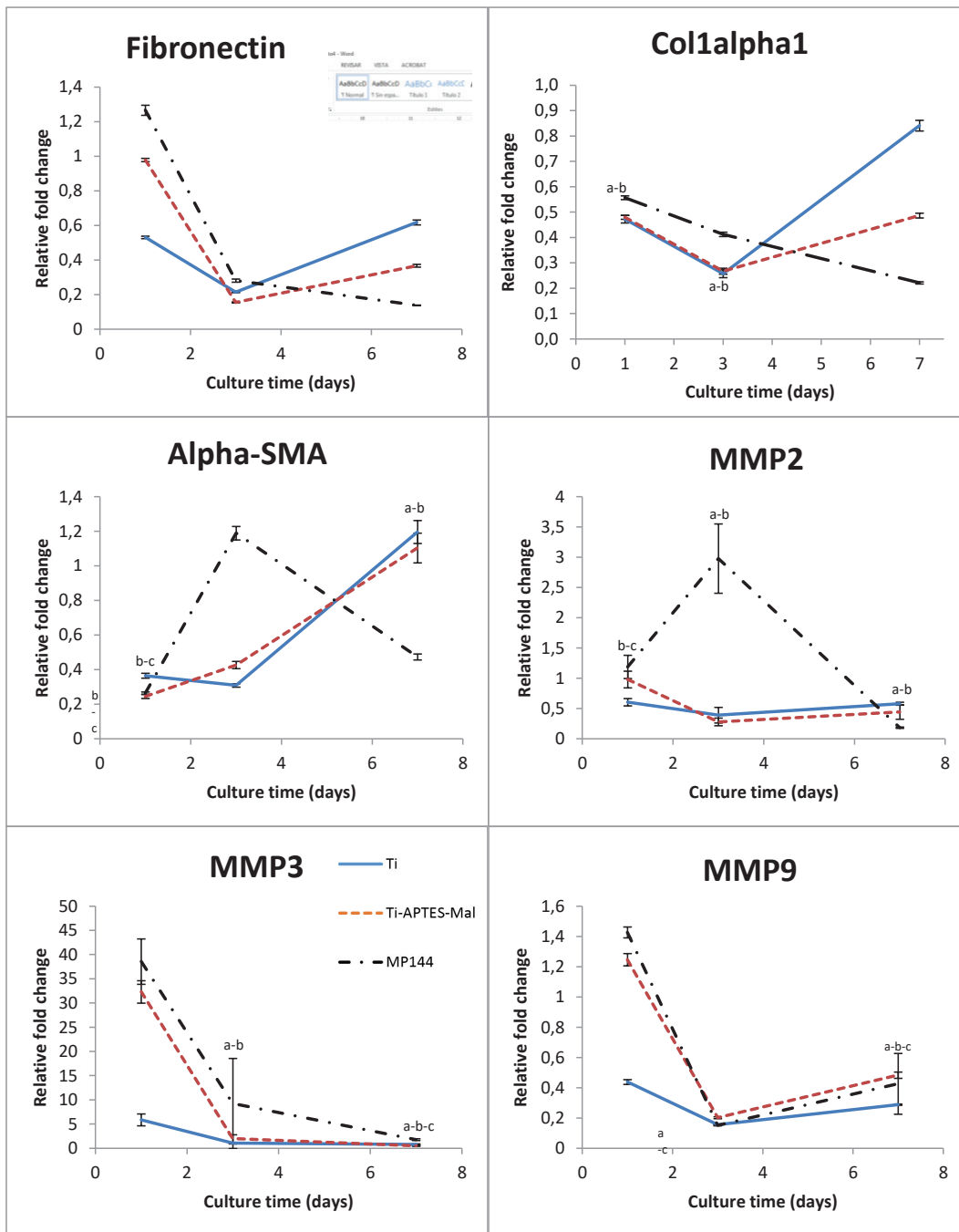


Figura 30: Expresión genética de fibronectina, Col1alpha1, Alpha-SMA, MMP2, MMP3 y MMP9 de células 3T3/NIH fibroblásticas en superficies de Ti con diferentes tratamientos (Azul: Ti; rojo: Ti+APTES+ácido malónico; negro: Ti+APTES+ácido malónico+MP144) cuantificada por qPCR después de 1, 7, 14, y 21 días de cultivo celular. Las proporciones de los genes diana en relación con el gen constitutivo β -actina se expresaron en relación con el poliestireno de cultivo tisular después de 2 días de cultivo celular. Los grupos marcados con el mismo símbolo (a,b and c) indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre (a: Ti, b: Ti+APTES+ácido malónico y c: Ti+APTES+ácido malónico+MP144) . Las comparaciones son entre grupos para el mismo tiempo de cultivo.

8.3 Resultados del estudio in vivo

8.3.1 Resultados del estudio de implantes (*estudio 3*)

Se realizó un seguimiento diario de las heridas y la mucosa periimplantaria se encontró clínicamente sana en todos los animales. Sin embargo, tres implantes del mismo animal se perdieron debido a hábitos parafuncionales y una muestra de un implante en resina tuvo que ser excluida del análisis histomorfométrico debido a la pérdida del implante durante la manipulación en la sierra. Finalmente, se incluyeron todos los animales (n=6) y un total de 32 implantes fueron analizados.

8.3.1.1 Resultados cuantitativos

La tabla 3A muestra los resultados de BIC (%) alrededor de los implantes. El grupo de implantes biofuncionalizado con P144 muestra los valores más elevados de BIC a las 2 semanas, mientras que a las 4 semanas el BIC parece disminuir y se mantiene estable hasta las 8 semanas. El incremento es remarcable en el grupo biofuncionalizado con P17, ya que dobla los valores de BIC con respecto al grupo control a las 4 semanas después de la inserción de los implantes, y parece mantener estos valores hasta la octava semana. Los valores del grupo de P17 a las 8 semanas muestran diferencias significativas con respecto al grupo control (*) y al grupo de P17 (+) a las 2 semanas.

La tabla 3B muestra el porcentaje de formación ósea en un área alrededor del implante. Dos semanas después de la colocación, los implantes biofuncionalizados con P17 y P144 muestran mayor formación ósea respecto a los del grupo control. Este aumento es incluso mayor a las 4 (*) y 8 (**) semanas en los implantes con el péptido P17, siendo el grupo con mayor formación ósea, con diferencias solamente significativas respecto al grupo control a las 2 semanas de la implantación (p valor<0,05).

Cuatro semanas después de la colocación, se observa casi la misma formación ósea en los implantes del grupo P144 y los del grupo control, y es ligeramente superior a las ocho semanas para el grupo de P144, aunque no se hayan encontrado diferencias significativas en estos valores.

Los resultados del área de los tejidos óseos presentes entre las espiras del implante, (IB) se muestran en la tabla 3C. A las dos semanas, ambos grupos experimentales muestran un porcentaje mayor de IB, siendo el grupo de P17 el doble respecto al grupo control y siendo el grupo de P144 significativamente el triple (*). Cuatro y ocho semanas después de la colocación de los implantes, el grupo control también presenta valores aumentados de formación ósea entre las espiras. Sin embargo, el valor más alto de IB, tanto a las 4 como a las 8 semanas, se observa en el grupo biofuncionalizado con P17; la diferencia de este aumento entre las 2 y las 8 semanas es estadísticamente significativa (+). Los implantes tratados con P144 muestran un aparente descenso de la osteointegración entre las 2 y 4 semanas seguida de un incremento no significativo a las 8 semanas.

Por tanto, se observan diferencias significativas al final del experimento en el grupo de P17 con respecto al grupo control a las 2 semanas (#). De forma similar, se han encontrado diferencias significativas entre los valores del grupo de P144 a las 8 semanas y el grupo control a las 2 semanas.

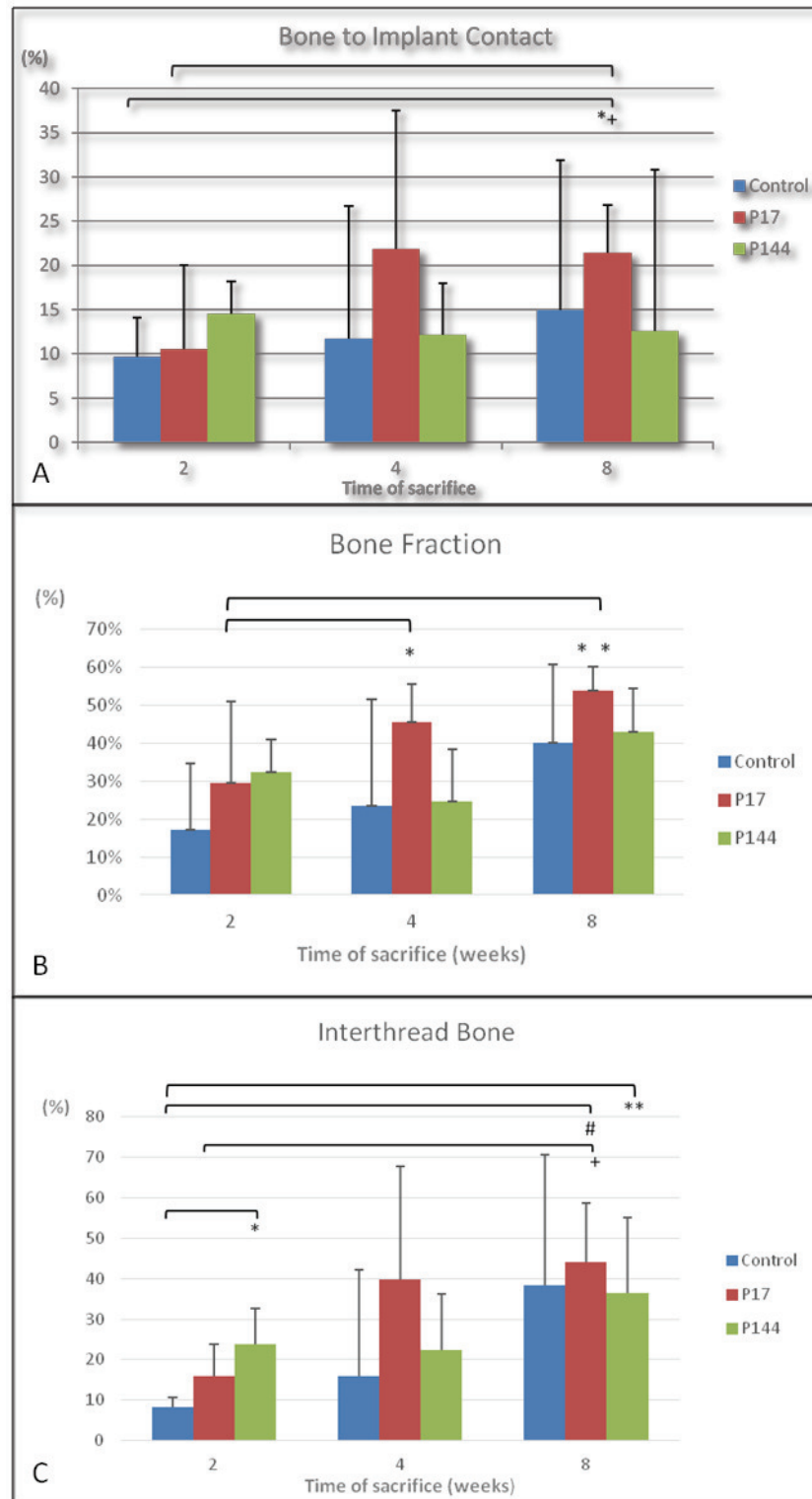


Tabla 3: Resultados cuantitativos de los parámetros histomorfométricos analizados. A: Resultados de porcentaje de contacto entre hueso e implante (BIC) a las 2, 4 y 8 semanas después de la colocación; B: Resultados de porcentaje del área de hueso periimplantario (BF) a las 2, 4 y 8 semanas; C: Resultados de porcentaje de hueso entre espiras (IB) a las 2, 4 y 8 semanas.

8.3.1.2 Análisis de microscopía electrónica de barrido (BS-SEM)

TIEMPO 1. Dos semanas post colocación de implantes.

Dos semanas después de la colocación de implantes, los tejidos calcificados que rodean los implantes que se observan en el BS-SEM (Figura 31) son coherentes con el análisis numérico presentado en la tabla 3. El grupo control de implantes está rodeado a cierta distancia por trabéculas calcificadas, delgadas y escasas, lo que explica las ligeras diferencias encontradas en las mediciones de BIC de los tres grupos. El número de trabéculas en contacto con la superficie del implante así como la cantidad de tejido calcificado conectado a la cortical ósea preexistente con el implante son mayores en ambos grupos biofuncionalizados, explicando así respectivamente los resultados biomorfométricos de BF e IB. La ligera diferencia del BIC en el grupo biofuncionalizado con P144 parece ser justificada por el mayor número de puntos de contacto entre el implante y el hueso visible (Figura 31C).

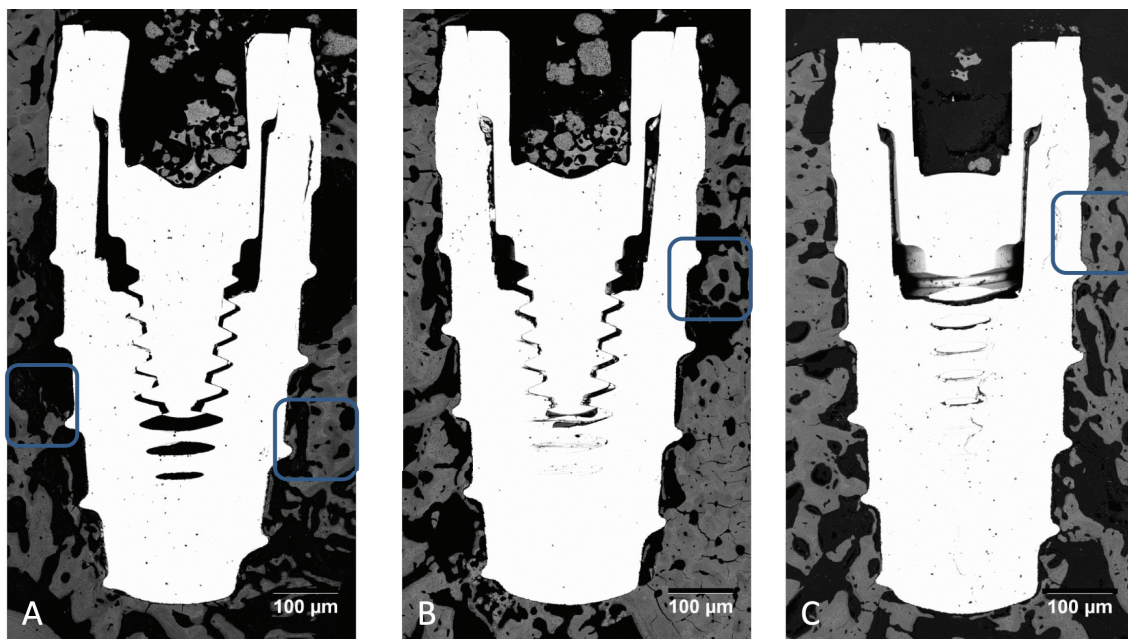


Figura 31: Imágenes sumativas (*stitching*) representativas de BS-SEM de los implantes 2 semanas después de la colocación. A) Grupo control (áreas enmarcadas en azul representadas en la Figura 32); B) Grupo biofuncionalizado con P17 (área enmarcada en azul representadas en la Figura 33A); C) Grupo biofuncionalizado con P144 (área enmarcada en azul representadas en la Figura 33B).

Dos semanas después de la implantación, el grupo control (Figura 32) muestra evidencias de alta actividad osteoclástica, revelada por numerosas lagunas de Howship en la superficie de hueso delante de la superficie del implante (flechas). También se encuentran lagunas de Howship erosionando la superficie interior de los canales vasculares, tanto en los presentes en las osteonas óseas remodeladas (#) de la cortical ósea preexistente osteonal (*) como de las situadas en paralelo a la superficie del implante.

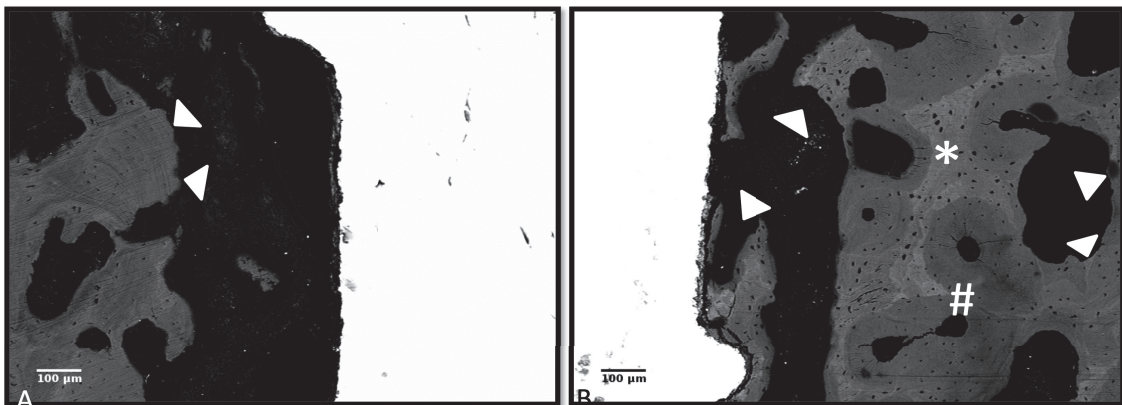


Figura 32: (Magnificación 250x) Imágenes representativas de BS-SEM. Áreas enmarcadas en la figura 31A. A: actividad osteoclástica (flechas blancas); B: actividad osteoclástica (flechas blancas), hueso preexistente (*), osteonas remodeladas (#) de hueso nuevo.

Alrededor de los implantes biofuncionalizados con el péptido P17, se observan trabéculas de tejido óseo en una fase muy inicial conectando con el área de la superficie ósea que se está remodelando con la superficie del implante (flecha blanca en Figura 33A). La Figura 33B, correspondiente a una muestra de implante biofuncionalizado con P144, muestra que la cortical preexistente de hueso en contacto con la superficie activa del implante está siendo activamente remodelada: actividad osteoclástica evidenciada por la presencia de lagunas de Howship en el interior de los canales de Havers simultáneamente con la evidencia de aposición nueva de hueso lamelar.

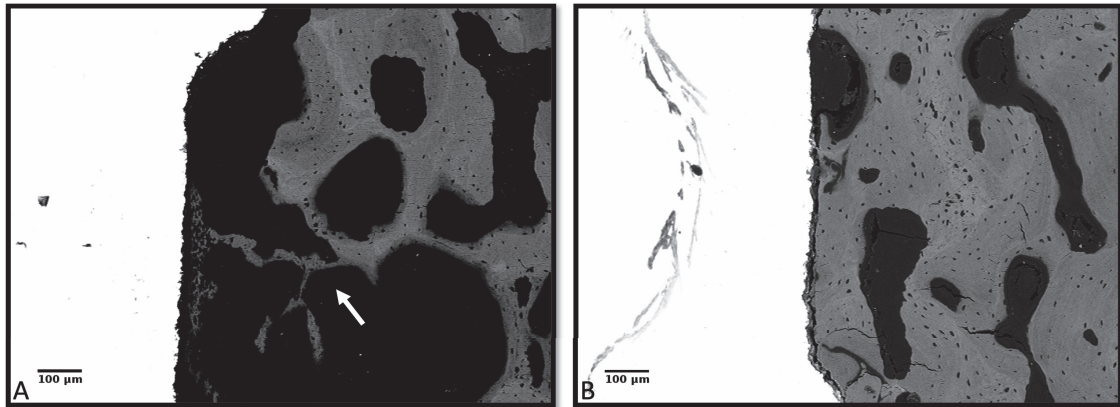


Figura 33: (Magnificación 250x) Imágenes representativas de BS-SEM. Áreas enmarcadas en la figura 31B y C. A: implante biofuncionalizado con P17, inicio de remodelación ósea (flecha blanca); B: detalle de implante biofuncionalizado con P144.

TIEMPO 2. Cuatro semanas post colocación de implantes.

Cuatro semanas después de la implantación, la reacción perióstica y la actividad osteoclástica son evidentes en todos los grupos (Figura 34, A, B y C), aunque en diferentes grados. La formación de hueso nuevo se observa en los tejidos calcificados que rodean la superficie de los implantes, donde los canales vasculares tienen una disposición paralela a la superficie implantaria. El área de cortical preexistente muestra evidencia de un proceso de remodelación intenso, con canales vasculares alargados y nueva aposición concéntrica de hueso laminar dentro.

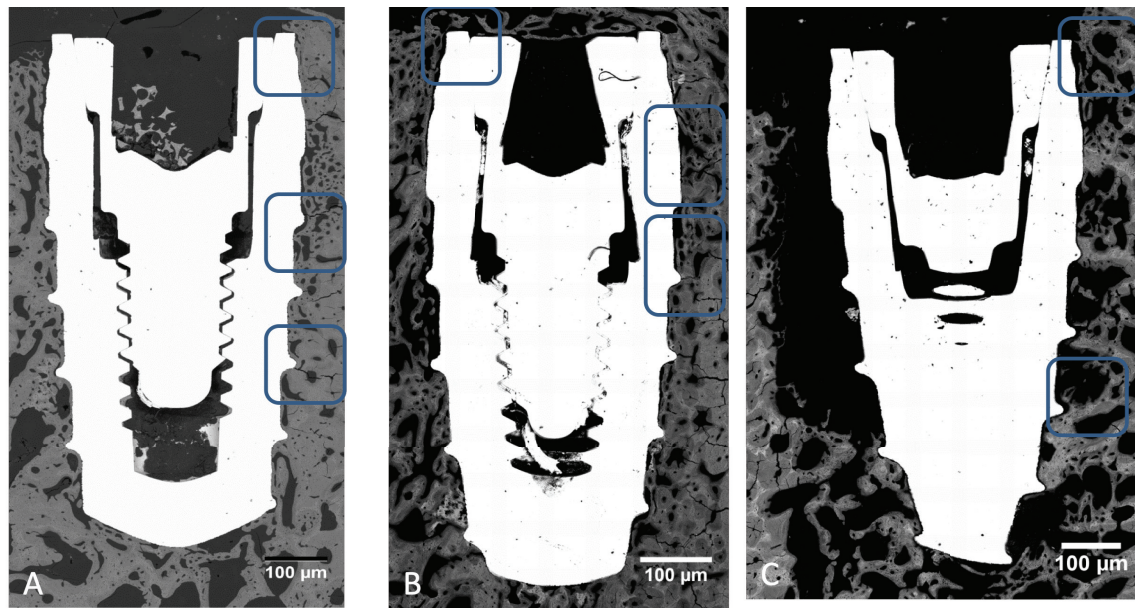


Figura 34: Imágenes sumativas (*stitching*) representativas de BS-SEM de los implantes 4 semanas después de la colocación. A) Grupo control (áreas enmarcadas en azul representadas en la Figura 35); B) Grupo biofuncionalizado con P17 (áreas enmarcadas en azul representadas en la Figuras 36, 37 y 38); C) Grupo biofuncionalizado con P144 (áreas enmarcadas en azul representadas en la Figura 39).

La reacción perióstica sobre los implantes control se muestra en la Figura 35A. La cortical preexistente es más clara, y separada por una línea cementante (flechas blancas) de los tejidos calcificados nuevos, menos maduros. Los canales vasculares dentro de los tejidos recién formados son más alargados que los que se encuentran en la cortical preexistente, a pesar de estar bordeada por el hueso lamelar recién depositado. La Figura 35C muestra un área de nuevo hueso donde un vaso conecta los tejidos de la cortical ósea preexistente con los nuevos tejidos formados, menos maduros formados adyacentes al implante (flechas blancas). La estabilidad secundaria u osteointegración, se ha establecido con el contacto directo entre el implante y el hueso neoformado, con canales vasculares largos y una remodelación activa visible por el hueso lamelar alineándolos.

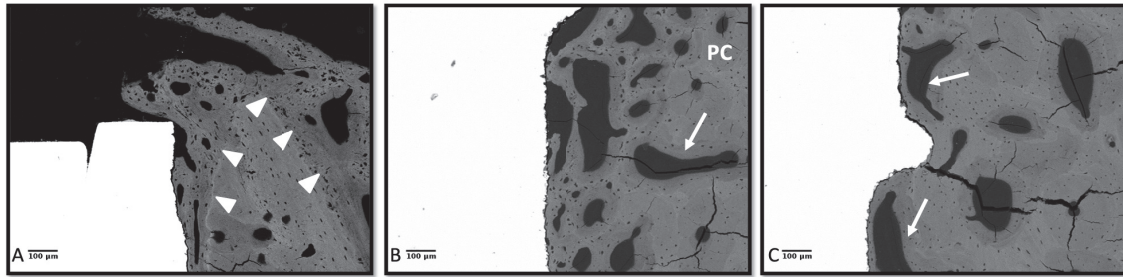


Figura 35: (Magnificación 250x) Imágenes representativas de BS-SEM, provenientes de lo enmarcado en la figura 34A (implante control). A: reacción perióstica, sobre el cuello del implante, línea cementante (flechas blancas); B: área de hueso nuevo; canal vascular (flecha blanca); cortical preexistente (PC). C: remodelado cortical (flechas blancas).

En contraste, a las cuatro semanas, los implantes biofuncionalizados con el péptido P17 presentan un grado más avanzado de formación ósea. La Figura 36 muestra numerosos espacios vasculares que se originan en la cortical ósea avanzando hacia los tejidos óseos nuevos, conectando la cortical con la reacción perióstica y también alrededor del implante. Tanto los tejidos nuevos que rodean la superficie del implante (izquierda) como la reacción perióstica (derecha) muestran abundantes canales vasculares. La reacción perióstica (Fig 36A) está constituida por trabéculas de tejido óseo, con lagunas de células grandes característicamente irregulares, confluentes bordeadas por aposición de hueso lamelar. La cortical preexistente (Figuras 37 y 38), constituida por hueso harvesiano osteonal regular, es más clara, muestra canales osteonales más pequeños que aquellos de la reacción perióstica (izquierda) y la reacción perióstica (derecha) aparece fracturada, un artefacto frecuente debido al vacío del BS-SEM.

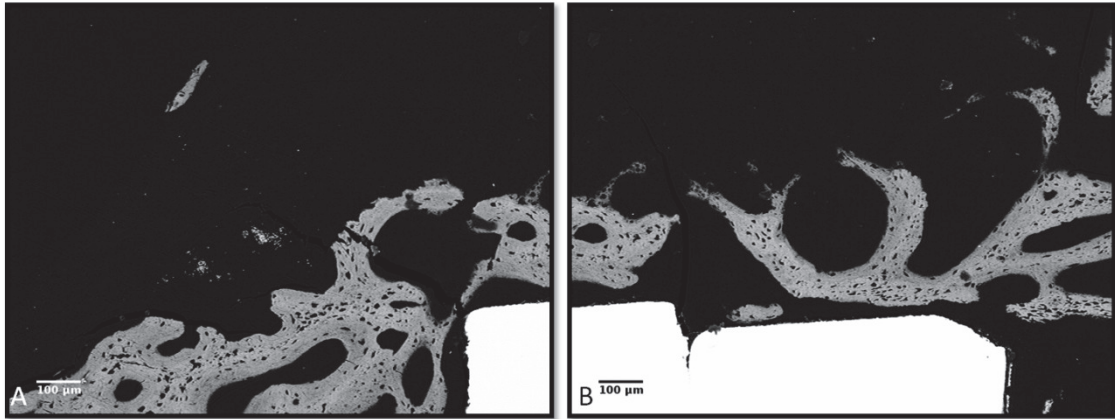


Figura 36: (Magnificación 250x) A y B: Imágenes representativas de BS-SEM (implante biofuncionalizado con péptido p17). Áreas enmarcadas en la figura 34B. Reacción perióstica.

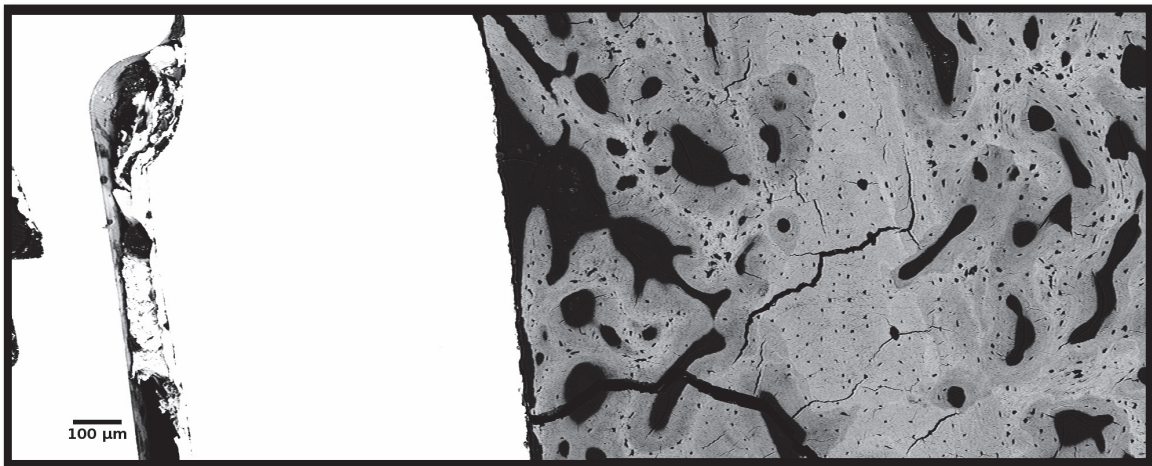


Figura 37: (Magnificación 250x) Imágenes representativas de BS-SEM. Implante biofuncionalizado con péptido P17. Área enmarcada en la figura 34B.

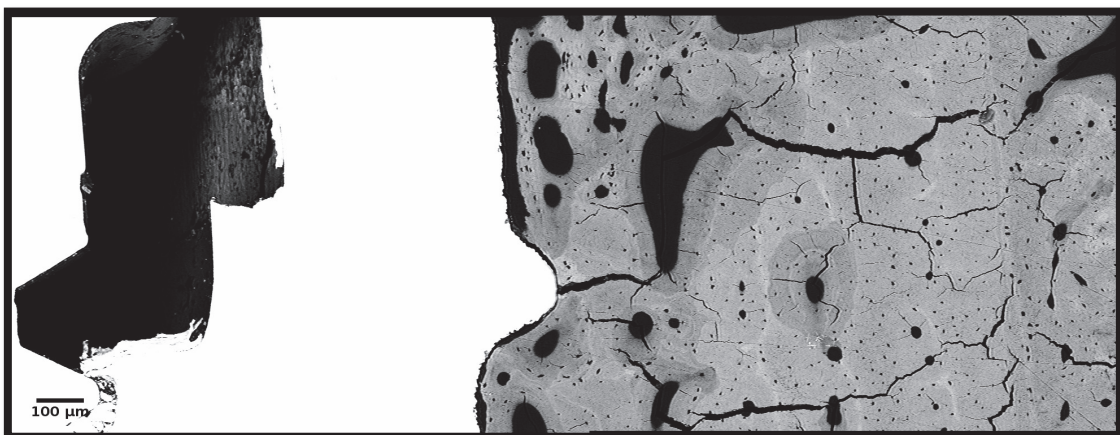


Figura 38: (Magnificación 250x) Imágenes representativas de BS-SEM. Implante biofuncionalizado con péptido P17. Área enmarcada en la figura 34B.

La muestra seleccionada del grupo de implantes biofuncionalizados con el péptido P144 a las cuatro semanas de la colocación muestra una reacción perióstica altamente activa con espacios vasculares largos que rodean el cuello del implante. El tejido calcificado más abundante aquí es el osteoide, evidente por sus numerosos, irregulares y confluentes lagunas celulares y canales que contienen fibras embebidas en una matriz extracelular altamente calcificada. El hueso laminar, con lagunas de células alargadas orientadas regularmente dentro de una matriz extracelular escasa y menos calcificada, rodea los canales vasculares. Éstos conectan la cortical con los tejidos nuevos formados tanto alrededor de la reacción perióstica (Fig 39A) como del implante (Fig 39B).

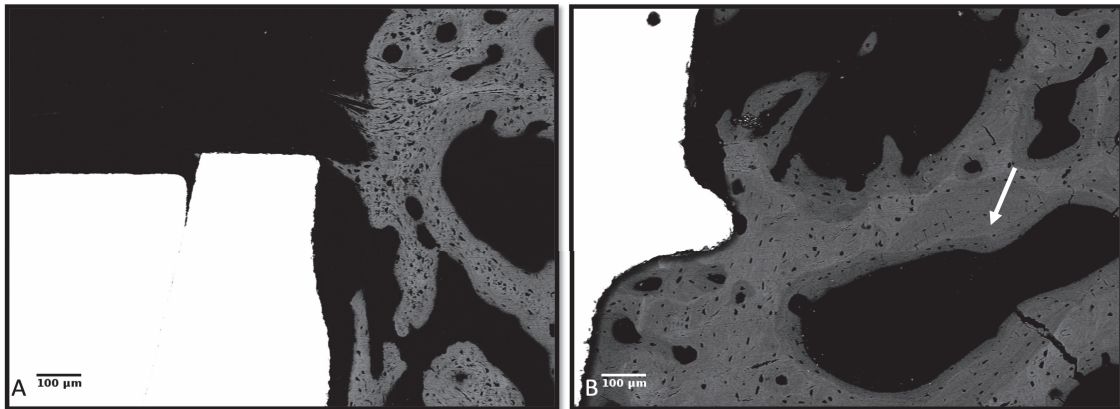


Figura 39: (Magnificación 250x) Imágenes representativas de BS-SEM. (implante biofuncionalizado con péptido p144) Áreas enmarcadas en la figura 34C. A: reacción perióstica; B: tejidos calcificados alrededor del implante. Hueso laminar alrededor de un canal vascular (flecha blanca).

TIEMPO 3. Ocho semanas post colocación de implantes.

Ocho semanas después de la implantación se observa un incremento generalizado de la oseointegración en todos los grupos de estudio, como se muestra en los resultados cuantitativos del BIC. El análisis de microscopía electrónica de barrido revela una arquitectura ósea más compacta alrededor de la superficie de titanio. Los canales vasculares aparecen más delgados. Alrededor de los implantes biofuncionalizados con P17, la cantidad de tejido calcificado es mayor, confirmando de nuevo los datos del BIC.

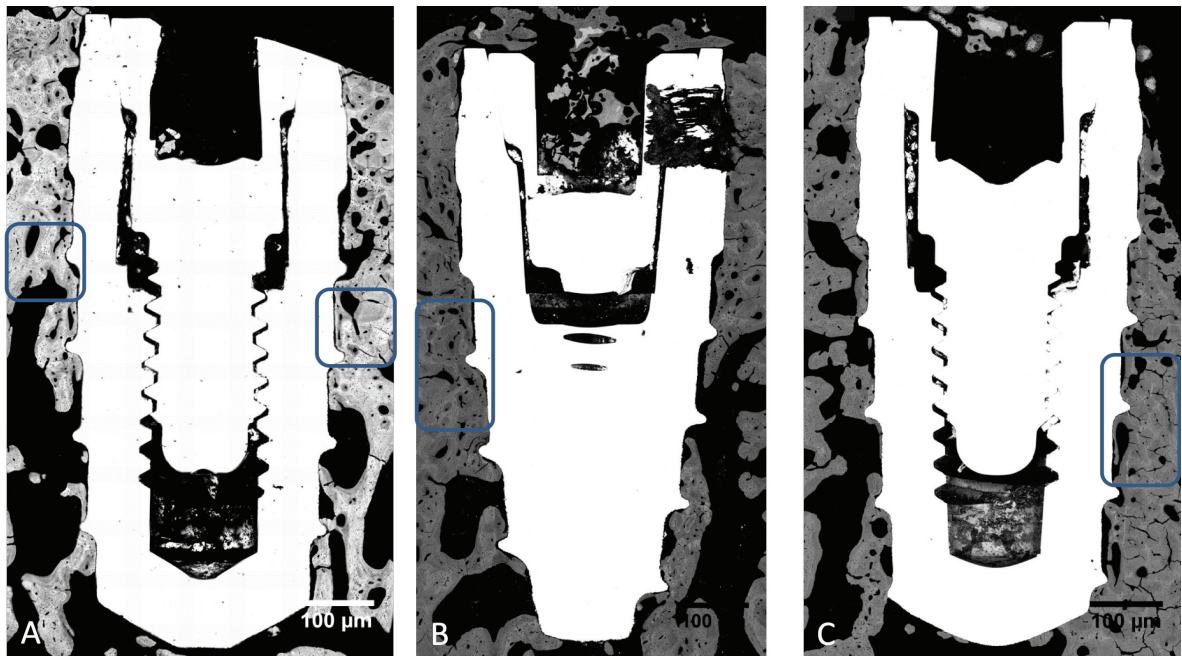


Figura 40: Imágenes sumativas (*stitching*) representativas de BS-SEM de los implantes 8 semanas después de la colocación. A) Grupo control (áreas enmarcadas en azul representadas en la Figura 41); B) Grupo biofuncionalizado con P17 (área enmarcada en azul representada en la Figura 42); C) Grupo biofuncionalizado con P144 (área enmarcada en azul representada en la Figura 44).

El grupo control muestra una estructura ósea compacta alrededor de la superficie de titanio. Los canales vasculares, aún paralelos a la superficie del implante, muestran hueso laminar denso, sustituyendo las trabéculas de tejido óseo antiguo (Figuras 41A y B).

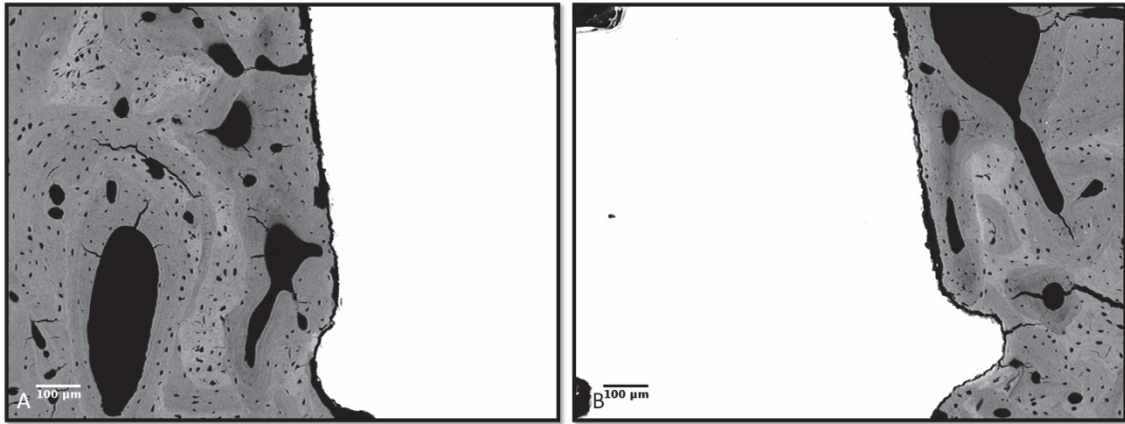


Figura 41: (Magnificación 250x) Imágenes representativas A y B de BS-SEM (Implante control). Áreas enmarcadas en la figura 40A.

En los implantes biofuncionalizados con el péptido P17 (Figura 42) los canales vasculares están alineados por mayor hueso laminar. El hueso laminar rodea áreas de tejido óseo antiguo escaso y aislado, lo que demuestra que el proceso de remodelación de la cortical preexistente ha progresado, y que la osteointegración está constituida por tejido óseo más maduro.

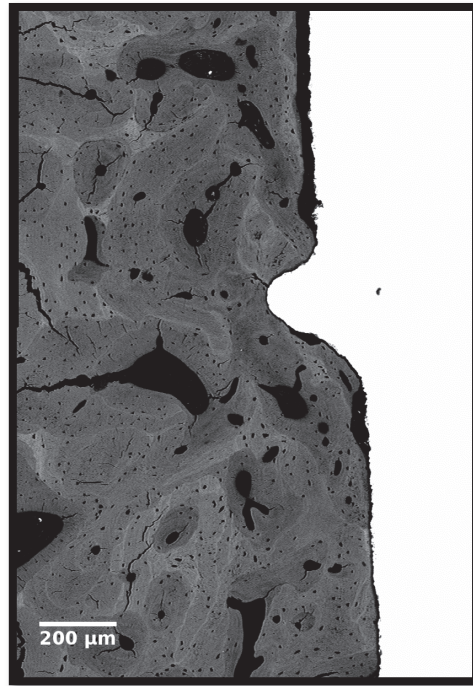


Figura 42: (Magnificación 250x) Imágenes representativas de BS-SEM (Implante biofuncionalizado con péptido P17). Área enmarcada en la figura 40B.

Alrededor de los implantes biofuncionalizados con P17 se observan sucesivas capas de hueso conectando con los canales vasculares. En la siguiente muestra, alrededor de la superficie del implante, estas capas aparecen como líneas haversianas concéntricas alrededor de un canal vascular que sigue la orientación de la cortical original (Figura 43A) , o como una línea de aposición de hueso laminar paralela a la superficie del implante (Figura 43B). Simultáneamente, la remodelación del hueso de la cortical preexistente es evidente por la actividad osteoclástica visible en algunos canales vasculares mientras hay un incremento en la aposición ósea de tipo laminar haversiana en otros canales vasculares cercanos (Figura 43C).

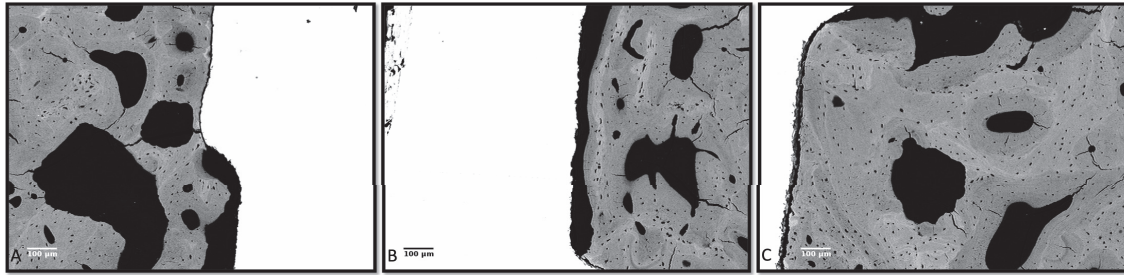


Figura 43. (Magnificación 250x) A, B, C.: Imágenes representativas de BS-SEM de una muestra de implante biofuncionalizado con P17.

En los implantes biofuncionalizados con el péptido P144 a las ocho semanas después de la implantación, se visualiza una línea cementante clara, casi continua, que separa la cortical preexistente (derecha) del hueso recién formado frente a la superficie del implante (Figura 44). La deposición de hueso laminar es evidente alineando los espacios vasculares peri-implantarios. En la cortical preexistente, las numerosas osteonas remodeladas son visibles dentro del hueso compacto. Las lagunas de Howship evidencian la actividad osteoclástica se observa en la superficie exterior cortical. La aposición de hueso laminar conectando los espacios vasculares tanto alrededor del implante como en la cortical, es menos densa que en las otras superficie biofuncionalizadas.

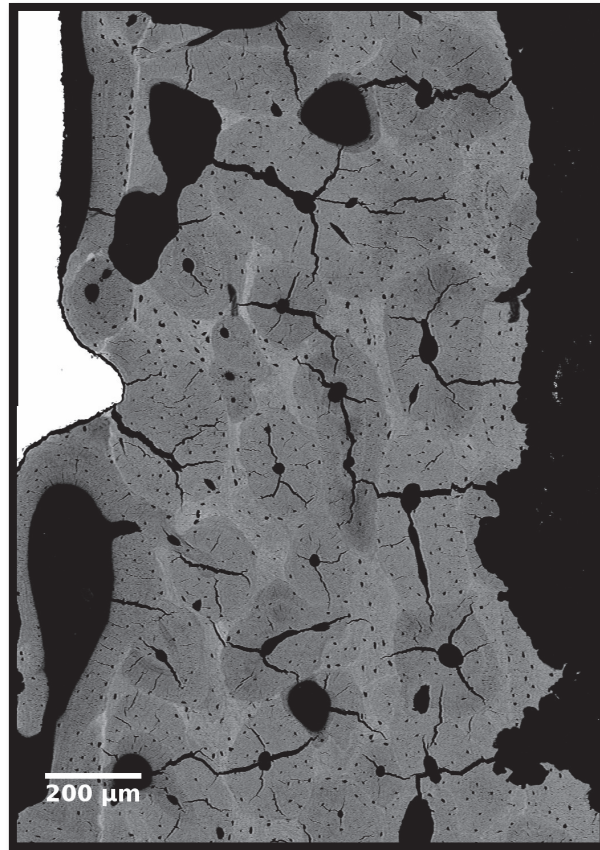


Figura 44: (Magnificación 250x) Imagen representativa de BS-SEM (Implante biofuncionalizado con péptido P144). Área enmarcada en la figura 40C.

8.3.1.3 Resultados cualitativos: análisis histológico

TIEMPO 1 .Dos semanas post colocación de implantes.

A las dos semanas después de la implantación, tanto en las muestras analizadas del grupo control (Figura 45A) como en las del grupo de estudio biofuncionalizado con P144 (Figura 45B), se encuentran numerosos espacios vasculares alrededor de la superficie de los implantes. Una reacción similar con numerosos vasos es evidente debajo de la superficie perióstica así como en la estructura ósea de la cortical preexistente. Todos los espacios vasculares están interconectados. En las figuras 45A y B las flechas rojas señalan los canales vasculares que conectan la cortical preexistente a la reacción subperiosteal y al callo peri-implantario, respectivamente.

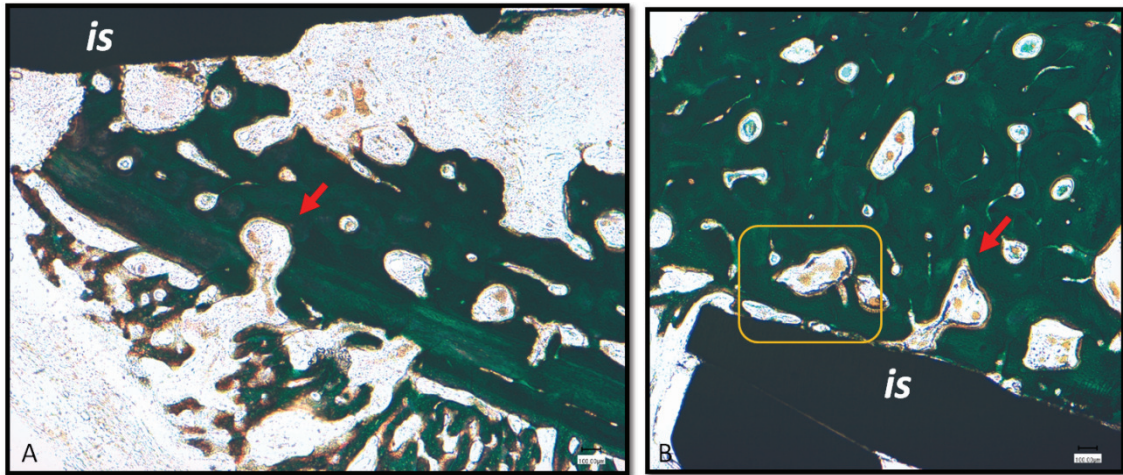


Figura 45: (Magnificación 10x) Muestras del grupo control (A) y del grupo biofuncionalizado con P144 (B). A: canal vascular (flecha roja) conectando con la cortical preexistente a la reacción subperióstica; “is”: superficie del implante; B: canal vascular (flecha roja) conectando la cortical preexistente al hueso periimplantario.

Los canales neovascularizados conectando con el hueso subperiosteal, el hueso de la cortical preexistente y los tejidos óseos que rodean la superficie del implante se observan en la mayoría de muestras de los tres grupos del experimento.

La figura 46 (20x aumentos) muestra la diferente orientación de ramificación radial (flechas blancas) de los canales vasculares de la cortical preexistente con respecto a aquellos canales vasculares del área peri-implantaria (flechas rojas), que parecen avanzar paralelamente a la superficie metálica del implante (*is*). El tono naranja alineando los canales vasculares corresponde a matriz extracelular no calcificada. Los eritrocitos (*e*) son visibles dentro de los vasos de los canales vasculares.

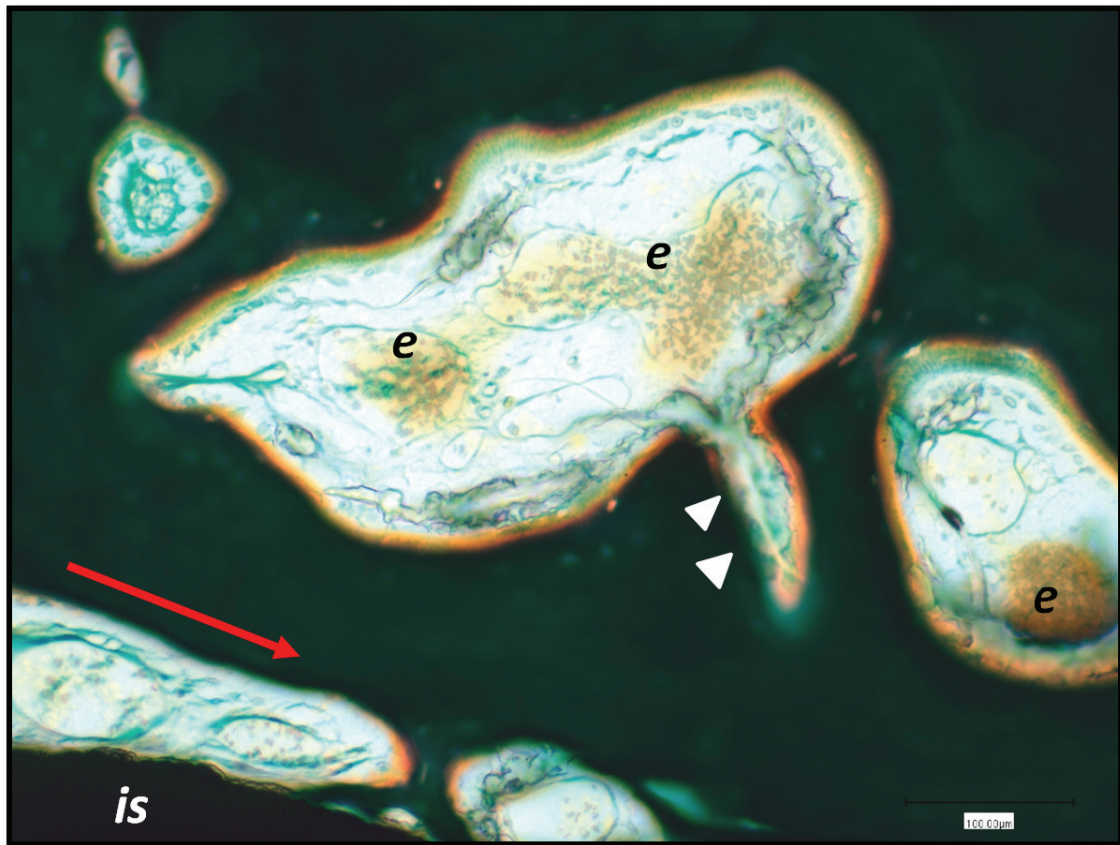


Figura 46: (Magnificación 20x). Muestra del grupo biofuncionalizado con P144 2 semanas después de la implantación. Flechas blancas: ramificación radial de los canales vasculares de la cortical; flecha roja: orientación de los canales vasculares periimplantares; “is”: superficie del implante; “e”: eritrocitos dentro de los canales vasculares.

Los osteoblastos activos, células morfológicamente cuboides, (flechas negras en Figura 47) son visibles en la superficie del tejido osteoide recientemente depositado y aún no calcificado (líneas de color verde), en las zonas limítrofes de la trabécula, dentro del tejido no mineralizado óseo. Una vez osificado dicho tejido osteoide, el hueso lamelar se observa de modo oscuro intenso y algunos osteoblastos se convertirán en osteocitos osteoides (flechas naranjas) para llegar a ocupar finalmente lagunas osteocitarias, ya transformados en osteocitos mineralizantes y osteocitos maduros (flechas blancas en Figura 47). (Bonewald 2013).

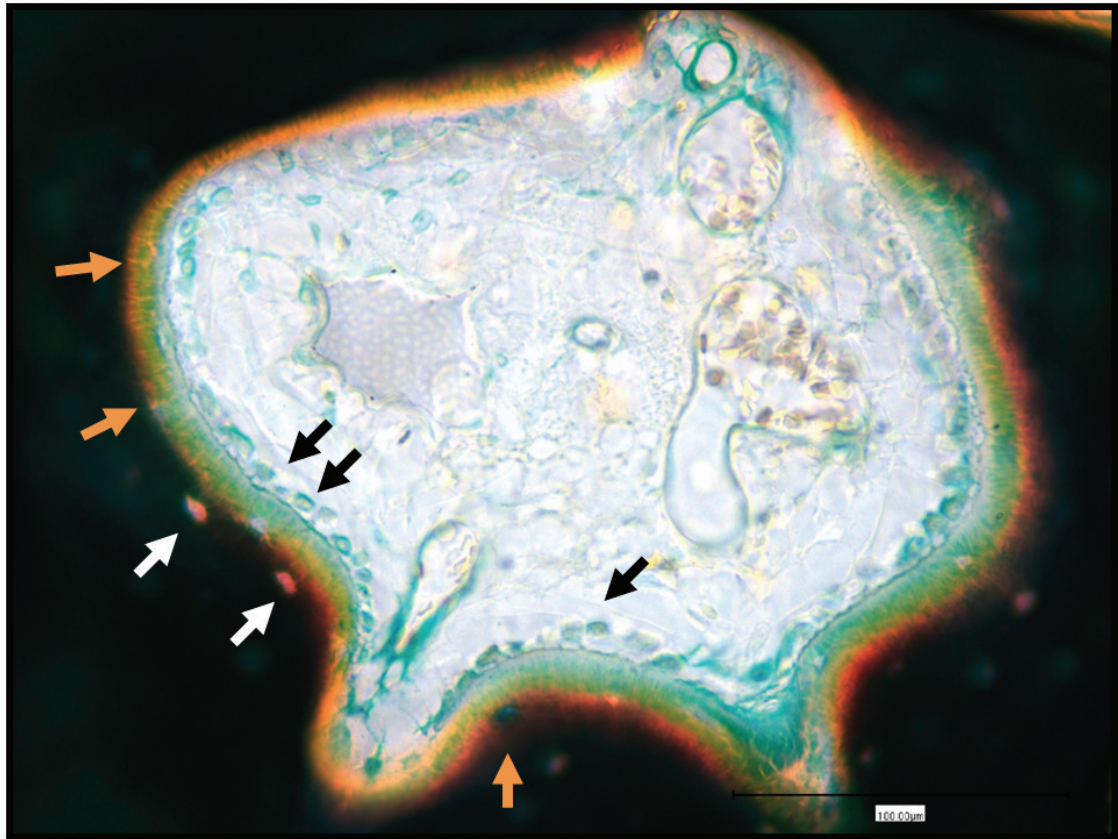


Figura 47. (Magnificación 50x). Muestra del grupo biofuncionalizado con P144 2 semanas después de la implantación. Flechas negras: osteoblastos activos”; flechas naranjas: osteocitos osteoides; flechas blancas: osteocitos mineralizantes en lagunas osteocitarias.

TIEMPO 2 . Cuatro semanas post colocación de implantes.

A las cuatro semanas de osteointegración, las muestras control muestran un aspecto más maduro de tejidos trabeculares constituyendo la reacción perióstica y de las trabéculas encontradas en el callo peri-implantario del implante (Figura 48A). La aposición de hueso maduro y hueso neoforado es visible alrededor de los canales vasculares, aún conectando las diferentes zonas del hueso mandibular (Figura 48B).

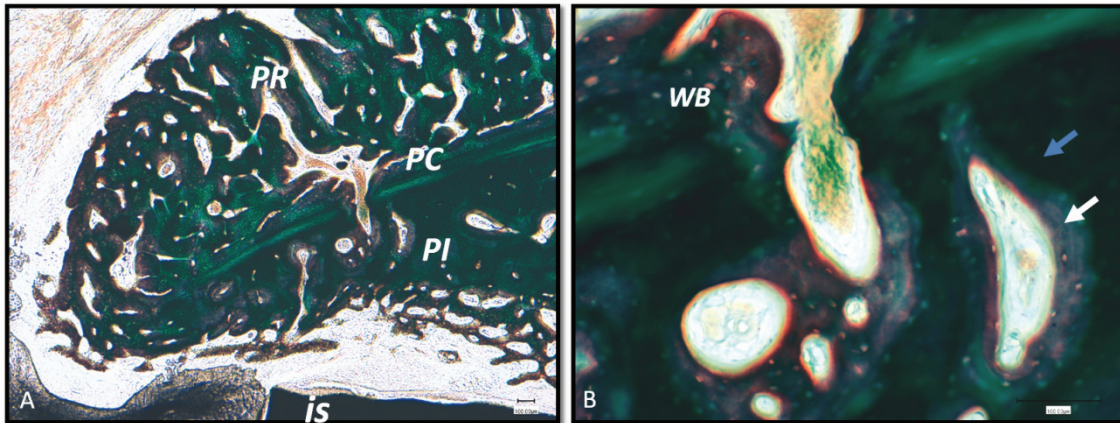


Figura 48: (Magnificación 10x y 50x). Muestra del grupo control 4 semanas después de la implantación. A: PC: cortical preexistente; PR: reacción perióstica; PI: callo periimplantario; "is": superficie del implante; B: WB: hueso maduro; flecha blanca: hueso laminar recientemente depositado; flecha azul: hueso cortical calcificado antiguo.

En la Figura 48A se observa el hueso de la cortical preexistente (PC) como una pared ósea sólida y lineal entre las estructuras trabeculares altamente vascularizadas de la reacción perióstica (PR) y de la reacción del callo peri-implantario (PI). La nueva aposición lineal va progresando dentro de los canales vasculares conectando estas tres estructuras, haciéndose evidente por las líneas concéntricas de osteoblastos y osteocitos en la matriz de hueso laminar cada vez más mineralizada alrededor de los canales vasculares.

A mayor magnificación, la Figura 48B muestra las capas concéntricas de una aposición lineal nueva de matriz ósea más clara y menos mineralizada (flecha blanca) rodeada por matriz ósea más calcificada, antigua y oscura (flecha azul). Aún se encuentran restos de la formación inicial de hueso neoformado ya maduro (WB).

De forma similar, una estructura densa de trabéculas originadas en la reacción perióstica cubre la cabeza del implante biofuncionalizado con el péptido P17 (Figura 49); al mismo tiempo, las trabéculas densas continúan por la cortical preexistente para rodear la superficie del implante. A mayores aumentos, se comprueba que los tejidos que constituyen las trabéculas son más maduros que en los grupos precedentes: no se observa tejido osteoide, mientras que el tejido óseo presente es el hueso laminar.

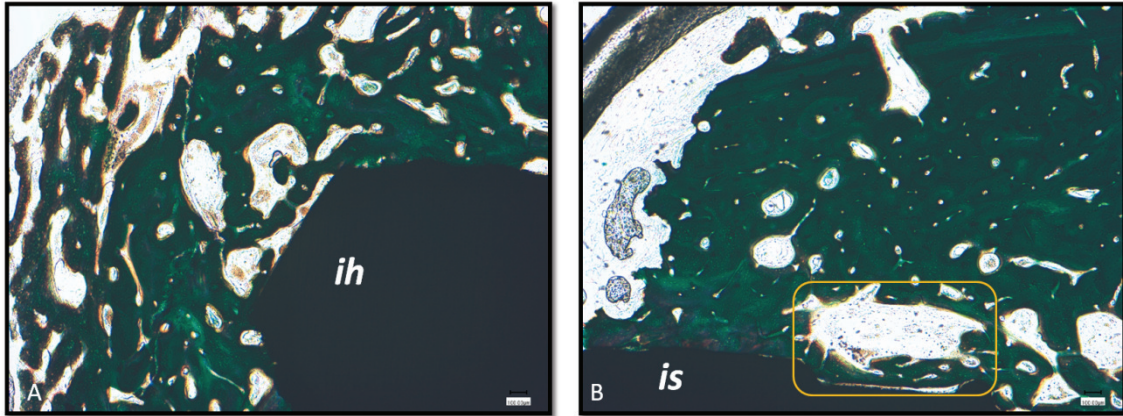


Figura 49: (Magnificación 10x) Muestra del grupo biofuncionalizado con P17 4 semanas después de la implantación. A: reacción perióstica; ih: cabeza del implante; B: callo periimplantario; is: superficie del implante. Área enmarcada en amarillo representada en la Figura 50.

La mayor magnificación de la muestra del grupo biofuncionalizado con P17 muestra numerosas células basales presentes en el interior de la trabécula ósea. El escaso depósito de matriz ósea no calcificada se tiñe de color naranja, mientras que el hueso nuevo laminar conecta el hueso de la cortical preexistente con las trabéculas en contacto con la superficie implantaría (is) (Figura 50).

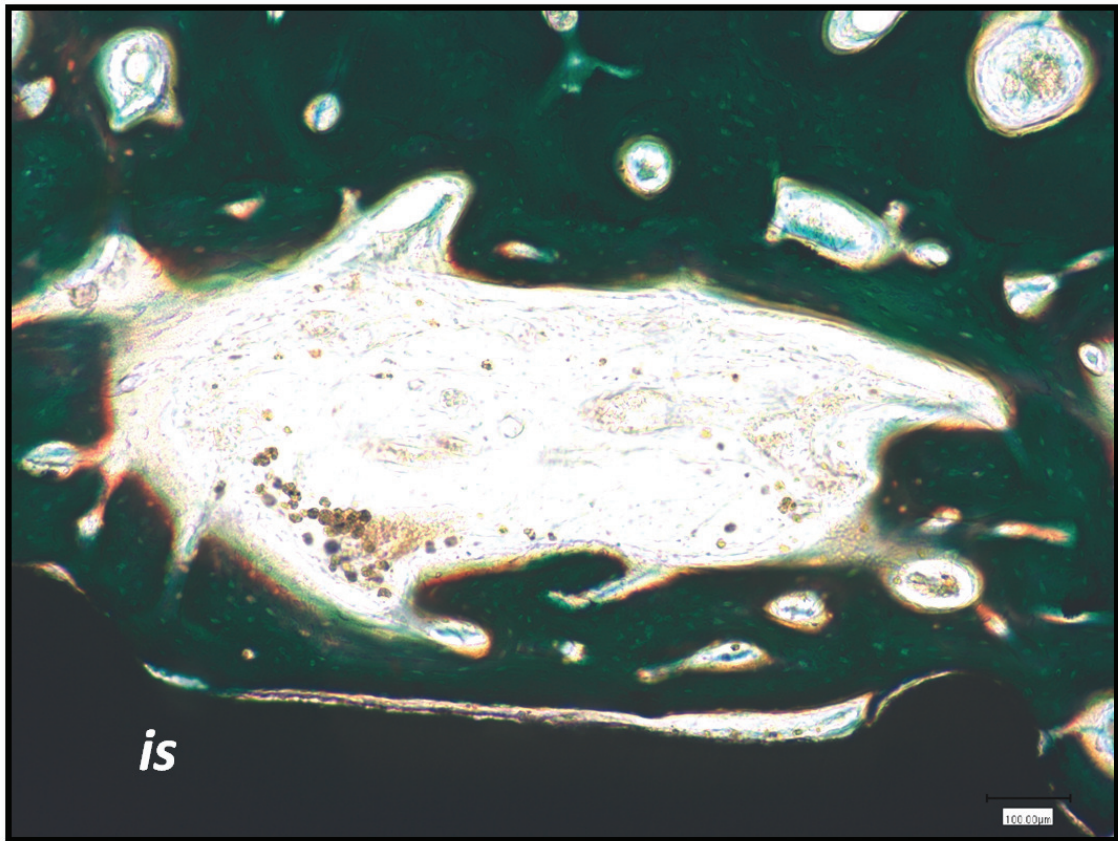


Figura 50. (Magnificación 20x) Muestra de implante biofuncionalizado con P17 4 semanas después de la implantación. Abundantes canales vasculares periimplantarios. Aposición de hueso laminar nuevo en contacto con la superficie del implante (is).

En las muestras histológicas de los implantes biofuncionalizados con P144 a las cuatro semanas de oseointegración, tanto la reacción perióstica como el callo periimplantario están menos avanzados que en las tratadas con P17. La distancia entre las estructuras óseas y el implante es notable, tanto a nivel de la cabeza del implante (Figura 51A) como en el hueso alveolar alrededor de las superficies activas del implante (Figura 51B).

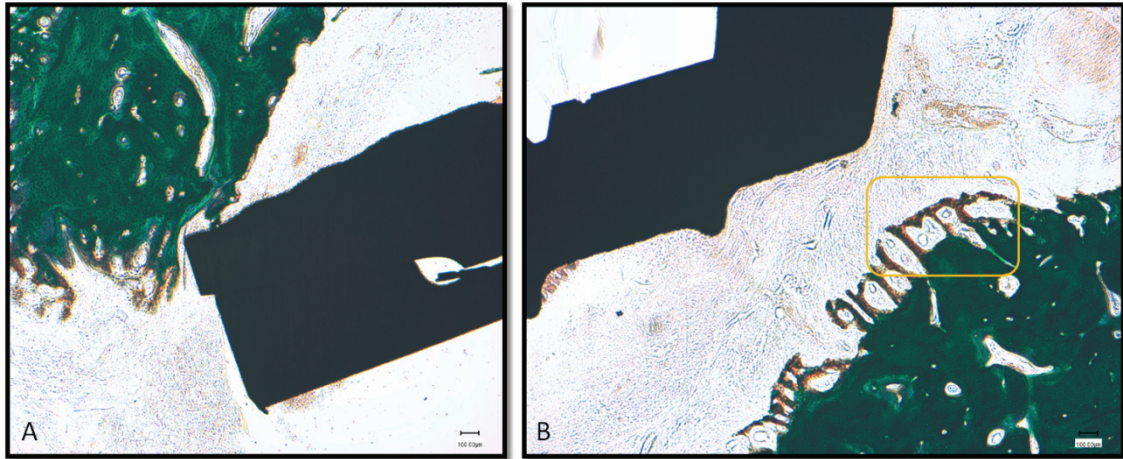


Figura 51: (Magnificación 10x) Muestra de implante biofuncionalizado con P144 4 semanas después de la implantación. A: callo periosteal y cabeza del implante; B: superficie del implante y hueso alveolar. Área enmarcada en amarillo representada en la Figura 52.

A mayores aumentos de esta muestra, el análisis histológico de los tejidos de las trabéculas evidencia la presencia de tejido osteoide y hueso laminar en el hueso alveolar alrededor del implante tratado con P144. Las características del tejido osteoide son visibles: numerosas lagunas celulares confluentes e irregulares con una línea dispersa de matriz extracelular no calcificada alrededor (flechas naranjas en Figura 52A). Un depósito irregular de matriz calcificada al que se unen numerosas fibras rodea los cúmulos de lagunas celulares (flechas blancas en Figura 52B).

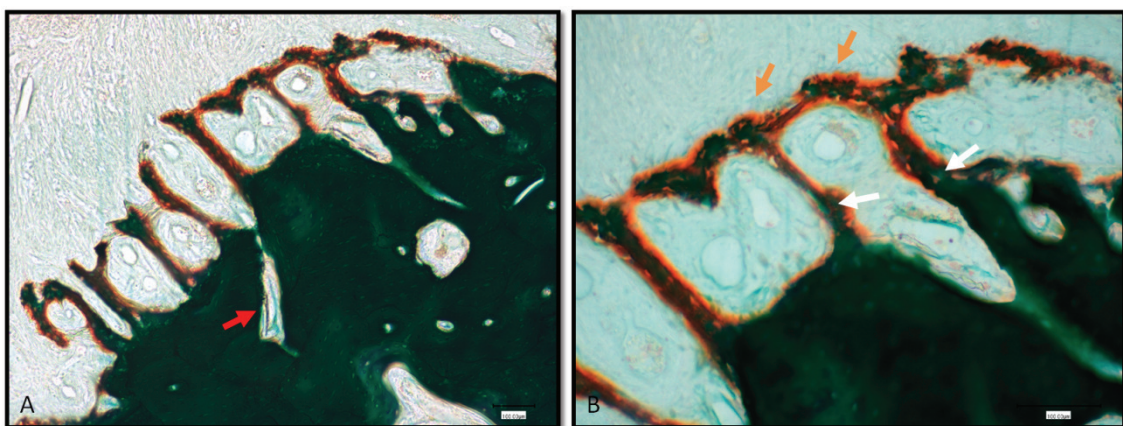


Figura 52: (Magnificaciones 20x y 50x de la figura 51B). A: canales vasculares provenientes de la cortical preexistente (flecha roja); B: aposición de hueso laminar (flechas blancas); tejido osteoide (flechas naranjas).

TIEMPO 3. Ocho semanas post colocación de implantes.

A las ocho semanas después de la colocación de los implantes, el grupo control muestra un aspecto más maduro de tejidos depositados. Los canales vasculares se observan más densamente alineados con las sucesivas capas de aposición de hueso laminar (Figura 53 A y B).

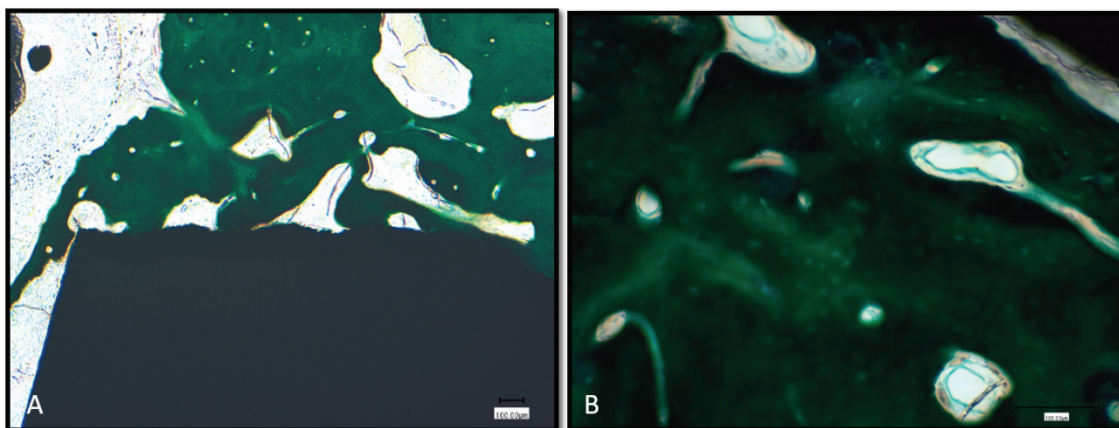


Figura 53. A y B (Magnificaciones 10x y 50x) Muestra del grupo control 8 semanas después de la implantación. A: tejidos calcificados alrededor de la cabeza del implante. B: células de revestimiento óseo dentro de los canales vasculares.

En referencia al grupo biofuncionalizado con P17 a las ocho semanas, las muestras histológicas muestran imágenes similares de numerosos espacios vasculares rodeados de tejido óseo laminar. Sin embargo, la tinción revela un proceso de remodelación intenso por parte de la cortical preexistente del hueso alveolar y del recién depositado hueso peri-implantario. La Figura 54 (20x aumentos) muestra la metacromasia del colágeno recientemente depositado del hueso laminar, no solamente en las osteonas haversianas de la cortical cerca de la superficie del implante, sino también en las lamelas que continúan la cortical para cubrir la cabeza del implante, lo que demuestra que los canales vasculares presentan una actividad intensa. La observación microscópica a mayores aumentos muestra un depósito estable y activo de nuevo hueso laminar, evidenciado por la capa densa de matriz no calcificada que rodea los canales vasculares y por las numerosas células que recubren su diámetro interno y los vasos de dentro (Figura 55Ay B). Las líneas cementantes (flechas blancas Figura 55A)

delimitan el hueso laminar de la cortical preexistente desde la aposición activa de hueso haversiano alrededor de los vasos sanguíneos.

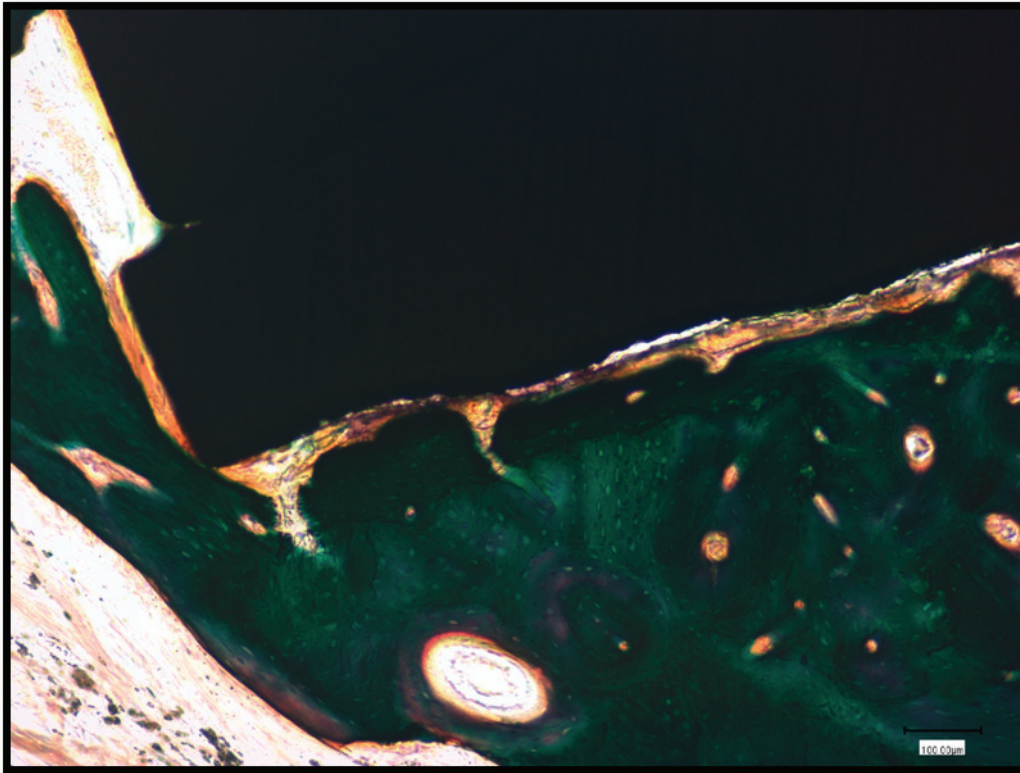


Figura 54. (Magnificación 20x) Muestra de implante biofuncionalizado con P17 8 semanas después de la implantación: metacromasia (tonalidad morada) del hueso laminar nuevo recién formado.

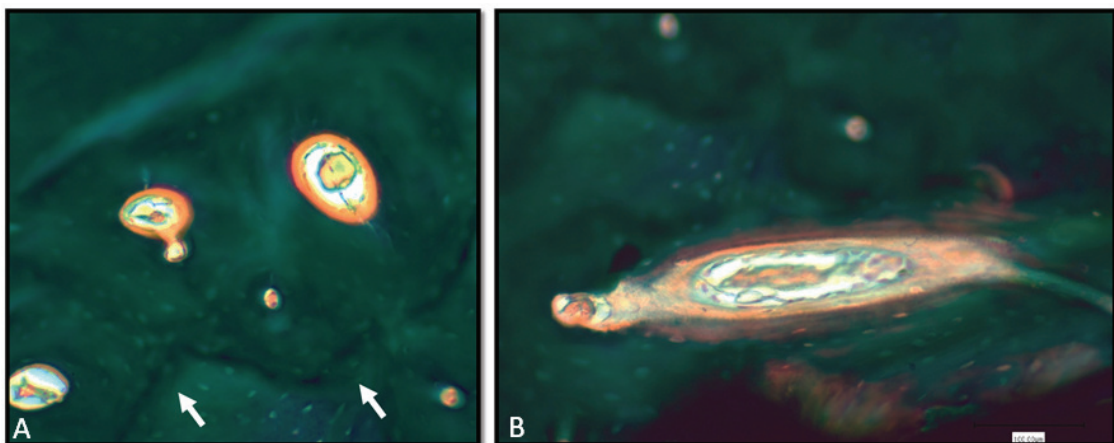


Figura 55. (Magnificación 50x) Muestra de implante biofuncionalizado con P17 8 semanas después de la implantación. A: canales vasculares revestidos por matriz ósea no calcificada (tonalidad naranja). Flechas: línea cementante; B: canal vascular revestido concéntricamente por matriz ósea no calcificada (tonalidad naranja) y hueso laminar recién formado (tonalidad morada).

Por lo que respecta a los implantes biofuncionalizados con el péptido P144 a las ocho semanas después de la implantación, se observan trabéculas densas y continuas de tejido óseo maduro. Sin embargo, la presencia de numerosos canales vasculares aún conectando la reacción perióstica con la cortical y el hueso peri-implantario evidencia que el proceso de remodelación no ha avanzado al mismo ritmo que en las muestras de los implantes biofuncionalizados con P17 (Figura 56A y B).

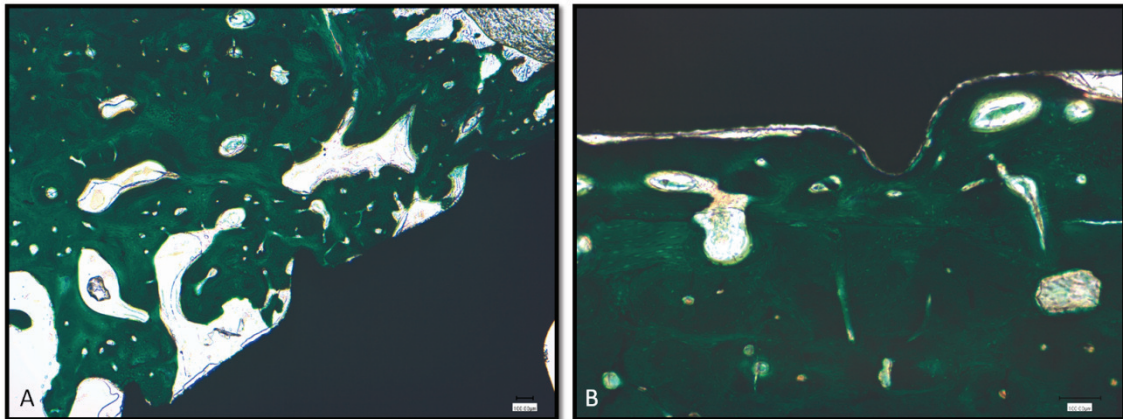


Figura 56. A y B (Magnificación 10x) Muestra de implante biofuncionalizado con P144 8 semanas después de la implantación: canales vasculares alrededor de la superficie del implante.

El diámetro de los canales vasculares de estas muestras difiere entre el hueso recién formado y el hueso de la corteza preexistente; a mayor magnificación, los signos de depósito perivascular activo de matriz extracelular no calcificada que lleva a la aposición ósea laminar son escasos (Figura 57A y B).

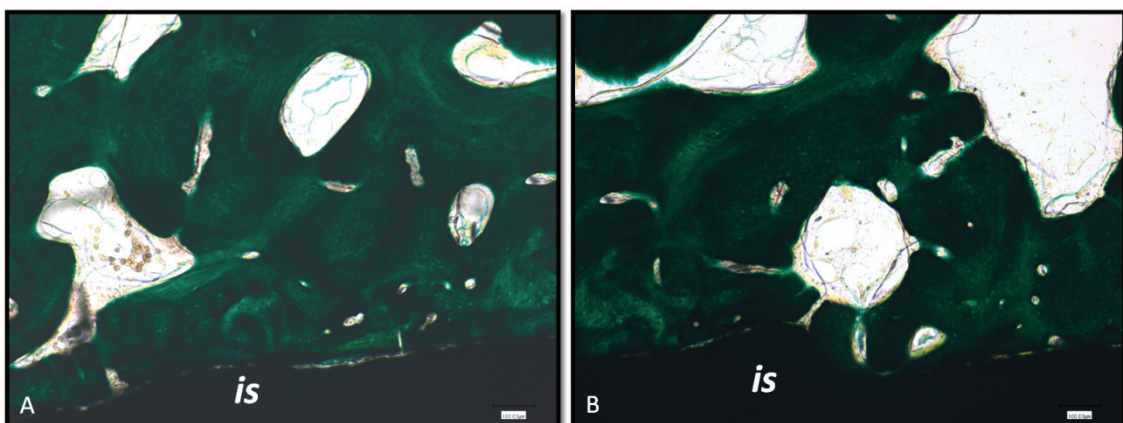


Figura 57 (Magnificación 20x) Muestra de implante biofuncionalizado con P144 8 semanas después de la implantación: canales vasculares orientados hacia la superficie del implante (is); las diferentes tonalidades de los tejidos óseos indican remodelación ósea activa.

8.3.2 Resultados del estudio de biomateriales (estudio 4)

Una parte importante de nuestro estudio fue analizar el comportamiento de los péptidos descrito en el presente trabajo en relación a superficies distintas de titanio. Para ello, se utilizaron los alvéolos post-extracción distales de los premolares de cada animal. Tras el injerto de dichos alveolos, tal y como está descrito en el apartado de materiales y métodos, se procedió a un seguimiento diario de las heridas y la mucosa cicatricial, que se encontró clínicamente sana en todos los animales desde su cicatrización postquirúrgica. Todas las muestras analizadas fueron preparadas según el protocolo descrito. Sin embargo, una muestra del grupo control se dañó durante el proceso de pulido y no pudo ser cuantificada; y una muestra del grupo biofuncionalizado con el péptido p144 fue descartada por presentar signos histológicos de infección apical, y por tanto fue excluida del análisis. En este manuscrito de tesis se analizan, por tanto, 22 alveolos regenerados con fosfato tricálcico bifásico comercial como control o el mismo material biofuncionalizado con p144 como material testado. Otros 12 alveolos en los seis animales fueron regenerados utilizando un biomaterial distinto, cuyo análisis y resultados no son objeto de esta tesis y que, por lo tanto, no describiremos ni analizaremos en este trabajo.

8.3.2.1 Resultados cuantitativos

La tabla 4 muestra los resultados del porcentaje de hueso en los defectos alveolares durante las 2, 4 y 8 semanas después de la cirugía. El grupo de biomaterial control presenta una diferencia en el crecimiento óseo entre las semanas 2 y 4 (p corregida=0,003), así como en las 2 y 8 (p corregida<0,001), siendo marginalmente significativa entre las semanas 4 y 8 (p corregida=0,081, p no corregida=0,027). El grupo funcionalizado con P144 muestra valores mayores que el grupo control durante todos los tiempos del experimento. Sin embargo, los valores de hueso son mayores entre las semanas 2 y 8 (p corregida=0,008), sin diferencias entre las semanas 2 y 4 y sólo un crecimiento marginal evidente entre las semanas 4 y 8 (p corregida=0,062, p no corregida=0,021).

La tabla 5 muestra el porcentaje de crecimiento óseo alrededor de los gránulos de biomaterial. Los valores del biomaterial control muestran diferencias entre las 2 y 4 semanas (p corregida=0,005), entre las 4 y 8 semanas (p corregida=0,029) y entre las 2 y 8 semanas (p corregida<0,001). El grupo biofuncionalizado con P144 muestra valores más altos pero no se observan diferencias significativas en el crecimiento entre los tiempos. Cuando comparamos el grupo control con el grupo experimental, hay una diferencia marginal a la octava semana (p corregida=0,08, p no corregida=0,027).

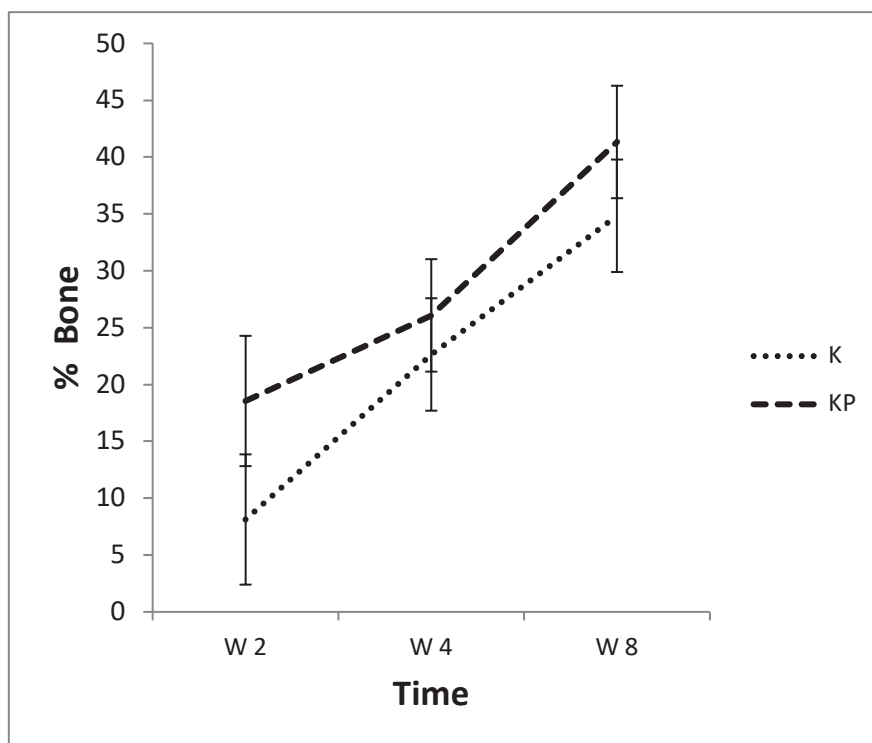


Tabla 4: Porcentaje de hueso formado (NBV) a las 2, 4 y 8 semanas después de la colocación del injerto. K: grupo control; KP: grupo experimental con péptido.

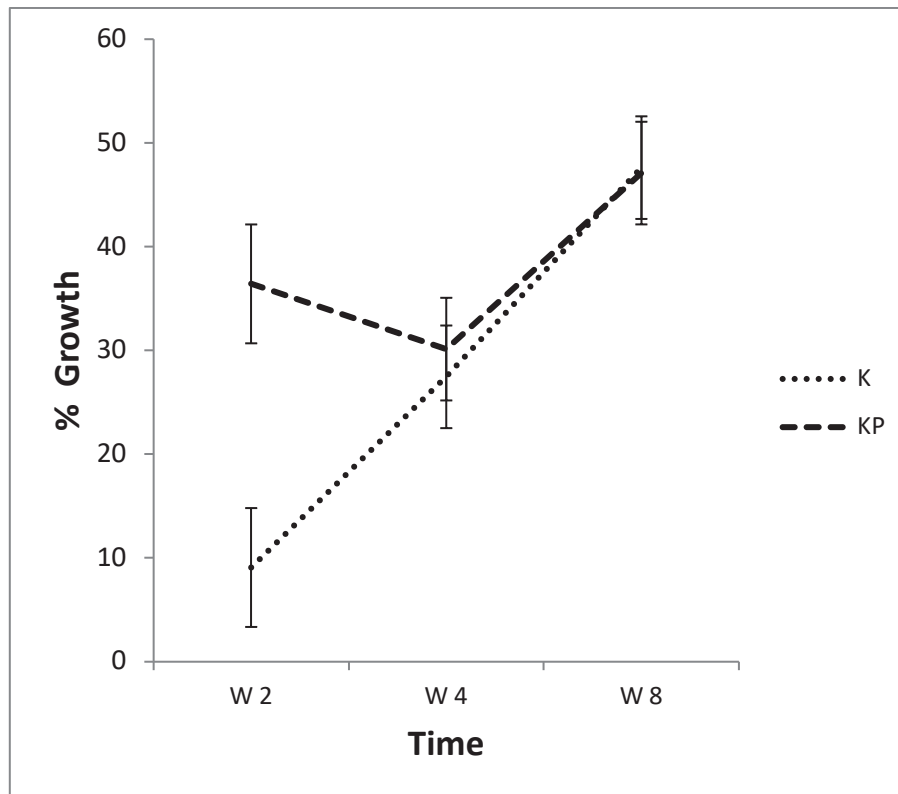


Tabla 5: Porcentaje de crecimiento óseo (NBV/TVol) a las 2, 4 y 8 semanas después de la colocación del injerto. K: grupo control; KP: grupo experimental con péptido.

8.3.2.2 Análisis histológico y de BS-SEM

TIEMPO 1. Dos semanas post colocación de biomaterial.

A las dos semanas, el grupo de biomateriales control está rodeado a distancia por trabéculas escasas, delgadas y calcificadas, constituidas principalmente por tejido óseo (Figura 58). La Figura 58C muestra sus lagunas celulares característicamente grandes, irregulares y confluentes (puntos naranjas) sumergidos en una matriz extracelular apenas calcificada (color verde oscuro), forrado por una banda de matriz extracelular no calcificada (color naranja en la Figura 58C) que forma trabéculas finas que establecen contactos dispersos entre ellos y con los gránulos de biomaterial. El grosor de las trabéculas en contacto con los gránulos biofuncionalizados es mayor que en el grupo control (Figura 58D), y su tinción homogénea de verde intenso y las lagunas de células poligonales separadas muestran que están constituidas por tejido más maduro.

La matriz extracelular no calcificada es visible alrededor de las lagunas de células óseas del tejido nuevo recién formado que rodea las trabéculas.

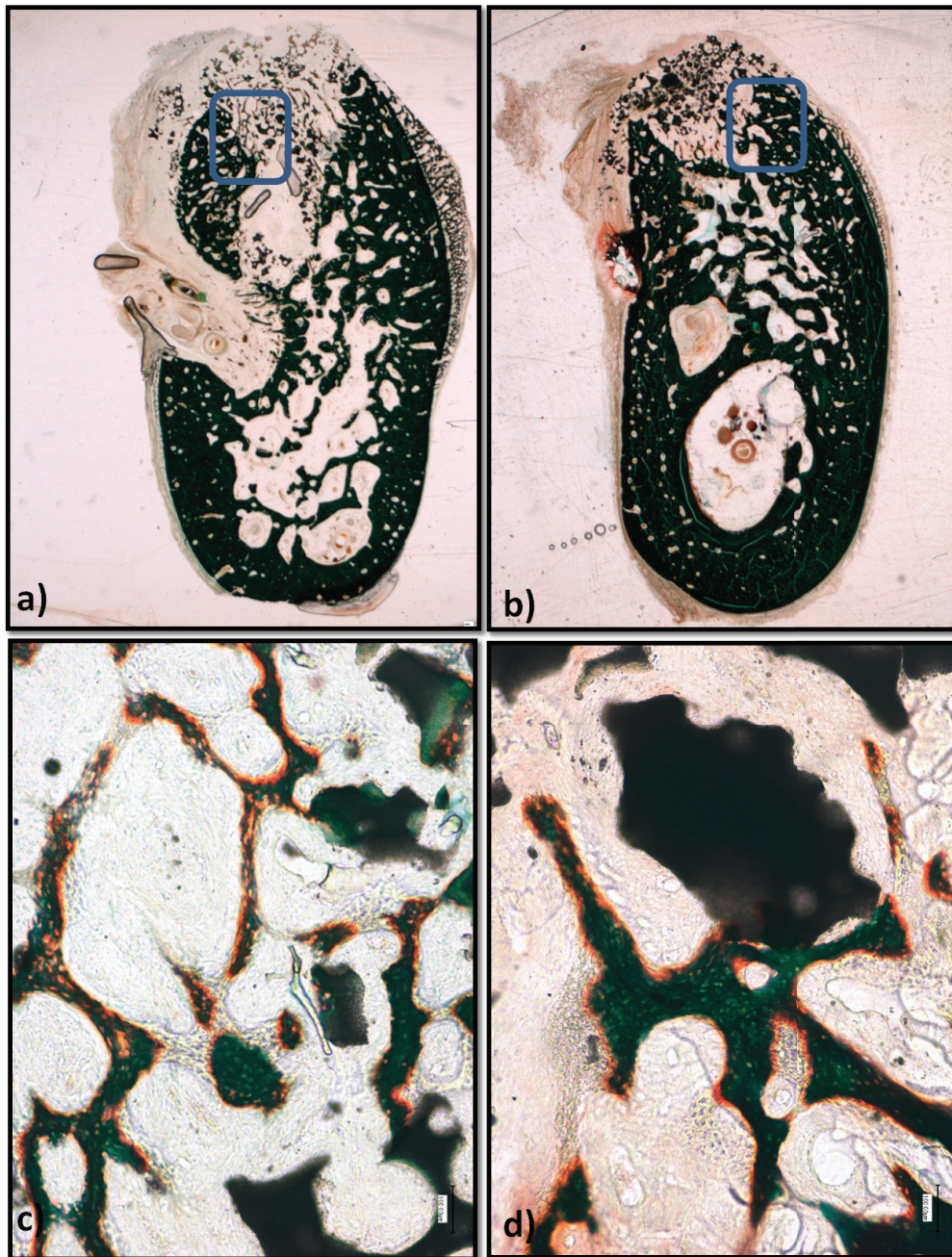


Figura 58: Resultados histológicos después de 2 semanas de la inserción del injerto óseo. a) Muestra de injerto óseo del grupo control. b) Muestra de Injerto óseo funcionalizado con P144; c) Magnificación 20x, área enmarcada en la figura a; d) Magnificación 20x, área enmarcada en la figura b.

El análisis con BS-SEM revela un crecimiento óseo similar en ambos grupos a las dos semanas después de la colocación del injerto a pocos aumentos. No se observa contacto aparente entre la cortical alveolar y los fragmentos de los materiales. Cuando se lleva a cabo un aumento de 250x, se puede observar que en el grupo del péptido, hay más fragmentos que muestran aposición de tejido óseo, todos situados cerca de la cortical preexistente (Figura 59D).

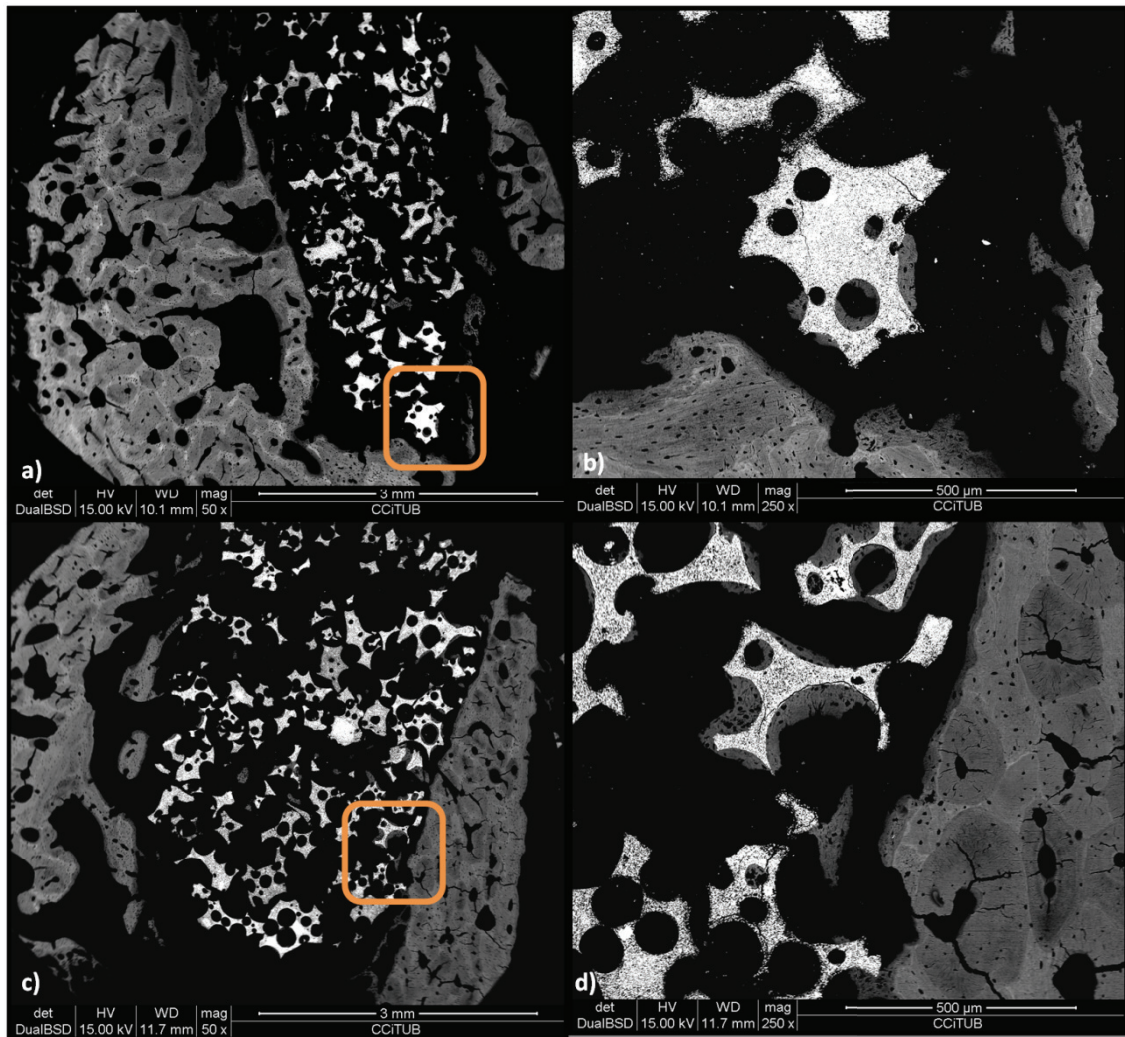


Figura 59: Resultados de BS-SEM 2 semanas después de la colocación del injerto. a) Muestra del grupo control. b) (Magnificación 250x, área enmarcada en la figura a): hueso nuevo recién formado alrededor de un gránulo; c) Muestra del grupo biofuncionalizado con P144; d) (Magnificación 250x, área enmarcada en la figura c): hueso nuevo recién formado en contacto con los gránulos biofuncionalizados cerca de la cortical preexistente.

TIEMPO 2. Cuatro semanas post colocación de biomaterial.

Cuatro semanas después de la implantación, en las muestras del grupo control (Figura 60) se observa una configuración densa de trabéculas más gruesas y densas alrededor de los fragmentos del biomaterial y estableciendo contactos con el hueso cortical (véase el *stitching*).

Los resultados histológicos muestran que la formación de hueso nuevo (tonalidad naranja en la Figura 60D) es aún evidente rodeando las trabéculas óseas, recubriendo las estructuras medulares que conectan las nuevas trabéculas con la pared alveolar cortical. El área de la cortical preexistente muestra también evidencias de un proceso de remodelación intento, constituido por numerosos y complejos canales vasculares y aposición concéntrica nueva del hueso laminar en su interior.

En este período, los fragmentos de biomaterial del grupo biofuncionalizado (Figura 61) adoptan el mismo color verde oscuro que los tejidos óseos de las trabéculas que los rodean. La tonalidad naranja de la tinción alrededor de las trabéculas revela lagunas celulares dentro de la matriz no calcificada depositada en la superficie (flecha roja en figura 60B) cerca de las estructuras vasculares. Estas trabéculas más densas y gruesas presentan canales vasculares largos y numerosos, interconectados y visibles en el hueso cortical, en el espacio alveolar y en la reacción perióstica.

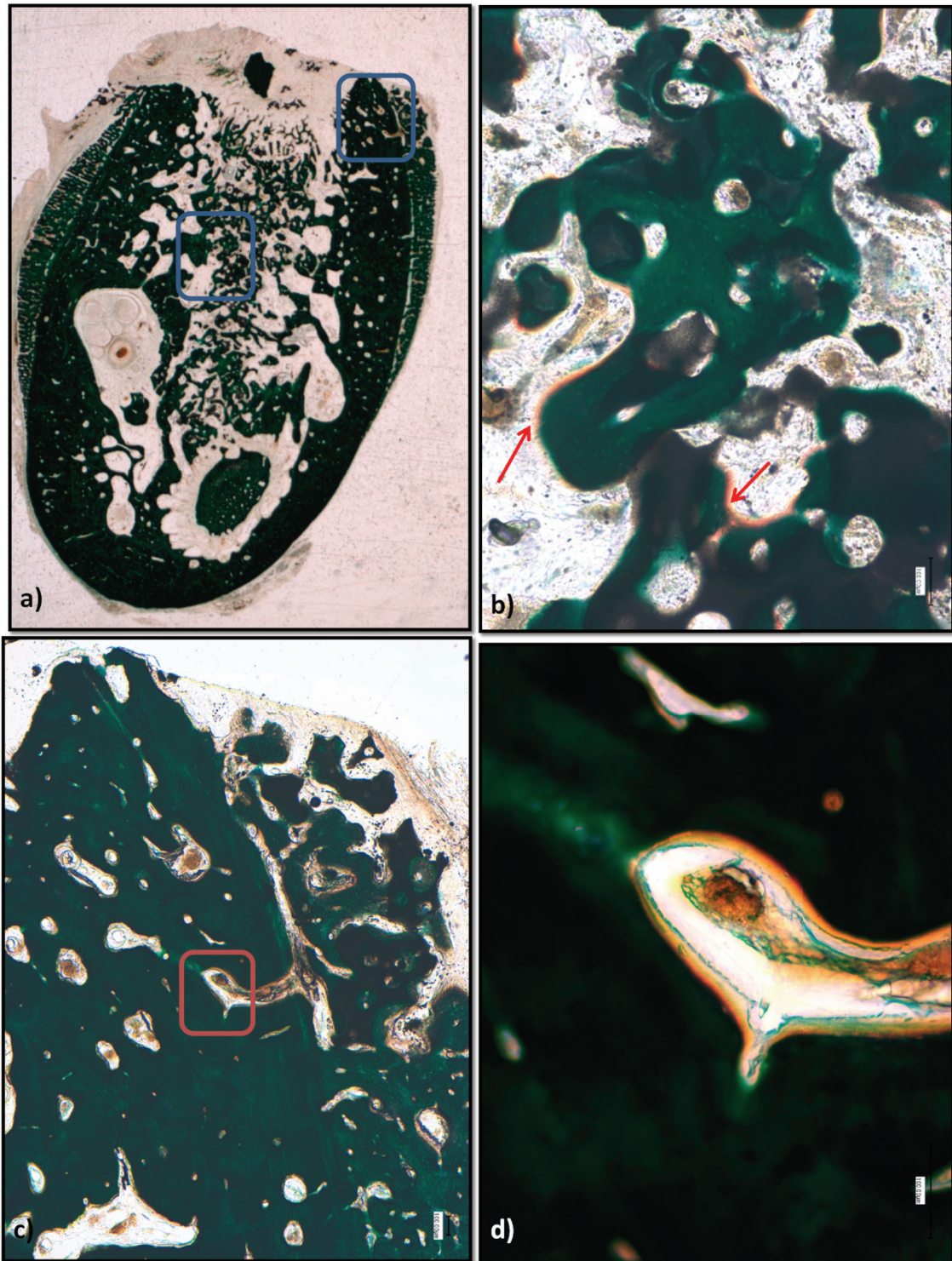


Figura 60: Resultados histológicos después de 4 semanas de la inserción del injerto óseo del grupo control. a) Visión general del grupo control; b) (Magnificación 10x) área enmarcada en figura a): flechas rojas: tonalidad naranja de la matriz extracelular no calcificada cerca de los gránulos; c) (Magnificación 10x), área enmarcada en la figura a): espacio trabecular neoformado cruzando la cortical preexistente; d) (Magnificación 50x, área enmarcada en la figura c): Aumento de la estructura no mineralizada con formación de tejido osteoide inducida por una capa celular osteoblástica.

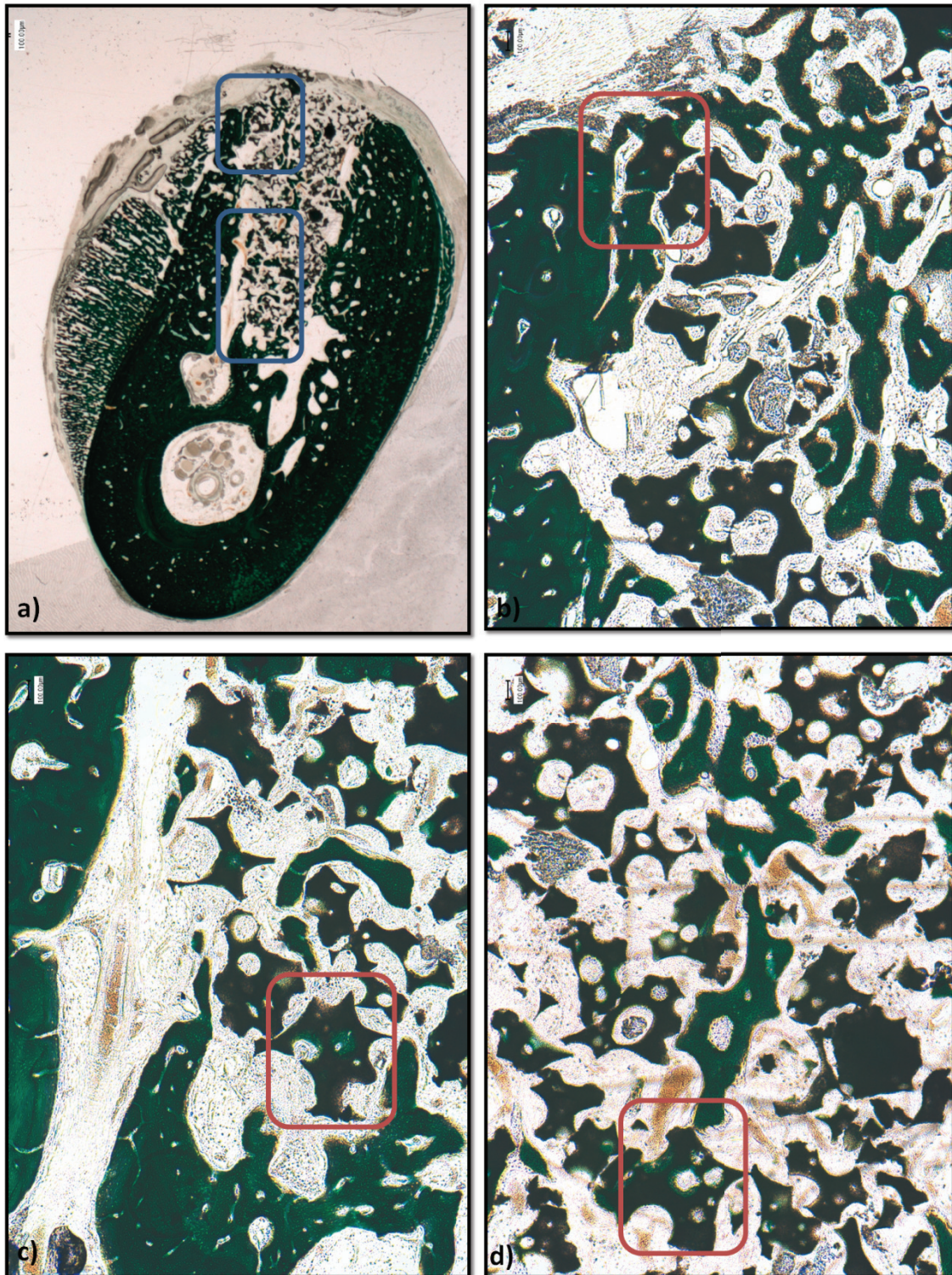


Figura 61: Resultados histológicos después de 4 semanas de la inserción del injerto óseo del grupo experimental. a) Visión general del grupo biofuncionalizado con P144; b) (Magnificación 10x, área enmarcada en figura a): gránulos en contacto con la cortical del defecto alveolar; c) y d) (Magnificación 10x, área enmarcada en figura a): hueso nuevo recién formado alrededor del gránulo.

A mayor magnificación de las muestras (Figura 62), se observan vasos sanguíneos invadiendo los gránulos del biomaterial y manteniendo conexiones con la vascularización de las áreas adyacentes (Figura 62A). Los vasos (“e” de eritrocitos visibles dentro), invaden los espacios dentro de los gránulos de biomaterial e inician el proceso de aposición de tejido óseo evidenciado por el depósito lineal de matriz extracelular no calcificada (naranja en figura 62B y C). Otra visión a la misma magnificación da una imagen más detallada, con osteoblastos (flechas rojas en figura 63B) ya inmersos en la matriz extracelular aún no calcificada, dentro de la cual la calcificación comienza a aparecer como gránulos de color verde intenso dispersos, todavía sin conectar. Dentro de las estructuras vasculares se observan los característicos eritrocitos en “pila de moneda”.

La segunda serie (Figura 63) de muestras a mayores aumentos revela el tamaño de los vasos dentro de las cavidades de los gránulos del biomaterial: cantidades visibles de eritrocitos son visibles en los vasos más grandes (Figura 63A y C), mientras que en las cavidades más pequeñas se observan los eritrocitos apilados en los vasos más pequeños (63A y B). De forma similar, los tejidos depositados muestran las características morfológicas de hueso esponjoso (Figura 63B): espacios trabeculares grandes y aislados en una matriz extracelular densa y muy calcificada, muy diferente de los espacios trabeculares confluentes, típico aspecto del hueso que osifica por modelo mesenquimal (Figura 63C).

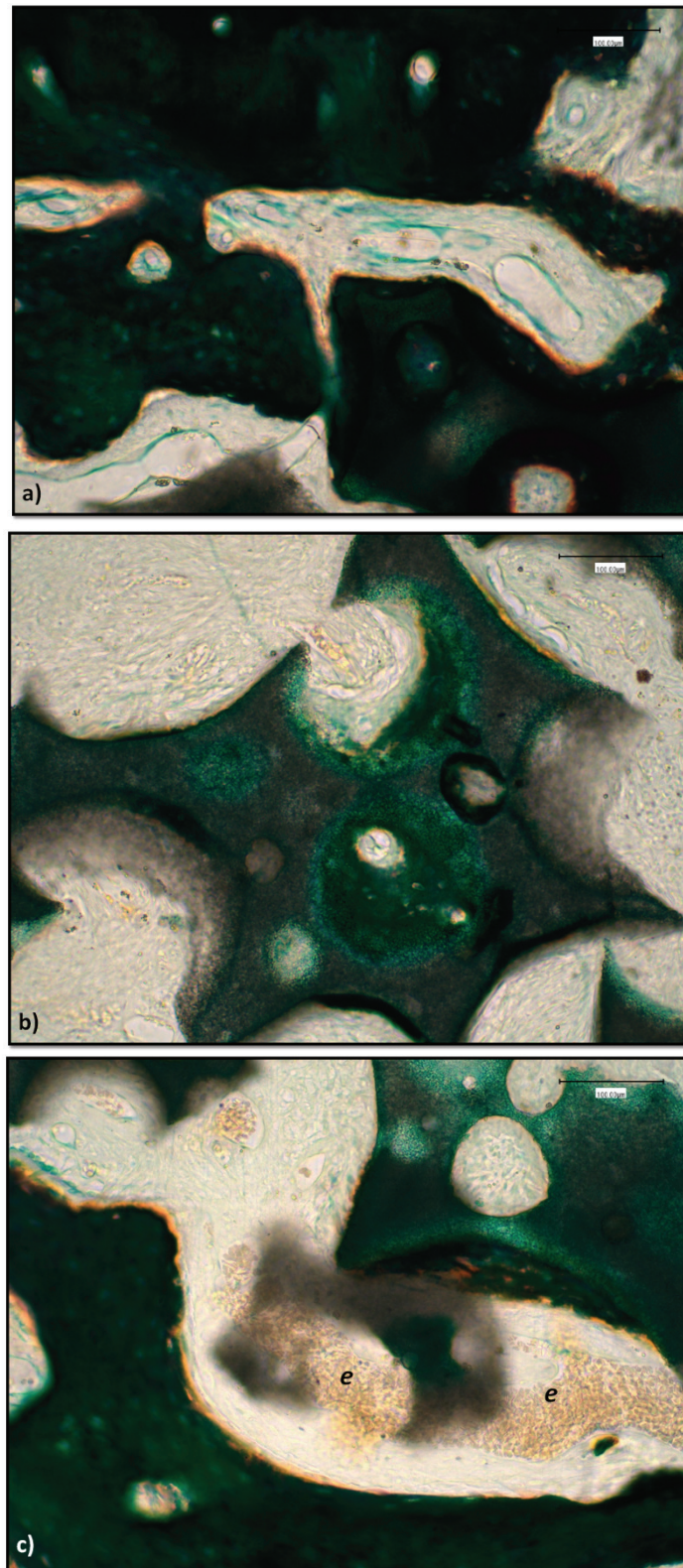


Figura 62: Serie 1. Resultados histológicos después de 4 semanas de la inserción del injerto óseo. a) (Magnificación 20x, área enmarcada en figura 61b); b) (Magnificación 50x, área enmarcada en figura 61c); c) (Magnificación 50x, área enmarcada en figura 61d) vasos abundantes con eritrocitos (e).

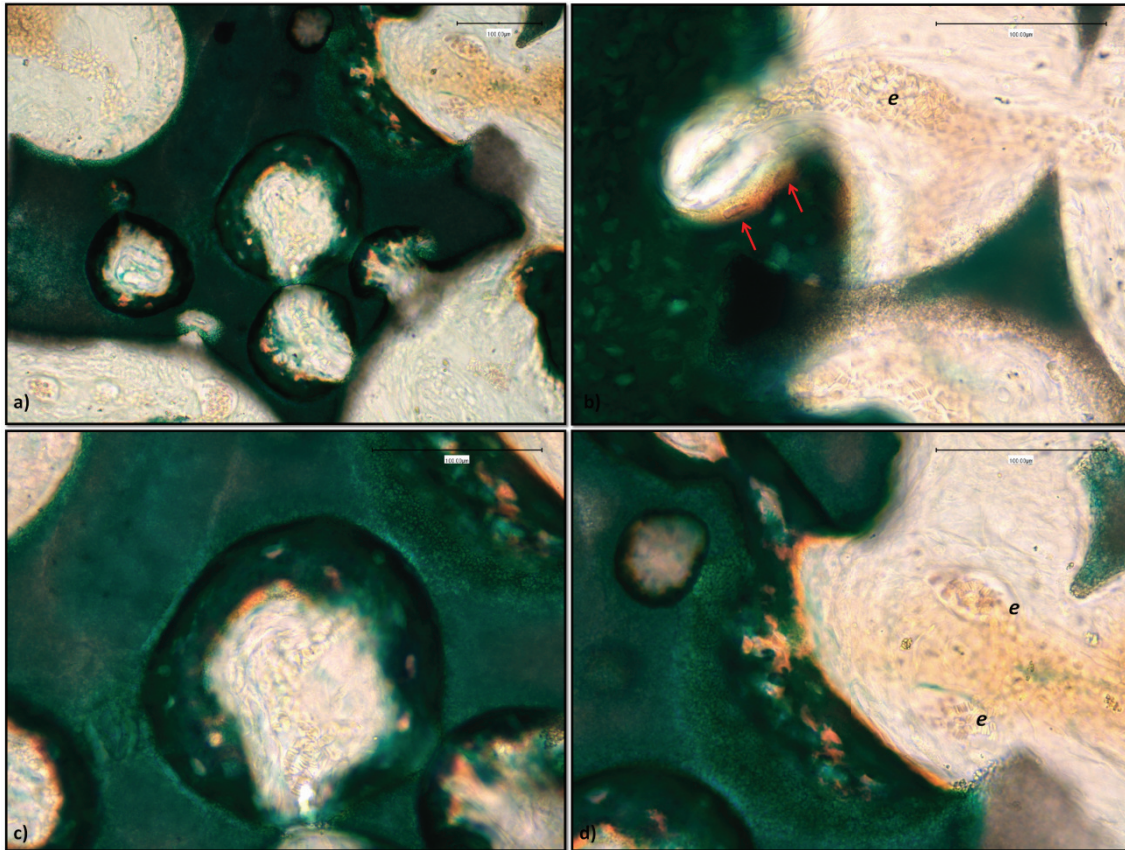


Figura 63: Serie 2. Resultados histológicos después de 4 semanas de la inserción del injerto óseo, áreas enmarcadas en la figura 61 de la muestra del grupo biofuncionalizado con P144. a) (Magnificación 20x, área enmarcada en la figura d); b) (Magnificación 50x, área enmarcada en la figura b): osteocitos osteoides (flechas rojas) dentro la matriz ósea extracelular no calcificada; eritrocitos (e); c) (Magnificación 50x de la figura 63a): hueso recién formado a expensas del gránulo; d) (Magnificación 50x de la figura 63a): Deposición de matriz alrededor del gránulo; abundantes vasos con eritrocitos (e).

En referencia a los resultados de BS-SEM (Figura 64), la mayor parte de los gránulos del grupo biofuncionalizado con P144 muestran un contacto sólido y continuo con la cortical del defecto alveolar, mientras que el grupo control presenta una conexión más discontinua, tanto entre los fragmentos y las trabéculas como entre las trabéculas y la cortical preexistente. En el grupo experimental, las trabéculas son más densas y muestran una fase más avanzada de remodelación ósea que la que se observa en el grupo no biofuncionalizado. La aposición ósea en el grupo del péptido se caracteriza

por una aposición laminar continua en el hueso osteoide inicial, mientras que el grupo control muestra aún tejido óseo en maduración y menos hueso laminar.

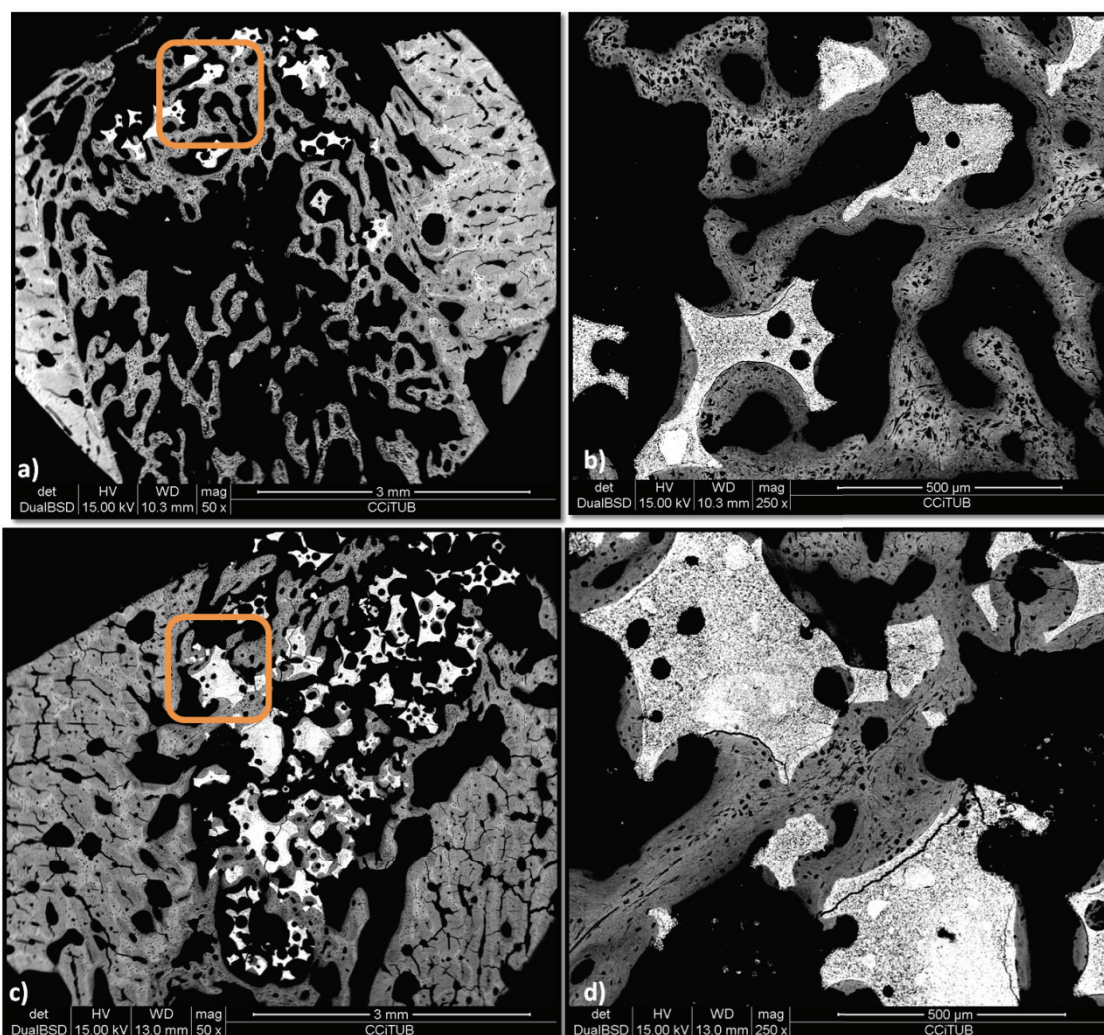


Figura 64: Resultados de BS-SEM 4 semanas después de la colocación del injerto. a) Muestra del grupo control. b) (Magnificación 250x, área enmarcada en la figura a): trabécula conectada con el hueso nuevo laminar recién formado; c) Muestra del grupo biofuncionalizado con P144; d) (Magnificación 250x, área enmarcada en la figura c): hueso laminar maduro interconectado y en contacto con los gránulos biofuncionalizados cerca de la cortical preexistente.

TIEMPO 3. Ocho semanas post colocación de biomaterial.

A las ocho semanas después de la colocación de los injertos óseos hay un incremento general de la osteointegración en todos los grupos de estudio, coherente con la tendencia mostrada en los resultados de los datos morfométricos.

El análisis con microscopio óptico revela que la arquitectura ósea alrededor de los fragmentos de los biomateriales es más densa gracias a la aposición de hueso laminar

que recubre los espacios medulares. Se observa un mayor número de espacios medulares entre los fragmentos del biomaterial en el grupo control que en el material biofuncionalizado. Además, los vasos que conectan con la cortical preexistente (PC en la Figura 65) son más grandes y más complejos en las muestras del grupo control. Al rodear los fragmentos biofuncionalizados, los tejidos óseos son más densos y más continuos con la cortical preexistente. A mayor magnificación, se observan aún numerosos canales vasculares alrededor de las trabéculas que rodean los fragmentos del biomaterial control, mientras que las trabéculas alrededor de los fragmentos biofuncionalizados son más densas, con menos espacios vasculares. Hay que mencionar, sin embargo, que los alvéolos en los dos grupos contienen aún fragmentos de biomaterial que no están en contacto con los tejidos óseos recientemente depositados.

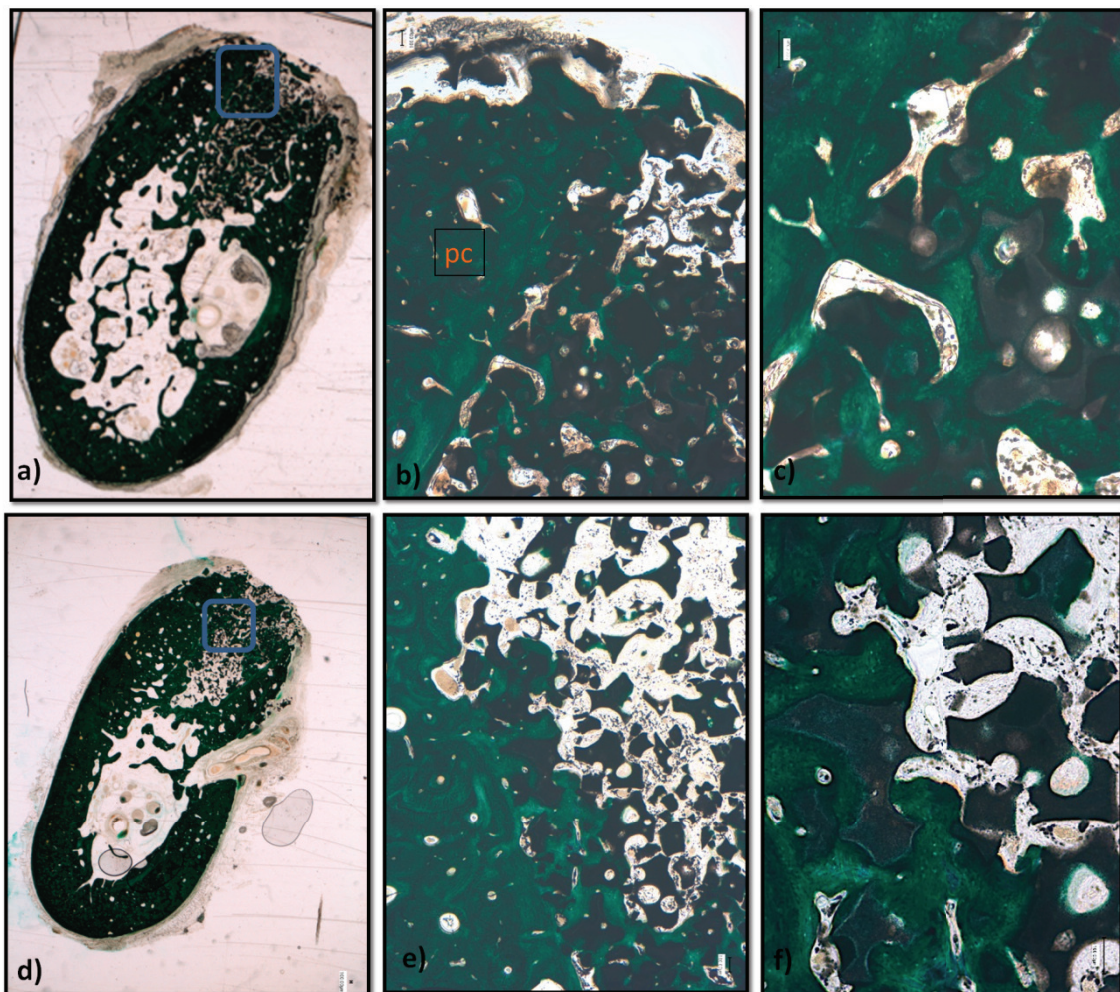


Figura 65: Resultados histológicos después de 8 semanas de la inserción del injerto óseo. a) Muestra del grupo control; b) (Magnificación 10x, área enmarcada en la figura a): PC: cortical

preexistente; c) (Magnificación 20x de la figura b); d) Muestra del grupo biofuncionalizado con P144; e) (Magnificación 10x, área enmarcada en la figura d); f) (Magnificación 20x de la figura e).

El análisis de BS-SEM muestra una fase de formación ósea más madura en ambos grupos del experimento. Las Figuras 66A y C muestran una formación ósea densa y compacta que conecta con los gránulos; en el grupo tratado, estos enlaces parecen más consistentes porque la estructura trabecular conecta ambas corticales del defecto alveolar y predomina el color gris de la aposición ósea laminar. Sin embargo, el grupo control presenta una red trabecular menos continua, y el remodelado osteonal es visible principalmente en la cortical preexistente (asteriscos en la Figura 66B). El grupo tratado con el péptido muestra aposición osteonal principalmente dentro de los gránulos del biomaterial (asteriscos en la Figura 66D).

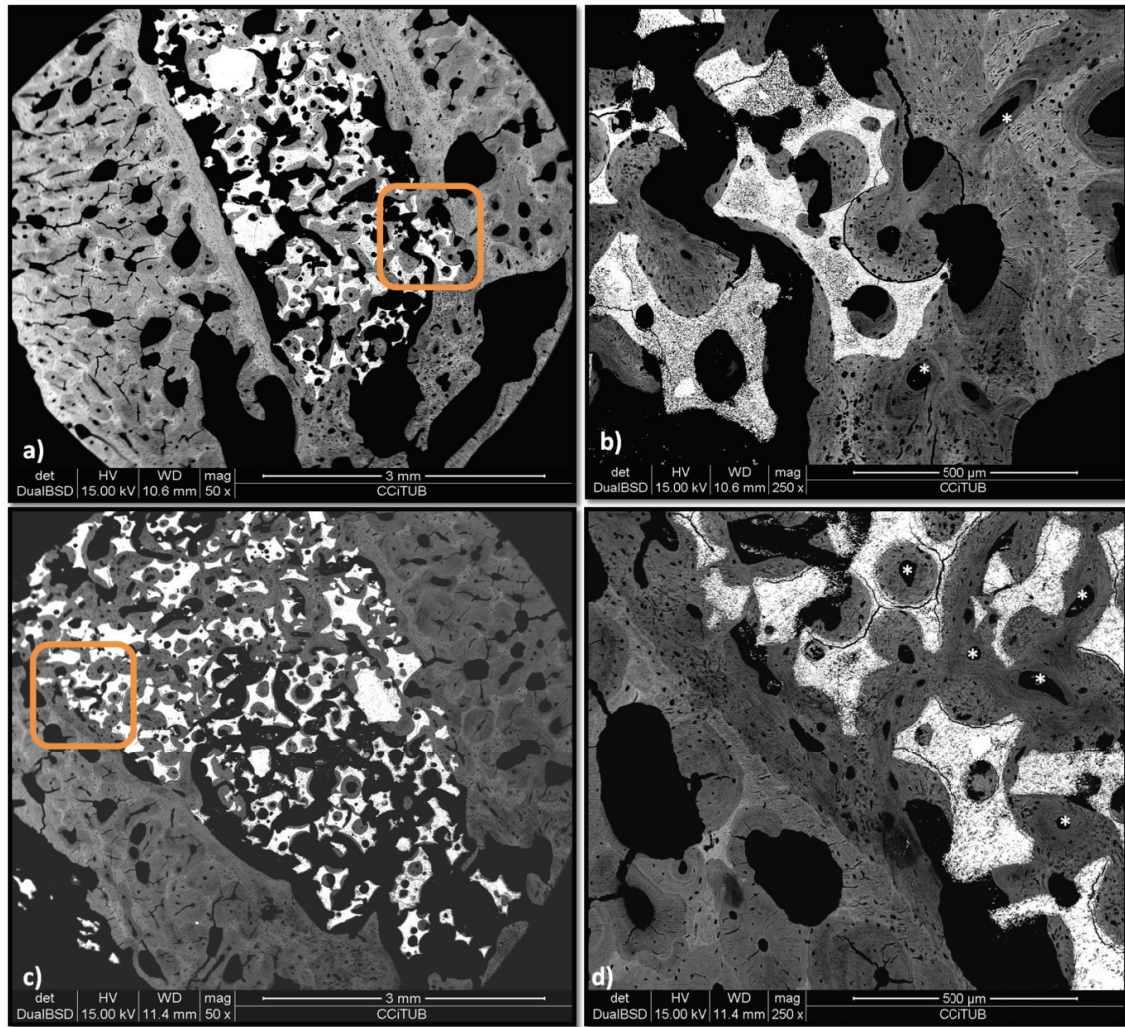


Figura 66: Resultados de BS-SEM 8 semanas después de la colocación del injerto. a) Muestra del grupo control; b) (Magnificación 250x, área enmarcada en la figura a): (*) tejido óseo osteonal; c) Muestra de grupo biofuncionalizado con P144; d) (Magnificación 250x, área enmarcada en la figura c): (*) tejido óseo osteonal.

9 Discusión

El objetivo principal de esta tesis fue evaluar las implicaciones biológicas de la inhibición del factor de crecimiento TGF- β 1 en la osteointegración.

9.1 Discusión de los resultados del primer estudio

Para ello, decidimos realizar primeramente un estudio *in vitro*, con el propósito de comprobar el efecto inhibitorio de dos péptidos sobre este factor de crecimiento. Estos péptidos, P17 y P144, sí habían sido testados en el hígado, pero no habían sido evaluados en el campo del tejido óseo. De ahí que nuestro modelo *in vitro* de elección fueran las células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas.

Las células MC3T3-E1 tienen la capacidad de diferenciarse en osteoblastos y osteocitos y existen estudios que confirman que forman tejido óseo calcificado *in vitro* (Anselme et al. 2000; Takeuchi et al. 2010). Según el estudio de Takeuchi et al (2010), las células MC3T3-E1 se muestran muy sensibles a TGF- β 1 y a su inhibición. Asimismo, TGF- β 1 suprime la diferenciación osteoblástica de las células de la médula ósea, mientras que su inhibición libera a las células estromales de su detención de diferenciación, facilitando la formación de osteoblastos diferenciados. En nuestro primer estudio *in vitro* comprobamos, en primer lugar, que los péptidos P17 y P144 inhiben a TGF- β 1. En segundo lugar, la determinación de la expresión de proteínas codificadoras de genes en remodelación ósea que llevamos a cabo a través del Real Time qPCR mostró que estos marcadores están incrementados en los grupos celulares tratados con los péptidos.

La diferenciación de los precursores osteoblásticos puede ser monitorizada por la expresión de proteínas que componen la matriz ósea, como el colágeno tipo I, y marcadores de diferenciación ósea, como la fosfatasa alcalina y la osteocalcina. (Janssens et al. 2005). Otro marcador osteoblástico, como Cbfa1 o RUNX2, el primer factor de transcripción específico de osteoblastos que se identificó, se expresa de

forma temprana en el linaje osteoblástico y es necesario para el desarrollo de tejidos mineralizados (Franceschi 1999).

En referencia a los resultados obtenidos con la osteocalcina, la mayor expresión de esta proteína se encuentra con el grupo tratado con TGF- β 1+P17 en los tiempos iniciales de qPCR. El incremento de esta proteína puede significar que el tratamiento con el péptido P17, a través de la inhibición de TGF- β 1, acelera la diferenciación osteoblástica durante las primeras 24 horas. La osteocalcina es una proteína no colágena secretada por los osteoblastos, se encuentra en la matriz extracelular y juega un papel importante en la mineralización ósea (Nakanishi et al. 2012).

Zur Nieden et al (zur Nieden et al. 2003) investigaron los perfiles de expresión de genes específicos de hueso en los osteoblastos, sugiriendo que los únicos marcadores específicos del fenotipo osteoblástico son la osteocalcina y la sialoproteína de hueso, siendo marcadores de osteoblastos maduros. Sin embargo, en los resultados obtenidos en este estudio, la osteocalcina se expresa a tiempos cortos, lo que podría indicar una maduración temprana de los osteoblastos.

El hecho de que haya un incremento en la expresión de osteocalcina a los dos días en el grupo tratado solamente con P17 sugiere que este péptido actúa no solamente mediante la inhibición de TGF- β 1 sino que también interacciona de alguna manera con otros componentes biológicos que afectan a la respuesta de los osteoblastos. El estudio de estas interacciones queda fuera del alcance de este estudio, aunque se está planificando realizar estudios futuros en esta línea.

En referencia al marcador Cbfa1 o RUNX2, es expresado de forma temprana en el linaje osteoblástico y es necesario para el desarrollo de tejidos mineralizados (Franceschi 1999). La expresión de RUNX2 se muestra normalmente al inicio de la diferenciación y es esencial para el linaje de los osteoblastos a partir de células mesenquimales estromales. Así se muestra también en los resultados de nuestro estudio, en el cual la expresión de esta proteína es alta desde el principio tanto en el grupo control como en los grupos tratados con los péptidos, siendo inferior en el grupo de TGF- β 1. RUNX2 juega un papel esencial en el proceso de formación ósea y maduración osteoblástica; es por ello que determinamos su expresión en el qPCR. La

expresión de RUNX2 a las 24 horas es menos de la mitad en el grupo control, que en los grupos tratados con péptidos, expresión que sigue siendo mayor que en el grupo control y en el grupo tratado solamente con TGF- β 1, que es el que menor expresión muestra. Por otra parte, el hecho de que el grupo TGF- β 1+P17 aumente tanto a los dos días pero el grupo control no aumente hasta pasados cuatro días, sugiere que el tratamiento con el péptido P17 puede acelerar la expresión de RUNX2 y, así, la diferenciación osteoblástica.

Durante la diferenciación osteoblástica, RUNX2 regula la expresión de proteínas de matriz ósea, como el colágeno tipo I. El colágeno tipo I es la proteína de la matriz que más se produce durante la proliferación de osteoblastos y la que se encuentra más abundantemente en la matriz ósea (Elkheldir et al. 2018). Se trata del principal marcador de la diferenciación osteoblástica e interviene en la síntesis de la matriz extracelular (George et al. 2006). La función principal de los osteoblastos diferenciados es la síntesis de colágeno. En nuestro estudio, la expresión del colágeno tipo I es mayor en las células tratadas con TGF- β 1+P17 y P17 que el grupo control. Este aumento ya es notorio las primeras 6 horas, 24 horas y dos días respecto al grupo control. El incremento de la expresión del colágeno tipo I sugiere que el tratamiento con los péptidos inhibidores de TGF- β 1 promueven la deposición de matriz extracelular.

A los cuatro días se produce un aumento de la expresión de colágeno tipo I en el grupo control, aunque cabe destacar que también sigue aumentando en los grupos de estudio, con diferencias significativas. Estos resultados sugieren que los péptidos, en especial P17, provocan un incremento en la expresión del colágeno, lo que podría implicar una aceleración en la diferenciación osteoblástica, siendo ésta más temprana que en condiciones normales.

El colágeno tipo I es un parámetro clave para la determinación de la diferenciación celular osteoblástica, pero no es exclusivo de los osteoblastos; es por ello que quisimos determinar también la expresión de osteocalcina y de fosfatasa alcalina, marcadores más específicos de la formación y mineralización óseas.

La fosfatasa alcalina es una enzima que se utiliza para identificar los precursores de los osteoblastos y se encuentra en osteocitos jóvenes (Bonucci & Nanci 2001). Se ha

comprobado *in vitro* que TGF- β 1 inhibe la actividad de ALP (Janssens et al. 2005a). La fosfatasa alcalina es un marcador temprano de los osteoblastos y participa en las primeras etapas de la osteogénesis. En el estudio de zur Nieden et al (zur Nieden et al. 2003), la actividad de ALP se mostró incrementada hacia el día 12 de cultivo, mostrando un pico de expresión a la cuarta y quinta semana. En nuestro estudio, a los 7 días, los grupos tratados con los péptidos P17, y en especial P144, muestran los valores más elevados de actividad de ALP. Estos resultados sugieren que los péptidos están actuando y promueven la diferenciación osteoblástica. El hecho de presentar valores más altos que el grupo control podría indicar que el tratamiento de las células MC3T3-E1 con los péptidos P17 y P144 promueve una aceleración en la actividad de la ALP. Además, el descenso que se produce en el grupo control a los 14 días, también se produce en el grupo tratado con P17, aunque en menor medida. Sin embargo, en el grupo tratado con P144 se observa un incremento en la actividad de la ALP, lo que plantearía que el tratamiento de las células con este péptido promueve la diferenciación osteogénica.

Se observa una mejor respuesta de P17 en qPCR y una mayor actividad de ALP con el P144, lo que podría ser debido a que los tiempos de estudio son distintos. En qPCR el tiempo máximo de estudio fueron 4 días, mientras que en la ALP los tiempos fueron 7, 14 y 21 días. Estos resultados indican que los dos péptidos podrían tener efectos distintos en las células y afectar a la respuesta celular en estadios diferentes.

9.2 Discusión de los resultados del segundo estudio.

En nuestro trabajo utilizamos dos péptidos que podrían inhibir la acción de TGF- β 1 en modelo de cultivo celular. El siguiente paso sería funcionalizar las superficies de titanio. Existen referencias previas en las que se han realizado funcionalizaciones de estas superficies utilizando el péptido P17 (Sevilla et al. 2016a). Es por este motivo que en este trabajo de tesis nos centramos en la funcionalización de la superficie con el péptido P144 para no ser repetitivos en los resultados encontrados por investigadores de nuestro grupo de trabajo. Por ello, en referencia a los resultados obtenidos en nuestro segundo estudio *in vitro*, las superficies biofuncionalizadas con MP144

inhibieron la expresión de p-SMAD2 y, por tanto, la ruta de señalización de TGF- β 1. En condiciones normales, la p-SMAD2 es activada por el TGF- β 1, que interacciona con Runx2, suprimiendo la expresión de Runx2, colágeno tipo I, ALP y osteocalcina por un mecanismo autoregulatorio de feedback (Janssens et al. 2005). La formación ósea es un proceso de desarrollo cuidadosamente controlado que implica señales morfogenéticas mediadas seguidas de la inducción de programas de diferenciación específicos de células que producen condrocitos y osteoblastos (Franceschi 1999).

Las superficies experimentales de CP-Ti biofuncionalizadas con el péptido P144 promovieron la diferenciación osteoblástica en células MC3T3-E1 y en células mesenquimales humanas, así como una reducción de la expresión de marcadores fibroblásticos en células NIH/3T3 fibroblásticas.

Las superficies de CP-Ti funcionalizadas con el péptido mostraron un efecto osteoinductivo fuerte que promovió la expresión de todos los marcadores osteoblásticos. De hecho, las células osteoprogenitoras mostraron un incremento en la producción de marcadores osteoblásticos en las superficies con péptido en comparación con las superficies control.

El proceso de diferenciación celular es una combinación de múltiples acontecimientos complejos. Tras un determinado estímulo, las células indiferenciadas son inducidas a adquirir fenotipos específicos, en su mayoría, al expresar genes que codifican un conjunto de proteínas únicas para un tipo determinado de células (Ogata et al. 1993).

Los estudios sobre el papel de TGF- β 1 en relación a la osteogénesis ya citados previamente (Aspenberg et al. 1996; Tieline et al. 2002; Mohammad et al. 2009), encontraron una relación negativa entre TGF- β 1 y la formación ósea.

La expresión de colágeno en las células MC3T3-E1 mostró valores especialmente altos a los 7 días de cultivo en el grupo tratado con el péptido. Al ser el colágeno el primer marcador de la diferenciación osteoblástica, estos resultados sugieren que se produce una diferenciación osteoblástica más temprana cuando inhibimos TGF- β 1 con el péptido anclado a la superficie de titanio.

Los osteoblastos derivan de células mesenquimales madre no diferenciadas. Después de la diferenciación en osteoblastos, las células mesenquimales expresan fenotipos relacionados con la diferenciación, como son un alto nivel de fosfatasa alcalina, colágeno tipo I, osteocalcina y otras proteínas óseas de matriz no colagénicas. La expresión de los genes que codifican estas proteínas puede ser regulada por muchos moduladores, como es el caso de las citoquinas (Ogata et al. 1993).

Los valores de RUNX2 también son más elevados en las superficies CP-Ti biofuncionalizadas, con diferencias significativas, a los 14 días de cultivo; normalmente, la expresión de RUNX2 se observa justo después de la producción de colágeno. Estos resultados concuerdan con los del estudio citado previamente (Mohammad et al. 2009), donde mostraron que la inhibición de TGF- β 1 inducía la expresión de RUNX2, promoviendo la diferenciación osteoblástica.

La expresión de fosfatasa alcalina y de osteocalcina se organiza de forma secuencial en el tiempo en condiciones normales. En nuestro estudio, las superficies funcionalizadas con MP144 muestran mayor producción de ALP y OC comparado con las superficies CP-Ti control.

En cuanto a la expresión de marcadores fibroblásticos, TGF- β 1 se ha visto relacionado con patologías fibróticas, no solamente en el hígado, sino también en el útero, induciendo la diferenciación fibroblástica, como la fibronectina (Szóstek-Mioduchowska et al. 2018). En nuestro estudio, las superficies de CP-Ti con MP144 mostraron los valores más bajos de expresión de fibronectina en las células fibroblásticas NIH3T3 a los 7 días de cultivo. También se ha relacionado a TGF- β 1 con una producción excesiva de α -SMA y de tejido fibrótico (Satish et al. 2011); en nuestro estudio, las superficies biofuncionalizadas muestran los valores más bajos de estos marcadores a los 7 días de cultivo.

TGF- β 1 interacciona con una amplia gama de otros factores de crecimiento y hormonas en el hueso, generando una red de intercomunicación intercelular y así provocando una respuesta compleja (Janssens et al. 2005). Las metaloproteasas de la matriz (MMPs) son inducidas por TGF- β 1 y se relacionan con la actividad fibroblástica y de la matriz extracelular, siendo una familia de enzimas secretadas por células

inflamatorias como los fagocitos y células del tejido conectivo. En nuestro estudio, las superficies funcionalizadas con el péptido no tuvieron efectos significativos en la expresión de las MMPs por parte de los fibroblastos.

Estos péptidos han sido probados para adherirse a superficies CP-Ti manteniendo su bioactividad; la funcionalización de superficies de titanio con el péptido P17 también fue desarrollada, ofreciendo resultados similares (Sevilla et al. 2016a). En nuestro estudio, esta inmovilización peptídica en la superficie de CP-Ti estimuló una respuesta celular *in vitro* caracterizada por la reducción de la diferenciación de fibroblastos y el incremento de los marcadores osteoblásticos.

9.3 Discusión de los resultados del tercer estudio.

En referencia a los resultados del estudio de implantes *in vivo*, el principal objetivo de nuestra investigación era comparar los efectos en la respuesta ósea peri-implantaria de implantes dentales biofuncionalizados con péptidos inhibidores de TGF- β 1 respecto a implantes no biofuncionalizados, utilizados como control. Para imitar la situación clínica habitual, los implantes fueron insertados en áreas desdentadas ya cicatrizadas de premolares inferiores en mandíbula de perro Beagle ocho semanas después de realizadas las exodoncias, puesto que es un modelo ampliamente validado en la literatura.

Existe una variación considerable en los modelos experimentales y los métodos aplicados en el análisis de la osteointegración de implantes. Los experimentos *in vivo* citados previamente (Aspenberg et al. 1996; Tieline et al, 2002) fueron llevados a cabo utilizando ratones, mientras que (Nikolidakis et al. 2009) utilizó cabras como modelo animal. Colaboradores de nuestro grupo (Godoy-Gallardo et al. 2016); (Barba et al. 2017); (Gallardo-Calero et al, in press), y nosotros mismos (Hsu et al. 2017) tenemos experiencias de trabajo en regeneración ósea utilizando mandíbula de perro como modelo de experimentación animal. La semejanza histomorfométrica del hueso humano y el de Beagle ha sido reportada (Arisan et al. 2010); (Schmitt et al. 2016); (Chang et al. 2016), incluso cuando existe una considerable variabilidad en los métodos

utilizados para medir el contacto entre los tejidos óseos y el perfil de los implantes (Aparicio et al. 2011); (Vivan Cardoso et al. 2013);(Cardoso et al. 2014).

BIC representa una medición cuantitativa que ha sido utilizada por muchos autores como medición de la osteointegración y la utilización de BS-SEM es un método simple, altamente discriminativo y menos costoso para la determinación del BIC. Nuestros resultados de BIC, basados en la metodología descrita por Manresa y colaboradores (Manresa et al. 2014), constituyen una medición sistemática y no subjetiva del contacto óseo de la superficie del implante y están de acuerdo con estudios similares. (Janner et al. 2018).

La formación ósea alrededor de los implantes medida por el análisis cuantitativo de las imágenes de BS-SEM fue significativamente mayor en los implantes biofuncionalizados con P17, a las cuatro y ocho semanas después de la implantación. Nuestro análisis se basa en el concepto de "*Bone fraction*", definido por Cardoso et al 2014 (Cardoso et al. 2014) como "*Relative Bone Fraction*" y por Cutando et al 2008 (Cutando et al. 2008) que representa tanto el hueso de la cortical preexistente como el hueso recién formado en un área de 1,5x2mm situada a 2mm de distancia de la superficie del implante. Los análisis histomorfométricos de BIC, BF e IB mostraron valores superiores en el grupo biofuncionalizado con P17 en la etapa inicial de cicatrización (2 semanas) y osteointegración temprana tanto a las 4 como las 8 semanas post-implantación. En referencia al grupo biofuncionalizado con P144, los valores histomorfométricos obtenidos también son altos pero su incremento parece más estable durante los tres tiempos de estudio. Nuestros resultados cuantitativos están de acuerdo con los reportados por otros autores (Aparicio et al. 2011) (Cardoso et al. 2014) y, por tanto, proporcionan la primera prueba de capacidad de las propiedades de promoción osteogénica de la caracterización de superficies. Sin embargo, estas medidas cuantitativas no reflejan la calidad de los tejidos en contacto con el implante.

Para ello, examinamos las muestras con detalle mediante el BS-SEM. La observación por BS-SEM muestra los tejidos calcificados, a diferentes niveles de blanco, dependiendo de la concentración de calcio presente, así como las líneas cementantes y el tamaño y forma de las lagunas celulares (López-López et al. 2009; Manresa et al.

2014). El análisis por microscopía electrónica de barrido de las imágenes sumativas de las secciones de los implantes a las dos semanas de la implantación representa el hueso en contacto con ambas superficies del implante como trabéculas escasas y delgadas en el primer período postoperatorio, que son más gruesas y más numerosas en los implantes biofuncionalizados.

El análisis de los tejidos involucrados en la primera fase de la osteointegración de los implantes muestra un alto nivel de actividad osteoclástica alrededor del hueso presente en las paredes internas de la trabéculas óseas, así como numerosos vasos recién formados conectando los presentes en el hueso de la cortical preexistente con los vasos situados entre las trabéculas que constituyen la respuesta tisular peri-implantaria y la respuesta tisular perióstica suprayacente al implante (Pardali & Dijke 2009); (Hu et al. 2018); (Bigueti et al. 2018). Las imágenes de los implantes biofuncionalizados muestran que los vasos nuevos se orientan radialmente en el hueso haversiano de la cortical preexistente, mientras que en el hueso nuevo recién formado peri-implantario los vasos se disponen paralelos a la superficie del implante. Se ha reportado la neovascularización alrededor de los implantes experimentales, así como los cambios en la orientación de los vasos que contribuyen a la formación de la matriz ósea mineralizada (Delgado-Ruiz et al. 2015). La reabsorción ósea osteoclástica ocurre alrededor de la superficie de titanio y juega un papel importante en el logro de la reparación tisular post quirúrgica y el posterior desarrollo de la estabilidad secundaria u osteointegración de los implantes (Zhao et al. 2007).

Los resultados histológicos demuestran la presencia de células de revestimiento óseo en el área peri-implantaria en las primeras etapas de osteointegración, demostrando además que la orientación de la aposición ósea alrededor del implante depende de la distribución de tensión mecánica descrita por algunos autores. (Takano et al. 1999). Los osteoblastos aún permanecen activos en nuestras muestras al final del experimento: se observa un depósito activo de la matriz ósea no calcificada en el borde interno de los canales vasculares ocho semanas después de la implantación en los implantes biofuncionalizados con P17. Además, las diferencias en la coloración de l hueso muestran que la aposición ósea aún se mantiene, tanto en las muestras de P17 y, con menor intensidad, en las muestras del grupo control y de P144.

La proliferación, deposición de matriz extracelular y posterior maduración y mineralización son los pasos principales que componen la osteogénesis.

Estos resultados cuantitativos y cualitativos sugieren que los efectos positivos de la biofuncionalización en el proceso de la osteointegración podrían ser no sólo inmediatos (por medio de la neoangiogénesis y/o la neoformación trabecular) sino también a medio o largo plazo (por la remodelación lamelar), como describieron algunos autores previamente. (Martino et al. 2015) and (Bigueti et al. 2018).

Las muestras del grupo tratado con el péptido P17 muestran valores mayores de BIC, BF e IB que el grupo del otro péptido, P144. Además, la neovascularización de las muestras de P17 muestra un patrón activo y lleva a una osteointegración más temprana que la que se observa en los grupos control y P144. Las diferencias en los resultados entre los grupos de implantes biofuncionalizados podría deberse al hecho de que las superficies adhieren al péptido P17 aproximadamente un 30% más que al péptido P144 debido a sus propiedades físico-químicas. La mayor hidrofilia de P17 comparado al P144 podría ser otro factor causal (Sevilla et al. 2016a).

La literatura disponible con respecto a los péptidos inhibidores de TGF- β 1 es limitada, de modo que los resultados de este estudio se tienen que tomar con cautela. Son necesarios más estudios experimentales con respecto a la acción de la biofuncionalización con los péptidos bioactivos y sus efectos en la osteointegración.

9.4 Discusión de los resultados del cuarto estudio.

El principal objetivo de esta investigación fue comparar los efectos del crecimiento y la osteointegración en modelo post-extracción *in vivo*, de un injerto óseo sintético ampliamente utilizado (Maxresorb®) en comparación a el mismo material modificado mediante biofuncionalización con el péptido anti-TGF- β 1, P144. Los biomateriales fueron insertados en los alvéolos post-extracción de las raíces distal de los segundos y terceros premolares mandibulares de los perros Beagle. Se sabe que el objetivo de esta técnica es limitar la reabsorción alveolar y la pérdida ósea, así como preservar la cantidad mayor de masa ósea posible para la colocación de implantes (Avila-Ortiz et al. 2014).

A pesar de las limitaciones, la investigación animal ha sido un buen modelo para el desarrollo de nuevos biomateriales para la ingeniería de tejidos óseos (Ebrahimi et al. 2017). Los estudios *in vivo* demostraron que los fosfatos cálcicos (CaP) son seguros y son una alternativa efectiva a los aloinjertos sin los inconvenientes asociados como la respuesta inmune o la transmisión de enfermedades (Owen et al. 2017). El uso de materiales aloplásticos puede ofrecer un procedimiento útil para evitar estos riesgos (Stein et al. 2009). Las propiedades osteoconductoras de los fosfatos tricálcicos bifásicos se han mejorado con características osteoinductivas por medio de la modulación de sus propiedades físico-químicas (Barba et al. 2017).

Los fosfatos cálcicos osteoconductoras se diseñan para provocar el anclaje, la proliferación, migración y diferenciación de las células óseas, y para conducir a la aposición directa de hueso nuevo sobre el material bioactivo. La superficie del biomaterial implantado adsorbe las proteínas ciculantes que atraen a los osteoclastos para luego inducir a los osteoblastos a la diferenciación, dando lugar a la producción de matriz mineralizada (Owen et al. 2017).

La remodelación ósea tiene lugar alrededor de los gránulos, empezando por la reabsorción de sus componentes de calcio y fosfato. Así, la integración de los gránulos del biomaterial con la estructura ósea está constantemente en progreso. Esta interfase es altamente dinámica, involucrando la biología ósea y la fisiopatología, los factores biomecánicos subyacentes y el factor del nicho (los vasos circundantes, los factores bioquímicos, el estado nutricional, etc). La remodelación ósea está dirigida a "*restitutio ad integrum*" resultando en un crecimiento óseo organizado y mineralizado a expensas del injerto (Daculsi et al. 2003). Como resultado final, los materiales bioactivos forman una unión directa con el hueso huésped. Los períodos de cicatrización utilizados para nuestro estudio, 2, 4 y 8 semanas, fueron seleccionados para demostrar las fases tempranas de remodelación ósea y determinar la progresión del hueso mientras interactúa con los diferentes injertos óseos.

Se ha descrito una correlación negativa entre la presencia de TGF- β 1 y la formación ósea en experimentos *in vivo* (Aspenberg et al. 1996; Tieline et al. 2002). Además, se encontró una capa fibrótica alrededor de la superficie después de la inserción de

implantes dentales cargados con TGF- β 1 (Nikolidakis et al. 2009). Sin embargo, los experimentos *in vitro* demostraron que TGF- β 1 suprime la diferenciación osteoblástica de las células de la médula ósea, mientras que su inhibición libera a las células estromales de su diferenciación, facilitando la formación de osteoblastos diferenciados (Takeuchi et al. 2010). Además, TGF- β 1 se ha relacionado con los procesos celulares para la cicatrización de heridas, así como con la regulación de los procesos inflamatorios (Cornelini et al. 2003). Eso llevó a nuestro grupo a investigar la biofuncionalización de los implantes dentales de titanio con péptidos inhibidores de TGF- β 1, que ha resultado en la aceleración de la diferenciación de células osteoprogenitoras *in vitro*.

Se han propuesto diversas técnicas de preservación alveolar después de la extracción dental, aunque ninguna ha sido demostrada como la *gold standard*. Además, se puede producir un aumento de la pérdida ósea debido a patología endodóntica, infección, granuloma periapical, periodontitis o exodoncia traumática (Mahesh et al. 2015). La preservación alveolar con sustitutos óseos aloplásticos de fosfatos de calcio ha demostrado mayor sustitución del injerto y una regeneración ósea incrementada cuando se compara con el xenoinjerto anorgánico bovino (Mahesh et al. 2015). Nuestros resultados sugieren que la biofuncionalización de un material de fosfato tricálcico bifásico con P144 tiene un efecto aditivo, estimulando tanto la osteoconducción como la osteoinducción evitando la pérdida de hueso fisiológica debida a la exodoncia.

Aunque el BIC representa una medición cuantitativa que ha sido utilizada por muchos autores como medida de osteointegración, no se ha propuesto una medición sistemática, estandarizada, objetiva ni sistemática para evaluar los tejidos óseos en contacto con la superficie de los fragmentos del biomaterial. Alt et al (Alt et al. 2016) y Ding et al (Ding et al. 2016) propusieron el análisis histomorfométrico mediante imágenes histológicas, pero utilizaron diferentes parámetros para las Regiones de Interés (ROIs). Nuestro análisis se desarrolló también utilizando todo el perímetro del defecto alveolar representado en la imagen por cosido (*stitching*) de la muestra. El ROI seleccionado corresponde al contorno del defecto alveolar, excluyendo los tejidos óseos constituyentes del perfil de la pared cortical alveolar. Después, el área de

gránulos de biomaterial se midió, y se cuantificaron también los tejidos óseos nuevos alrededor de los gránulos. Los valores que llegaron a significaciones estadísticas fueron el Volumen de hueso neoformado (NBV), definido como el porcentaje de tejido óseo nuevo en el RoI, y el NBV/TVol, es decir, la ratio de hueso nuevo mineralizado en el RoI después de restar el área correspondiente a los gránulos del biomaterial, estimada de las secciones analizadas. Este análisis cuantitativo de las imágenes histológicas de cosido (*stitching*) se parece al método descrito por Bakhshalian et al (Bakhshalian et al. 2018). Estos autores excluyeron de su análisis el hueso cortical, y restaron el perfil de los gránulos del biomaterial calculando el Volumen Total del RoI. Además, estos cálculos se realizan sin tener en cuenta información valiosa que podría ser aplicada al análisis de la osteointegración de los biomateriales de gránulos, como el número de trabéculas (Tb.N), la separación trabecular (Tb.Sp), el grosor trabecular (Tb.Th) y especialmente el factor patrón trabecular (Tb.Pf), como se reporta en el estudio de Blouin et al (Blouin et al. 2006) utilizando la “Nomenclatura Estandarizada de Histomorfometría Ósea” que fue establecida por Parfitt et al en 1987 (Parfitt 1987; Parfitt et al. 2009) para evaluar la remodelación ósea (Dempster et al. 2013).

Nuestros resultados histomorfométricos mostraron un comportamiento mejor en el injerto biofuncionalizado con P144 con respecto al injerto no tratado. Sin embargo, nuestras observaciones histológicas y de BS-SEM han demostrado la importancia del contacto entre el hueso de la cortical alveolar y los tejidos óseos nuevos depositados alrededor de los gránulos del biomaterial. Las conexiones entre las trabéculas óseas recientemente formadas son importantes para evaluar la calidad del hueso que está llenando el espacio alveolar y así valorar el anclaje óseo para la futura colocación del implante.

Nuestros resultados a tiempos tempranos de cicatrización (dos semanas) muestran valores mayores en el grupo experimental. Mientras que el grupo control muestra un incremento lineal de crecimiento óseo, nuestro grupo tratado muestra valores disminuidos a las cuatro semanas; esta reducción podría ser explicada gracias a nuestros resultados cualitativos (histología y BS-SEM): a mayor magnificación, el injerto biofuncionalizado con el péptido muestra más espacios vasculares en el defecto alveolar. Esta neovascularización permite que los gránulos sean invadidos por vasos y

facilita la adsorción de proteínas. De hecho, este fenómeno se puede observar por el cambio de color que adoptan los fragmentos, la misma tonalidad verde intensa que los tejidos óseos de su alrededor.

Dos semanas después de la cirugía, los tejidos calcificados que rodean el biomaterial se observan mediante el análisis de microscopía óptica y electrónica de barrido, que ayuda a explicar los resultados numéricos del análisis presentado en las tablas 4 y 5. Así, las propiedades osteoconductoras del biomaterial permiten la aproximación de los gránulos a la cortical preexistente; los gránulos están en contacto con el hueso nuevo empezando a crecer a su alrededor.

A las cuatro semanas, los gránulos biofuncionalizados muestran una estructura ósea densa en contacto con las corticales preexistentes: los gránulos están siendo integrados a través del defecto alveolar y el hueso nuevamente formado parece más estructurado y compacto que en las semanas anteriores. Estos resultados son coherentes con el análisis numérico presentado, teniendo en cuenta que los resultados cuantitativos no consideraron el hueso de la cortical preexistente.

A las ocho semanas, los valores de crecimiento óseo son similares en ambos grupos. Estos resultados proporcionan la capacidad de promoción y las propiedades de la técnica de biofuncionalización, al menos parcialmente diseñada para atraer células con el fin de inducir su fenotipo a líneas celulares osteogénicas. El análisis de microscopía electrónica de barrido de las secciones representa el crecimiento óseo a expensas de los gránulos; las trabéculas son más gruesas y la aposición de hueso laminar más densa en los injertos biofuncionalizados.

El análisis histológico demuestra la presencia de células óseas en el perímetro de la superficie de los gránulos en una fase temprana de la osteointegración. Las células óseas también se observan al final del experimento, a las ocho semanas: la deposición activa de matriz en los gránulos se observa en gran medida en las muestras biofuncionalizadas. Las diferencias en la coloración del hueso laminar muestran el mantenimiento de la aposición laminar a lo largo del periodo experimental.

Los efectos positivos de la biofuncionalización en la osteointegración de injertos óseos sintéticos podrían ser no sólo inmediatos sino también a medio y largo plazo, gracias a la aposición trabecular y la remodelación laminar, tal y como describieron Martino et al (Martino et al. 2015) y Bigueti et al (Bigueti et al. 2018).

Las diferencias en la técnica quirúrgica, el trauma quirúrgico y la duración del procedimiento pueden influenciar en la tasa de reabsorción y la respuesta biológica (Ebrahimi et al. 2017). Además, la heterogeneidad en la morfología de los defectos alveolares tiene que tenerse en cuenta. La literatura limitada disponible respecto a los péptidos inhibidores de TGF- β 1 sobre organización ósea obliga a tomar estos resultados con cautela. Se requieren más estudios de investigación sobre la biofuncionalización con péptidos bioactivos, como estos péptidos inhibidores de TGF- β 1 y sobre sus efectos en la osteointegración.

Nuestro trabajo no está exento de limitaciones. El efecto de TGF- β 1 en osteogénesis *in vitro* es altamente dependiente de muchas condiciones experimentales y es el resultado final de muchos factores de interacción. El factor clave para la futura investigación *in vitro* es controlar cuidadosamente la mayoría de estos factores y minimizar la variabilidad experimental. Por lo tanto, se requieren más estudios para dilucidar las funciones exactas de TGF- β 1 en el hueso y su papel como agente terapéutico anabólico.

Estas observaciones discordantes se pueden atribuir a las diferencias en el sistema de modelo celular osteoblástico (tumorigénicos vs no tumorigénicos), condiciones del cultivo, densidad celular, concentración de TGF- β 1 y la presencia de otros factores de crecimiento.

Aunque el presente ensayo es un estudio preliminar, se podría sugerir un tratamiento con P17 los primeros días y un uso posterior de P144 hacia la primera semana de tratamiento en regeneración ósea, si se corroboraran estos resultados en ensayos *in vivo*, y si se ajustaran adecuadamente los tiempos.

No obstante, cabe destacar que los grupos tratados con TGF- β 1+P17 y TGF- β 1+P144 muestran resultados diferentes a las células tratadas solamente con P17 o P144. Estos

resultados sugieren que los péptidos podrían estar interaccionando con las células de algún otro modo que no fuera la inhibición de TGF- β 1, estando relacionada con las propiedades fisicoquímicas de los péptidos. El P17 es muy soluble en medios acuosos a pH biológico, de modo que la concentración de P17 en el medio puede ser muy alta si se desea. El P144, por el contrario, es un péptido muy neutro e hidrofóbico, de forma que su solubilidad es muy baja. El péptido puede agregarse y afectar a muchas proteínas hidrofóbicas, presentes en la membrana celular. Estos resultados sólo sugieren que puede haber una interacción directa entre los péptidos y las células, pero se requieren estudios adicionales para dilucidar los efectos concretos de los péptidos y sus causas. Por lo tanto, una profundización en esta línea de trabajo, para futuras investigaciones queda sugerida con el presente trabajo

10 Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* e *in vivo* realizados durante el desarrollo de esta tesis doctoral podemos concluir que:

En respuesta al objetivo general de este trabajo,

- *In vitro*, los péptidos P17 y P144 producen cambios a nivel de la expresión osteogénica en células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas. Estos cambios son positivos en algunos casos, acelerando la expresión de marcadores osteoblásticos y así la diferenciación osteoblástica, aunque debido la heterogeneidad de nuestros resultados, se necesitan más estudios para confirmar una acción más precisa de estos péptidos.
- *In vivo*, la biofuncionalización de la superficie de titanio o de fosfato tricálcico bifásico con péptidos inhibidores de TGF- β 1 produce cambios en la respuesta biológica del entorno cicatricial óseo, consistentes en la aceleración de la diferenciación osteoblástica y en la reducción de la diferenciación fibroblástica.
- En general, la biofuncionalización con péptidos inhibidores de TGF- β 1 puede ser una estrategia utilizada para acelerar los tiempos de cicatrización alrededor de implantes dentales o biomateriales de regeneración. Los resultados de este estudio podrían ser útiles para estudios futuros orientados al análisis de los mecanismos específicos de la biofuncionalización de implantes dentales o biomateriales de regeneración ósea.

En respuesta a los objetivos específicos de este trabajo

- Los péptidos P17 y P144 modifican la acción biológica del factor de crecimiento TGF- β 1, tanto en cultivo celular, como sobre superficies de titanio biofuncionalizadas con dichos péptidos, en respuesta a los objetivos 1 y 2.
- Estos cambios biológicos también se observan en el modelo *in vivo*, observado a través de modificaciones en los parámetros cuantitativos analizados de la osteointegración de los implantes. Los implantes biofuncionalizados con P17 y

P144 presentan neovascularización y neoformación ósea a tiempos más cortos de cicatrización (2 y 4 semanas después de la colocación), que los implantes control, en respuesta a los objetivos 3 y 4.

- La biofuncionalización de injertos óseos sintéticos de fosfatos de calcio bifásicos con el péptido inhibidor P144 acelera la adaptación tisular y la osteointegración del biomaterial, con la consiguiente promoción de formación ósea temprana en el área injertada, en respuesta al objetivo 5.

11 Bibliografía

- A, I.D., Stein, J.M., Fickl, S., Yekta, S.S., Hoischen, U. & Ocklenburg, C. (2009) Clinical Evaluation of a Biphasic Calcium Composite Grafting Material in the Treatment of Human Periodontal Randomized Controlled Clinical Trial. **80**..
- 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**: 155–70.
- Alliston, T., Choy, L., Ducey, P., Karsenty, G. & Derynck, R. (2001) TGF- β -induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO Journal* **20**: 2254–2272.
- Alt, V., Cheung, W.H., Chow, S.K.H., Thormann, U., Cheung, E.N.M., Lips, K.S., Schnettler, R. & Leung, K.S. (2016) Bone formation and degradation behavior of nanocrystalline hydroxyapatite with or without collagen-type 1 in osteoporotic bone defects - An experimental study in osteoporotic goats. *Injury* **47**: S58–S65.
- Anselme, K., Linez, P., Bigerelle, M., Le Maguer, D., Le Maguer, A., Hardouin, P., Hildebrand, H.F., Iost, A. & Leroy, J.M. (2000) The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour. *Biomaterials* **21**: 1567–77.
- Aparicio, C., Padrós, A. & Gil, F.J. (2011) In vivo evaluation of micro-rough and bioactive titanium dental implants using histometry and pull-out tests. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **4**: 1672–1682.
- Arisan, V., Anil, A., Wolke, J.G. & Özer, K. (2010) The effect of injectable calcium phosphate cement on bone anchorage of titanium implants: an experimental feasibility study in dogs. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **39**: 463–468.
- Aspenberg, P., Jeppsson, C., Wang, J.S. & Boström, M. (1996) Transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein 2 for bone ingrowth: a comparison using bone chambers in rats. *Bone* **19**: 499–503.

- Avila-Ortiz, G., Elangovan, S., Kramer, K.W.O., Blanchette, D. & Dawson, D. V (2014) Effect of alveolar ridge preservation after tooth extraction: a systematic review and meta-analysis. *Journal of dental research* **93**: 950–8.
- Bagno, A., Piovan, A., Dettin, M., Chiarion, A., Brun, P., Gambaretto, R., Fontana, G., Di Bello, C., Palù, G. & Castagliuolo, I. (2007) Human osteoblast-like cell adhesion on titanium substrates covalently functionalized with synthetic peptides. *Bone* **40**: 693–9.
- Bakhshalian, N., Abdelhamid, A., Park, Y.J. & Zadeh, H.H. (2018) Histological and Histomorphometric Response to SocketKAP™ and SocketKAGE™ Used for Ridge Preservation and Repair: Results From a Randomized Controlled Clinical Trial. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **76**: 1884–1892.
- Barba, A., Diez-Escudero, A., Maazouz, Y., Rappe, K., Espanol, M., Montufar, E.B., Bonany, M., Sadowska, J.M., Guillem-Marti, J., Öhman-Mägi, C., Persson, C., Manzanares, M.-C., Franch, J. & Ginebra, M.-P. (2017) Osteoinduction by Foamed and 3D-Printed Calcium Phosphate Scaffolds: Effect of Nanostructure and Pore Architecture. *ACS Applied Materials & Interfaces* **9**: 41722–41736.
- Barros, R.R.M., Novaes, A.B., Papalexiou, V., Souza, S.L.S., Taba, M., Palioto, D.B. & Grisi, M.F.M. (2009) Effect of biofunctionalized implant surface on osseointegration: a histomorphometric study in dogs. *Brazilian dental journal* **20**: 91–8.
- Bigueti, C.C., Cavalla, F., Silveira, E.M., Fonseca, A.C., Vieira, A.E., Tabanez, A.P., Rodrigues, D.C., Trombone, A.P.F., Garlet, G.P., Bigueti, C.C., Cavalla, F., Silveira, E.M., Fonseca, A.C., Vieira, A.E., Tabanez, A.P., Rodrigues, D.C., Trombone, A.P.F. & Garlet, G.P. (2018) Oral implant osseointegration model in C57Bl/6 mice: microtomographic, histological, histomorphometric and molecular characterization. *Journal of Applied Oral Science* **26**..
- Blouin, S., Moreau, M.F., Weiss, P., Daculsi, G., Baslé, M.F. & Chappard, D. (2006) Evaluation of an injectable bone substitute (betaTCP/hydroxyapatite/hydroxypropyl-methyl-cellulose) in severely osteopenic and aged rats. *Journal of*

- biomedical materials research. Part A* **78**: 570–80.
- Bonewald, L.F. (2013) *Osteocyte Biology*, Fourth Edi. Elsevier.
- Bonewald, L.F. (2016) The Role of the Osteocyte in Bone and Nonbone Disease. *Endocrinology and Metabolism Clinics of NA*.
- Bonucci, E. & Nanci, A. (2001) Alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase in osteoblasts of normal and pathologic bone. *Italian journal of anatomy and embryology = Archivio italiano di anatomia ed embriologia* **106**: 129–33.
- Bouwman, W.F., Bravenboer, N., Zijderfeld, S.A., Schulten, E.A.J.M. & Bruggenkate, C.M. (2010) The use of Straumann Bone Ceramic in a maxillary sinus floor elevation procedure : a clinical , radiological , histological and histomorphometric evaluation with a 6-month healing period. 201–208.
- Buser, D. (1991) Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants . A histomorphometric study in miniature pigs. **25**: 889–902.
- Cardoso, M.V., Chaudhari, A., Yoshida, Y., Van Meerbeek, B., Naert, I. & Duyck, J. (2014) Bone tissue response to implant surfaces functionalized with phosphate-containing polymers. *Clinical Oral Implants Research* **25**: 91–100.
- CENTRELLA, M., HOROWITZ, M.C., WOZNEY, J.M. & MCCARTHY, T.L. (1994) Transforming Growth Factor- β Gene Family Members and Bone*. *Endocrine Reviews* **15**: 27–39.
- Chang, Y.-C., Ho, K.-N., Feng, S.-W., Huang, H.-M., Chang, C.-H., Lin, C.-T., Teng, N.-C., Pan, Y.H. & Chang, W.-J. (2016) Fibronectin-Grafted Titanium Dental Implants: An *In Vivo* Study. *BioMed Research International* **2016**: 1–11.
- Chen, X., Sevilla, P. & Aparicio, C. (2013) Surface biofunctionalization by covalent co-immobilization of oligopeptides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **107**: 189–197.
- Cornelini, R., Rubini, C., Fioroni, M., Favero, G.A., Strocchi, R. & Piattelli, A. (2003)

- Transforming growth factor-beta 1 expression in the peri-implant soft tissues of healthy and failing dental implants. *Journal of periodontology* **74**: 446–50.
- Cutando, A., Gómez-Moreno, G., Arana, C., Muñoz, F., Lopez-Peña, M., Stephenson, J. & Reiter, R.J. (2008) Melatonin stimulates osteointegration of dental implants. *Journal of Pineal Research* **45**: 174–179.
- Cuzmar, E., Perez, R.A., Manzanares, M.-C., Ginebra, M.-P. & Franch, J. (2015) In Vivo Osteogenic Potential of Biomimetic Hydroxyapatite/Collagen Microspheres: Comparison with Injectable Cement Pastes. *PLOS ONE* **10**: e0131188.
- Daculsi, G. (1998) Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials* **19**: 1473–8.
- Daculsi, G., Laboux, O., Malard, O. & Weiss, P. (2003) Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *Journal of materials science. Materials in medicine* **14**: 195–200.
- Davies, J.E. (2007) Bone bonding at natural and biomaterial surfaces *J*. **28**: 5058–5067.
- Davies, J.E. (2003a) Understanding peri-implant endosseous healing. *Journal of dental education* **67**: 932–49.
- Davies, J.E. (2003b) Understanding peri-implant endosseous healing. *Journal of dental education* **67**: 932–49.
- Davies, J.E., Mendes, V.C., Ko, J.C.H. & Ajami, E. (2014) Biomaterials Topographic scale-range synergy at the functional bone / implant interface. *Biomaterials* **35**: 25–35.
- Delgado-Ruiz, R.A., Abboud, M., Romanos, G., Aguilar-Salvatierra, A., Gomez-Moreno, G. & Calvo-Guirado, J.L. (2015) Peri-implant bone organization surrounding zirconia-microgrooved surfaces circularly polarized light and confocal laser scanning microscopy study. *Clinical Oral Implants Research* **26**: 1328–1337.
- Dempster, D.W., Compston, J.E., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M., Recker, R.R. & Parfitt, A.M. (2013) Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: A 2012 update of

- the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *Journal of Bone and Mineral Research* **28**: 2–17.
- Díaz-Valdés, N., Basagoiti, M., Dotor, J., Aranda, F., Monreal, I., Riezu-Boj, J.I., Borrás-Cuesta, F., Sarobe, P. & Feijóo, E. (2011) Induction of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-10 by TGFbeta1 in melanoma enhances tumor infiltration and immunosuppression. *Cancer research* **71**: 812–21.
- Diez-Escudero, A., Espanol, M., Beats, S. & Ginebra, M.-P. (2017) In vitro degradation of calcium phosphates: Effect of multiscale porosity, textural properties and composition. *Acta Biomaterialia* **60**: 81–92.
- Ding, M., Henriksen, S.S., Theilgaard, N. & Overgaard, S. (2016) Assessment of activated porous granules on implant fixation and early bone formation in sheep. *Journal of Orthopaedic Translation* **5**: 38–47.
- Donath, K. & Breuner, G. (1982) A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *Journal of oral pathology* **11**: 318–26.
- Dotor, J., López-Vázquez, A.B., Lasarte, J.J., Sarobe, P., García-Granero, M., Riezu-Boj, J.I., Martínez, A., Feijóo, E., López-Sagasetta, J., Hermida, J., Prieto, J. & Borrás-Cuesta, F. (2007a) Identification of peptide inhibitors of transforming growth factor beta 1 using a phage-displayed peptide library. *Cytokine* **39**: 106–15.
- Dotor, J., López-Vázquez, A.B., Lasarte, J.J., Sarobe, P., García-Granero, M., Riezu-Boj, J.I., Martínez, A., Feijóo, E., López-Sagasetta, J., Hermida, J., Prieto, J. & Borrás-Cuesta, F. (2007b) Identification of peptide inhibitors of transforming growth factor beta 1 using a phage-displayed peptide library. *Cytokine* **39**: 106–115.
- Ebrahimi, M., Botelho, M.G. & Dorozhkin, S. V (2017) Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA / TCP): Concept , physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. **71**: 1293–1312.
- Elkhidir, Y., Lai, R. & Feng, Z. (2018) The impact of photofunctionalized gold nanoparticles on osseointegration. *Heliyon* **4**: e00662.

- Ellinger, R.F., Nery, E.B. & Lynch, K.L. (1986) Histological assessment of periodontal osseous defects following implantation of hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate ceramics: a case report. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* **6**: 22–33.
- Ezquerro, I.-J., Lasarte, J.-J., Dotor, J., Castilla-Cortázar, I., Bustos, M., Peñuelas, I., Blanco, G., Rodríguez, C., Lechuga, M. del C.G., Greenwel, P., Rojkind, M., Prieto, J. & Borrás-Cuesta, F. (2003) A synthetic peptide from transforming growth factor beta type III receptor inhibits liver fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride liver injury. *Cytokine* **22**: 12–20.
- França, R., Samani, T.D., Bayade, G., Yahia, L. & Sacher, E. (2014) Nanoscale surface characterization of biphasic calcium phosphate, with comparisons to calcium hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate bioceramics. *Journal of Colloid and Interface Science* **420**: 182–188.
- Franceschi, R.T. (1999) The Developmental Control of Osteoblast-Specific Gene Expression: Role of Specific Transcription Factors and the Extracellular Matrix Environment. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **10**: 40–57.
- George, J., Kuboki, Y. & Miyata, T. (2006) Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Into Osteoblasts on Honeycomb Collagen Scaffolds.
- Gil, F.J., Padrós, A., Manero, J.M., Aparicio, C., Nilsson, M. & Planell, J.A. (2002) Growth of bioactive surfaces on titanium and its alloys for orthopaedic and dental implants. *Materials Science and Engineering: C* **22**: 53–60.
- Gil, F.J. Avances tecnológicos en implantología oral: hacia los implantes dentales inteligentes. Real Academia europea de doctores. Barcelona 2018. Isbn 978-84-697-9148-6
- Godoy-Gallardo, M., Manzanares-Céspedes, M.C., Sevilla, P., Nart, J., Manzanares, N., Manero, J.M., Gil, F.J., Boyd, S.K. & Rodríguez, D. (2016) Evaluation of bone loss in antibacterial coated dental implants: An experimental study in dogs. *Materials Science and Engineering: C* **69**: 538–545.

- Gombotz, W.R., Pankey, S.C., Bouchard, L.S., Ranchalis, J. & Puolakkainen, P. (1993) Controlled release of TGF-beta 1 from a biodegradable matrix for bone regeneration. *Journal of biomaterials science. Polymer edition* **5**: 49–63.
- Gruber, R., Varga, F., Fischer, M.B. & Watzek, G. (2002) Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clinical oral implants research* **13**: 529–35.
- Le Guéhennec, L., Soueidan, A., Layrolle, P. & Amouriq, Y. (2007) Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* **23**: 844–54.
- Hanawa, T. (2011) A comprehensive review of techniques for biofunctionalization of titanium. 263–272.
- Hsu, Y.-T., Al-Hezaimi, K., Galindo-Moreno, P., O'Valle, F., Al-Rasheed, A. & Wang, H.-L. (2017) Effects of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 on Vertical Bone Augmentation in a Canine Model. *Journal of periodontology* **88**: 896–905.
- Hu, X.F., Wang, L., Xiang, G., Lei, W. & Feng, Y.F. (2018) Angiogenesis impairment by the NADPH oxidase-triggered oxidative stress at the bone-implant interface: Critical mechanisms and therapeutic targets for implant failure under hyperglycemic conditions in diabetes. *Acta Biomaterialia* **73**: 470–487.
- Imamura, K., Kawasaki, Y., Nagayasu, T., Sakiyama, T. & Nakanishi, K. (2007) Adsorption characteristics of oligopeptides composed of acidic and basic amino acids on titanium surface. *Journal of bioscience and bioengineering* **103**: 7–12.
- Janner, S.F.M., Gahlert, M., Bosshardt, D.D., Roehling, S., Milz, S., Higginbottom, F., Buser, D. & Cochran, D.L. (2018) Bone response to functionally loaded, two-piece zirconia implants: A preclinical histometric study. *Clinical Oral Implants Research* **29**: 277–289.
- Janssens, K., ten Dijke, P., Janssens, S. & Van Hul, W. (2005a) Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocrine reviews* **26**: 743–74.
- Janssens, K., ten Dijke, P., Janssens, S. & Van Hul, W. (2005b) Transforming growth

- factor-beta1 to the bone. *Endocrine reviews* **26**: 743–74.
- Kamitakahara, M., Ohtsuki, C. & Miyazaki, T. (2008) Review Paper : Behavior of Ceramic Biomaterials Derived.
- Kim, K.-H. & Ramaswamy, N. (2009) Electrochemical surface modification of titanium in dentistry. *Dental materials journal* **28**: 20–36.
- Kusafuka, K., Yamaguchi, A., Kayano, T. & Takemura, T. (2001) Immunohistochemical localization of members of the transforming growth factor (TGF)-beta superfamily in normal human salivary glands and pleomorphic adenomas. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* **30**: 413–20.
- Legeros, R.Z. (2002) Properties of Osteoconductive Biomaterials : Calcium Phosphates. 81–98.
- LeGeros, R.Z., Lin, S., Rohanizadeh, R., Mijares, D. & LeGeros, J.P. (2003) Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *Journal of materials science. Materials in medicine* **14**: 201–9.
- Lin, R.Y., Sullivan, K.M., Argenta, P.A., Meuli, M., Lorenz, H.P. & Adzick, N.S. (1995) Exogenous transforming growth factor-beta amplifies its own expression and induces scar formation in a model of human fetal skin repair. *Annals of surgery* **222**: 146–54.
- Llopiz, D., Dotor, J., Casares, N., Bezunartea, J., Díaz-Valdés, N., Ruiz, M., Aranda, F., Berraondo, P., Prieto, J., Lasarte, J.J., Borrás-Cuesta, F. & Sarobe, P. (2009) Peptide inhibitors of transforming growth factor- β enhance the efficacy of antitumor immunotherapy. *International Journal of Cancer* **125**: 2614–2623.
- Lobo, S.E., Livingston Arinze, T., Lobo, S.E. & Livingston Arinze, T. (2010) Biphasic Calcium Phosphate Ceramics for Bone Regeneration and Tissue Engineering Applications. *Materials* **3**: 815–826.
- López-López, J., Chimenos-Küstner, E., Manzanares-Cespedes, C., Muñoz-Sánchez, J., Castañeda-Vega, P., Jané-Salas, E., Alvarez-López, J.-M. & Gimeno-Sanding, A.

- (2009) Histomorphological study of the bone regeneration capacity of platelet-rich plasma, bone marrow and tricalcium phosphate: Experimental study on pigs. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal* **14**: e620-7.
- Lutz, R., Pechtl, C., Nonhoff, J., Weisel, T., Damien, C.J. & Schlegel, K.A. (2012) Biofunctionalization of the implant surface with different concentrations of a synthetic peptide (P-15). 1–6.
- Mahesh, L., Venkataraman, N., Shukla, S., Prasad, H. & Kotsakis, G.A. (2015) Alveolar Ridge Preservation With the Socket-Plug Technique Utilizing an Alloplastic Putty Bone Substitute or a Particulate Xenograft: A Histological Pilot Study. *Journal of Oral Implantology* **41**: 178–183.
- Manresa, C., Bosch, M., Manzanares, M.C., Carvalho, P. & Echeverría, J.J. (2014) A new standardized-automatic method for bone-to-implant contact histomorphometric analysis based on backscattered scanning electron microscopy images. *Clinical Oral Implants Research* **25**: 702–706.
- Martino, M.M., Briquez, P.S., Maruyama, K. & Hubbell, J.A. (2015) Extracellular matrix-inspired growth factor delivery systems for bone regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews* **94**: 41–52.
- Massagué, J. & Wotton, D. (2000) Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *The EMBO journal* **19**: 1745–54.
- Meng, H., Chien, E.Y. & Chien, H. (2016) Dental implant bioactive surface modifications and their effects on osseointegration : a review. *Biomarker Research* 1–14.
- Miyazono, K., ten Dijke, P. & Heldin, C.H. (2000) TGF-beta signaling by Smad proteins. *Advances in immunology* **75**: 115–57.
- Mohammad, K.S., Chen, C.G., Balooch, G., Stebbins, E., McKenna, C.R., Davis, H., Niewolna, M., Peng, X.H., Nguyen, D.H.N., Ionova-Martin, S.S., Bracey, J.W., Hogue, W.R., Wong, D.H., Ritchie, R.O., Suva, L.J., Derynck, R., Guise, T. a & Alliston, T. (2009) Pharmacologic inhibition of the TGF-beta type I receptor kinase has anabolic and anti-catabolic effects on bone. *PLoS one* **4**: e5275.

- Moore, D.C., Chapman, M.W. & Manske, D. (1987) The evaluation of a biphasic calcium phosphate ceramic for use in grafting long-bone diaphyseal defects. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **5**: 356–65.
- Morra, M. (2007) Biomolecular modification of implant surfaces. *Expert review of medical devices* **4**: 361–72.
- Nakanishi, T., Kokubun, K., Oda, H., Aoki, M., Soma, A., Taniguchi, M., Kazuki, Y., Oshimura, M. & Sato, K. (2012) Bioluminescence imaging of bone formation using hairless osteocalcin-luciferase transgenic mice. *Bone* **51**: 369–75.
- Nery, E.B., Lynch, K.L., Hirthe, W.M. & Mueller, K.H. (1975) Bioceramic implants in surgically produced infrabony defects. *Journal of periodontology* **46**: 328–47.
- zur Nieden, N.I., Kempka, G. & Ahr, H.J. (2003) In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation; research in biological diversity* **71**: 18–27.
- Nikolidakis, D., Meijer, G.J., Oortgiesen, D. a W., Walboomers, X.F. & Jansen, J. a (2009) The effect of a low dose of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) on the early bone-healing around oral implants inserted in trabecular bone. *Biomaterials* **30**: 94–9.
- Noda, M. (1989) Transcriptional regulation of osteocalcin production by transforming growth factor-beta in rat osteoblast-like cells. *Endocrinology* **124**: 612–7.
- Novaes, A.B., de Souza, S.L.S., de Barros, R.R.M., Pereira, K.K.Y., Iezzi, G. & Piattelli, A. (2010) Influence of implant surfaces on osseointegration. *Brazilian dental journal* **21**: 471–81.
- Ogata, T., Wozney, J.M., Benezra, R. & Noda, M. (1993) Bone morphogenetic protein 2 transiently enhances expression of a gene, Id (inhibitor of differentiation), encoding a helix-loop-helix molecule in osteoblast-like cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 9219–22.
- Owen, G.R., Dard, M. & Larjava, H. (2017) Review Article Hydroxyapatite / beta-

- tricalcium phosphate biphasic ceramics as regenerative material for the repair of complex bone defects. 1–20.
- Pardali, E. & Dijke, P. (2009) Transforming growth factor-beta signaling and tumor angiogenesis. *Molecular Cell* 4848–4861.
- Parfitt, A.M. (1987) Trabecular bone architecture in the pathogenesis and prevention of fracture. *The American journal of medicine* **82**: 68–72.
- Parfitt, A.M., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M. & Recker, R.R. (2009) Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units: Report of the asbmr histomorphometry nomenclature committee. *Journal of Bone and Mineral Research* **2**: 595–610.
- R, H.J., Lyngstadaas, S.P. & Ellingsen, J.E. (2003) Analysing the optimal value for titanium implant roughness in bone attachment using a tensile test. **24**: 4559–4564.
- Raymond, S., Maazouz, Y., Montufar, E.B., Perez, R.A., González, B., Konka, J., Kaiser, J., Ginebra, M. & Raymond, S. (2018) Accelerated hardening of nanotextured 3D-plotted self-setting calcium phosphate inks. *Acta Biomaterialia*.
- Reyes, C.D., Petrie, T.A., Burns, K.L., Schwartz, Z. & García, A.J. (2007) Biomolecular surface coating to enhance orthopaedic tissue healing and integration. *Biomaterials* **28**: 3228–3235.
- Sadowska, J.M., Wei, F., Guo, J., Guillem-Marti, J., Ginebra, M.-P. & Xiao, Y. (2018) Effect of nano-structural properties of biomimetic hydroxyapatite on osteoimmunomodulation. *Biomaterials* **181**: 318–332.
- Saito, H., Tsujitani, S., Oka, S., Kondo, A., Ikeguchi, M., Maeta, M. & Kaibara, N. (1999) The expression of transforming growth factor-beta1 is significantly correlated with the expression of vascular endothelial growth factor and poor prognosis of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer* **86**: 1455–62.
- Santibañez, J.F., Quintanilla, M. & Bernabeu, C. (2011) TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science* **121**: 233–

251.

- Satish, L., Gallo, P.H., Baratz, M.E., Johnson, S. & Kathju, S. (2011) Reversal of TGF- β 1 stimulation of α -smooth muscle actin and extracellular matrix components by cyclic AMP in Dupuytren's - derived fibroblasts. *BMC Musculoskeletal Disorders* **12**: 113.
- Schmitt, C.M., Koepple, M., Moest, T., Neumann, K., Weisel, T. & Schlegel, K.A. (2016) In vivo evaluation of biofunctionalized implant surfaces with a synthetic peptide (P-15) and its impact on osseointegration. A preclinical animal study. *Clinical Oral Implants Research* **27**: 1339–1348.
- Schouten, C., Meijer, G.J., Van Den Beucken, J.J.J.P., Spauwen, P.H.M. & Jansen, J.A. (2009) Effects of implant geometry, surface properties, and TGF- β 1 on peri-implant bone response: An experimental study in goats. *Clinical Oral Implants Research* **20**: 421–429.
- Serrati, S., Margheri, F., Pucci, M., Cantelmo, A.R., Cammarota, R., Dotor, J., Borràs-Cuesta, F., Fibbi, G., Albinì, A. & Del Rosso, M. (2009) TGF β 1 antagonistic peptides inhibit TGF β 1-dependent angiogenesis. *Biochemical pharmacology* **77**: 813–25.
- Sevilla, P., Gil, J. & Aparicio, C. (2017) Relevant Properties for Immobilizing Short Peptides on Biosurfaces. *IRBM* **38**: 256–265.
- Sevilla, P., Holmberg, K., Rodríguez, D., Gil, J. & Aparicio, C. (2011) Biofunctionalisation of titanium surfaces with TGF- β inhibitor peptides. In: *24th European Conference on Biomaterials - Annual Conference of the European Society for Biomaterials*. .
- Sevilla, P., Vining, K. V., Dotor, J., Rodríguez, D., Gil, F.J. & Aparicio, C. (2016a) Surface immobilization and bioactivity of TGF- β 1 inhibitor peptides for bone implant applications. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* **104**: 385–394.
- Sevilla, P., Vining, K. V., Dotor, J., Rodríguez, D., Gil, F.J. & Aparicio, C. (2016b) Surface immobilization and bioactivity of TGF- β 1 inhibitor peptides for bone implant

- applications. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* **104**: 385–94.
- Shalabi, M.M., Gortemaker, A., Van't Hof, M.A., Jansen, J.A. & Creugers, N.H.J. (2006) Implant surface roughness and bone healing: a systematic review. *Journal of dental research* **85**: 496–500.
- Skaleric, U., Kramar, B., Petelin, M., Pavlica, Z. & Wahl, S.M. (1997) Changes in TGF-beta 1 levels in gingiva, crevicular fluid and serum associated with periodontal inflammation in humans and dogs. *European journal of oral sciences* **105**: 136–42.
- Souchelnytskyi, S., Rönstrand, L., Heldin, C.H. & ten Dijke, P. (2001) Phosphorylation of Smad signaling proteins by receptor serine/threonine kinases. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **124**: 107–20.
- van Steenberghe, D., Jacobs, R., Desnyder, M., Maffei, G. & Quirynen, M. (2002) The relative impact of local and endogenous patient-related factors on implant failure up to the abutment stage. *Clinical oral implants research* **13**: 617–22.
- Steinsvoll, S., Halstensen, T.S. & Schenck, K. (1999) Extensive expression of TGF-beta1 in chronically-inflamed periodontal tissue. *Journal of clinical periodontology* **26**: 366–73.
- Szóstek-Mioduchowska, A.Z., Lukasik, K., Skarzynski, D.J. & Okuda, K. (2019) Effect of transforming growth factor - β 1 on α -smooth muscle actin and collagen expression in equine endometrial fibroblasts. *Theriogenology* **124**: 9–17.
- Takano, Y., Turner, C.H., Owan, I., Lau, T., Forwood, M.R. & Burr, D.B. No Title. 59–66.
- Takata, T., Miyauchi, M., Ogawa, I., Kudo, Y., Takekoshi, T., Zhao, M., Sato, S., Nikai, H. & Komiyama, K. (2000) Immunoexpression of transforming growth factor beta in desmoplastic ameloblastoma. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **436**: 319–23.
- Takeuchi, K., Abe, M., Hiasa, M., Oda, A., Amou, H., Kido, S., Harada, T., Tanaka, O., Miki, H., Nakamura, S., Nakano, A., Kagawa, K., Yata, K., Ozaki, S. & Matsumoto, T. (2010) TGF- β 1 inhibition restores terminal osteoblast differentiation to suppress

- myeloma growth. *PLoS ONE* **5**: e9870.
- Tatakis, D.N., Wikesjö, U.M., Razi, S.S., Sigurdsson, T.J., Lee, M.B., Nguyen, T., Ongpipattanakul, B. & Hardwick, R. (2000) Periodontal repair in dogs: effect of transforming growth factor-beta 1 on alveolar bone and cementum regeneration. *Journal of clinical periodontology* **27**: 698–704.
- Tieline, L., Puolakkainen, P., Pohjonen, T., Rautavuori, J., Törmälä, P. & Rokkanen, P. (2002) The effect of transforming growth factor-beta1, released from a bioabsorbable self-reinforced polylactide pin, on a bone defect. *Biomaterials* **23**: 3817–23.
- Tsourdi, E., Jähn, K., Rauner, M., Busse, B. & Bonewald, L.F. (2018) Physiological and pathological osteocytic osteolysis. **18**: 292–303.
- Tyler, L.W., Matossian, K., Todd, R., Gallagher, G.T., White, R.R. & Wong, D.T.W. (1999) Eosinophil-derived transforming growth factors (TGF- α and TGF- β 1) in human periradicular lesions. *Journal of Endodontics* **25**: 619–624.
- Urist, M.R. (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science (New York, N.Y.)* **150**: 893–9.
- Vivan Cardoso, M., Vandamme, K., Chaudhari, A., De Rycker, J., Van Meerbeek, B., Naert, I. & Duyck, J. (2013) Dental Implant Macro-Design Features Can Impact the Dynamics of Osseointegration. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 1–7.
- Wang, L. & Nancollas, G.H. (2008) Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution. *Chemical reviews* **108**: 4628–69.
- Wikesjö, U.M., Razi, S.S., Sigurdsson, T.J., Tatakis, D.N., Lee, M.B., Ongpipattanakul, B., Nguyen, T. & Hardwick, R. (1998) Periodontal repair in dogs: effect of recombinant human transforming growth factor-beta1 on guided tissue regeneration. *Journal of clinical periodontology* **25**: 475–81.
- Xiong, J., Piemontese, M., Onal, M. & Campbell, J. (2015) Osteocytes , not Osteoblasts or Lining Cells , are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast

Formation in Remodeling Bone. 1–19.

Yamada, S., Heymann, D., Bouler, J.M. & Daculsi, G. (1997) Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate ratios. *Biomaterials* **18**: 1037–41.

YANG, Y., KIM, K. & ONG, J. (2005) A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process?an alternative to plasma spraying. *Biomaterials* **26**: 327–337.

Zhao, G., Raines, A.L., Wieland, M., Schwartz, Z. & Boyan, B.D. (2007) Requirement for both micron- and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography. *Biomaterials* **28**: 2821–9.

https://www.genscript.com/ssl-bin/site2/peptide_calculation.cgi

12 Indicios de calidad

12.1 Publicación de artículo científico

- Título: In vitro cell response on CP-Ti surfaces functionalized with TGF- β 1 inhibitory peptides.
- Autores: Sevilla P, Cirera A, Dotor J, Gil FJ, Galindo-Moreno P, Aparicio C.
- Referencia y DOI: [J Mater Sci Mater Med.](#) 2018 May 23;29(6):73. doi: 10.1007/s10856-018-6082-0.
- Revista: Journal of Materials Science: Materials in Medicine
- Cuartil: Q2
- Ámbito: Engineering, Biomedical
- Factor de impacto: 2,48
- Posición 29/78

JCR Impact Factor			
JCR Year	ENGINEERING, BIOMEDICAL		
	Rank	Quartile	JIF Percentile
2017	29/78	Q2	63.462
2016	29/77	Q2	62.987
2015	27/76	Q2	65.132
2014	25/76	Q2	67.763
2013	26/76	Q2	66.447
2012	30/79	Q2	62.658
2011	21/72	Q2	71.528
2010	20/70	Q2	72.143
2009	25/59	Q2	58.475
2008	34/52	Q3	35.577
2007	21/44	Q2	53.409
2006	20/42	Q2	53.571
2005	23/41	Q3	45.122
2004	24/42	Q3	44.048
2003	27/42	Q3	36.905
2002	22/40	Q3	46.250

12.2 Premio a la Mejor Comunicación Oral de Investigación Básica.

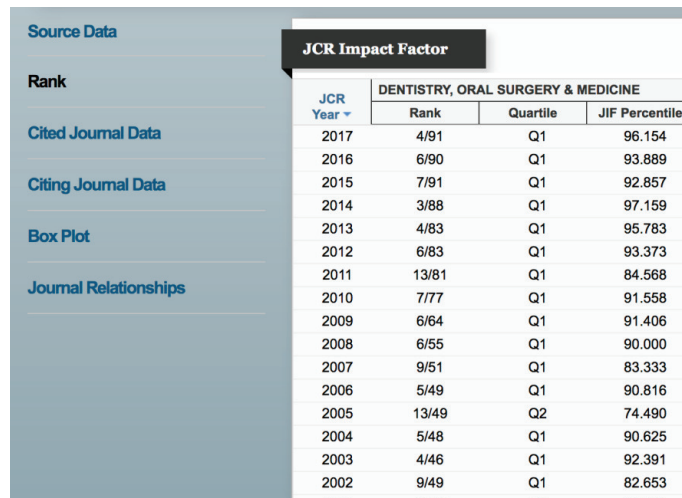
Congreso SECIB 2014.

- Título: “Implicaciones de la inhibición de TGF- β 1 en células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas: estudio in vitro.

- Autores: Cirera Estadella A., Sevilla Sánchez P., Sánchez Fernández E., O'Valle Ravassa F., Galindo Moreno P., Gil Mur J.

12.3 Artículo científico enviado del estudio 3 a COIR

- Título: Osseointegration around dental implants biofunctionalized with TGF-β1 inhibitor peptides: an *in vivo* study in beagle dogs.
- Autores: Cirera A, Manzanares MC, Sevilla P, Franch J, Gil J, Galindo-Moreno P.
- Referencia: enviado.
- Revista: Clinical Oral Implants Research
- Cuartil: Q1



The image shows a screenshot of a JCR Impact Factor table. The table is titled 'JCR Impact Factor' and is for the field 'DENTISTRY, ORAL SURGERY & MEDICINE'. The table has four columns: 'JCR Year', 'Rank', 'Quartile', and 'JIF Percentile'. The data is presented for the years 2002 through 2017. The 'Rank' column shows the journal's position relative to other journals in the field, and the 'Quartile' column indicates the journal's performance relative to other journals in the same field. The 'JIF Percentile' column shows the journal's impact factor relative to other journals in the same field.

JCR Year	Rank	Quartile	JIF Percentile
2017	4/91	Q1	96.154
2016	6/90	Q1	93.889
2015	7/91	Q1	92.857
2014	3/88	Q1	97.159
2013	4/83	Q1	95.783
2012	6/83	Q1	93.373
2011	13/81	Q1	84.568
2010	7/77	Q1	91.558
2009	6/64	Q1	91.406
2008	6/55	Q1	90.000
2007	9/51	Q1	83.333
2006	5/49	Q1	90.816
2005	13/49	Q2	74.490
2004	5/48	Q1	90.625
2003	4/46	Q1	92.391
2002	9/49	Q1	82.653

13 Anexos

13.1 Protocolo del estudio *in vivo*.

13.2 Aprobación del Comité de Ética del estudio *in vivo* en modelo animal

13.3 Aprobación de la Financiación de Tesis Doctoral. Cátedra Universidad de Granada y Klockner®.

13.4 Premio Mejor Comunicación Oral de Investigación Básica.

13.5 Artículos científicos

13.6 Certificado de Originalidad de Tesis Doctoral

CICATRIZACIÓN ÓSEA ALREDEDOR DE IMPLANTES DE TITANIO Y BIOMATERIALES DE REGENERACIÓN ÓSEA BIOFUNCIONALIZADOS CON PÉPTIDOS INHIBIDORES DEL TGF- β 1

BONE HEALING AROUND TITANIUM IMPLANTS AND BONE BIOMATERIALS BIOFUNCTIONALIZED WITH TGF- β 1 INHIBITOR PEPTIDES

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

PALABRAS CLAVE

Implantes dentales, superficie de implantes, biomateriales, biofuncionalización, histomorfometría, osteointegración, TGF- β 1, alvéolos post-extracción.

INVESTIGADORES

Dr. Javier Gil Mur

Dr. Pablo Sevilla Sánchez

Dr. Pablo Galindo Moreno

Andrea Cirera Estadella

OBJETIVOS

- **Objetivo primario:** conocer la acción biológica de superficies de titanio funcionalizadas con péptidos P17 y P144 inhibidores de TGF- β 1 y de biomateriales para regeneración ósea emplazados en alvéolos dentales.
- **Objetivos secundarios:**
 - o Evaluación estadística de cambios significativos en el porcentaje de contacto hueso-implante de los implantes biofuncionalizados respecto a los del grupo control.
 - o Evaluación histológica e histomorfométrica del hueso neoformado en los alvéolos dentales tratados con los péptidos respecto a los del grupo control.
 - o Valorar la influencia de la morfología o diseño macroscópico del implante en la osteointegración.
 - o Evaluación del hueso generado comparando hueso sintético puro con hueso sintético cargado con P144.

JUSTIFICACIÓN

La familia TGF- β (Transforming growth factor beta) es un grupo de citoquinas multifuncionales que juegan un papel principal en cicatrización y reparación de tejidos. TGF- β se encuentra en todos los tejidos, pero es particularmente abundante en hueso, pulmón, hígado y placenta.¹

TGF- β 1 está implicado en el control de la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de muchos tipos celulares. Tiene influencia en procesos diversos como la embriogénesis, angiogénesis, inflamación y reparación de heridas. En el tejido esquelético, TGF- β 1 está implicado en el desarrollo y mantenimiento, afectando tanto al metabolismo del cartílago como del hueso.²

La inhibición de TGF- β es una estrategia prometedora para inhibir efectos indeseados como una producción excesiva de tejido fibroso, o para la aceleración de la actividad osteoblástica y osteoclástica.^{16,17} La inhibición de TGF- β abre una nueva perspectiva para mejorar la regeneración ósea y la integración de los implantes.

La citoquina TGF- β 1 es la principal responsable de la producción de tejido fibroso en múltiples órganos¹⁸, por lo que la inhibición de esta citoquina, mediante la aplicación de péptidos antagonistas del TGF- β 1, podría generar la disminución o completa desaparición de la fibrointegración de los implantes o incluso la aceleración de la oseointegración.

Una reducción o desaparición de la capa de tejido fibroso entre hueso e implante podría suponer un acortamiento en los tiempos de integración de implantes, así como una mejor osteointegración.

METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

1) Diseño del estudio:

El estudio se realizará sobre 12 hemimandíbulas de 6 perros Beagle.

Los tiempos de sacrificio serán a las 2, 4 y 8 semanas y se sacrificarán 2 perros por tiempo.

Se colocarán un total de 36 implantes y se hemiseccionarán 36 premolares para los grupos de regeneración de alvéolos.

En la primera cirugía se realizará la desdentación. Se hemiseccionarán los premolares de cada hemimandíbula y se extraerá cuidadosamente la raíz mesial del 2º, 3º y 4º premolar mandibular, exponiendo la mitad del alvéolo dental. A la sección de los premolares que se conserven en boca se les realizará el tratamiento de conductos o endodoncia para su conservación. Este procedimiento se realizará bajo anestesia general.

- Se suministrará a los animales analgésicos y antibióticos en el postoperatorio.

En la segunda cirugía se realizará la colocación de implantes, en condiciones de asepsia, mediante la preparación de un campo estéril en un gabinete dental preparado para cirugía oral.

- La colocación de implantes en las mandíbulas desdentadas, realizando una incisión en la región molar. La elevación de colgajo será a espesor total, se realizará una osteotomía cuidadosa, con el fin de obtener una zona desdentada suficiente para la colocación de 3 implantes en cada hemimandíbula. El fresado respetará el sistema indicado según la casa comercial. Los implantes se colocarán tal que el margen del cuello pulido con la superficie rugosa quede a nivel de la cresta ósea. Se colocará el tapón de cierre encima del implante. Después del cierre de la herida mediante suturas interrumpidas realizadas con sutura sintética Supramid 4/0, se permite la cicatrización de las localizaciones durante 2, 4 y 8 semanas.
- Se extraerán las raíces distales que se habían endodonciado y se colocará el hueso sintético. Se cubrirá con una membrana y se suturará con Supramid 4/0.

2) Grupos de estudio

Implantes:

- Implante control
- Implante biofuncionalizado con P17
- Implante biofuncionalizado con P144

Regeneración ósea:

- Alvéolo tratado con hueso sintético Klockner
- Alvéolo tratado con hueso sintético Klockner + P144
- Alvéolo tratado con hueso sintético Mimetiss

El estudio se realizará a doble ciego, el histopatólogo que realice la histología y histomorfometría desconocerá cuál es la superficie del implante que evalúa y los datos serán interpretados por un analista que desconocerá a qué grupo pertenece cada superficie.

3) Descripción de los implantes

Los implantes tendrán un diámetro de 3.5 mm y una longitud de 8 mm. Serán de conexión interna.

4) Animales, sacrificio, procesamiento histológico y análisis histomorfométrico.

- Animales:
- Se intervendrán 6 perros Beagle adultos
- Los animales se tratarán y sacrificarán en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona. Los animales pasarán un período de aclimatación de al menos 15 días de forma previa a la cirugía de colocación de los implantes una vez llegados al centro de experimentación de animales.

- Tanto el mantenimiento de los animales como todos los procedimientos del estudio se realizarán bajo la supervisión y la intervención cuando sea menester, del servicio de veterinarios de dicho centro.
- Todas las cirugías serán realizadas por el mismo cirujano, este deberá estar experimentado en el uso de ambos sistemas de implantes con una experiencia quirúrgica de al menos 10 años.
- Antes de la cirugía se sedará a los perros con midazolam y se anestesiarán con ketamina y xilazina.

Sacrificio:

Los animales serán sacrificados en tres tiempos: 2, 4 y 8 semanas. Se sacrificarán 3 perros en cada tiempo. La eutanasia se llevará a cabo mediante sobredosis de pentotal sódico con una perfusión a través de las arterias carotídeas de una mezcla compuesta por glutaraldehído (5%) y formaldehído (4%) en un pH 7.2.

Procesamiento histológico y análisis histomorfométrico

- A) En cada animal se obtendrán 4 bloques óseos mediante una sierra oscilante. Las piezas óseas obtenidas en bloque junto con los implantes serán sumergidas en una solución de formaldehído (4%) combinado con cloruro cálcico (Cl₂Ca) (1%) para la preparación histológica (Schenk y cols. 1984). Las piezas serán deshidratadas y embebidas en metilmetacrilato. Se cortarán en dirección buco-lingual y paralelas al eje del implante. Se realizarán tres secciones en los bloques. Estas secciones tendrán aproximadamente 500 µm de espesor, estarán sin descalcificar, utilizando una sierra de diamante a baja velocidad con refrigeración (Leco Corporation). A continuación, se pegarán las secciones con cemento acrílico a Plexiglass opaco, preparadas a un espesor final de 80 µm, y teñidas superficialmente con azul de toluidina seguida de fuchina básica.

Se examinarán tres piezas de cada implante por un examinador experimentado. El porcentaje de contacto directo entre hueso mineralizado y la superficie de titanio (contacto hueso-implante) se determinará a una magnificación 100 x (en otros estudios a 250 x), utilizando un software para el análisis de la imagen.

5) Fotografías

Se tomarán fotografías a lo largo de las diferentes fases del estudio, si bien el único objetivo es la documentación, no siendo obligatorias y además no serán evaluadas.

6) Análisis de los datos

Un especialista independiente realizará las determinaciones histomorfométricas. Este especialista desconocerá al grupo al que pertenece cada uno de los especímenes.

7) Diagrama de tiempos previstos

El presente trabajo de investigación tiene una duración prevista de 12 meses.

Para la realización de este estudio se plantea el siguiente plan de trabajo:

- Selección de los animales y se procede en una primera intervención a la extracción de los dientes de la mandíbula, hemisección de premolares y tratamiento de conductos del hemipremolar.
- Fase experimental del estudio: colocación de implantes y regeneración ósea. Se realizará a los 2 meses de la realización de las extracciones.
- Sacrificio de los animales y preparación de las muestras para enviar al servicio de histomorfometría. Se realizará a las 2, 4 y 8 semanas de la colocación de los implantes.
- Envío al laboratorio del servicio de histomorfometría para el procesado de las muestras y la obtención de los datos.
- Análisis de los datos obtenidos por el Servicio de Estadística de la Universidad de Granada.

8) Asignación de tareas

Andrea Cirera Estadella: Intervención en todas las fases y procedimientos. Coordinación del estudio experimental y análisis histopatológico.

Pablo Galindo Moreno: Realización de los procedimientos quirúrgicos e intervención en animales.

Javier Gil Mur: Control de los test de laboratorio para el análisis de muestras

Pablo Sevilla Sánchez: Realización de la biofuncionalización de superficies para la obtención del material a examinar



RESOLUCIÓ

Assumpte: autorització de procediment d'experimentació núm. **8890**

Identificació de l'expedient

Resolució per a la realització de procediments d'experimentació sol·licitat pel centre **Servei de Granges i Camps Experimentals**, a l'empara del Decret 214/1997, de 30 de juliol, pel qual es regula la utilització d'animals per a experimentació i per a altres finalitats científiques.

Antecedents

1. El centre va presentar sol·licitud d'autorització expressa per a l'execució del procediment d'experimentació que es relaciona tot seguit, atès que en principi es troba inclòs en algun dels supòsits establerts a l'article 34 del Decret 214/1997:

“Aplicació quirúrgica de nous implants quirúrgico-dentals per avaluar-ne la seva osteointegració i resposta tisular en gos”

3256

Investigador/a responsable: Jordi Franch Serracanta

2. La Comissió d'Experimentació Animal, en la reunió feta el **10.05.2016** va informar **Favorablement** la realització d'aquest procediment d'experimentació.

Fonaments de dret

1. El Decret 214/1997, de 30 de juliol, pel qual es regula la utilització d'animals per a experimentació i per a altres finalitats científiques, estableix que per a la realització de procediments d'experimentació que es troben inclosos en algun dels supòsits establerts al seu article 34, es requereix autorització expressa.
2. L'article 36 de l'esmentat Decret estableix que la Comissió d'Experimentació Animal emetrà un informe sobre la realització dels procediments que requereixen autorització expressa, que tindrà caràcter vinculant.
3. D'acord amb la Llei 30/1992, de règim jurídic de les administracions públiques i del procediment administratiu comú, emeto la present

Resolució

Per tant, resolc:

1. Informar **Favorablement** la sol·licitud d'autorització expressa del procediment d'experimentació que es relaciona a continuació, al qual se l'ha assignat el número d'ordre que segueix:

Títol: "Aplicació quirúrgica de nous implants quirúrgico-dentals per avaluar-ne la seva osteointegració i resposta tisular en gos"

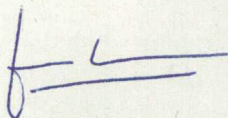
Investigador/a responsable: Jordi Franch Serracanta

Núm. ordre DAAM: **8890**

2. S'autoritza la realització d'aquest procediment d'experimentació fins la data: **27.05.2018**
3. Aquesta autorització no eximeix del compliment i disposició d'altres autoritzacions, d'acord amb la normativa sectorial vigent.

Contra aquesta resolució que no exhaureix la via administrativa, es pot interposar recurs d'alçada davant el director general de Polítiques Ambientals en el termini d'un mes, a comptar de l'endemà de la notificació d'aquesta resolució, segons el que estableix l'article 114 de la Llei 30/1992, de 26 de novembre, de règim jurídic de les administracions públiques i del procediment administratiu comú.

El subdirector general de la Biodiversitat



Generalitat de Catalunya
Departament de Territori i Sostenibilitat
Direcció General
de Polítiques Ambientals
Subdirecció General de la Biodiversitat

Jaume Vicens Perpinyà

Barcelona, 27 de maig de 2016



Universidad de Granada



Klockner[®] implant system

CONVENIO ENTRE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA Y SOADCO, S.L. PARA LA CREACIÓN DE LA "CÁTEDRA DE EMPRESA KLOCKNER IMPLANT SYSTEM UNIVERSIDAD DE GRANADA EN IMPLANTOLOGÍA"

UNIVERSIDAD DE GRANADA SECRETARIA GENERAL REGISTRO DE CONVENIOS <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">05 JUL. 2016</div> Entrada núm. <u>72949</u>
--

Granada, a 3 de junio de 2016

REUNIDOS

De un lado, la Sra. Dña. María Pilar Aranda Ramírez, en nombre y representación de la Universidad de Granada (CIF Q-1818002-F) de la que es Rectora Magnífica en virtud del Decreto 157/2015, de 19 de junio (BOJA nº 119, de 22 de junio de 2015), actuando con las atribuciones que le confieren el artículo 20.1 de la Ley Orgánica 6/2001, de 21 de diciembre, de Universidades y el artículo 45, k) de los Estatutos de la Universidad de Granada,

Y, por el otro, la Sra. Dña. Mercedes Roldán Chesa, Directora General de la empresa SOADCO, S.L., con NRT L702549T, como representante de ésta, en virtud de la escritura formalizada por el notario D. Matías Aleix Santuré, el día 9 de diciembre de 1996 con el número 245/96 de su protocolo, con domicilio en Avenida Fiter i Rosell, 4 bis, local 2 en Escaldes Engordany AD700 de Andorra.

Ambas partes se reconocen mutuamente la capacidad necesaria para obligar a las entidades respectivas.

EXPONEN

PRIMERO.- SOADCO S.L. está interesada en apoyar la investigación y el conocimiento en Odontología, particularmente en implantología y prótesis dental.

SEGUNDO.- La Universidad de Granada posee una amplia experiencia en investigación y docencia en implantología y prótesis dental.

TERCERO.- SOADCO S.L. y la Universidad de Granada valoran muy positivamente una colaboración en actividades de I + D + I, formación y transferencia de resultados de investigación relacionadas con la implantología y la prótesis dental, para lo que



Universidad de Granada



KLOCKNER[®] implant system

ACUERDAN

PRIMERO. NOMBRE

La creación de la "Cátedra de Empresa Klockner Implant System-UGR en Implantología" (en adelante, "la Cátedra").

SEGUNDO. OBJETO

La Cátedra, con carácter genérico, meramente enunciativo y no exhaustivo, se centrará en el desarrollo de las actividades conjuntas siguientes:

- Desarrollo de proyectos conjuntos de investigación.
- Redacción de trabajos de investigación y de tesis doctorales y otras publicaciones.
- Fomento de la valorización, la protección y la transferencia del conocimiento con objeto de que los resultados de la investigación sean transferidos a la sociedad.
- Organización de cursos, seminarios, conferencias u otras actividades formativas y de divulgación.
- Colaboración en el diseño e impartición de programas de postgrado.
- Colaboración en eventos y en encuentros nacionales e internacionales de expertos sobre temas de interés para ambas partes.

TERCERO. COMISIÓN MIXTA DE SEGUIMIENTO

Del seguimiento y desarrollo del Convenio se ocupará una Comisión Mixta creada al efecto, que tiene como finalidad proyectar, informar, organizar y controlar la ejecución de las actividades a que se refiere el presente Convenio y resolver las cuestiones de interpretación y funcionamiento de las actividades en su conjunto.

En particular, la Comisión Mixta se encargará de la aprobación de un programa anual de actividades.

La Comisión Mixta estará integrada por cuatro miembros, dos de ellos nombrados por cada una de las partes que suscriben el presente Convenio.

Por parte de la Universidad de Granada, los miembros de la Comisión Mixta de Seguimiento serán:

- a) Un miembro del PDI de la Universidad de Granada en el que recaerá la Dirección de la Cátedra, el Sr. D. Pablo Antonio Galindo Moreno.
- b) El Vicerrector de Investigación y Transferencia, el Sr. D. Enrique Herrera Viedma.

Por parte de la Empresa los que ésta establezca.

La Comisión Mixta de Seguimiento se constituirá en el plazo de 15 días a partir de la firma del presente Convenio y se reunirá tantas veces como lo requiera la buena marcha del Convenio. Su régimen de organización y funcionamiento será el previsto para los órganos colegiados en los artículos 19 y siguientes de la Ley 40/2015, de 1 de octubre, de Régimen Jurídico del Sector Público. Todas las decisiones que se adopten serán acordadas por unanimidad.

MR



Universidad de Granada



Klockner[®] implant system

El acuerdo de la Comisión Mixta de Seguimiento que recoja las actividades o actuaciones a desarrollar, deberá contener, al menos, los siguientes aspectos:

- a) Objeto o denominación del proyecto y/o programa.
- b) Profesores, Grupos e Institutos de Investigación o servicios de la Universidad que llevarán a cabo la actividad y la persona que se responsabilizará de la actuación.
- c) Plan de trabajo: fases o planificación de actividades y cronograma.
- d) Presupuesto total y medios materiales y humanos que requiera la actuación, especificando las aportaciones de cada entidad.
- e) Los relacionados con la confidencialidad y la publicación de los resultados, así como la regulación de la propiedad intelectual e industrial de los resultados derivados de la ejecución de esas actividades.

CUARTO. DIRECCIÓN

La Dirección de la Cátedra será la encargada de:

1. Elaborar y presentar a la Comisión Mixta, para su aprobación, el Programa Anual de Actividades de la Cátedra.
2. Elaborar y presentar a la Comisión Mixta, para su aprobación, la Memoria Anual de Actividades de la Cátedra.
3. Coordinar y desarrollar las actividades establecidas en el Convenio.
4. Administrar los fondos de la Cátedra.
5. Difundir las actividades de la Cátedra.
6. La captación de recursos y su administración.

QUINTO. PERSONAL, RESPONSABILIDAD CIVIL

La Cátedra, además del personal propio de la Universidad o de SOADCO S.L. podrá contar con personal propio encargado de funciones técnicas o administrativas. La eventual contratación de personal por la Cátedra estará regida por las condiciones generales de la Universidad de Granada y se hará a través de contratos de obra o servicio. La contratación de personal se incluirá en la programación anual de la Cátedra, a propuesta de su Dirección.

El personal de la empresa, al igual que el de la Universidad de Granada o el contratado por la Cátedra, contará con el oportuno seguro de responsabilidad civil que cubra posibles responsabilidades en las actividades propias de la Cátedra, quedando ésta y la UGR exentas de toda responsabilidad.

SEXTO. INFRAESTRUCTURA

La Cátedra podrá contar con equipamiento propio de la Universidad o de la Empresa destinado al desarrollo de sus actividades, así como otros equipos adquiridos *ad hoc* por la Cátedra. En todos los casos, el material será oportunamente inventariado con indicación expresa de su adscripción a la Universidad o a la Empresa.

ME/



Universidad de Granada



KLOCKNER[®] implant system

SÉPTIMO. VIGENCIA

El presente Convenio entrará en vigor el mismo día de su firma y tendrá una vigencia de dos años naturales. A su vencimiento, quedará tácitamente prorrogado por periodos adicionales de doce meses, siempre que la memoria de resultados aprobada por la Comisión Mixta así lo aconseje y exista consignación presupuestaria.

OCTAVO. FINANCIACIÓN

SOADCO S.L. financiará la Cátedra con una cuantía igual o superior a los 40.000 euros. Correspondiendo esta cuantía a las partidas en metálico (no menos de 20.000 euros/año) y en especie (material, pago de servicios...) dirigidos a financiar gastos de investigación, de publicación, de gestión y becas de prácticas de alumnos de postgrado oficial colaboradores de la Cátedra.

La Universidad de Granada ingresará el 10% de las cantidades abonadas cada año en metálico, en concepto de compensación por la gestión y utilización de infraestructuras de la Universidad. Estas cantidades tendrán la consideración de costes indirectos a efectos de lo dispuesto en el artículo 31.9 de la Ley 38/2003, de 17 de noviembre, General de Subvenciones.

El abono por SOADCO S.L. de la cantidad dotada a la Cátedra en metálico se realizará dentro de los 60 días naturales posteriores a la firma del Convenio mediante transferencia bancaria a la cuenta de la Universidad de Granada: ES48 0049/0004/95/2814499711.

NOVENO. IMAGEN

La UGR reconoce de forma expresa a SOADCO el derecho de difundir su participación en la Cátedra reseñada. De forma Particular, SOADCO podrá difundir su colaboración con la UGR en las actividades relacionadas con la Cátedra de la siguiente forma:

1. Presencia del logotipo de la Cátedra/ UGR en sus comunicados
2. Web
3. Notas de prensa

DÉCIMO. INFORMACIÓN PÚBLICA

De conformidad con lo establecido en el artículo 8 b) de la Ley 19/29013, de 9 de diciembre, de transparencia, acceso a la información pública y buen gobierno (BOE núm. 295 de 10.12.2013), la Universidad de Granada, en relación con este convenio, hará pública la información relativa a las partes firmantes, su objeto, su vigencia, las obligaciones que asumen las partes, incluyendo las económicas, y cualquier modificación que se realice.

MP4



Universidad de Granada



KLOCKNER[®] implant system

DÉCIMOPRIMERO. MODIFICACIÓN Y RESCISIÓN

Las partes podrán modificar el presente Convenio en cualquier momento por mutuo acuerdo. Cualquiera de las partes podrá denunciar el presente Convenio comunicándolo por escrito a la otra parte con dos meses de antelación a la fecha en que vaya a darlo por terminado.

Si se denuncia o se modifica el Convenio, las partes se comprometen a finalizar las actividades iniciadas en virtud de los compromisos adquiridos.

DÉCILOSEGUNDO. POLÍTICA DE PRIVACIDAD

SOADCO acepta la siguiente política de privacidad de la Universidad de Granada:

“De acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, la Universidad de Granada, con domicilio en la C/Cuesta del Hospicio s/n 18071 Granada, informa que los datos personales aportados en este procedimiento serán incorporados a un fichero de nuestra responsabilidad con la finalidad de gestionar su aportación económica al Plan de Mecenazgo de la Universidad de Granada, así como para la realización de estadísticas. Al aceptar nuestra política de protección de datos, usted acepta el tratamiento de los mismos para los fines anteriormente expresados.

Finalmente, le informamos que los consentimientos anteriormente otorgados son revocables y que podrá ejercer en cualquier momento sus derechos de acceso, rectificación, oposición y cancelación mediante escrito dirigido a la Secretaría General de esta Universidad, a la siguiente dirección y mediante el modelo habilitado al efecto que se podrá obtener en la Agencia Española de Protección de Datos o en la propia Secretaría General de la Universidad de Granada: Secretaría General - Universidad de Granada- Cuesta del Hospicio s/n - 18071 Granada”.

DÉCIMOTERCERO. JURISDICCIÓN

La Universidad de Granada y SOADCO S.L. acuerdan que cualquier divergencia, discrepancia o controversia que pudiera surgir con la interpretación o ejecución del presente Convenio será sometida a la jurisdicción y competencia de los Tribunales de la ciudad de Granada, renunciando de manera expresa a cualquier otro fuero jurisdiccional que pudiera corresponderles.

Los representantes de ambas Instituciones firman el presente Convenio en dos ejemplares originales, igualmente válidos, y estampan en ellos sus respectivos sellos en la fecha y lugar mencionados *ut supra*.



Universidad de Granada



KLOCKNER[®] implant system

Por la UNIVERSIDAD DE GRANADA

Por SOADCO S.L.



La Rectora,
María Pilar Aranda Ramírez

La Directora General,
Mercedes Roldán Chesa



SECIB

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIRUGÍA BUCAL

Presidente

Eduard Valmaseda Castellón

Vicepresidenta

María Peñarrocha Diago

Secretaria

Gemma Santmartí García

Tesorero

Rui Figueiredo

Vocales

Daniel Torres Lagares

Juan López-Quiles Martínez

Agurne Uribarri Etxebarria

Directora Ejecutiva

Marta Ventura Bosch

Gemma Santmartí García, secretaria de la Sociedad Española de Cirugía Bucal (SECIB)

CERTIFICA: Que **ANDREA CIRERA ESTADELLA, PABLO SEVILLA SÁNCHEZ, ELENA SÁNCHEZ FERNÁNDEZ, FRANCISCO O'VALLE RAVASSA, PABLO GALINDO MORENO y JAVIER GIL MUR** han recibido el Premio a la mejor comunicación oral de investigación básica por el trabajo "**IMPLICACIONES DE LA INHIBICIÓN DE TGF-B1 EN CÉLULAS MC3T3-E1 PRE-OSTEOBLÁSTICAS: ESTUDIO IN VITRO**" presentado en el XII Congreso Nacional de la SECIB, celebrado los días 20, 21 y 22 de noviembre de 2014 en Salamanca

Y para que conste, y a los efectos que correspondan, firmo el presente certificado

Barcelona, 18 de junio de 2018



Original Research

In vitro cell response on CP-Ti surfaces functionalized with TGF- β 1 inhibitory peptides

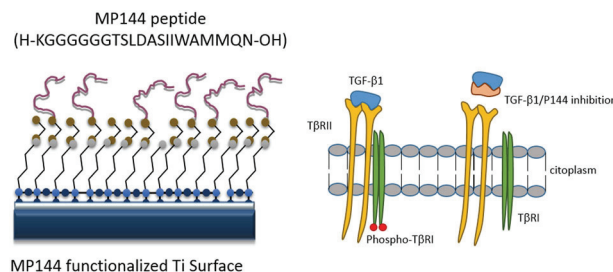
Pablo Sevilla^{1,2} · Andrea Cirera³ · Javier Dotor⁴ · Francisco Javier Gil^{2,5} · Pablo Galindo-Moreno³ · Conrado Aparicio⁶

Received: 31 March 2018 / Accepted: 26 April 2018 / Published online: 23 May 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Osseointegration of implants is conversely related to the generation of a fibrous tissue capsule around the implant by the host environment. Although TGF- β 1 plays many roles in regeneration processes, it is the cytokine to be mostly associated to the production of fibrotic tissue and thus, its inhibition has demonstrated to be beneficial to prevent several fibrotic reactions. Surface biofunctionalization enables the immobilization of biologically active molecules on an implant surface to tailor the biological response of the host. Here, we studied in vitro biological effects of biofunctionalized CP-Ti surfaces with a TGF- β 1 inhibitor peptide, P144. A reliable biofunctionalization process that tethers P144 peptides to commercially pure titanium was developed. Differentiation of human mesenchymal stem cells, osteoblasts and fibroblasts on P144-functionalized and control surfaces was assessed at the gene expression and protein production levels. Results showed that P144-functionalized surfaces reduced expression and production of fibrotic differentiation markers and increased osteoblastic differentiation markers. Therefore, biofunctionalization of surfaces with TGF- β 1 inhibitor peptides are an alternative promising strategy for inducing osseointegration around medical devices and implants.

Graphical Abstract



✉ Pablo Sevilla
psevilla@euss.es

¹ Escola Universitària Salesiana de Sarrià, Pg. Sant Joan Bosco 74, 08017, Barcelona, Spain

² Biomaterials, Biomechanics and Tissue Engineering group, Technical University of Catalonia, Pav. E, Av. Diagonal 647, Barcelona, Spain

³ School of Dentistry, University of Granada, Campus Universitario de Cartuja, s/n, 18071, Granada, Spain

⁴ Independent Researcher, Madrid, Spain

⁵ School of Dentistry, Universitat Internacional de Catalunya, C/ Inmaculada 22, Barcelona, Spain

⁶ Department of Restorative Sciences, MDRCBB-Minnesota Dental Research Center for Biomechanics and Biomaterials, University of Minnesota School of Dentistry, 16-250A Moos Tower, 515 Delaware St. SE, Minneapolis, Minneapolis, MN 55455, USA

1 Introduction

The transforming growth factor β (TGF- β) is a member of a cytokine family that regulates the balance between cell mass and extracellular matrix. Three isoforms of this cytokine (TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3) are present in the extracellular matrix and are expressed by stem cells. TGF- β increases deposition of collagen and other proteins directly stimulating the expression of the corresponding genes and inhibiting the synthesis of collagenase [1, 2]. In chronic hepatic inflammation, the secretion of TGF- β in the liver is closely related to fibro genesis [3]. In bone, the most abundant isoform of TGF- β is TGF- β 1.

As for the regeneration of bone, there is considerable controversy regarding the role of TGF- β . TGF- β 1 has been shown to promote osteoblast proliferation, but also to be an inhibitor of alkaline phosphatase and osteoblast mineralization [4]. Although the effectiveness of TGF- β 1 for bone repair has been demonstrated in several animal studies using either large (10–335 μ g) [5–7] or small doses (0.3–1.0 μ g) [8, 9] of the cytokine, other studies have proven TGF- β 1 to be ineffective and even detrimental to bone regeneration [10–13]. Aspenberg et al. [10] placed titanium implants in rat tibiae that had been treated with 1.33 or 1000 ng TGF- β 1 and compared them with untreated controls, obtaining a negative correlation between the amount of administered TGF- β 1 and bone formation. Nikolidakis et al. [13] conducted a similar study inserting implants loaded with 0.5 or 1 mg of TGF- β 1 in goat femurs, and obtained analogous results. Authors proposed that TGF- β 1 stimulates fibrotic reactions in bone healing just as it does in other tissues. Similarly Tielinen et al. [11] inserted bio-absorbable implants containing 50 μ g of TGF- β 1 in rat distal femurs. After 3 weeks of implantation, histological analysis showed a fibroblast-rich mesenchymal tissue within the defects treated with TGF- β 1. Finally, Ueda et al. [12] demonstrated that a single dose of 0.1 μ g of TGF- β 1 was ineffective in promoting bone formation in rabbit cranial defects after 6 weeks of implantation. In this case, rapid diffusion of the growth factor was suggested as the most plausible reason for this detrimental effect on bone formation.

Endosseous metallic implants are encapsulated by an undesirable fibrous tissue layer with thickness that depends on the virulence of the host reaction and micro-displacements between the implant and the bone bed [14, 15]. This formation of the fibrous tissue layer may lead to bad vascularization of periimplant tissues and thus, low stability of the implant may occur. The inhibition of TGF- β 1 could, therefore, reduce the formation of fibrous tissue around the implant and promote bone regeneration.

Borrás-Cuesta et. al. have developed a series of peptides that inhibit TGF- β activity [3], [16, 17] by blocking

interaction with cellular receptors, thereby preventing their interaction with cells. These peptides have demonstrated their beneficial effect by inhibiting fibrogenesis in cirrhotic rat livers [3] and angiogenesis [17]. They have not yet been evaluated in bone *in vitro* or *in vivo*, although unpublished studies suggest beneficial effects on cartilage regeneration. Specifically, P144 (NH₂-TSLDASIIWAMMQN-OH) is a peptide derived from the TGF- β type III receptor found at the cytoskeleton of multiple cell types. P144 interacts with TGF- β 1 in the region where the cytokine connects with the cell receptor and blocks the cell signaling pathway [3, 17, 18].

Our previous studies have demonstrated that other TGF- β inhibitor peptides developed by Borrás-Cuesta et. al.; i.e.: P17, can be immobilized on synthetic substrates via silanization and crosslinking. After immobilization, these peptides retained their biological activity by reducing SMAD2 phosphorylation on TGF- β 1 stimulated cells [19, 20]. Here we used P144 peptide due to higher solubility than P17 on anhydrous solvents used for functionalization and higher inhibition of TGF- β 1 activity of P144 than P17.

The objective of this work was to study the fibroblast and osteoblast differentiation response on commercially pure titanium surfaces functionalized with a TGF- β 1 inhibitor peptide, P144. Covalent immobilization of the peptide was accomplished via optimized silanization and crosslinking methods [21].

2 Experimental

2.1 Materials

Bars of 10 mm in diameter of commercially pure titanium grade 2 (Ti) were purchased from Daido Steel Co. (Nagoya, Japan). 96% ethanol and acetone were purchased from Panreac S.A (Barcelona, Spain). Sodium hydroxide (NaOH), 2-propanol, anhydrous toluene, anhydrous cyclohexane, 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES), malonic acid (Mal), dimethyl formamide (DMF), N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl) uronium hexafluorophosphate (HBTU), N,N-Diisopropylethylamine (DIEA), Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), glycine, methanol, sodium deoxycholate, Trizma base, Trizma hydrochloride, sodium dodecyl sulfate (SDS), Bovine Serum Albumin (BSA) and Ponceau S solution were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Penicillin-streptomycin, L-glutamine, phosphate-buffered saline (PBS) and alpha minimum essential medium (α -MEM) were purchased from Gibco Life technologies (New York City, NY, USA). Protease inhibitor cocktail, rabbit-anti-phospho-SMAD2 antibody and mouse-anti-rabbit peroxidase coupled secondary antibody were purchased from Cell

Signaling (Danvers, MA, USA). FITC-streptavidin conjugate was purchased from Anaspec (Fremont, CA, USA). Chemiluminescence detection kit Lumi-LightPLUS was purchased from Roche GmbH, (Mannheim, Germany). Acrylamide:Bis (29:1), ammonium persulfate (APS), tetramethylethylenediamine (TEMED), bromophenol blue and dithiothreitol (DTT) were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Alkaline Phosphatase Assay Kit (Colorimetric) was purchased from Abcam (Cambridge, UK).

Osteocalcin Human Direct ELISA kit from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) was used to determine osteocalcin production. To quantify total protein production the BCA Protein Assay was purchased from Pierce (Waltham, MA, USA). To determine gene expression, RNeasy® Mini Kit, QuantiTect Reverse Transcription Kit and QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit were purchased from Qiagen (Hilden, Germany). Primers were purchased from the Qiagen (Hilden, Germany) to amplify specific genes of osteoblast and fibroblast differentiation (Table 1). Human recombinant TGF- β 1 was purchased from Prospec (Ness-Ziona, Israel). MP144 (H-KGGGGGGTSLDASII-WAMMQN-OH) is a peptide derived from the P144 sequence [3]. MP144 includes a lysine and 6 glycines at the N-terminus of P144. The lysine enables direct reaction with the linker to induce covalent tethering to the modified surface. The glycines space the peptide from the surface and thus are aimed to increase P144 molecular interaction probabilities. Additionally, a biotinylated P144 peptide was used to determine the amount of peptide

anchored on the surface as well as its mechanical stability. MP144 and biotinylated P144 were synthesized by solid-phase peptide synthesis method [22] in an automatic APEX 396 multiple peptide synthesizer (AAPPTEC LLC) and kindly furnished by Digna Biotech (Madrid, Spain).

3 Methods

3.1 Biofunctionalization of CP-Ti surfaces with TGF- β inhibitor peptides

Functionalization of CP-Ti surfaces was attained by a 4 step process [20]. The samples were first grinded with silicon carbide and mirror polished ($R_a \leq 50$ nm) with alumina suspensions (1 μ m and 0.05 μ m mean size). After polishing, the samples were washed 5 min by ultrasonication in cyclohexane, isopropanol, distilled water and acetone. The clean and polished CP-Ti samples were immersed in NaOH 5 mol/l at 60 °C for 24 h (Step 1) to form reactive -OH groups on the surface. After etching, the samples were immersed in distilled water during 30 min three times, washed with acetone and dried with N₂ [23]. The surfaces were then silanized (Step 2) by immersion in a 30 mM APTES solution in anhydrous toluene at 70 °C during 1 h with agitation and nitrogen atmosphere. After silanization, the samples were sonicated in anhydrous toluene for 15 min and washed with ethanol, isopropanol, distilled water and acetone and dried with N₂. Subsequently, tethering of a chemical linker, malonic acid was performed (Step 3). To do so, the silanized surfaces were treated by immersing them into a dimethylformamide (DMF) solution containing malonic acid (Mal) 10 mM, O-benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate (HBTU) 30 mM and di-isopropylethylamine (DIEA) 100 mM. The cross-linker solution was used during 2 h at room temperature with agitation. Then the samples were washed in pure DMF twice. Finally, covalent conjugation of oligopeptides (Step 4) on Ti surfaces was accomplished by immersing overnight the treated Ti discs into a DMF solution containing 0.2 mM of the MP144 peptide at room temperature. Finally, the samples were washed with pure DMF and ethanol twice and dried with N₂.

3.2 X ray photoelectron spectroscopy (XPS)

XPS analysis was conducted with a Quantum 2000 spectrometer (Physical Instruments, USA) using a monochromated Al K α beam of 1 mm spot size at 45° with respect to the analyzed surface and a step size of 1 eV (4 scans/sample). Chemical composition was assessed using CASA XPS v. 2.3.16 software (Teignmouth, UK). Two replicas of each condition were analyzed.

Table 1 Primer DNA sequences used in the qPCR assay

Alpha-SMA mouse forward	5'-cccaccagatggagaa-3'
Alpha-SMA mouse reverse	5'-acatagctggagcagctct-3'
Beta-actin mouse forward	5'-ctaaggccaacctgaaaag-3'
Beta-actin mouse reverse	5'-accagagcatacagggaca-3'
ALP mouse forward	5'-cggatcctgacaaaaacc-3'
ALP mouse reverse	5'-tcatgatgctcctgtcaat-3'
Osteocalcin mouse forward	5'-agactccggcctacct-3'
Osteocalcin mouse reverse	5'-ctcgtcacaagcagggttaag-3'
RUNX2 mouse forward	5'-gccaggcgtatttcaga-3'
RUNX2 mouse reverse	5'-tgcctggctcttctactag-3'
Col1alpha1 mouse forward	5'-catgttcagctttgtgacct-3'
Col1alpha1 mouse reverse	5'-gcagctgacttcaggatgt-3'
MMP2 mouse forward	5'-taacctggatccctcgt-3'
MMP2 mouse reverse	5'-tcaggtaataagcaccctgaa-3'
MMP3 mouse forward	5'-ttgtctttgatgcagtcagc-3'
MMP3 mouse reverse	5'-gatttcgccaaaagtgc-3'
MMP9 mouse forward	5'-acgacatagagcgcaccca-3'
MMP9 mouse reverse	5'-gctgtgttcagttgtgtg-3'
Fibronectin mouse forward	5'-cggagagagtcccactacta-3'
Fibronectin mouse reverse	5'-cgatattggtgaatgcaga-3'

3.3 Mechanical stability of the coatings and quantification of peptides

In order to visualize the peptide coatings, P144 peptides containing a biotin molecule at the C-terminus were immobilized on 3 replicas of the different CP-Ti surfaces following the same previously-described protocol. Afterwards, the peptide-coated surfaces were immersed in 5 mg/ml of streptavidin-FITC conjugate dissolved in 10 mM phosphate buffer (PBS), 150 mM NaCl, pH 7.2, with 2% BSA and 2 mM of sodium azide overnight and washed with ethanol, isopropanol, water and acetone. Then, FITC-labeled peptide-coated surfaces were washed with distilled water and mechanically challenged by ultrasonication in distilled water for 2 h at room temperature. Fluorescence visualization was performed after different times of ultrasonication and fluorescence intensity was evaluated by means of Image J 1.47 v software.

To quantify the amount of peptide initially present on the surface after functionalization samples with adsorbed FITC-fluorescent peptides were immersed in NaOH 0.1 mol/l and ultrasonicated for 3 h or until no fluorescence was detected on the surface of each sample [21, 24–27]. Subsequently, the NaOH solutions containing the released peptides were collected and analyzed using a spectrofluorophotometer [25, 26] (Infinite® 200pro Nanoquant Microplate reader, Tecan, Switzerland). The excitation and emission wavelengths were set at 495 and 520 nm, respectively according to the values for the FITC probe.

3.4 Western blot of p-SMAD2

MC3T3-E1 murine cells were cultured in α -MEM supplemented with 1% penicillin and 1% L-Glutamine. When the necessary number of cells was reached, 500.000 cells were transferred to 6 cm petri dish. After 24 h of cell adhesion, serum free medium supplemented with 0.7 ng/ml of TGF- β 1, was added to the different CP-Ti surfaces with the adhered cells and incubated at 37 °C for 30 min. Subsequently, the medium was transferred to the cells and incubated at 37 °C for 1 h. Then cells were lysed with RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.25% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, plus protease inhibitors) and centrifuged (12,000g, 10 min, 4 °C). Total protein of supernatants was determined by the bicinchoninic acid assay and equal amounts were size-fractionized in SDS-PAGE under reducing conditions (100 V, 40 mA/gel), transferred to nitrocellulose membrane (60 V; 4 °C, overnight) and stained with Ponceau S solution. Membranes were blocked in TBS-T buffer (0.9% NaCl, 0.02 M Tris pH 7.5, 0.05% Tween-20, 5% BSA; 1 h; RT) previous to incubation with rabbit-anti-phospho SMAD2 antibody (1:500). Detection was performed with mouse-anti-rabbit peroxidase coupled secondary

antibody in TBS-T buffer and an enhanced chemiluminescence (ECL) kit. Bands were quantified with a digital image analyzer (Quantity One Quantitation Software™; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) on unsaturated X-ray films. Two analyses per sample were made.

3.5 Gene expression of fibroblasts and osteoblasts on biofunctionalized surfaces

Gene expression by fibroblasts was determined using NIH/3T3 cells. 40,000 cells were seeded at each well containing the different CP-Ti surfaces. Tissue culture plastic (TCPS) was used as control substrate. Experiments were conducted in triplicate. Cells were cultured with D-MEM supplemented with 1% penicilin/streptomycin, 1% L-glutamine and 0.5 ng/ml of TGF- β 1. After one day of culture 10% of FBS was added to the medium and the medium was changed every day. Cells were harvested at days 1, 3 and 7 using RLT buffer from the Qiagen's RNeasy Kit.

Gene expression by osteoblasts was determined using MC3T3-E1 cells. The culture media used was alpha-MEM supplemented with 1% penicilin/streptomycin 1% L-glutamine and 0.5 ng/ml of TGF- β 1. Additionally, 10% FBS and osteogenic factors (10 mM β -glycerol phosphate, 50 μ g/ml ascorbic acid and 50 μ M dexamethasone) were added from the second day of culture. MC3T3-E1 cells were harvested after 2, 7, 14 and 21 days of culture.

RNA from the different samples was extracted and purified. RNA to cDNA transcription was performed using Qiagen's RNeasy Kit and QuantiTect Reverse Transcription Kit, respectively, following manufacturers' instructions. cDNA products were diluted to 1 ng/ μ L and used as real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) templates. 1 μ M of the corresponding primers (Table 1) were added to the templates. SYBR Green RT-qPCR analyses were carried out using the QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit in a StepOnePlus real-time PCR analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Specificity of each RT-qPCR reaction was determined by melting curve analysis. All samples were normalized by the expression levels of β -actin (reference gene) and fold changes were related to Control at the first day of harvest as follows [28]:

$$FC = \frac{E^{\Delta C_{\text{target}} [T_i(\text{sample}-\text{control})]}}{E^{\Delta C_{\text{reference}} [T_i(\text{sample}-\text{control})]}} \quad (1)$$

where ΔC is the median value for the quantification cycle for the triplicate of each sample and E is the amplification efficiency, determined from the slope of the log-linear portion of the calibration-curve, as

$$E = 10^{\left[\frac{1}{\text{slope}}\right]} \quad (2)$$

3.6 Alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin production (OC) of human mesenchymal stem cells on biofunctionalized surfaces

ALP activity and OC production of human mesenchymal stem cells on the differently treated CP-Ti surfaces were assessed. Experiments were conducted in triplicate. Cells were harvested after 7, 14, and 21 days in culture. 10,000 cells were seeded on each CP-Ti surface and cultured in Advance-MEM with 1% penicillin/streptomycin, 1% L-glutamine, 0.5 ng/ml of TGF- β 1 and osteogenic factors (10 mM β -glycerol phosphate, 50 μ g/ml ascorbic acid and 50 μ M dexamethasone).

The measurement of ALP activity was performed using the Alkaline Phosphatase Assay Kit (Colorimetric) following manufacturer's instruction. ALP quantification and the standard curve were determined using an Infinite 200 Pro spectrofluorophotometer (Tecan, Männedorf, Switzerland). Similarly, OC production was determined using Osteocalcin Human Direct ELISA kit (Invitrogen, Life Technologies, Waltham, MA, USA) following manufacturer's instructions.

4 Results

4.1 Fabrication and characterization of biofunctionalized surfaces with coatings of MP144 TGF- β inhibitor peptides

Peptide biofunctionalized CP-Ti surfaces were obtained through a 4-step method using APTES as coupling agent and malonic acid as crosslinker. Activation with NaOH was conducted to generate abundant hydroxyl groups at the CP-Ti surfaces. Immobilization of APTES was achieved through hydrolysis of ethoxy groups and reaction with hydroxyl groups present on the activated CP-Ti surfaces forming Si-O-Ti and Si-O-Si bonds [29]. Malonic acid and HBTU were then let to react with silanized surfaces to obtain an amide bond between APTES and malonic acid [21]. Finally, the covalent binding of the oligopeptide MP144 is achieved by the covalent reaction of the peptide amino groups with the free ester of the malonic acid on the

surface [21]. We presented further details of the functionalization process elsewhere [20, 21].

In this work, XPS analysis was used to confirm the proper functionalization process. After activation of CP-Ti surfaces with NaOH an increase in sodium and oxygen was detected due to the transformation of the titanium oxide layer into a sodium titanate layer [30] and the formation of hydroxyl groups on the surface (Table 2). After silanization, an increase in nitrogen and silicon was detected indicating the presence of APTES on the surface. After anchoring the linker, the quantity of carbon increased suggesting the presence of malonic acid on the surface. Finally, the presence of the MP144 peptide was confirmed by an increase in carbon and nitrogen. Additionally, the O/Ti ratio increased after each step of the functionalization process indicating the increase of organic species on the surface after each of steps of the peptide coating process.

The amount of peptide immobilized on the CP-Ti surface was assessed by the quantification of fluorescent labeled biotinylated P144 peptide. The total amount of peptide obtained on functionalized surfaces was approx. 25 nmol/cm². Functionalized CP-Ti surfaces were mechanically challenged by ultrasonication (Fig. 1). Surfaces missing one of the 4 steps for functionalization lose most of the peptides after 5 h of ultrasonication. However, CP-Ti surfaces that were peptide functionalized through the 4-step coating process reached a stable level of peptide signal after 3 h of ultrasonication. This suggests that after release of the loosely bonded peptides, a significant amount of covalently

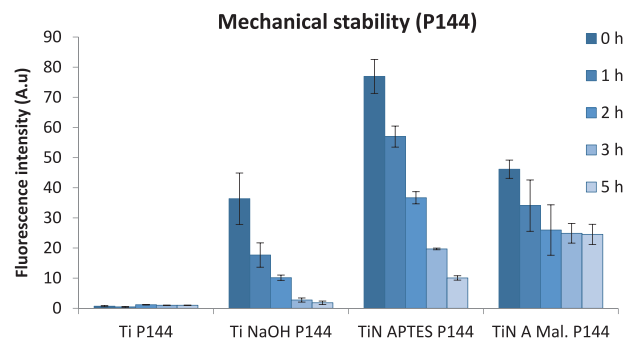


Fig. 1 Values of fluorescence intensity of the biotin-labelled P144 peptide on the different Ti surfaces after different sonication times in water

Table 2 Quantification by XPS of elemental composition of treated surfaces at each fabrication step and final MP144 coatings

	C1s	Cl2p	N1s	Na1s	O1s	S2p	Si2p	Ti2p	Total	O/Ti
Plain Ti	16.7	0.4	0.7	0.1	57.3	0.0	0.5	24.4	100.0	2.35
NaOH (St.1)	7.8	0.0	0.6	3.6	65.9	0.2	0.6	21.2	100.0	3.11
APTES (St.2)	21.1	0.0	4.0	0.4	54.5	0.2	4.5	15.4	100.0	3.54
Malonic a. (St.3)	30.9	0.1	6.5	0.0	46.8	0.1	5.2	10.5	100.0	4.45
MP144 (St.4)	36.1	0.0	7.1	0.0	42.8	0.1	6.0	7.8	100.0	5.49

bonded peptides was retained and mechanically stabilized on these surfaces.

4.2 Effects of biofunctionalized surfaces on osteoblasts and human mesenchymal stem cells

TGF- β signaling pathway involves the phosphorylation of the receptor regulated SMADS (also called R-SMADs). Specifically, TGF- β 1 signaling pathway is mediated by SMAD2 and SMAD3. When the TGF- β type 1 receptor (TGF- β R1) is phosphorylated, then binds the corresponding R-SMAD through the SMAD anchor for receptor activation (SARA) [31] and phosphorylates the serine residue of R-SMAD. Phosphorylation induces a conformational change of the R-SMAD and its subsequent dissociation from the receptor complex and SARA [32]. TGF- β 1 inhibition capability of the developed surfaces was assessed by the quantification of the relative levels of phosphorylated SMAD2 on MC3T3-E1 cells by Western Blot (Fig. 2). MP144 coated surfaces inhibited near 57% of p-SMAD2 production compared to the positive control group, which is non-coated CP-Ti surface, indicating significant effects of the surface coated peptide as TGF- β 1 activity inhibitor. Results also showed that exogenous administration of the peptide at the concentration of 200 μ g/ml had an even stronger inhibiting effect. When exogenous TGF- β 1 is not administered to cells, the p-SMAD2 signal has a base level on MC3T3-E1 cells.

Cell adhesion and proliferation tests were performed on MC3T3-E1 cells when seeded on the functionalized surfaces. No significant differences were found on the number of adhered cells, cell morphology or cell proliferation with respect to all other surfaces tested; i.e., non-coated and

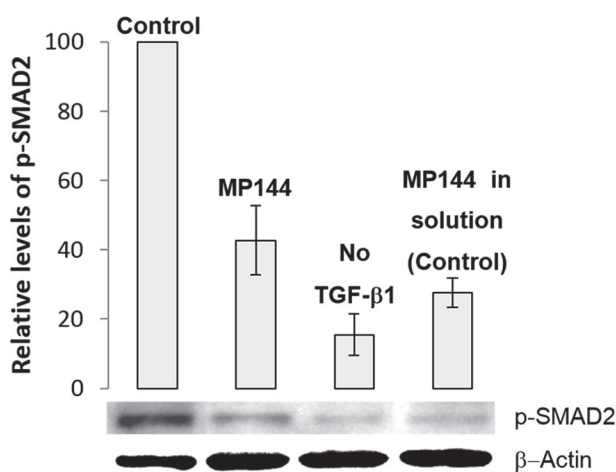


Fig. 2 Western blot for phospho-SMAD2 produced by MC3T3-E1 pre-osteoblasts. TGF- β 1 was administered to cells at a concentration of 0.7 ng/ml. Last column, MP144 was administered to cells in solution at a concentration of 200 μ g/ml. Sample without administration of exogenous TGF- β 1 (no TGF- β 1) was used as control background

coated with molecules through the different steps of the functionalization process (data not shown).

Figure 3 shows collagen type 1 (coll α 1), runt-related transcription factor 2 (RUNX2), alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OC) gene expression by MC3T3-E1 pre-osteoblasts cultured on the functionalized CP-Ti surfaces. Collagen is the earliest marker of osteoblastic differentiation [33]. A collagen matrix is necessary for pre-osteoblasts to differentiate into mature osteoblasts [34, 35]. The peak of collagen expression on control surfaces was reached at 14 days of culture, whereas MP144 coated surfaces induced cells to peak collagen expression after 7 days of culture. This result suggests that MP144 surfaces accelerated and notably increased collagen expression that could enabled a premature osteoblastic differentiation.

RUNX2 is a transcription factor, essential for osteoblastic differentiation. The expression of RUNX2 is usually shown at the early stages of differentiation just after collagen expression [91]. The peak of RUNX2 expression was invariably obtained at 14 days for all surfaces tested with the highest levels on the functionalized MP144 surfaces. Differences were statistically significant between MP144 surfaces and the two control groups.

Alkaline phosphatase (ALP) is one of the most common osteoblast differentiation marker protein and has a stimulatory effect on calcium deposition in bone tissue [36, 37]. ALP expression increased over time with the highest values obtained at day 21 of culture. The peak in ALP activity *in vitro* is usually reached by this type of cells at earlier culture periods, between days 10 and 14. The specific clone of MC3T3-E1 used for this experiment is known to have a delayed expression of ALP [38]. As for the previous markers at peak level for gene expression MP144 surfaces induced the highest values of ALP expression. Differences were not statistically significant among the different groups.

Osteocalcin (OC) is a specific marker protein for osteoblastic differentiation. It has many different functions related to bone formation and it is expressed and produced at late stages of osteoblast differentiation [39]. Again, OC expression peaked at day 21 of culture on all tested surfaces and the highest expression was determined for cells on the MP144 coated surfaces.

Overall, these results suggest that pre-osteoblasts increase gene expression of osteoblastic markers when cultured on surfaces functionalized with TGF- β 1 inhibitory peptides.

Figure 4 shows ALP activity in cultures of human bone marrow stem cells on control and MP144 coated surfaces. ALP activity peaked after 14 days of culture in osteogenic media. At this time, MP144 surfaces exhibited higher ALP activity than non-coated CP-Ti surfaces. Osteocalcin production by human bone marrow stem cells on these same surfaces is shown in Fig. 5. OC production increased

Fig. 3 Gene expression of MC3T3-E1 pre-osteoblasts on Ti surfaces with different surface treatments (Blue:Ti, red: Ti + APTES + Malonic acid, green: Ti + APTES + Malonic acid + MP144) quantified by qRT-PCR after 1, 3, and 7 days of cell culture. Ratios of target genes relative to housekeeping gene β -actin were expressed relative to tissue culture polystyrene after 2 days of cell culture. Groups marked with same symbols (a–c) indicate non-statistically significant differences between them. **a** Ti. **b** Ti + APTES + Malonic acid. **c** Ti + APTES + Malonic acid + MP144. Comparisons are for groups at the same culture time

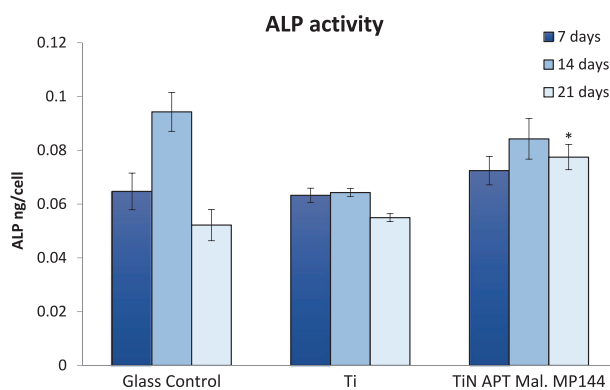
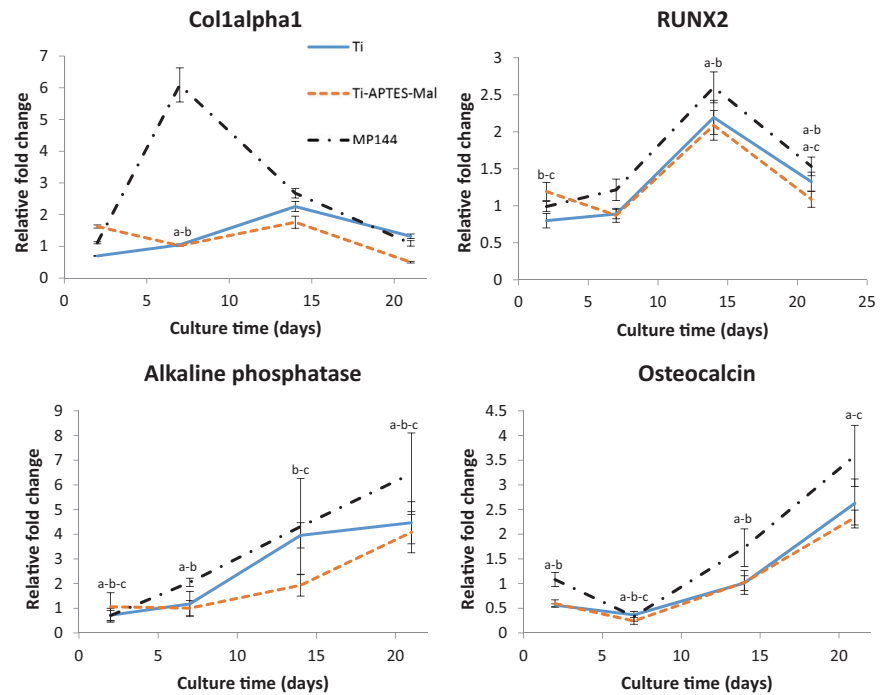


Fig. 4 Alkaline phosphatase activity of human mesenchymal stem cells seeded on Ti surfaces with different surface treatments after 7, 14 and 21 days of culture. *: indicates statistically significant differences with respect to Ti at the same time of culture

continuously over culture time. The MP144 biofunctionalized surfaces showed higher production of osteocalcin at 14 and 21 days compared to CP-Ti controls although not statistically significant after 21 days of culture. These results correlated with the findings on gene expression by MC3T3-E1 cells confirming the effectiveness of the biofunctionalized surfaces on promoting osteoblastic differentiation.

4.3 Effects of biofunctionalized surfaces on fibroblasts

Figure 6 shows collagen type 1 (col 1 alpha 1), fibronectin (FN), alpha smooth muscle actin and matrix metalloproteinases 2,3 and 9 (MMP2, MMP3 and MMP9 respectively)

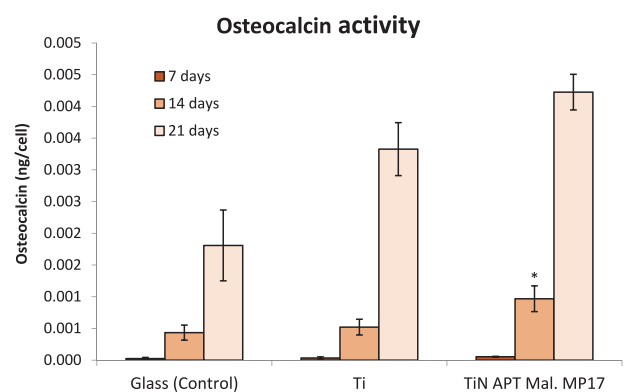
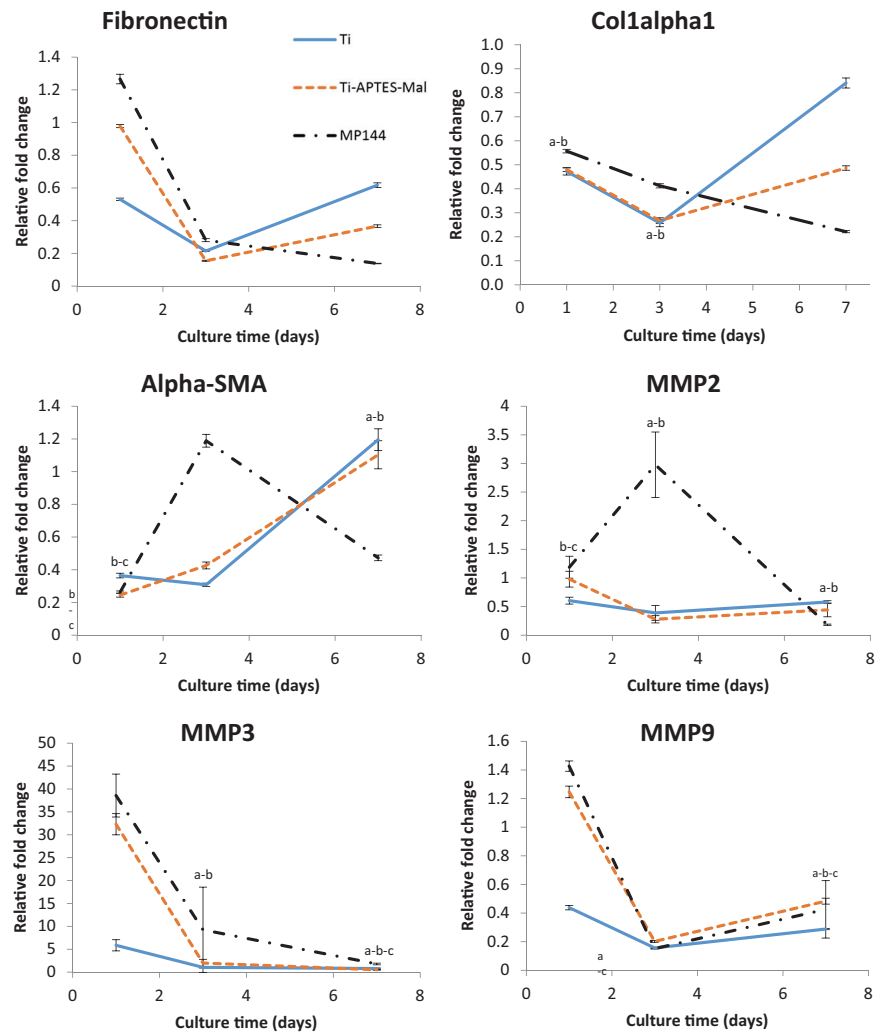


Fig. 5 Osteocalcin production per cell by human mesenchymal stem cells seeded on Ti surfaces with different surface treatments after 7, 14 and 21 days of culture. *: indicates statistically significant differences with respect to Ti at the same time of culture

gene expression by NIH/3T3 fibroblasts cultured on the functionalized CP-Ti surfaces. TGF- β 1 stimulates the production of collagen among other fibroblastic proteins like alpha-SMA and fibronectin [40–42]. MP144-functionalized CP-Ti surfaces continuously decrease collagen expression over time, as opposed to control surfaces. This resulted in a markedly decreased collagen expression on MP144 coated surfaces after 7 days of fibroblast culture in comparison to control surfaces. This result proves an inhibitory effect of the MP144-functionalized surfaces on the expression of collagen.

Alpha-smooth muscle actin (α -SMA) is a common marker for myofibroblast formation [43, 44]. Alpha-SMA is present in the contractile apparatus as well as in the fibrous

Fig. 6 Gene expression of 3T3/NIH fibroblasts on Ti surfaces with different surface treatments (Blue:Ti, red: Ti + APTES + Malonic acid, black: Ti + APTES + Malonic acid + MP144) quantified by qRT-PCR after 1, 7, 14, and 21 days of cell culture. Ratios of target genes relative to housekeeping gene, β -actin, were expressed relative to tissue culture polystyrene after 2 days of cell culture. Groups marked with same symbols (a–c) indicate non statistically significant differences between them. **a** Ti. **b** Ti + APTES + Malonic acid. **c** Ti + APTES + Malonic acid + MP144. Comparisons are for groups at the same culture time



tissue [45]. Effects on α -SMA expression by fibroblasts on MP144-coated surfaces were notably different than on collagen expression. α -SMA expression on MP144-coated surfaces was markedly increased at early times of cell culture but sharply decreased to significantly lower values than on control surfaces after 7 days of culture.

Insoluble cellular fibronectin is a major component of the extracellular matrix. It is secreted by various cells, primarily fibroblasts, as a soluble protein dimer and is then assembled into an insoluble matrix in a complex cell-mediated process [46]. Fibronectin expression by fibroblasts showed similar temporal evolution over time for controls surfaces with the lowest expression after 3 days of cell culture. However, as in the case of collagen expression, fibronectin expression continuously decreased for cells on MP144-functionalized surfaces which expressed the lowest values of all tested groups after 7 days in culture.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of enzymes that are secreted by connective tissue cells, inflammatory phagocytes, and a number of different

transformed cells. MMPs are responsible for normal turnover and remodeling of the extracellular matrix during normal tissue regeneration and after injury healing by breaking down most components in the extracellular matrix, including collagen, laminin, fibronectin and elastin [47]. Matrix metalloproteinase-2, also known as gelatinase A, readily digests the denatured collagens type I, II, and III [48] and is related to certain bone diseases, such as osteolysis and arthritis, when a mutation of the MMP-2 gene occurs [49]. TGF- β 1 can induce the expression of this protein [50]. Matrix metalloproteinase-3 degrades collagen types II, III, IV, IX, and X, proteoglycans, fibronectin, laminin, and elastin. In addition, MMP-3 can also activate other MMPs such as MMP-1, MMP-7, and MMP-9, rendering MMP-3 crucial in connective tissue remodeling [51]. The enzyme is thought to be involved in wound repair, progression of atherosclerosis, and tumor initiation. The expression of MMP-3 is an indicator for myofibroblastic activity and remodeling of the extracellular matrix. Matrix metalloproteinase-9 degrades type IV and V collagens [52].

Also, MMP-9 is related to inflammatory processes [53]. MP144-coated surfaces did not have significant effects on the expression of all MMPs when compared to control groups, except for a marked increase of MMP2 after 3 days in culture. These results indicate that the functionalized surfaces did not induce differentiated matrix remodeling responses mediated by fibroblasts.

These results suggest that the MP144-functionalized surfaces have a continuous inhibition of the fibroblast activity that results in significant effects in comparison to control surfaces after 7 days of culture.

5 Discussion

P144 is a TGF- β 1 inhibitory peptide that inhibits the TGF- β 1 signaling pathway and reduces myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats [18]. P144 binds TGF- β 1 blocking the interaction between TGF- β 1 and the cell receptors and, therefore, reduces production of type I collagen and fibrotic reactions [3, 17]. Here, we immobilized P144 on commercially pure titanium by covalent attachment. The P144-functionalized surfaces promoted osteoblastic differentiation on mesenchymal stem cells and reduced expression of fibroblastic markers on MC3T3-E1 pre-osteoblast cells.

The MP144 biofunctional coatings on CP-Ti surfaces hindered the expression of phospho-SMAD2 and therefore, inhibited the TGF- β 1 signaling pathway. Results of gene expression of relevant markers for osteoblast and fibroblast differentiation further validated that the MP144 peptides on CP-Ti surfaces downregulated gene expression related to fibroblast activation and upregulated gene expression related to osteoblasts differentiation.

APTES silanized CP-Ti surfaces treated with malonic acid using HBTU readily reacted with primary amines in the peptide sequence and produced a covalent bond between the peptides and the linker, malonic acid. The stability of the tethered peptides facilitated retention of the bioactive coating after mechanical challenge and can also facilitate sustained bioactive effect of the peptides over extended periods of time. This fact in combination with the high density of anchored peptides might account for the significant inhibitor effect of the MP144 coatings on fibroblast gene expression at the longest time of culture tested here.

MP144 functionalized surface showed general strong osteoinductive effect that promoted the expression of all osteoblastic differentiation markers. Also, osteoprogenitor cells showed an increase in production of osteoblast differentiation markers on MP144 coated surfaces in comparison to non-coated surfaces. TGF- β 1 has been proven to promote osteoblast differentiation in MC3T3 cells [50], whereas some studies reported negative effects of using

exogenous TGF- β 1 on the differentiation of osteoblasts [4, 54–56] and the improvement of osteoblastic differentiation when this cytokine is inhibited [57]. Our results on ALP activity and OC production by human mesenchymal stem cells supported results found by others on effects on gene expression by MC3T3 cells when studying the effect on TGF- β 1 and its inhibition [58–60]. We have previously reported the use of coating made with the inhibitor peptide MP17 [61]. MP144-coated CP-Ti surfaces induced differentiation of osteoblast, as shown here, whereas MP17-coated surfaces inhibited it (results not shown). The different effects of the two TGF- β 1 inhibitor peptide coatings on osteoblast response will be further studied.

Overall, these results demonstrated that the coatings with TGF- β 1 inhibitor MP144 peptide are preferential candidates to be used in bone repair and regeneration applications with the ultimate purpose of accelerating osseointegration and improving the quality of interfacial interactions during the process of healing and regeneration after implantation.

6 Conclusions

A new commercially pure titanium surface with capability to inhibit TGF- β 1 has been developed. The covalent immobilization of P144 peptide was achieved by APTES-Malonic acid route obtaining a mechanically stable surface. The new surface is biocompatible and its capability to inhibit TGF- β 1 signaling pathway on MC3T3-E1 cells has been proved. CP-Ti surfaces functionalized with P144 inhibit the long term fibroblastic differentiation and activity and notably favored osteoblast and osteoprogenitor cell differentiation.

The results proved that the coatings produced with MP144 peptides are preferential candidates to be used in bone repair and regeneration applications with the ultimate purpose of accelerating osseointegration and improving the quality of interfacial interactions during the process of healing and regeneration after implantation.

Acknowledgements This work was partially supported by the University of Minnesota through a Grant-in-Aid of Research, Artistry, and Scholarly (CA), and the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (project MAT 2012-30706) (FJG). PS acknowledges financial support from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through a fellowship for research stays at international institutions (FPU-MEC). Parts of this work were carried out in the University of Minnesota I.T. Characterization Facility, which receives partial support from NSF through the MRSEC program. Parts of this work were carried out in the Institute for Bioengineering of Catalonia-IBEC.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Sporn MB, Roberts AB. Introduction: what is TGF-beta? Ciba Found Symp. 1991;157:1–6.
- Massague J. The transforming growth factor-beta family. Annu Rev Cell Biol. 1990;6:597–641.
- Ezquerro I-J, Lasarte J-J, Dotor J, Castilla-Cortázar I, Bustos M, Peñuelas I, Blanco G, Rodríguez C, del M, Lechuga CG, Greenwel P, Rojkind M, Prieto J, Borrás-Cuesta F. A synthetic peptide from transforming growth factor [beta] type III receptor inhibits liver fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride liver injury. Cytokine. 2003;22:12–20.
- Bosetti M, Boccafoschi F, Leigheb M, Cannas MF. Effect of different growth factors on human osteoblasts activities: a possible application in bone regeneration for tissue engineering. Biomol Eng. 2007;24:613–8.
- Summer DR, Turner TM, Purchio AF, Gombotz WR, Urban RM, Galante JO. Enhancement of bone ingrowth by transforming growth factor-beta. J Bone Jt Surg. 1995;77:1135–47.
- Clokie CML, Bell RC. Recombinant human transforming growth factor beta-1 and its effects on osseointegration. J Craniofac Surg. 2003;14:268–77.
- Schmidmaier G, Lucke M, Schwabe P, Raschke M, Haas NP, Wildemann B. Collective review: bioactive implants coated with poly(D,L-lactide) and growth factors IGF-I, TGF-beta1, or BMP-2 for stimulation of fracture healing. J Long Term Eff Med Implants. 2006;16:61–9.
- Lind M, Overgaard S, Søballe K, Nguyen T, Ongpipattanakul B, Bünger C. Transforming growth factor-beta1 enhances bone healing to unloaded tricalcium phosphate coated implants: an experimental study in dogs. J Orthop Res. 1996;14:343–50.
- Lind M. Transforming growth factor-beta1 adsorbed to tricalcium-phosphate coated implants increases peri-implant bone remodeling. Biomaterials. 2001;22:189–93.
- Aspenberg P, Jeppsson C, Wang J-S, Boström M. Transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein 2 for bone ingrowth: a comparison using bone chambers in rats. Bone. 1996;19:499–503.
- Tielinen L, Puolakkainen P, Pohjonen T, Rautavuori J, Törmälä P, Rokkanen P. The effect of transforming growth factor-beta1, released from a bioabsorbable self-reinforced polylactide pin, on a bone defect. Biomaterials. 2002;23:3817–23.
- Ueda H, Hong L, Yamamoto M, Shigeno K, Inoue M, Toba T, Yoshitani M, Nakamura T, Tabata Y, Shimizu Y. Use of collagen sponge incorporating transforming growth factor-beta1 to promote bone repair in skull defects in rabbits. Biomaterials. 2002;23:1003–10.
- Nikolidakis D, Meijer GJ, Oortgiesen DAW, Walboomers XF, Jansen JA. The effect of a low dose of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) on the early bone-healing around oral implants inserted in trabecular bone. Biomaterials. 2009;30:94–99.
- Aparicio C, Padrós A, Gil F-J. In vivo evaluation of micro-rough and bioactive titanium dental implants using histometry and pull-out tests. J Mech Behav Biomed Mater. 2011;4:1672–82.
- Javed F, Romanos GE. The role of primary stability for successful immediate loading of dental implants. A literature review. J Dent. 2010;38:612–20.
- Vicent S, Luis-Ravelo D, Antón I, García-Tuñón I, Borrás-Cuesta F, Dotor J, De Las Rivas J, Lecanda F. A novel lung cancer signature mediates metastatic bone colonization by a dual mechanism. Cancer Res. 2008;68:2275–85.
- Serrati S, Margheri F, Pucci M, Cantelmo AR, Cammarota R, Dotor J, Borrás-Cuesta F, Fibbi G, Albini A, Del Rosso M. TGFbeta1 antagonistic peptides inhibit TGFbeta1-dependent angiogenesis. Biochem Pharmacol. 2009;77:812–25.
- Hermida N, López B, González A, Dotor J, Lasarte JJ, Sarobe P, Borrás-Cuesta F, Díez J. A synthetic peptide from transforming growth factor-beta1 type III receptor prevents myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. Cardiovasc Res. 2009;81:601–9.
- Sevilla P, Holmberg K, Rodríguez D, Gil J, Aparicio C. Bio-functionalisation of titanium surfaces with TGF-beta inhibitor peptides, in *24th European Conference on Biomaterials—Annual Conference of the European Society for Biomaterials*, 2011.
- Sevilla P. Functionalization of titanium surfaces with TGF-beta inhibitor peptides. Universitat Politècnica de Catalunya. 2013; 221–224.
- Sevilla P, Gil J, Aparicio C., Relevant properties for immobilizing short peptides on biosurfaces. IRBM. 2017;38:256–265. <https://doi.org/10.1016/J.IRBM.2017.06.003>.
- Lloyd-Williams P, Albericio F, Giralt. Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, in *New Directions in Organic and Biological Chemistry*. CRC-Press, Boca Raton, Florida, USA, 1997.
- Gil FJ, Padrós A, Manero JM, Aparicio C, Nilsson M, Planell JA. Growth of bioactive surfaces on titanium and its alloys for orthopaedic and dental implants. Mater Sci Eng C. 2002;22:53–60.
- Xing Y, Borguet E. Specificity and sensitivity of fluorescence labeling of surface species. Langmuir. 2007;23:684–8.
- Xing Y, Dementev N, Borguet E. Chemical labeling for quantitative characterization of surface chemistry. Curr Opin Solid State Mater Sci. 2007;11:86–91.
- McArthur EA, Ye T, Cross JP, Petoud S, Borguet E. Fluorescence detection of surface-bound intermediates produced from UV photoreactivity of alkylsiloxane SAMs. J Am Chem Soc. 2004;126:2260–1.
- Fykse EM, Olsen JS, Skogan G. Application of sonication to release DNA from Bacillus cereus for quantitative detection by real-time PCR. J Microbiol Methods. 2003;55:1–10.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucl Acids Res. 2001;29:e45–45.
- Chen X, Sevilla P, Aparicio C. Surface biofunctionalization by covalent co-immobilization of oligopeptides. Colloids Surf B Biointerfaces. 2013;107:189–97.
- Aparicio C, Manero JM, Conde F, Pegueroles M, Planell JA, Vallet-Regí M, Gil FJ. Acceleration of apatite nucleation on microrough bioactive titanium for bone-replacing implants. J Biomed Mater Res A. 2007;82:521–9.
- Lin RY, Sullivan KM, Argenta PA, Meuli M, Lorenz HP, Adzick NS. Exogenous transforming growth factor-beta amplifies its own expression and induces scar formation in a model of human fetal skin repair. Ann Surg. 1995;222:146–54.
- Souchelnytskyi S, Rönnstrand L, Heldin CH, ten Dijke P, Ronnstrand L, Heldin CH, ten Dijke P. Phosphorylation of Smad signaling proteins by receptor serine/threonine kinases. Methods Mol Biol. 2001;124:107–20.
- zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ. In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. Differentiation. 2003;71:18–27.
- George J, Kuboki Y, Miyata T. Differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts on honeycomb collagen scaffolds. Biotechnol Bioeng. 2006;95:404–11.
- Zhu B, Lu Q, Yin J, Hu J, Wang Z. Alignment of osteoblast-like cells and cell-produced collagen matrix induced by nanogrooves. Tissue Eng. 2005;11:825–34.
- Cho Y-E, Alcántara E, Kumaran S, Son K-H, Sohn H-Y, Lee J-H, Choi C-S, Ha T-Y, Kwun I-S. Red yeast rice stimulates osteoblast proliferation and increases alkaline phosphatase activity in MC3T3-E1 cells. Nutr Res. 2010;30:501–10.
- Franceschi RT, Ge C, Xiao G, Roca H, Jiang D. Transcriptional regulation of osteoblasts. Ann NY Acad Sci. 2007;1116:196–207.

38. Wang D, Christensen K, Chawla K, Xiao G, Krebsbach PH, Franceschi RT. Isolation and characterization of MC3T3-E1 pre-osteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *J Bone Miner Res.* 1999;14:893–903.
39. Nakamura A, Dohi Y, Akahane M, Ohgushi H, Nakajima H, Funaoka H, Takakura Y. Osteocalcin secretion as an early marker of in vitro osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part C Methods.* 2009;15:169–80.
40. Silverio-Ruiz KG, Martinez AET, Garlet GP, Barbosa CF, Silva JS, Cicarelli RMB, Valentini SR, Abi-Rached RSG, Junior CR. Opposite effects of bFGF and TGF-beta on collagen metabolism by human periodontal ligament fibroblasts. *Cytokine.* 2007;39:130–7.
41. Kegui W, Liangdi X, Shuilong C. P-423: effects of TGF- β 1 and PDGF on collagen synthesis of cardiac fibroblasts from spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 2001;14:172A.
42. Moir LM, Burgess JK, Black JL. Transforming growth factor β 1 increases fibronectin deposition through integrin receptor α 5 β 1 on human airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:1034–9.e4.
43. Martinez EF, Araújo VC, Sousa SOM, Arana-Chavez VE. TGF-beta1 enhances the expression of alpha-smooth muscle actin in cultured human pulpal fibroblasts: immunochemical and ultrastructural analyses. *J Endod.* 2007;33:1313–8.
44. Mohan RR, Gupta R, Mehan MK, Cowden JW, Sinha S. Decorin transfection suppresses profibrogenic genes and myofibroblast formation in human corneal fibroblasts. *Exp Eye Res.* 2010;91:238–45.
45. Kisseleva T, Brenner DA. Anti-fibrogenic strategies and the regression of fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011;25:305–17.
46. Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci.* 2002;115:3861–3.
47. Rasmussen HS, McCann PP. Matrix metalloproteinase inhibition as a novel anticancer strategy: a review with special focus on Batimastat and Marimastat. *Pharmacol Ther.* 1997;75:69–75.
48. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003;92:827–39.
49. Martignetti JA, Aqeel AA, Sewairi WA, Boumah CE, Kambouris M, Mayouf SA, Sheth KV, Eid WA, Dowling O, Harris J, Glucksman MJ, Bahabri S, Meyer BF, Desnick RJ. Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. *Nat Genet.* 2001;28:261–5.
50. Xie J, Wang C, Huang D-Y, Zhang Y, Xu J, Kolesnikov SS, Sung KLP, Zhao H. TGF-beta1 induces the different expressions of lysyl oxidases and matrix metalloproteinases in anterior cruciate ligament and medial collateral ligament fibroblasts after mechanical injury. *J Biomech.* 2013;46:890–8.
51. Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J Biol Chem.* 1996;271:13055–60.
52. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4:197–250.
53. Halade GV, Jin Y-F, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase (MMP)-9: a proximal biomarker for cardiac remodeling and a distal biomarker for inflammation. *Pharmacol. Ther.* 2013;139:32–40. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.03.009>.
54. Erlebacher A, Derynck R. Increased expression of TGF-beta 2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype. *J Cell Biol.* 1996;132:195–210.
55. Kahai S, Vary CPH, Gao Y, Seth A. Collagen, type V, α 1 (COL5A1) is regulated by TGF- β in osteoblasts. *Matrix Biol.* 2004;23:445–55.
56. Fischer U, Hempel U, Becker D, Bierbaum S, Scharnweber D, Worch H, Wenzel K-W. Transforming growth factor β 1 immobilized adsorptively on Ti6Al4V and collagen type I coated Ti6Al4V maintains its biological activity. *Biomaterials.* 2003;24:2631–41.
57. Takeuchi K, Abe M, Hiasa M, Oda A, Amou H, Kido S, Harada T, Tanaka O, Miki H, Nakamura S, Nakano A, Kagawa K, Yata K, Ozaki S, Matsumoto T. TGF- β Inhibition Restores Terminal Osteoblast Differentiation to Suppress Myeloma Growth. *PLoS ONE.* 2010;5:e9870.
58. Spinella-Jaegle S, Roman-Roman S, Faucheu C, Dunn F-W, Kawai S, Galléa S, Stiot V, Blanchet AM, Courtois B, Baron R, Rawadi G. Opposite effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor- β 1 on osteoblast differentiation. *Bone.* 2001;29:323–30.
59. Sodek J, Li IWS, Li H, Bellows CG, McCulloch CAG, Tenenbaum HC, Ellen RP. The role of TGF- β and BMP-7 in regenerating bone and soft tissues. *Mater Sci Eng C.* 1994;2:19–26.
60. Shen Z-J, Kook Kim S, Youn Jun D, Park W, Ho Kim Y, Malter JS, Jo Moon B. Antisense targeting of TGF- β 1 augments BMP-induced upregulation of osteopontin, type I collagen and Cbfa1 in human Saos-2 cells. *Exp Cell Res.* 2007;313:1415–25.
61. Sevilla P, Vining KV, Dotz J, et al. Surface immobilization and bioactivity of TGF- β 1 inhibitor peptides for bone implant applications. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 2016;104:385–394. [10.1002/jbm.b.33374](https://doi.org/10.1002/jbm.b.33374).

Osseointegration around dental implants biofunctionalized with TGF β -1 inhibitor peptides: an in vivo study in beagle dogs.

Journal:	<i>Clinical Oral Implants Research</i>
Manuscript ID:	COIR-Jul-18-OR-7043
Manuscript Type:	Original Research
Date Submitted by the Author:	02-Aug-2018
Complete List of Authors:	CIRERA, ANDREA; Universidad de Granada Facultad de Odontologia, 18071 Campus Universitario de Cartuja Manzanares, Maria Cristina; Health Universitat de Barcelona Campus (HUBc), Barcelona, Spain, Human Anatomy and Embryology Unit, DPyTEx Sevilla, Pablo; Universitat Autònoma de Barcelona Escola Universitaria Salesiana de Sarria Franch, Jordi; Surgery Department, Veterinary School, Autonomous University of Barcelona Gil, Francisco Javier; Universitat Internacional de Catalunya Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Dentistry Galindo-Moreno, Pablo; Universidad de Granada, Oral Surgery and Implant Dentistry
Keywords:	Animal Experiments, Biomaterials, Bone implant interactions, Tissue physiology, structural biology

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

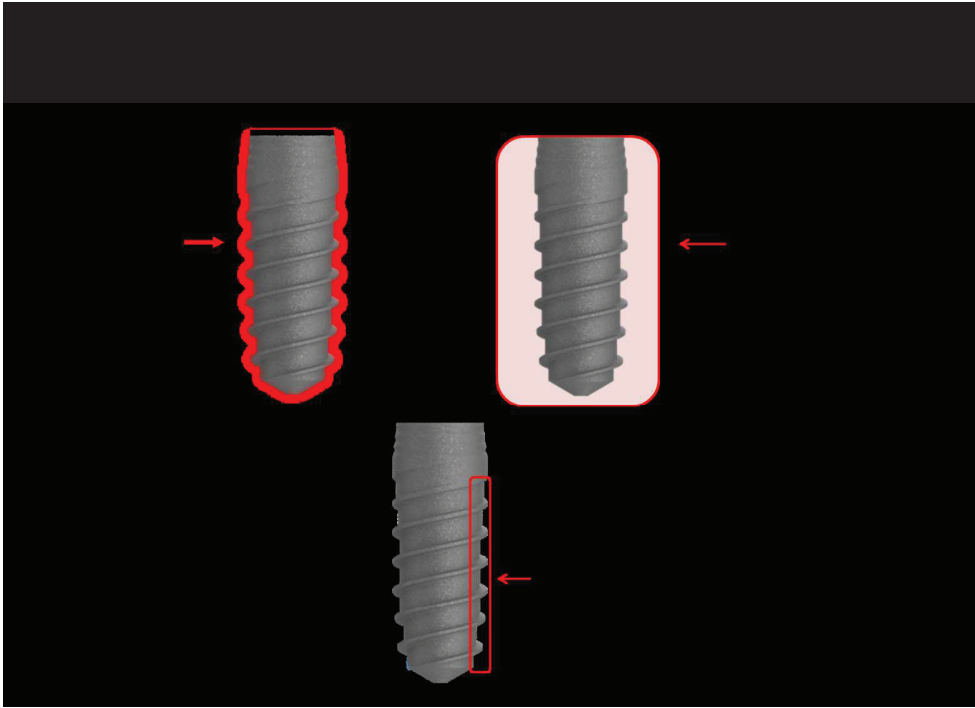


FIGURE 1. Scheme of the measurements for the calculations of Bone to implant contact (BIC), Bone Fraction (BF) and Interthread Bone (IB).

289x209mm (150 x 150 DPI)

Its Research

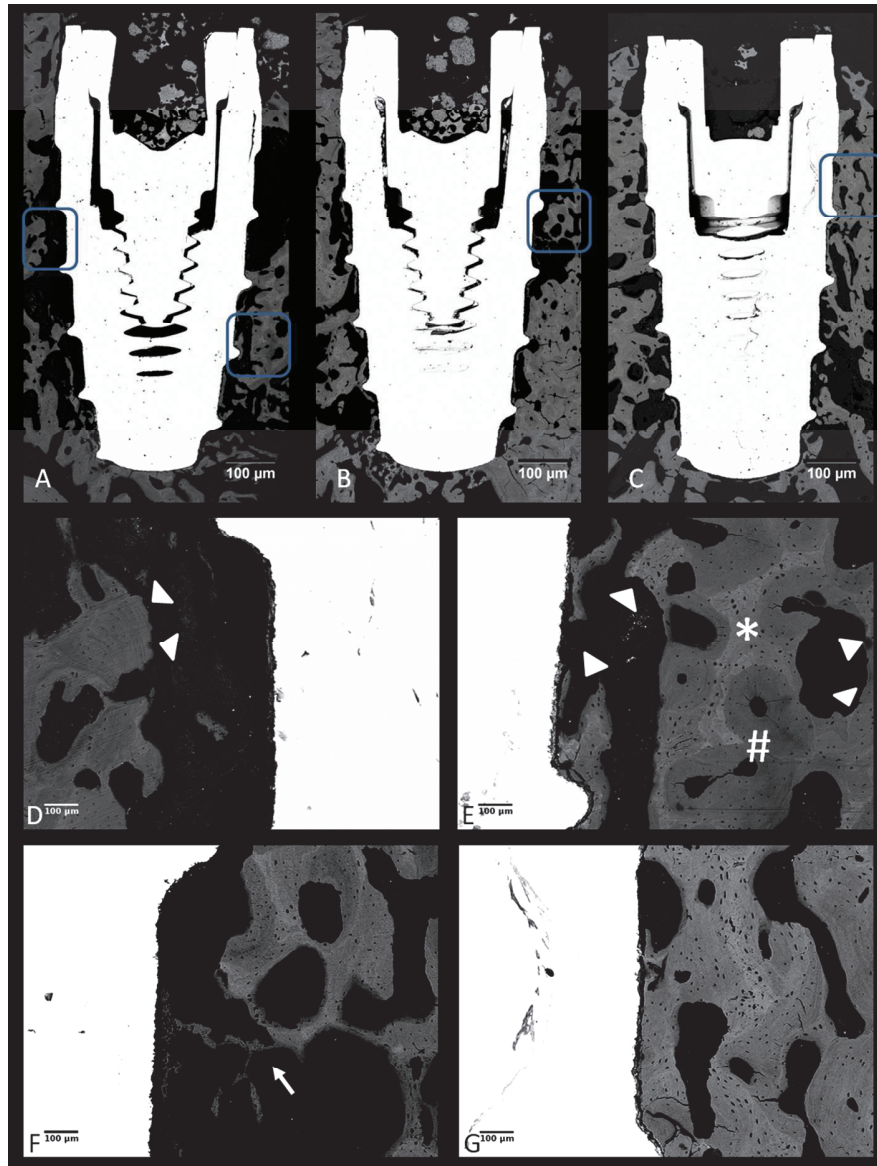


FIGURE 2. A, B and C: BS-SEM summative (stitched) images of the implants after 2 weeks of implantation. A: Control group; B: P17-biofunctionalized group; C: P144-biofunctionalized group. D and E: Framed areas in Figure 2A. D: White arrowheads: Howship's lacunae. E: White arrowheads: Howship's lacunae. *: cortical bone. # osteon. F and G: framed areas in Figure 2B and 2C, respectively. F: White arrow: chondroid tissue trabecula.

198x263mm (150 x 150 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

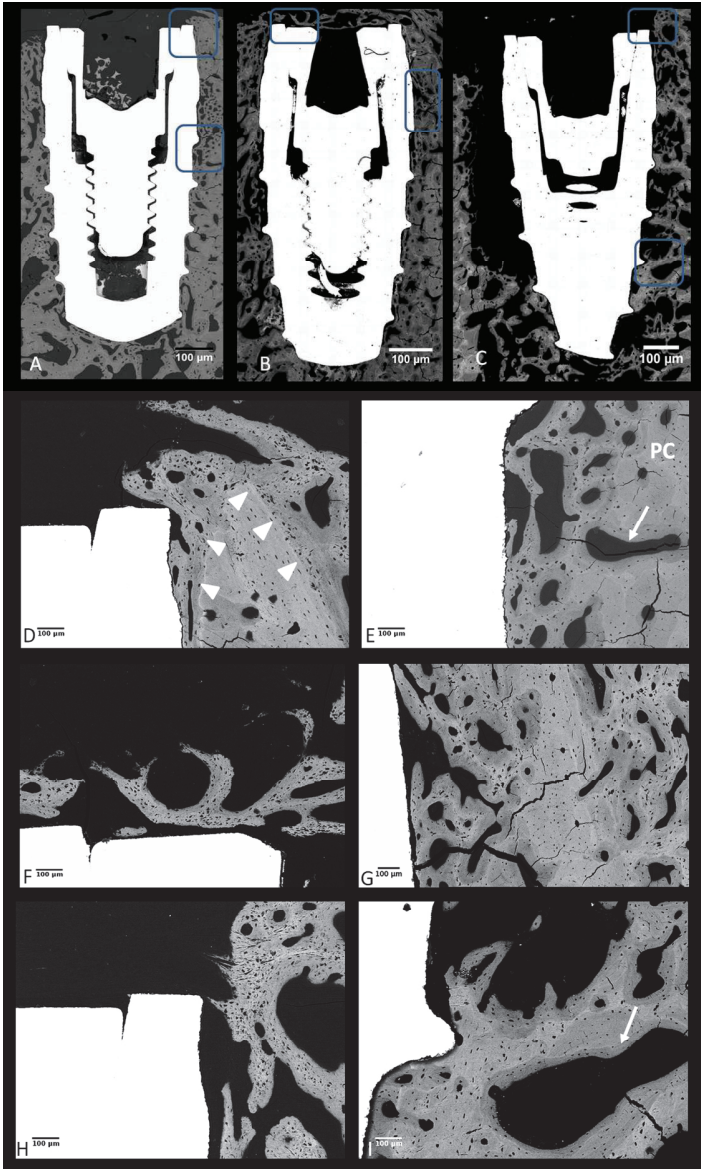


FIGURE 3. A, B and C: BS-SEM summative (stitched) images of the implants after 4 weeks of implantation. A: Control group; B: P17-biofunctionalized group; C: P144-biofunctionalized group. D and E: framed areas in Figure 3A. D: periosteal reaction. White arrowheads: cementing line; E: Peri-implant new bone area. White arrow: vascular channel; PC: preexisting cortical. F and G: framed areas in Figure 3B. H and I: framed areas in Figure 3C. H: Periosteal reaction; I: Calcified tissues around the implant. White arrow: lamellar bone around vascular channel.

207x345mm (150 x 150 DPI)

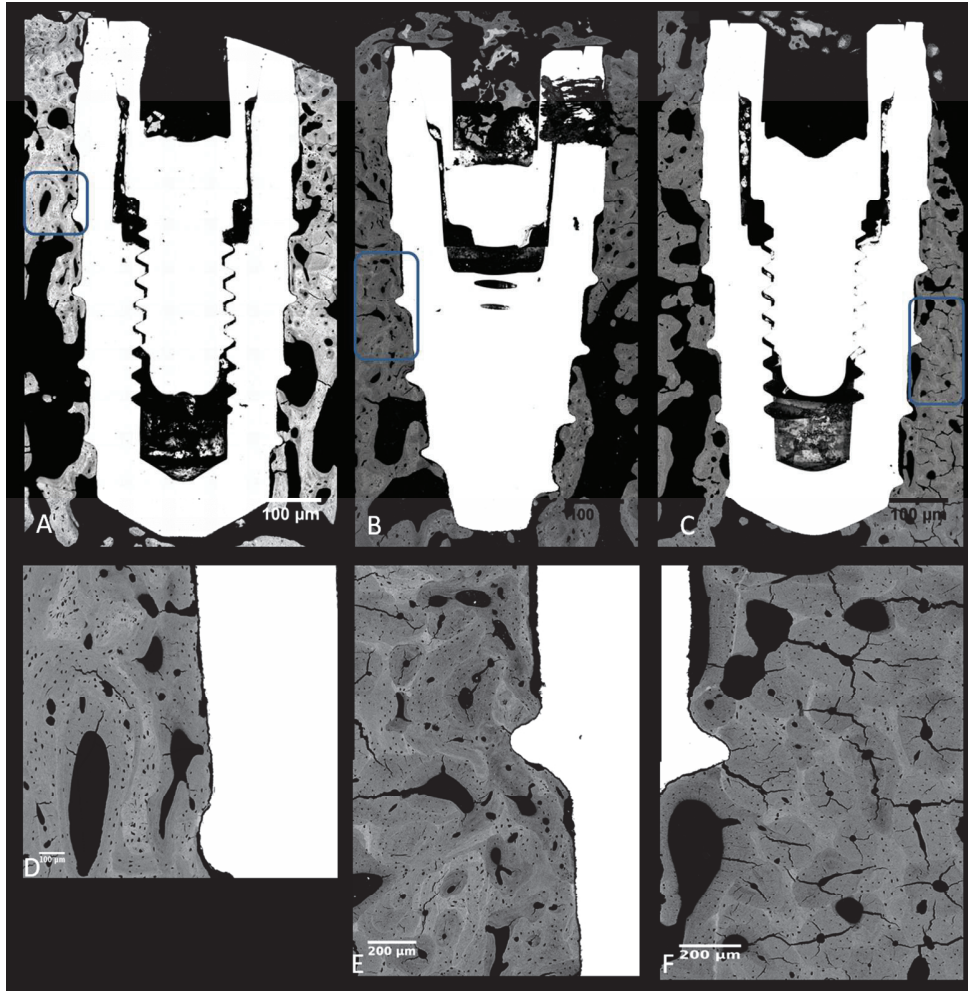


FIGURE 4. A, B and C: BS-SEM summative (stitched) images of the implants after 8 weeks of implantation. A: Control group; B: P17-biofunctionalized group; C: P144-biofunctionalized group; D: framed area in Figure 4A; E: framed area in Figure 4B; F: framed area in Figure 4C.

217x222mm (150 x 150 DPI)

arch

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

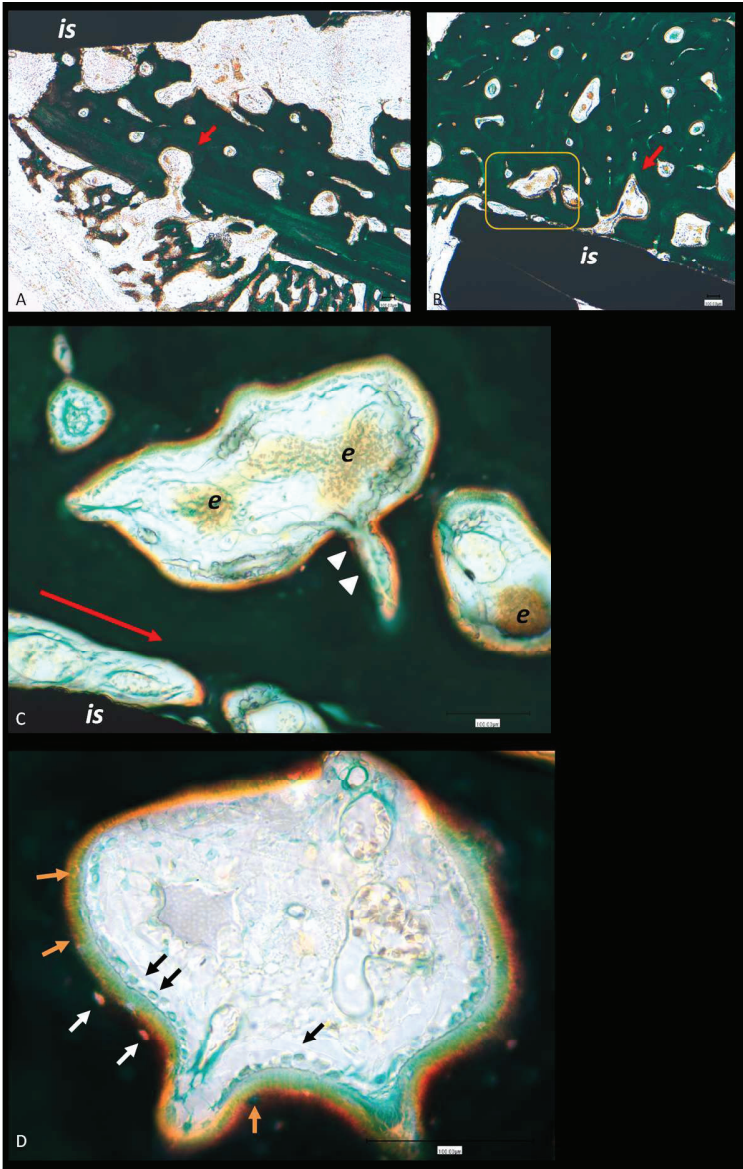


FIGURE 5. Results after 2 weeks of implantation A: Control group sample. Red arrow: vascular. is: implant surface; B: P144 sample after 2 weeks of implantation. Red arrow: vascular channel; C: (20x magnification, framed area in figure 5B). White arrowheads: radial branching of cortical vascular channels; red arrow: orientation of peri-implant vascular channels; is: implant surface; e: erythrocytes within vessels of vascular channels. D: (50x magnification). P144 biofunctionalized sample after 2 weeks of implantation. Black arrows: lining cells; orange arrows: osteoblasts; white arrows, osteocyte lacunae.

255x401mm (150 x 150 DPI)

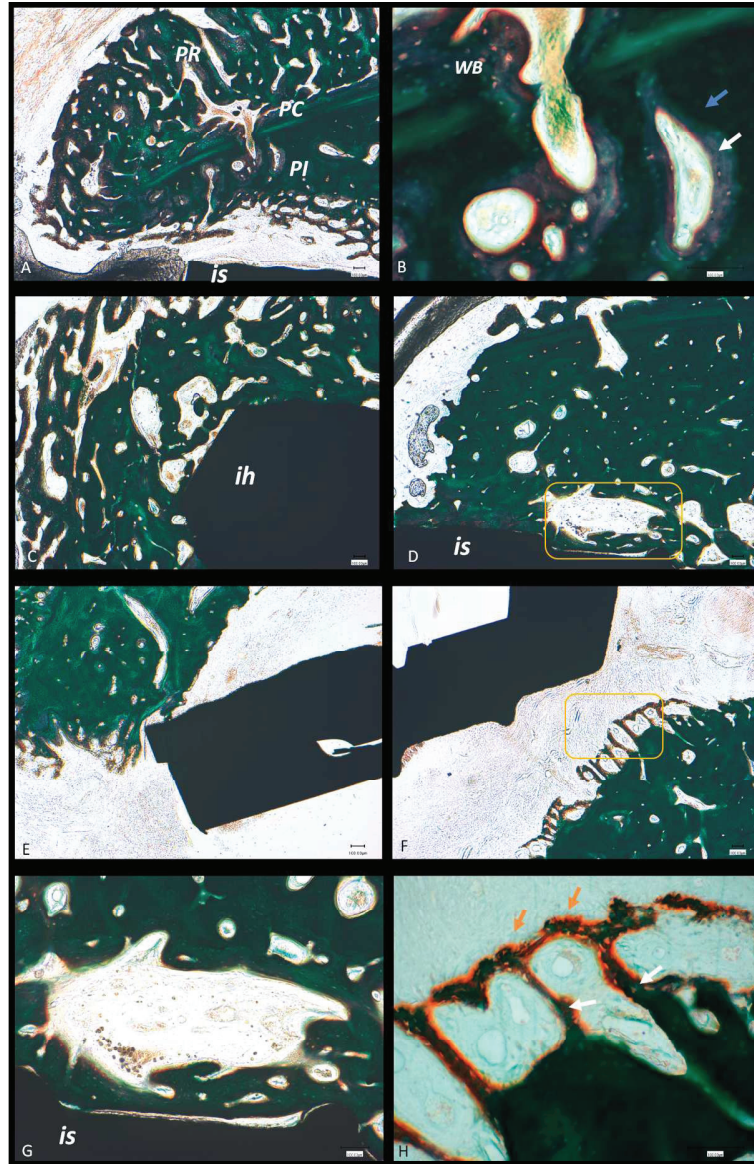


FIGURE 6. Results after 4 weeks of implantation. A and B Control sample. A: (10x) PC: preexisting cortical; PR: periosteal reaction; PI: peri-implantary reaction. is: implant surface. B: (50x) vessel in the center of image A. WB: woven bone; White arrow: newly deposited lamellar bone. Blue arrow: older, more calcified cortical bone. C and D (10x) P17 biofunctionalized sample. C: periosteal reaction; ih: implant head; D: peri-implant callus; is: implant surface. E and F: (10x) P144 biofunctionalized sample E: periosteal callus and head of the implant; F: implant surface and alveolar bone. G: (20x, framed area in Fig 6D). P17 biofunctionalized sample. Abundant peri-implant vascular channels. New bone lamellae deposition in contact with the implant surface (is). H (20x, framed area in Fig 6F): lamellar bone deposition (white arrows); chondroid tissue (orange arrows).

276x426mm (150 x 150 DPI)

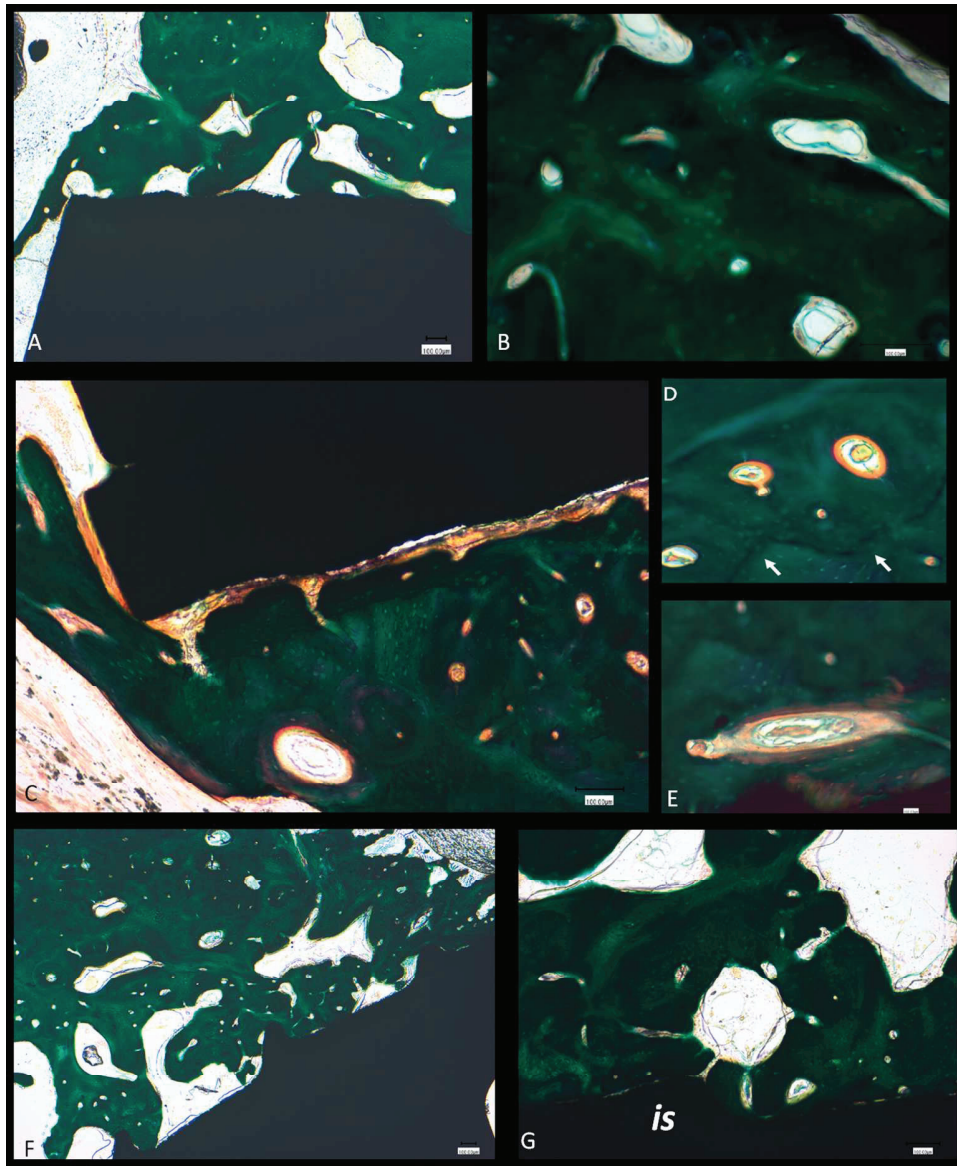


FIGURE 7. Results after 8 weeks of implantation. A and B Control sample. A: (10x) Calcified tissues around the implant head. B: (50x) lining cells inside vascular channels. C, D and E P17 biofunctionalized sample. C: (20x) metachromasia (purple hue) of the newly formed lamellar bone. D: (50x) vascular channels lined by non-calcified bone matrix (orange). Arrows: cementing line. E: (50x) vascular channel concentrically lined by non-calcified bone matrix (orange) and newly formed lamellar bone (purple). F and G P144 biofunctionalized sample. F: (10x) vascular channels around implant surface. G: (20x) vascular channels oriented towards the implant surface (is); the different hues of the osseous tissues indicate active bone remodeling.

250x303mm (150 x 150 DPI)



RESOLUCIÓ

Assumpte: autorització de procediment d'experimentació núm. **8890**

Identificació de l'expedient

Resolució per a la realització de procediments d'experimentació sol·licitat pel centre **Servei de Granges i Camps Experimentals**, a l'empara del Decret 214/1997, de 30 de juliol, pel qual es regula la utilització d'animals per a experimentació i per a altres finalitats científiques.

Antecedents

1. El centre va presentar sol·licitud d'autorització expressa per a l'execució del procediment d'experimentació que es relaciona tot seguit, atès que en principi es troba inclòs en algun dels supòsits establerts a l'article 34 del Decret 214/1997:

“Aplicació quirúrgica de nous implants quirúrgico-dentals per avaluar-ne la seva osteointegració i resposta tisular en gos”

3256

Investigador/a responsable: Jordi Franch Serracanta

2. La Comissió d'Experimentació Animal, en la reunió feta el **10.05.2016** va informar **Favorablement** la realització d'aquest procediment d'experimentació.

Fonaments de dret

1. El Decret 214/1997, de 30 de juliol, pel qual es regula la utilització d'animals per a experimentació i per a altres finalitats científiques, estableix que per a la realització de procediments d'experimentació que es troben inclosos en algun dels supòsits establerts al seu article 34, es requereix autorització expressa.
2. L'article 36 de l'esmentat Decret estableix que la Comissió d'Experimentació Animal emetrà un informe sobre la realització dels procediments que requereixen autorització expressa, que tindrà caràcter vinculant.
3. D'acord amb la Llei 30/1992, de règim jurídic de les administracions públiques i del procediment administratiu comú, emeto la present

1
2
3
4
5 **Resolució**
6

7 Per tant, resolc:

- 8
9
10 1. Informar **Favorablement** la sol·licitud d'autorització expressa del procediment
11 d'experimentació que es relaciona a continuació, al qual se l'ha assignat el número
12 d'ordre que segueix:

13
14 **Títol: "Aplicació quirúrgica de nous implants quirúrgico-dentals per avaluar-ne
15 la seva osteointegració i resposta tisular en gos"**

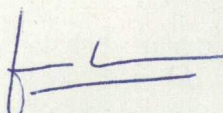
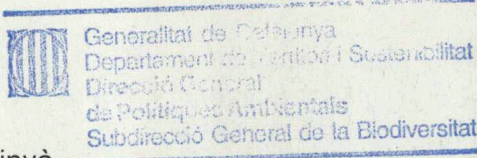
16 Investigador/a responsable: Jordi Franch Serracanta

17
18 Núm. ordre DAAM: **8890**

- 19
20
21 2. S'autoritza la realització d'aquest procediment d'experimentació fins la data:
22 **27.05.2018**
23
24 3. Aquesta autorització no eximeix del compliment i disposició d'altres autoritzacions,
25 d'acord amb la normativa sectorial vigent.
26
27
28
29

30 Contra aquesta resolució que no exhaureix la via administrativa, es pot interposar recurs
31 d'alçada davant el director general de Polítiques Ambientals en el termini d'un mes, a
32 comptar de l'endemà de la notificació d'aquesta resolució, segons el que estableix l'article
33 114 de la Llei 30/1992, de 26 de novembre, de règim jurídic de les administracions públiques
34 i del procediment administratiu comú.
35

36
37 El subdirector general de la Biodiversitat

38
39  
40
41
42
43 **Jaume Vicens Perpinyà**
44

45 Barcelona, 27 de maig de 2016
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **Osseointegration around dental implants biofunctionalized with TGF β -1 inhibitor peptides:**
4 **an *in vivo* study in beagle dogs.**
5

6 Cirera A.*, Manzanares MC., Sevilla P., Franch J., Gil J., Galindo-Moreno P.
7

8
9 **Abstract:**

10
11 **Objectives:** The aim of this study was to evaluate the effect on osseointegration of
12 biofunctionalization with two TGF- β 1 inhibitor peptides, P17 and P144, on dental implants.
13

14
15 **Material and methods:** Three groups of implants (VEGA, Klockner[®]) with 3,5x8mm internal
16 connection were used: (1) control (n=12), (2) biofunctionalized with P17 peptide inhibitor
17 (n=12), (3) biofunctionalized with P144 peptide (n=12). Three implants were inserted in both
18 hemimandibles of 6 beagle dogs 2 months after tooth extraction. Two animals were sacrificed
19 2, 4 and 8 weeks post implant insertion, respectively. The samples were submitted to
20 Backscattering Scanning Electron Microscopy (BS-BS-SEM) and histological analysis.
21 Histomorphometrical analyses: Bone to implant contact (BIC), Peri-implant bone fraction (BF)
22 and IB (interthread bone) were carried out.
23

24
25 **Results:** Blood vessels within vascular channels and osseous cells and tissues are present since
26 early times of healing in the biofunctionalized implants. The surface biofunctionalization
27 maintains a stable peri-implant membranous bone formation through the experiment
28 timeline. Better results in the experimental groups were proven both by the quantitative and
29 the qualitative analysis.
30

31
32 **Conclusion:** Surface biofunctionalization results in better quantitative and qualitative
33 parameters of implant's osseointegration. The peptide biofunctionalization may shorten the
34 healing period of dental implants.
35

36
37 **KEYWORDS:** osseointegration; biofunctionalization; histomorphometric analysis, scanning
38 electron microscopy, TGF- β 1, dental implant
39

40
41
42
43
44
45
46
47
48 **RUNNING TITLE:** Osseointegration of biofunctionalized implants
49

50
51 ***Corresponding author:** Andrea Cirera Estadella; Campus Universitario de Cartuja 18071
52 Granada, ES; andreacirera@gmail.com, +34690378320.
53
54
55
56
57

Introduction

During the osseointegration process, inflammatory and immune responses are generated (Cornelini et al. 2003). In early healing time, dental implants can be encapsulated by a fibrotic tissue layer, which thickness depends on the host reaction and micro-displacements between the implant and bone (Schiller et al. 2004; Dotor et al. 2007).

The topography of dental implants has been identified as an important factor affecting the osseointegration (Vlacic-Zischke et al. 2011). A molecular view of the kinetics of osseointegration reports the elements responsible for orchestrating cell migration, extracellular matrix deposition and maturation, angiogenesis, bone formation and remodeling at the bone-implant interface (Bigueti et al. 2018). Implant surface roughness and microtexture can affect the collagen fiber organization at the peri-implant bone because they are able to modify the cell architecture and function by increasing cell metabolism, phenotype expression and cell orientation (Anselme et al. 2000; Davidson et al, 2009).

When analyzing failed implants, an increased TGF- β 1 (Transforming growth factor beta 1) expression in the peri-implant tissues has been found. (Cornelini et al. 2003). It has been suggested that it is the central mediator of the fibrotic response. (Santiago et al. 2005). On the other hand, TGF- β superfamily members play a main role in tissue repair and bone remodeling (Branton & Kopp 1999). TGF- β 1 is involved in the control of proliferation, migration, differentiation and survival of different kind of cells. It has a major role on embryogenesis, angiogenesis and inflammation. In skeletal tissue, TGF- β 1 is involved in the development and maintenance of cartilage and bone (Janssens et al. 2005).

However, the exact role of TGF- β as a promotor or inhibitor in the inflammatory response remains unclear (Gonzalo-Gil & Galindo-Izquierdo 2014). TGF- β 1 can stimulate the proliferation of fibroblasts and epithelial cells derived from mesenchymal cells (Sporn & Roberts 1992). It also increments the expression of integrins and receptors that modulate the cell interactions with proteins of the extracellular matrix (Barnard et al. 1990).

The inhibition of TGF- β 1 can be a strategy to either stop the adverse effects of the fibrotic capsule production around dental implants or accelerate the osteoblast and osteoclasts activities and therefore osseointegration (Filvaroff et al. 1999; Shen et al. 2007) thus reducing healing time.

Recently, our group developed a biofunctionalized surface for titanium dental implants with TGF- β 1 inhibitor peptides, P17 and P144. These peptides block the interaction of TGF- β 1 with its receptor and, therefore, cells interaction (Ezquerro et al. 2003; Vicent et al. 2008; Serrati et

1
2
3 al. 2009). The *in vitro* results of this modification of the implant surface notably favored
4 osteoblast and osteoprogenitor cell differentiation (Sevilla et al. 2018). In addition, *in vitro*
5 studies in MC3T3-E1 stem cells performed by our group showed improvement of the quality of
6 interfacial interactions during the healing process (Sevilla et al. 2017).
7
8

9
10 The aim of this study was to evaluate the effect on the osseointegration of dental implants of
11 its biofunctionalization with two types of TGF- β 1 inhibitor peptide, P17 and P144.
12
13

14 **Material and methods**

15 **Description of the implant types and surfaces**

16
17 Three groups of implants (VEGA, Klockner®) with 3,5x8mm internal connection were used.
18
19 Group 1 was the control group (n=12); Group 2 implants (n=12), were biofunctionalized with
20 P17 peptide inhibitor, while Group 3 (n=12) were biofunctionalized with P144 peptide.
21
22
23

24 **Implant biofunctionalization process**

25
26 Dimethylformamide, NaOH, 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES), malonic acid, N,N,N',N'-
27 tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl) uronium hexafluorophosphate (HBTU), isopropanol, N,N-
28 diisopropylethylamine (DIEA) and Kaiser Test Kit were purchased from Sigma-Aldrich S(t. Louis,
29 MO, USA).
30
31
32

33
34 Acetone, ethanol and anhydrous toluene were acquired from Panreac S.A, (Barcelona, Spain).
35

36
37 P17 and P144 peptides were synthesized by solid-phase peptide synthesis method (Lloyd-
38 Williams et al. 1997) in an automatic APEX 396 multiple peptide synthesizer (AAPTEC LLC) and
39 kindly furnished by Digna Biotech (Madrid, Spain) in lyophilized state. The peptides were
40 dissolved in Dimethyl formamide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at a concentration of 0.2
41 mmol/l.
42
43
44

45
46 In order to anchor the peptides on the implants surface, the implants were submitted to a 4
47 steps process (Sevilla et al. 2011, 2017). Initially, implants were immersed in NaOH 5 mol/l at
48 60°C during 24 hours (Step 1) to form a high amount of OH⁻ groups on the Ti surface. After
49 activation, the implants were washed in distilled water during 30 minutes three times, rinsed
50 with acetone and dried with N₂ (Gil et al. 2002). After activation, the implants were silanized
51 (step 2) by immersing it in a 30 mmol/l APTES solution in anhydrous toluene at 70°C during 1h
52 with agitation and nitrogen atmosphere. Subsequently, the implants were sonicated in
53 anhydrous toluene for 15 minutes and washed with ethanol, isopropanol, distilled water and
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 acetone and dried with N₂. Step 3 consisted on anchoring a crosslinker (malonic acid) on the
4 APTES silanized surfaces immersing the implants in a dimethylformamide solution containing
5 malonic acid 10 mM, O-benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate
6 (HBTU) 30 mM and di-isopropylethylamine (DIEA) 100 mM during 2 h at room temperature
7 with agitation. Then, the samples were washed in pure dimethylformamide twice. Finally,
8 immobilization of P17 and P144 of oligopeptides (Step 4) on Ti surfaces was accomplished by
9 immersing overnight the treated implants into a DMF solution containing 0.2 mmol/l of the
10 P17 or P144 peptide at room temperature. Finally, the samples were washed with pure DMF
11 and ethanol twice and dried with N₂. The presence of the peptides on the implants surface was
12 confirmed by the performance of Kaiser Test on extra implants treated in the same batches.
13 The implants were then stored in dry conditions for subsequent sterilization and implantation.

14
15
16
17
18
19
20
21 Immediately prior implantation samples were sterilized by immersion in ethanol 70% during 10
22 minutes and rinsed in sterile PBS thrice.

23 24 25 **Animal model and animal selection criteria**

26
27 6 one-year-old male beagle dogs (body weight 12-15kg) were used for this study. The study
28 was approved by the Local Ethical Committee (CEEHA 3256 DMAH 8890) and all animal
29 procedures were performed under the European Community Guidelines (Directive
30 2010/63/EU). Prior to surgery, animals were acclimatized to the local environment for 2
31 weeks.
32
33
34

35 36 **Surgical procedures**

37
38 All experimental surgeries were performed at the *Hospital Clínic Veterinari* of the Universitat
39 Autònoma de Barcelona (Barcelona, Spain).
40

41
42 For surgical procedure, dogs were preanesthetized using an intramuscular injection of
43 medetomidine and methadone. Anaesthesia was induced by intravenous injection of propofol
44 and diazepam and maintained with inhaled isoflurane in an oxygen carrier. During surgery, all
45 animals received an intravenous saline isotonic solution and intravenous injection of cefazolin.
46 Local dental anaesthesia was achieved with articaine 4% 1:100.000 epinephrine infiltrative
47 technique at the site of extractions and surgery in mandibles.
48
49

50
51
52 Extractions of first, second and third premolar (P1, P2, P3) of each hemimandible were carried
53 out two months before the surgical implantation following an atraumatic technique.
54
55
56
57

Two months after extractions, implants were inserted in the mandible of the beagle dogs with a crestal technique and a cover screw was placed. Each animal received 6 implants, three at each hemimandible. Flap margins were adapted using a tension-free sutured with bioresorbable polyglactin 910-Vycril©4/0. X-Rays were done after every surgery.

Immediately after surgery, all animals received subcutaneously a prophylactic long-acting antibiotic (cefovecin) and pain relief (methadone and meloxicam).

During the postoperative period, a non-steroidal anti-inflammatory drug was given subcutaneously to the animals for 7 days to prevent pain and inflammation.

Two animals were euthanized at 2, 4 and 8 weeks post-implantation, by an intravenous injection of an overdose of pentobarbital sodium. A pre-euthanasia sedation of medetomidine was used for animal welfare reasons.

Histology and sample preparation

All samples were processed following the same protocol (Barba et al. 2017). To preserve tissues, mandibles were immediately immersed in a 10% formalin solution (pH=7) for three weeks. Afterwards, the jaws were dehydrated by immersion in aqueous solutions with increasing ethanol concentrations (30%, 50%, 70% 96% and twice 100%). One totally dehydrated, samples were embedded in MMA resin Technovit 7200 VLC (Kulzer-Heraeus, Germany) by immersion in with increasing resin concentrations (30%, 50%, 75% and 100%), using benzoic peroxide as initiator.

Then, resin polymerization was carried out with a photopolymerization unit EXAKT 520 (Exakt, Germany), during 12h with white light and 12h with UV light. After polymerization process, samples were stored in a heater (37°C) for evaporating resin vapors and cut in coronal sections using an irrigated diamond saw EXAKT 300 (Exakt). All samples were polished in a grinding machine EXAKT 400 CS (Exakt). One half of all samples were processed for scanning electron microscopy (BS-SEM) while the other halves were reserved for optical microscopy.

The blocks destined to scanning electron microscopy (BS-SEM) were polished with SiC abrasive papers with different index mesh (P800, P1200 and P4000) and coated with carbon sputtering to be observed.

The samples selected to be submitted to optical microscopy were sectioned and polished using the same SiC papers until obtaining a 50µm thickness, and then stained with Masson-Goldner Thricrome's.

Image acquisition and Quantification

BS-SEM observation was carried out by a Neon[®] 40 FIB/BS-SEM equipment (Zeiss, Germany).

All specimens were carbon coated to be examined by Backscattered BS-SEM two days before in a heater. The conditions of BS-SEM were 15kV, 8mm working distance, 250x magnification and 1024x678 resolution. An average of forty images per sample was obtained and an automatic stitching procedure was carried out to obtain a whole image of the implant at high resolution.

Quantification was carried out with Photoshop (Adobe Systems, USA) and ImageJ (NIH, *National Institutes of Health*) for measurements of Bone to implant contact (BIC), Peri-implant bone fraction (BF) and IB (Interthread bone) (Cardoso et al. 2014; Manresa et al. 2014). BIC (%) is defined as the percentage of the implant border line where there is direct bone contact without intervening tissues. In our analysis (Figure 1) BF (%) is defined as the percentage area of bone tissues within a rectangular area region (1,5x2 mm) situated 2 mm from the axis of the implant. Interthread Bone (IB) is the percentage area of the bone tissues situated between the threads of the implant.

Based on BS-SEM findings and histomorphometrical analysis, some samples were selected for the staining procedure and the optical microscopy observation in order to complement data with histological analysis.

A stitching procedure (x5, Nikon E600 Nikon, Japan) was made to obtain an image of the whole sample to guide the histological analysis (data not shown). Samples were observed at higher magnifications (10x, 20x, 50x) for tissue qualitative analysis and cell identification (Leica DMD 108, Leica Microsistemas S.L.U., Spain).

Statistical analysis

BIC, BF and Interthread Bone measurements were calculated for the implants in test and control groups. To determine statistically significant differences among groups, Minitab[™] 16 Statistical Software was used.

The postoperative healing was uneventful and peri-implant mucosa appeared to be clinically healthy. Three implants of the same dog were lost due to parafunctional mastication, and a sample had to be excluded of the histomorphometric analysis because of the loss of the implant during the manipulation of the sample. A total of 32 implants were analyzed.

Results

Table 1A shows results of BIC (%) around implants. P144-functionalized implant groups have the highest BIC values at 2 weeks, while at 4 weeks BIC appears to diminish and remains stable until 8 weeks. The increase is remarkable in the P17-group, as it doubles the BIC values with respect to control group 4 weeks after implant insertion and seems to maintain these values until the 8th week. The values of P17-group at eight weeks show significant differences with respect to both control group (*) and with P17 (+) at 2 weeks.

Table 1B shows percentages of bone formation in an area around the implant. Two weeks after implantation, implants biofunctionalized with P17 and P144 peptides show more bone formation with respect to control group. This increase is even higher at 4 (*) and 8 (**) weeks in the P17-implants, becoming the group with more bone formation, the differences being significant only with respect to control group at 2 weeks of implantation (p value <0.05).

Four weeks after insertion, there is almost the same bone formation at P144-biofunctionalized implant and control group, and it is slightly higher at eight weeks for P144, although no significant differences in these values have been found.

The results of the osseous tissues area found between the implant threads (IB) are showed in *Table 1C*. At two weeks, both experimental groups show a higher percentage of IB, P17 doubling respect control group and P144 being significantly triple (*). 4 and 8 weeks after implantation, control group also increments the interthread bone formation. However, the highest IB, both at 4 and at 8 weeks is shown by P17-biofunctionalized implants; the difference between the increase at 2 and 8 weeks is statistically significant (+). Implants treated with P144 show an apparent descent of osseointegration between 2 and 4 weeks followed by a non-significant increment at eight weeks.

Significant differences have been found at the end of the experiment in the P17 group with respect to control group at 2 weeks (#). In a similar manner, significant differences between P144 values at eight weeks and control at 2 weeks have been found (**).

Backscattering electron microscopy analysis

Two weeks after implantation, the calcified tissues surrounding the implants revealed by the backscattered electron microscopy analysis are coherent with the numerical analysis presented in Tables 1A, B and C. The control group implants are surrounded at a distance by

1
2
3 sparse, thin, calcified trabeculae, thus explaining the slight differences found in the BIC
4 measurements of the three groups. The number of trabeculae surrounding the implant surface
5 as well as the area of the calcified tissues linking the preexisting cortical bone with the
6 implants are increased in the two biofunctionalized groups, in accordance respectively the BF
7 and the IB biomorphometric results. The slight difference in the BIC of the P144 group seem to
8 be justified by the more numerous contact points between implant and bone visible in Fig 2C.

9
10
11
12
13 Two weeks after implantation, control group (Figure 2A) show evidences of a high osteoclastic
14 activity, revealed by numerous Howship's lacunae in the bone surfaces in front of the implant
15 surface (arrowheads in Fig 2D). There are also Howship's lacunae (arrowheads in Fig 2E)
16 eroding the inner surface of the vascular channels, both the ones present in the remodelled
17 bone osteons (#) of the osteonal preexisting cortical bone (*) and the ones situated in parallel
18 around the implant surface.
19
20
21
22

23
24 Around the implants biofunctionalized with P17 peptide, chondroid tissue trabeculae are seen
25 in a very initial phase linking the remodelling bone surface area with the implant surface
26 (white arrow in Fig 2F). Figure 2G (corresponding to a sample biofunctionalized with P144)
27 shows that the preexisting cortical bone in contact with the implant active surface is being
28 actively remodeled: osteoclastic activity proven by Howship's lacunae visible within the
29 osteonal vascular channels appears simultaneously with evidence of new lamellar bone
30 apposition.
31
32
33
34

35
36 Four weeks after implantation, periosteal reaction as well as osteoclastic activity are evident in
37 all groups (Fig 3, A, B and C), albeit in different degrees. New bone formation is seen in the
38 calcified tissues surrounding the implant surface, where vascular channels are parallel to the
39 implant surface. The preexisting cortical area shows evidence of an intense remodeling
40 process, with enlarged osteonal channels and new concentric lamellar bone apposition within.
41
42
43

44
45 The periosteal reaction on control samples is shown in Figure 3D. The preexisting cortical is
46 clearer, and separated by the cementing line (white arrowheads) from the new, less mature
47 calcified tissues constituting the periosteal and the peri-implant reactions. The vascular
48 channels within the newly formed tissues are larger than the ones in the cortical, despite being
49 lined by newly deposited lamellar bone. Figure 3E shows a new bone area where a vessel is
50 connecting the preexisting osseous cortical tissue with the new, less mature osseous tissues
51 formed adjacent to the implant (white arrow). The primary stability is established by the direct
52 contact between the implant and the newly formed bone, with large vascular channels and
53 active remodeling visible by the lamellar bone lining them.
54
55
56
57

1
2
3 In contrast, after 4 weeks, implants biofunctionalized with P17 peptide show a more advanced
4 stage of new bone formation. Figures 3F and G show plenty of vascular channels that originate
5 from the bone cortical advancing to the new osseous tissues connecting the cortical with the
6 periosteal reaction as well as around the implant. Both the new tissues that surround the
7 implant surface (left) and the periosteal reaction (right) show abundant vascular channels. The
8 periosteal reaction (Fig 3F) is constituted by chondroid tissue trabeculae, with characteristic
9 irregular, confluent, big cell lacunae lined by lamellar bone apposition. The preexisting cortical,
10 (Fig 3G) constituted by haversian, regular osteonal bone, is clearer, shows smaller osteonal
11 channels than both the peri-implant reaction (left) and the periosteal reaction (right) and
12 appears fractured, a frequent artifact due to the BS-SEM vacuum.
13
14
15
16
17
18

19 The sample selected from the group of implants biofunctionalized with P144 peptide at four
20 weeks shows a highly active periosteal reaction with large vascular spaces surrounding the
21 implant neck. The more abundant calcified tissue here is chondroid, evident by its numerous,
22 irregular, confluent cell lacunae and channels containing fibers embedded in a highly calcified
23 extracellular matrix. Lamellar bone, with regularly oriented elongated cell lacunae within a less
24 calcified, sparse extracellular matrix, surrounds the vascular channels. Those connect the
25 cortical with the new tissues formed both around the periosteal reaction (Fig 3H) and the
26 implant (Fig 3I).
27
28
29
30
31

32 Eight weeks after implantation there is a general increase of the osseointegration in all study
33 groups, as shown by the BIC data. Backscattered electron microscopy analysis reveals more
34 compact bone architecture around the titanium surface. Vascular channels appear thinner.
35 Around the implants biofunctionalized with P17, the amount of calcified tissue is higher,
36 further confirming the BIC data.
37
38
39
40

41 Control group shows a compact bone structure around the titanium surface. Vascular
42 channels, still parallel to the surface of the implant, show a dense lining by lamellar bone,
43 substituting the oldest woven bone trabeculae. (Figures 4A and D).
44
45
46

47 In P17-biofunctionalized implants (Fig 4B; Fig E), vascular channels are lined by more bone
48 lamellae. Lamellar bone surrounds sparse and isolated woven bone areas, thus proving that
49 the remodeling process of the preexisting cortical has progressed, and that the
50 osseointegration is constituted by more mature bone tissue.
51
52
53

54 All around the P17-biofunctionalized implants successive layers of bone appear lining the
55 vascular channels. In the same sample, around the implant surface, these layers could appear
56
57
58
59
60

1
2
3 as concentric, haversian lines around a vascular channel that follows the original cortical
4 orientation (Fig 4E), or as lamellar bone apposition lining the new bone area vessels around
5 the implant surface.
6
7

8 In the implants biofunctionalized with P144 peptide 8 weeks after implantation, a clear, almost
9 continuous cementing line is visible, separating the preexisting cortical (right) from the newly
10 formed bone facing the implant surface (Fig 4F). Laminar bone deposition is evident lining the
11 peri-implantary vascular spaces. In the preexisting cortical, numerous remodeled osteons are
12 visible within the compact bone. Howship's lacunae, evidence of osteoclastic activity is evident
13 in the cortical outer surface. The lamellar bone apposition lining the vascular spaces around
14 the implant as well as in the cortical is less dense than in the other biofunctionalized surfaces.
15
16
17
18
19

20 **Histological analysis**

21
22 At two weeks, both in the control group (Fig 5A) and in the biofunctionalized with P144 (Fig
23 5B) samples, numerous vascular spaces are found around the surface of the implants. A similar
24 reaction with numerous vessels is evident at the bone periosteal surfaces as well as at the
25 preexistent cortical bone structures. All those vascular spaces are interconnected. In Figures
26 5A and B red arrows mark the vascular channels connecting the preexisting cortical to the
27 subperiosteal reaction and to the peri-implant callus, respectively.
28
29
30
31

32 The neovascularization channels connecting the subperiosteal bone, the preexisting cortical
33 bone and the osseous tissues surrounding the implant surface are found in most samples of
34 the three experimental groups.
35
36
37

38 Figure 5C (20x) shows the different orientation of the radial branching (white arrowheads) of
39 the preexisting cortical vascular channels with respect to the peri-implant vascular channels
40 (red arrows), that appear to advance running in parallel to the implant metal surface (is). The
41 orange hue lining the vascular channels corresponds to non-calcified extracellular bone matrix.
42 Erythrocytes (e) are visible within the vessels of the vascular channels.
43
44
45
46

47 Lining cells (preosteoblasts) can be observed surrounding the inner border of the vascular
48 channels (black arrows in Fig 5D), while osteoblasts (orange arrows in Fig 5D), are visible
49 within the newly deposited, still non-calcified osteoid lamellae, stained in orange. Once
50 ossified, the lamellae staining turns to dark green and the osteoblasts (white arrows in Fig 5D),
51 become osteocytes, within characteristic long, ellipsoid, osteocyte lacunae.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Four weeks after implantation, control samples show a more mature aspect of the trabecular
4 tissues constituting the periosteal reaction as well as of the trabeculae constituting the peri-
5 implantary callus around the implant (Fig 6A). Woven bone and lamellar bone apposition are
6 visible around the vascular channels, still connecting the different zones of the mandibular
7 bone (Fig 6B).
8
9

10
11 Figure 6A shows the preexisting cortical bone (PC) as a solid, linear bone wall between the
12 highly vascularized trabecular structures of the periosteal reaction (PR) and of the peri-implant
13 *callus* reaction (PI). New linear apposition is progressing within the vascular channels
14 connecting the three structures, made evident by the concentric lines of osteoblasts and
15 osteocytes in the increasingly mineralized lamellar bone matrix around the vascular channels.
16 In a higher magnification, Figure 6B shows concentric layers of new linear apposition of
17 clearer, less mineralized bone matrix (white arrow) surrounded by older, darker, more calcified
18 bone matrix (blue arrow). Remnants of the initial woven bone (WB) formation are still present.
19
20
21
22
23

24
25 Similarly, a dense mesh of trabeculae originated in the periosteal reaction cover the head of
26 the implant biofunctionalized with P17 peptide (Figure 6C); at the same time, dense trabeculae
27 continue the preexisting cortical to surround the implant surface.
28
29

30
31 In the samples containing the implants biofunctionalized with P144 peptide at four weeks,
32 both the periosteal reaction in the periosteal callus are less advanced than in the P17. The
33 distance between the osseous structure and the implant is notable, both at the level of the
34 implant head (Fig 6E) and in the alveolar bone around the active surfaces of the implant (Fig
35 6F).
36
37
38

39
40 The bigger magnification image of P17-peptide group shows numerous lining cells present in
41 all the vascular channels. The sparse non-calcified bone matrix deposition is stained with
42 orange color, while the new bone lamellae connect the preexisting cortical bone with the
43 trabeculae in contact with the implant surface (*is*) (Fig 6G).
44
45

46
47 The histological analysis of the tissues of the trabeculae evidences the presence of chondroid
48 tissue and lamellar bone in the alveolar bone around the implant of the P144 sample. The
49 characteristics of chondroid tissue are visible: numerous, irregular, confluent cell lacunae with
50 a sparse line of non-calcified extracellular matrix around (orange arrows in Fig 6H). An irregular
51 deposit of calcified matrix to which numerous fibers are attached surrounds the cell lacunae
52 clusters (white arrows in Fig 6H). Lamellar bone apposition is also visible continuing the
53 vascular channel's wall, near the cortical surface.
54
55
56
57

1
2
3 Eight weeks after implantation, the control group shows a more mature aspect of the
4 deposited tissues. Vascular channels appear more densely lined with successive layers of
5 lamellar bone apposition (Figures 7 A and B).
6
7

8 P17 biofunctionalized group histologies show after eight weeks similar images of numerous
9 vascular channels surrounded by lamellar bone tissue. However, the staining reveals an intense
10 remodelling process experienced by the preexisting cortical of the alveolar bone as well as
11 the peri-implant newly deposited bone. Figure 7C (20x) shows the metachromasia due to the
12 recently deposited collagen of the lamellar bone, not only in the haversian osteons of the
13 cortical near the implant surface but also in the lamellae that continue the cortical to cover the
14 head of the implant, thus proving that the vascular channels present an intense activity. The
15 higher magnifications show a stable active deposit of new lamellar bone, proven by the dense
16 layer of non-calcified matrix surrounding the vascular channels and by the numerous cells
17 lining its internal diameter and the vessels within (Figure 7D and E) . Cementing lines
18 delimitate the preexisting cortical lamellar bone from the haversian bone active apposition
19 around the blood vessels.
20
21
22
23
24
25
26
27

28 Implants biofunctionalized with P144 after 8 weeks of implantation show dense, continuous
29 trabeculae of mature bone tissue. However, the presence of numerous, vascular channels still
30 connecting the periosteal reaction with the cortical and the peri-implant bone evidences that
31 the remodelling has not advanced at the same rhythm than in the P17 samples (Figure 7F).
32 The diameter of the vascular channels differs between the newly formed bone and the
33 preexisting cortical bone and at bigger magnification the signs of an active perivascular deposit
34 of non-calcified extracellular matrix leading to lamellar bone apposition are scarce (Figure 7G).
35
36
37
38
39
40
41
42

43 Discussion

44
45 The main objective of this investigation was to compare the effects on the peri-implant bone
46 response of the biofunctionalized titanium dental implants with respect to non-
47 biofunctionalized dental implants. To mimic the clinical situation, the implants were placed in
48 extraction sites of the mandibular premolar area of beagle dogs eight weeks after the teeth
49 extraction.
50
51
52

53
54 TGF- β 1 has significant effects on the regulation during inflammatory processes and has been
55 related to cellular processes for wound healing (Cornellini et al. 2003). Different *in vivo* studies
56
57
58

1
2
3 reported a negative correlation between the presence of TGF- β 1 and bone formation
4 (Aspenberg et al. 1996; Tieline et al. 2002), while other *in vivo* results showed that insertion of
5 dental implants with added TGF- β 1 resulted in the formation of a fibrotic layer around the
6 surface (Nikolidakis et al. 2009). More recently, however, (Takeuchi et al. 2010) proved *in vitro*
7 that TGF- β 1 suppressed the osteoblastic differentiation of bone marrow cells, while its inhibition
8 released the stromal cells from their differentiation arrest, facilitating the formation of
9 terminally differentiated osteoblasts. That led our group to explore the biofunctionalization
10 of titanium dental implants with TGF- β 1 inhibitor peptides, that resulted in accelerating the
11 osteoprogenitor cell differentiation *in vitro* (Sevilla et al. 2018).
12
13
14
15
16

17
18 There has been considerable variation in the experimental models and methods applied to the
19 analysis of the implant's osseointegration. The previously cited *in vivo* experiments
20 (Aspenberg et al. 1996; Tieline et al, 2002) were carried out using rats, while (Nikolidakis et
21 al. 2009) used goats as the animal model. Our group (Godoy-Gallardo et al. 2016; Barba et al.
22 2017); (Gallardo-Calero et al, in press) has experience in the dog as experimental animal. The
23 histomorphometric similarity of beagle and human bone has been reported (Arisan et al. 2010;
24 Schmitt et al. 2016; Chang et al. 2016), even when there is a considerable variability in the
25 methods used to measure the contact between the osseous tissues and the profile of the
26 implants (Aparicio et al. 2011; Vivan Cardoso et al. 2013; Cardoso et al. 2014).
27
28
29
30
31

32
33 BIC represents a quantitative measurement that has been used by many authors as a measure
34 for osseointegration and BS-BS-SEM offers a simpler, highly discriminative and less resource-
35 consuming method for BIC determination. Our BIC results, based in the methodology
36 described by (Manresa et al. 2014), constitute a non-subjective, systematic measurement of
37 the bone contact of all the active implant surface and are in agreement with similar studies
38 (Janner et al. 2018).
39
40
41
42

43
44 Bone formation around implants measured by quantitative analysis of the backscattering
45 images was significantly higher in the P17-biofunctionalized implants, 4 and 8 weeks after the
46 implantation. Our analysis is based on the concept of "Bone fraction", defined by Cardoso et al
47 (2014) as "Relative Bone Fraction" and by Calvo-Guirado et al (2015) as "Peri Implant Bone
48 Area", which represents both the preexisting cortical bone and the newly formed bone in an
49 1,5x2mm area situated at 2mm distance of the active surface of the implant.
50 Histomorphometrical analyses of BIC, BF and IB showed higher values in the P17-
51 biofunctionalized group at initial stages of healing (2 weeks) and early osseointegration both at
52 4 and 8 weeks. As for P144 bionfunctionalized group, the histomorphometric values obtained
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 are also high but their increase seems more stable during the three healing times. Our
4 quantitative results agree with (Aparicio et al. 2011) and (Cardoso et al. 2014) and, therefore,
5 provide the first proof of the capability of the osteogenic-promoting properties of the surface
6 characterization. However, these quantitative measurements do not reflect the quality of the
7 tissues in contact with the implant.
8
9

10
11 BS-BS-SEM examination shows the calcified tissues, in different levels of whiteness, depending
12 on their calcium concentration, as well as the cementing lines and the size and shape of the
13 cell's lacunae (López-López et al. 2009; Manresa et al. 2014). The Backscattering electron
14 microscopy analysis of the summative image of the implant sections 2 weeks after the
15 implantation depicts the bone in contact with both implant surfaces as sparse, thin trabeculae
16 at the first postoperative period, that are thicker and more numerous in the biofunctionalized
17 implants.
18
19

20
21 The tissues of the first trabeculae that surround the implant, as well as the ones formed as a
22 response to the periosteal injury are mainly constituted by chondroid tissue (Manzanares et al.
23 1988; Lafuente et al. 2009). It is known that chondroid tissue is the main component of the
24 endomembranous ossification process; it has a faster calcification and contains types I and II
25 collagen fibers. (Goret-Nicaise 1984; Lafuente et al. 2009). Woven, lamellar and osteonal bone
26 are the calcified tissues that replace chondroid tissue in our histological and BT-BS-SEM
27 findings, in a similar manner than in other endomembranous ossification-based processes,
28 such as the mandibular symphysis closure (Goret-Nicaise & Dhem 1984), the skull sutures
29 growth and closure (Goret-Nicaise et al. 1988; Manzanares et al. 1988); the tooth eruption
30 (Pilipili et al. 1995, 1998), the fracture repair (Zagba-Mongalima et al. 1988; Lafuente et al.
31 2009; Gallardo-Calero et al, *in press*), and, more recently the osseointegration of metallic and
32 non-metallic biomaterials (Cuzmar et al. 2015; Barba et al. 2017).
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43
44 The analysis of the tissues involved in this first phase of the osteointegration of the implants
45 shows a high level of osteoclastic activity around the numerous newly formed vessels
46 connecting the ones present in the preexisting cortical bone with the vessels situated between
47 the trabeculae constituting the peri-implant tisular response and the periosteal tisular
48 response (Pardali & Dijke 2009; Hu et al. 2018; Bigueti et al. 2018). The biofunctionalized
49 implants images show that the new vessels are oriented radially in the preexisting cortical
50 haversian bone, while, in the peri-implant newly formed bone, the vessels run parallel to the
51 implant surface. Neovascularization around tested implants has been reported, as well as
52 changes in the orientation of vessels that contribute to the formation of mineralized bone
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 matrix (Delgado-Ruiz et al. 2015). Osteoclast bone resorption occurs around the titanium
4 surface and plays an important role in the achievement of implant stability (Zhao et al. 2007).
5

6
7 Our histological findings have demonstrated the presence of lining cells in the peri-implant
8 area vessels at early stages of osseointegration further proving that the orientation of the
9 bone apposition around the implant is dependent on the mechanical strain distribution as
10 described by (Takano et al. 1999;Delgado-Ruiz et al. 2015). The lining cells remain active in our
11 samples at the end of the experiment: non calcified bone matrix is being actively deposited in
12 the inner border of the vascular channels eight weeks after implantation in the P17
13 biofunctionalized samples. Moreover, the differences in the coloring of the lamellae show
14 that apposition is maintained, both in the P17 samples, and, with less intensity in the control
15 group and the P144-treated samples.
16
17
18
19
20

21
22 These quantitative and qualitative results suggest that the positive effects of the
23 biofunctionalization on the osseointegration process could be not only immediate (by way of
24 neoangiogenesis and/or trabecular apposition) but also middle or long term (by way of the
25 lamellar remodellation) as described by Martino et al. (2015) and Biguetti et al. (2018). P17-
26 inhibitor peptide-treated samples show higher values of BIC, BF and IB than the other peptide,
27 P144. Moreover, the neovascularization of the P17 samples shows an active pattern and leads
28 to an earlier osseointegration than the visible in P144 samples and in the control group. These
29 peptides have been proven to adhere to Cp-Ti surfaces while keeping their bioactivity (Sevilla
30 et al. 2016) by eliciting an in vitro cell response characterized by the reduction of the fibroblast
31 differentiation and the increase of the osteoblastic markers (Sevilla et al. 2018). The
32 differences in our results between the two biofunctionalized implant groups could be due to
33 the fact that the surfaces adhere to peptide P17 approximately 30% more than to peptide
34 P144 due to its physical-chemical properties. The higher hidrophily of P17 peptide compared
35 to P144 peptide can be other causal factor (Sevilla et al. 2016).
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 The limited literature available with respect to TGF- β 1 inhibitor peptides regarding the peri-
46 implant bone organization oblige us to take these results with caution. Further research is
47 necessary regarding the action of the biofunctionalization with TGF- β 1 or other bioactive
48 peptides and its effects on osseointegration.
49
50

51 **Conclusions**

52
53
54 Based on the results of this study, it can be concluded that:
55
56
57

- The surface biofunctionalization results in better quantitative parameters of implant's osseointegration.
- Blood vessels (vascular channels) and bone cells are present in early times of healing (2 and 4 weeks) in the biofunctionalized implants.
- The surface biofunctionalization maintains a stable peri-implant bone formation through the experiment timeline.
- The peptide biofunctionalization may shorten the healing period of dental implants.
- The results of this study may serve as a useful reference for further studies oriented to the analysis of the mechanisms behind the biofunctionalization.

Competing interests

The authors declare that there is no conflict of interest associated with this study.

Acknowledgements

The authors kindly acknowledge the collaboration of many individuals and institutions in the present manuscript. The present study was supported by the Research Cathedra Klockner-University of Granada. The experimental animals surgery and care was carried out with the valuable collaboration of Dr Albert Barba and Katrin Rappe of the surgical team in the Veterinary Faculty, Autonomous University of Barcelona; we would like to thank Ricardo Fernández and Allinson Olaechea for their participation during surgeries; the samples preparation and visualization was carried out by Ms Mónica Ortiz, from the Grup de Biomaterials, Biomecànica i Enginyeria de Teixits, Dept. de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica and the Barcelona Research Center in MultiScale Science and Engineering, Universitat Politècnica de Catalunya (UPC). Ms Eva Sanchez, from the Human Anatomy and Embryology lab in the Bellvitge campus of the University of Barcelona is kindly acknowledged by her technical support to the management of the undecalcified samples.

Bibliography

- Anselme, K., Linez, P., Bigerelle, M., Le Maguer, D., Le Maguer, A., Hardouin, P., Hildebrand, H.F., Iost, A. & Leroy, J.M. (2000) The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour. *Biomaterials* **21**: 1567–77.
- Aparicio, C., Padrós, A. & Gil, F.J. (2011) In vivo evaluation of micro-rough and bioactive titanium dental implants using histometry and pull-out tests. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **4**: 1672–1682.
- Arisan, V., Anil, A., Wolke, J.G. & Özer, K. (2010) The effect of injectable calcium phosphate cement on bone anchorage of titanium implants: an experimental feasibility study in dogs. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **39**: 463–468.
- Aspenberg, P., Jeppsson, C., Wang, J.S. & Boström, M. (1996) Transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein 2 for bone ingrowth: a comparison using bone chambers in rats. *Bone* **19**: 499–503.
- Barba, A., Diez-Escudero, A., Maazouz, Y., Rappe, K., Espanol, M., Montufar, E.B., Bonany, M., Sadowska, J.M., Guillem-Marti, J., Öhman-Mägi, C., Persson, C., Manzanares, M.-C., Franch, J. & Ginebra, M.-P. (2017) Osteoinduction by Foamed and 3D-Printed Calcium Phosphate Scaffolds: Effect of Nanostructure and Pore Architecture. *ACS Applied Materials & Interfaces* **9**: 41722–41736.
- Barnard, J.A., Lyons, R.M. & Moses, H.L. (1990) The cell biology of transforming growth factor beta. *Biochimica et biophysica acta* **1032**: 79–87.
- Bigueti, C.C., Cavalla, F., Silveira, E.M., Fonseca, A.C., Vieira, A.E., Tabanez, A.P., Rodrigues, D.C., Trombone, A.P.F., Garlet, G.P., Bigueti, C.C., Cavalla, F., Silveira, E.M., Fonseca, A.C., Vieira, A.E., Tabanez, A.P., Rodrigues, D.C., Trombone, A.P.F. & Garlet, G.P. (2018) Oral implant osseointegration model in C57Bl/6 mice: microtomographic, histological, histomorphometric and molecular characterization. *Journal of Applied Oral Science* **26**:

- 1
2
3 Branton, M.H. & Kopp, J.B. (1999) TGF-beta and fibrosis. *Microbes and infection* **1**:
4 1349–65.
5
6
7 Cardoso, M.V., Chaudhari, A., Yoshida, Y., Van Meerbeek, B., Naert, I. & Duyck, J.
8 (2014) Bone tissue response to implant surfaces functionalized with phosphate-
9 containing polymers. *Clinical Oral Implants Research* **25**: 91–100.
10
11
12
13 Chang, Y.-C., Ho, K.-N., Feng, S.-W., Huang, H.-M., Chang, C.-H., Lin, C.-T., Teng, N.-C.,
14 Pan, Y.H. & Chang, W.-J. (2016) Fibronectin-Grafted Titanium Dental Implants: An
15 *In Vivo* Study. *BioMed Research International* **2016**: 1–11.
16
17
18
19 Cornelini, R., Rubini, C., Fioroni, M., Favero, G.A., Strocchi, R. & Piattelli, A. (2003)
20 Transforming growth factor-beta 1 expression in the peri-implant soft tissues of
21 healthy and failing dental implants. *Journal of periodontology* **74**: 446–50.
22
23
24
25 Cuzmar, E., Perez, R.A., Manzanares, M.-C., Ginebra, M.-P. & Franch, J. (2015) In Vivo
26 Osteogenic Potential of Biomimetic Hydroxyapatite/Collagen Microspheres:
27 Comparison with Injectable Cement Pastes. *PLOS ONE* **10**: e0131188.
28
29
30
31 Davidson, P.M., Hasirci, V., Reiter, G. & Anselme, K. Microstructured Surfaces Cause
32 Severe but Non-Detrimental Deformation of the Cell Nucleus.
33
34
35 Delgado-Ruiz, R.A., Abboud, M., Romanos, G., Aguilar-Salvatierra, A., Gomez-Moreno,
36 G. & Calvo-Guirado, J.L. (2015) Peri-implant bone organization surrounding
37 zirconia-microgrooved surfaces circularly polarized light and confocal laser
38 scanning microscopy study. *Clinical Oral Implants Research* **26**: 1328–1337.
39
40
41
42 Dotor, J., López-Vázquez, A.B., Lasarte, J.J., Sarobe, P., García-Granero, M., Riezu-Boj,
43 J.I., Martínez, A., Feijoó, E., López-Sagaseta, J., Hermida, J., Prieto, J. & Borrás-
44 Cuesta, F. (2007) Identification of peptide inhibitors of transforming growth factor
45 beta 1 using a phage-displayed peptide library. *Cytokine* **39**: 106–15.
46
47
48
49
50 Ezquerro, I.-J., Lasarte, J.-J., Dotor, J., Castilla-Cortázar, I., Bustos, M., Peñuelas, I.,
51 Blanco, G., Rodríguez, C., Lechuga, M. del C.G., Greenwel, P., Rojkind, M., Prieto, J.
52 & Borrás-Cuesta, F. (2003) A synthetic peptide from transforming growth factor
53 beta type III receptor inhibits liver fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 liver injury. *Cytokine* **22**: 12–20.
4
5
6 Filvaroff, E., Erlebacher, a, Ye, J., Gitelman, S.E., Lotz, J., Heillman, M. & Derynck, R.
7 (1999) Inhibition of TGF-beta receptor signaling in osteoblasts leads to decreased
8 bone remodeling and increased trabecular bone mass. *Development (Cambridge,*
9 *England)* **126**: 4267–79.
10
11
12
13 Gil, F.J., Padrós, A., Manero, J.M., Aparicio, C., Nilsson, M. & Planell, J.A. (2002) Growth
14 of bioactive surfaces on titanium and its alloys for orthopaedic and dental
15 implants. *Materials Science and Engineering: C* **22**: 53–60.
16
17
18
19 Godoy-Gallardo, M., Manzanares-Céspedes, M.C., Sevilla, P., Nart, J., Manzanares, N.,
20 Manero, J.M., Gil, F.J., Boyd, S.K. & Rodríguez, D. (2016) Evaluation of bone loss in
21 antibacterial coated dental implants: An experimental study in dogs. *Materials*
22 *Science and Engineering: C* **69**: 538–545.
23
24
25
26
27 Gonzalo-Gil, E. & Galindo-Izquierdo, M. (2014) Papel del factor de crecimiento
28 transformador-beta (TGF- β) en la fisiopatología de la artritis reumatoide.
29 *Reumatología Clínica* **10**: 174–179.
30
31
32
33 Goret-Nicaise, M. (1984) Identification of collagen type I and type II in chondroid
34 tissue. *Calcified tissue international* **36**: 682–9.
35
36
37 Goret-Nicaise, M. & Dhem, A. (1984) The mandibular body of the human fetus.
38 Histologic analysis of the basilar part. *Anatomy and embryology* **169**: 231–6.
39
40
41 Goret-Nicaise, M., Manzanares, M.C., Bulpa, P., Nolmans, E. & Dhem, A. (1988)
42 Calcified tissues involved in the ontogenesis of the human cranial vault. *Anatomy*
43 *and embryology* **178**: 399–406.
44
45
46
47 Hu, X.F., Wang, L., Xiang, G., Lei, W. & Feng, Y.F. (2018) Angiogenesis impairment by
48 the NADPH oxidase-triggered oxidative stress at the bone-implant interface:
49 Critical mechanisms and therapeutic targets for implant failure under
50 hyperglycemic conditions in diabetes. *Acta Biomaterialia* **73**: 470–487.
51
52
53
54
55 Janner, S.F.M., Gahlert, M., Bosshardt, D.D., Roehling, S., Milz, S., Higginbottom, F.,
56 Buser, D. & Cochran, D.L. (2018) Bone response to functionally loaded, two-piece
57
58
59
60

- 1
2
3 zirconia implants: A preclinical histometric study. *Clinical oral implants research*
4 **29**: 277–289.
5
6
7 Janssens, K., ten Dijke, P., Janssens, S. & Van Hul, W. (2005) Transforming growth
8 factor-beta1 to the bone. *Endocrine reviews* **26**: 743–74.
9
10
11 Lafuente, P., Franch, J., Durall, I. & Manzanares, C. (2009) Experimental study of bone
12 lengthening in dogs by means of backscattered scanning electron microscopy.
13 *Veterinary Surgery* **38**: 388–397.
14
15
16
17 Lloyd-Williams, P., Albericio, F. & Giralt, E. (1997) *Chemical Approaches to the Synthesis*
18 *of Peptides and Proteins (New Directions in Organic & Biological Chemistry)*. (Ed.
19 CRC-Press), CRC-Press.
20
21
22
23 López-López, J., Chimenos-Küstner, E., Manzanares-Cespedes, C., Muñoz-Sánchez, J.,
24 Castañeda-Vega, P., Jané-Salas, E., Alvarez-López, J.-M. & Gimeno-Sanding, A.
25 (2009) Histomorphological study of the bone regeneration capacity of platelet-
26 rich plasma, bone marrow and tricalcium phosphate: Experimental study on pigs.
27 *Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal* **14**: e620-7.
28
29
30
31
32 Manresa, C., Bosch, M., Manzanares, M.C., Carvalho, P. & Echeverría, J.J. (2014) A
33 new standardized-automatic method for bone-to-implant contact
34 histomorphometric analysis based on backscattered scanning electron
35 microscopy images. *Clinical Oral Implants Research* **25**: 702–706.
36
37
38
39
40 Manzanares, M.C., Goret-Nicaise, M. & Dhem, A. (1988) Metopic sutural closure in the
41 human skull. *Journal of anatomy* **161**: 203–15.
42
43
44
45 Martino, M.M., Briquez, P.S., Maruyama, K. & Hubbell, J.A. (2015) Extracellular matrix-
46 inspired growth factor delivery systems for bone regeneration. *Advanced Drug*
47 *Delivery Reviews* **94**: 41–52.
48
49
50
51 Nikolidakis, D., Meijer, G.J., Oortgiesen, D. a W., Walboomers, X.F. & Jansen, J. a (2009)
52 The effect of a low dose of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) on the
53 early bone-healing around oral implants inserted in trabecular bone. *Biomaterials*
54 **30**: 94–9.
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Pardali, E. & Dijke, P. (2009) Transforming growth factor-beta signaling and tumor
4 angiogenesis. *Molecular Cell* 4848–4861.
5
6
7 Pilipili, C.M., Goret-Nicaise, M. & Dhem, A. (1998) Microradiographic aspects of the
8 growing mandibular body during permanent premolar eruption in the dog.
9 *European journal of oral sciences* **106 Suppl 1**: 429–36.
10
11
12 Pilipili, C.M., Nyssen-Behets, C. & Dhem, A. (1995) Microradiography and fluorescence
13 microscopy of bone remodeling on the basal crypt of permanent mandibular
14 premolars in dogs during eruption. *Connective tissue research* **32**: 171–81.
15
16
17
18 Santiago, B., Gutierrez-Cañas, I., Dotor, J., Palao, G., Lasarte, J.J., Ruiz, J., Prieto, J.,
19 Borrás-Cuesta, F. & Pablos, J.L. (2005) Topical application of a peptide inhibitor of
20 transforming growth factor-beta1 ameliorates bleomycin-induced skin fibrosis.
21 *The Journal of investigative dermatology* **125**: 450–5.
22
23
24
25 Schiller, M., Javelaud, D. & Mauviel, A. (2004) TGF-beta-induced SMAD signaling and
26 gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound
27 healing. *Journal of dermatological science* **35**: 83–92.
28
29
30
31
32 Schmitt, C.M., Koepple, M., Moest, T., Neumann, K., Weisel, T. & Schlegel, K.A. (2016)
33 In vivo evaluation of biofunctionalized implant surfaces with a synthetic peptide
34 (P-15) and its impact on osseointegration. A preclinical animal study. *Clinical Oral*
35 *Implants Research* **27**: 1339–1348.
36
37
38
39
40 Serrati, S., Margheri, F., Pucci, M., Cantelmo, A.R., Cammarota, R., Dotor, J., Borràs-
41 Cuesta, F., Fibbi, G., Albini, A. & Del Rosso, M. (2009) TGFbeta1 antagonistic
42 peptides inhibit TGFbeta1-dependent angiogenesis. *Biochemical pharmacology*
43 **77**: 813–25.
44
45
46
47
48 Sevilla, P., Cirera, A., Dotor, J., Gil, F.J., Galindo-Moreno, P. & Aparicio, C. (2018) In vitro
49 cell response on CP-Ti surfaces functionalized with TGF-β1 inhibitory peptides.
50 *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **29**: 73.
51
52
53
54 Sevilla, P., Gil, J. & Aparicio, C. (2017) Relevant Properties for Immobilizing Short
55 Peptides on Biosurfaces. *IRBM*.
56
57

- 1
2
3 Sevilla, P., Holmberg, K., Rodríguez, D., Gil, J. & Aparicio, C. (2011) Biofunctionalisation
4 of titanium surfaces with TGF- β inhibitor peptides. In: *24th European Conference*
5 *on Biomaterials - Annual Conference of the European Society for Biomaterials*. .
6
7
8
9 Sevilla, P., Vining, K. V., Dotor, J., Rodríguez, D., Gil, F.J. & Aparicio, C. (2016) Surface
10 immobilization and bioactivity of TGF- β 1 inhibitor peptides for bone implant
11 applications. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied*
12 *Biomaterials* **104**: 385–394.
13
14
15
16 Shen, Z.-J., Kim, S.K., Jun, D.Y., Park, W., Kim, Y.H., Malter, J.S. & Moon, B.J. (2007)
17 Antisense targeting of TGF-beta1 augments BMP-induced upregulation of
18 osteopontin, type I collagen and Cbfa1 in human Saos-2 cells. *Experimental cell*
19 *research* **313**: 1415–25.
20
21
22
23
24 Sporn, M.B. & Roberts, A.B. (1992) Transforming growth factor-beta: recent progress
25 and new challenges. *The Journal of cell biology* **119**: 1017–21.
26
27
28
29 Takano, Y., Turner, C.H., Owan, I., Lau, T., Forwood, M.R. & Burr, D.B. No Title. 59–66.
30
31
32 Takeuchi, K., Abe, M., Hiasa, M., Oda, A., Amou, H., Kido, S., Harada, T., Tanaka, O.,
33 Miki, H., Nakamura, S., Nakano, A., Kagawa, K., Yata, K., Ozaki, S. & Matsumoto, T.
34 (2010) TGF- β 1 inhibition restores terminal osteoblast differentiation to suppress
35 myeloma growth. *PLoS ONE* **5**: e9870.
36
37
38
39 Tieline, L., Puolakkainen, P., Pohjonen, T., Rautavuori, J., Törmälä, P. & Rokkanen, P.
40 (2002) The effect of transforming growth factor-beta1, released from a
41 bioabsorbable self-reinforced polylactide pin, on a bone defect. *Biomaterials* **23**:
42 3817–23.
43
44
45
46 Vicent, S., Luis-Ravelo, D., Antón, I., García-Tuñón, I., Borrás-Cuesta, F., Dotor, J., De Las
47 Rivas, J. & Lecanda, F. (2008) A novel lung cancer signature mediates metastatic
48 bone colonization by a dual mechanism. *Cancer research* **68**: 2275–85.
49
50
51
52 Vivan Cardoso, M., Vandamme, K., Chaudhari, A., De Rycker, J., Van Meerbeek, B.,
53 Naert, I. & Duyck, J. (2013) Dental Implant Macro-Design Features Can Impact the
54 Dynamics of Osseointegration. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 1–
55
56
57
58
59
60

1
2
3 7.
4

5 Vlacic-Zischke, J., Hamlet, S.M., Friis, T., Tonetti, M.S. & Ivanovski, S. (2011) The
6 influence of surface microroughness and hydrophilicity of titanium on the up-
7 regulation of TGF β /BMP signalling in osteoblasts. *Biomaterials* **32**: 665–71.
8

9
10
11 Zagba-Mongalima, G., Goret-Nicaise, M. & Dhem, A. (1988) Age Changes in Human
12 Bone: A Microradiographic and Histological Study of Subperiosteal and Periosteal
13 Calcifications. *Gerontology* **34**: 264–276.
14

15
16
17 Zhao, G., Raines, A.L., Wieland, M., Schwartz, Z. & Boyan, B.D. (2007) Requirement for
18 both micron- and submicron scale structure for synergistic responses of
19 osteoblasts to substrate surface energy and topography. *Biomaterials* **28**: 2821–9.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Tables and Figures

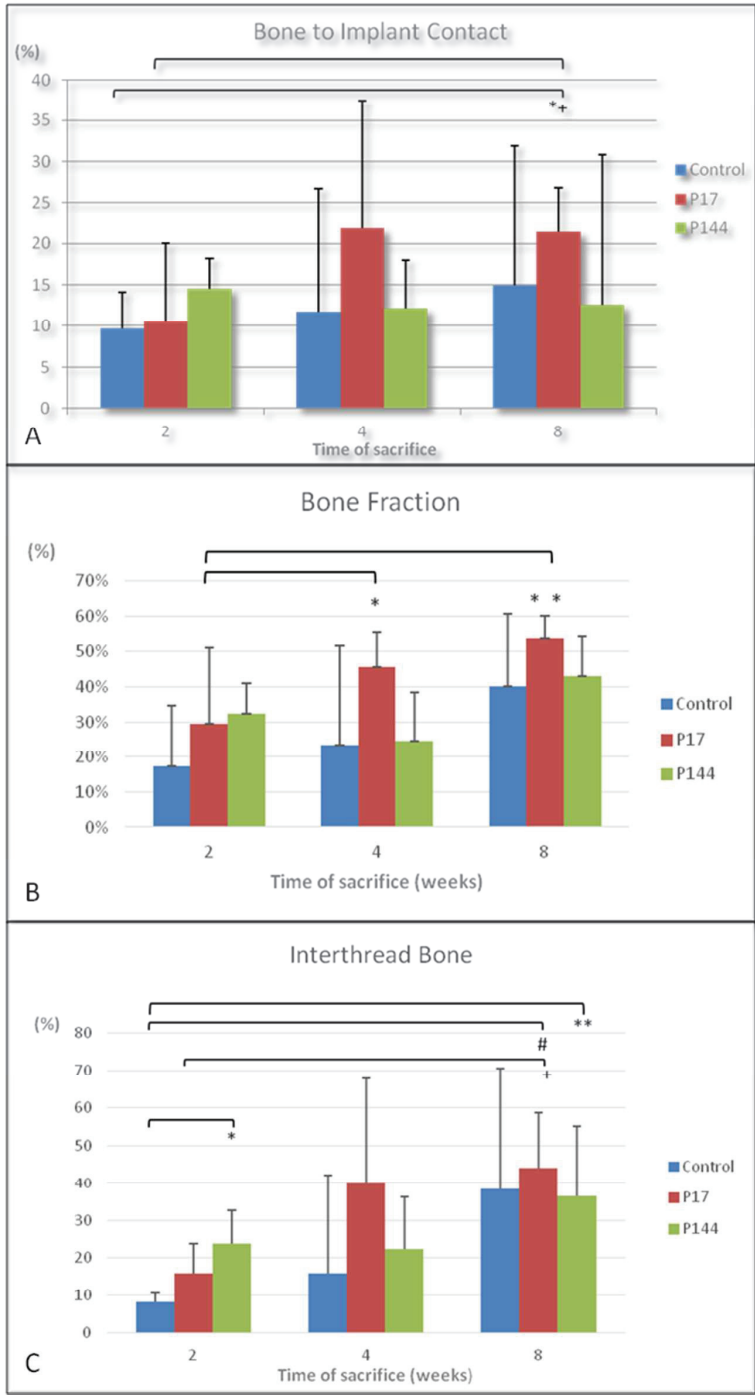


TABLE 1: A. Bone to Implant Contact (BIC) results at 2, 4 and 8 weeks. B. Bone Fraction (BF) results at 2, 4 and 8 weeks. C. Interthread Bone (IB) results at 2, 4 and 8 weeks.

FIGURE 1. Scheme of the measurements for the calculations of Bone to implant contact (BIC), Bone Fraction (BF) and Interthread Bone (IB).

FIGURE 2. A, B and C: BS-SEM summative (stitched) images of the implants after 2 weeks of implantation. **A:** Control group; **B:** P17-biofunctionalized group; **C:** P144-biofunctionalized group. **D and E:** Framed areas in Figure 2A. **D:** White arrowheads: Howship's lacunae. **E:** White arrowheads: Howship's lacunae. *: cortical bone. # osteon. **F and G:** framed areas in Figure 2B and 2C, respectively. **F:** White arrow: chondroid tissue trabecula.

FIGURE 3. A, B and C: BS-SEM summative (stitched) images of the implants after 4 weeks of implantation. **A:** Control group; **B:** P17-biofunctionalized group; **C:** P144-biofunctionalized group. **D and E:** framed areas in Figure 3A. **D:** periosteal reaction. White arrowheads: cementing line; **E:** Peri-implant new bone area. White arrow: vascular channel; PC: preexisting cortical. **F and G:** framed areas in Figure 3B. **H and I:** framed areas in Figure 3C. **H:** Periosteal reaction; **I:** Calcified tissues around the implant. White arrow: lamellar bone around vascular channel.

FIGURE 4. A, B and C: BS-SEM summative (stitched) images of the implants after 8 weeks of implantation. **A:** Control group; **B:** P17-biofunctionalized group; **C:** P144-biofunctionalized group; **D:** framed area in Figure 4A; **E:** framed area in Figure 4B; **F:** framed area in Figure 4C.

FIGURE 5. Results after 2 weeks of implantation **A:** Control group sample. Red arrow: vascular. is: implant surface; **B:** P144 sample after 2 weeks of implantation. Red arrow: vascular channel; **C:** (20x magnification, framed area in figure 5B). White arrowheads: radial branching of cortical vascular channels; red arrow: orientation of peri-implant vascular channels; is: implant surface; e: erythrocytes within vessels of vascular channels. **D:** (50x magnification). P144 biofunctionalized sample after 2 weeks of implantation. Black arrows: lining cells; orange arrows: osteoblasts; white arrows, osteocyte lacunae.

FIGURE 6. Results after 4 weeks of implantation. A and B Control sample. **A:** (10x) PC: preexisting cortical; PR: periosteal reaction; PI: peri-implantary reaction. is: implant surface. **B:** (50x) vessel in the center of image A. WB: woven bone; White arrow: newly deposited lamellar bone. Blue arrow: older, more calcified cortical bone. **C and D** (10x) P17 biofunctionalized sample. **C:** periosteal reaction; ih: implant head; **D:** peri-implant callus; is: implant surface. **E and F:** (10x) P144 biofunctionalized sample **E:** periosteal callus and head of the implant; **F:** implant surface and alveolar bone. **G:** (20x, framed area in Fig 6D). P17 biofunctionalized sample. Abundant peri-implant vascular channels. New bone lamellae deposition in contact with the implant surface (is). **H** (20x, framed area in Fig 6F): lamellar bone deposition (white arrows); chondroid tissue (orange arrows).

FIGURE 7. Results after 8 weeks of implantation. A and B Control sample. **A:** (10x) Calcified tissues around the implant head. **B:** (50x) lining cells inside vascular channels. **C, D and E** P17 biofunctionalized sample. **C:** (20x) metachromasia (purple hue) of the newly formed lamellar bone. **D:** (50x) vascular channels lined by non-calcified bone matrix (orange). Arrows: cementing line. **E:** (50x) vascular channel concentrically lined by non-calcified bone matrix (orange) and newly formed lamellar bone (purple). **F and G** P144 biofunctionalized sample. **F:** (10x) vascular channels around implant surface. **G:** (20x) vascular channels oriented towards the implant surface (is); the different hues of the osseous tissues indicate active bone remodeling.



The ARRIVE Guidelines Checklist

Animal Research: Reporting In Vivo Experiments

Carol Kilkenny¹, William J Browne², Innes C Cuthill³, Michael Emerson⁴ and Douglas G Altman⁵

¹The National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research, London, UK, ²School of Veterinary Science, University of Bristol, Bristol, UK, ³School of Biological Sciences, University of Bristol, Bristol, UK, ⁴National Heart and Lung Institute, Imperial College London, UK, ⁵Centre for Statistics in Medicine, University of Oxford, Oxford, UK.

	ITEM	RECOMMENDATION	Section/ Paragraph
Title	1	Provide as accurate and concise a description of the content of the article as possible.	Title Page 1
Abstract	2	Provide an accurate summary of the background, research objectives, including details of the species or strain of animal used, key methods, principal findings and conclusions of the study.	Abstract page 1
INTRODUCTION			
Background	3	a. Include sufficient scientific background (including relevant references to previous work) to understand the motivation and context for the study, and explain the experimental approach and rationale. b. Explain how and why the animal species and model being used can address the scientific objectives and, where appropriate, the study's relevance to human biology.	Paragraph s 1-5
Objectives	4	Clearly describe the primary and any secondary objectives of the study, or specific hypotheses being tested.	Paragraph s 6, 7
METHODS			
Ethical statement	5	Indicate the nature of the ethical review permissions, relevant licences (e.g. Animal [Scientific Procedures] Act 1986), and national or institutional guidelines for the care and use of animals, that cover the research.	Methods, Paragraph s 6 & 7
Study design	6	For each experiment, give brief details of the study design including: a. The number of experimental and control groups. b. Any steps taken to minimise the effects of subjective bias when allocating animals to treatment (e.g. randomisation procedure) and when assessing results (e.g. if done, describe who was blinded and when). c. The experimental unit (e.g. a single animal, group or cage of animals). A time-line diagram or flow chart can be useful to illustrate how complex study designs were carried out.	Paragraph 6
Experimental procedures	7	For each experiment and each experimental group, including controls, provide precise details of all procedures carried out. For example: a. How (e.g. drug formulation and dose, site and route of administration, anaesthesia and analgesia used [including monitoring], surgical procedure, method of euthanasia). Provide details of any specialist equipment used, including supplier(s). b. When (e.g. time of day). c. Where (e.g. home cage, laboratory, water maze). d. Why (e.g. rationale for choice of specific anaesthetic, route of administration, drug dose used).	Paragraph s 6-13
Experimental animals	8	a. Provide details of the animals used, including species, strain, sex, developmental stage (e.g. mean or median age plus age range) and weight (e.g. mean or median weight plus weight range). b. Provide further relevant information such as the source of animals, international strain nomenclature, genetic modification status (e.g. knock-out or transgenic), genotype, health/immune status, drug or test naïve, previous procedures, etc.	Paragraph s 6-13

The ARRIVE guidelines. Originally published in *PLoS Biology*, June 2010¹

Housing and husbandry	9	Provide details of: a. Housing (type of facility e.g. specific pathogen free [SPF]; type of cage or housing; bedding material; number of cage companions; tank shape and material etc. for fish). b. Husbandry conditions (e.g. breeding programme, light/dark cycle, temperature, quality of water etc for fish, type of food, access to food and water, environmental enrichment). c. Welfare-related assessments and interventions that were carried out prior to, during, or after the experiment.	Paragraphs 6-14
Sample size	10	a. Specify the total number of animals used in each experiment, and the number of animals in each experimental group. b. Explain how the number of animals was arrived at. Provide details of any sample size calculation used. c. Indicate the number of independent replications of each experiment, if relevant.	Paragraph 1 Paragraph 13
Allocating animals to experimental groups	11	a. Give full details of how animals were allocated to experimental groups, including randomisation or matching if done. b. Describe the order in which the animals in the different experimental groups were treated and assessed.	Paragraph 1-6
Experimental outcomes	12	Clearly define the primary and secondary experimental outcomes assessed (e.g. cell death, molecular markers, behavioural changes).	Paragraphs 14-17
Statistical methods	13	a. Provide details of the statistical methods used for each analysis. b. Specify the unit of analysis for each dataset (e.g. single animal, group of animals, single neuron). c. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach.	Page 6, paragraph 22-23
RESULTS			
Baseline data	14	For each experimental group, report relevant characteristics and health status of animals (e.g. weight, microbiological status, and drug or test naïve) prior to treatment or testing. (This information can often be tabulated).	Methods, paragraph 23
Numbers analysed	15	a. Report the number of animals in each group included in each analysis. Report absolute numbers (e.g. 10/20, not 50%). b. If any animals or data were not included in the analysis, explain why.	Methods, paragraph 23
Outcomes and estimation	16	Report the results for each analysis carried out, with a measure of precision (e.g. standard error or confidence interval).	Results, Paragraphs 1-5, Table 1
Adverse events	17	a. Give details of all important adverse events in each experimental group. b. Describe any modifications to the experimental protocols made to reduce adverse events.	Methods, paragraph 23
DISCUSSION			
Interpretation/scientific implications	18	a. Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory and other relevant studies in the literature. b. Comment on the study limitations including any potential sources of bias, any limitations of the animal model, and the imprecision associated with the results ² . c. Describe any implications of your experimental methods or findings for the replacement, refinement or reduction (the 3Rs) of the use of animals in research.	Throughout Paragraphs 2-3, 11
Generalisability/translation	19	Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to translate to other species or systems, including any relevance to human biology.	Paragraphs 10-11
Funding	20	List all funding sources (including grant number) and the role of the funder(s) in the study.	No

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



References:

1. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol* 8(6): e1000412. doi:10.1371/journal.pbio.1000412
2. Schulz KF, Altman DG, Moher D, the CONSORT Group (2010) CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ* 340:c332.

Clinical Oral Implants Research

Tesis Andrea Cirera

ORIGINALITY REPORT

2%

SIMILARITY INDEX

2%

INTERNET SOURCES

1%

PUBLICATIONS

0%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

- | | | |
|---|---|-----|
| 1 | Pablo Sevilla, Andrea Cirera, Javier Dotor, Francisco Javier Gil, Pablo Galindo-Moreno, Conrado Aparicio. "In vitro cell response on CP-Ti surfaces functionalized with TGF- β 1 inhibitory peptides", Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2018
Publication | <1% |
| 2 | oa.upm.es
Internet Source | <1% |
| 3 | worldwidescience.org
Internet Source | <1% |
| 4 | www.genscript.pt
Internet Source | <1% |
| 5 | www.tdx.cat
Internet Source | <1% |
| 6 | Webb, R. Eric, David M. Leslie, Robert L. Lochmiller, and Ronald E. Masters. "IMPACT OF FOOD SUPPLEMENTATION AND METHIONINE ON HIGH DENSITIES OF | <1% |

COTTON RATS: SUPPORT OF THE AMINO-ACID-QUALITY HYPOTHESIS?", Journal of Mammalogy, 2005.

Publication

7	orca.cf.ac.uk Internet Source	<1%
8	www.doc4net.fr Internet Source	<1%
9	Submitted to Universidad de Jaén Student Paper	<1%
10	xipe.insp.mx Internet Source	<1%
11	www.google.com Internet Source	<1%
12	www.inta.cl Internet Source	<1%
13	Soliman A. El-Shakhs. "Effective Hepatic Cryoablation: Does It Enhance Tumor Dissemination?", World Journal of Surgery, 03/1999 Publication	<1%
14	ddd.uab.cat Internet Source	<1%
15	colectivogist.wordpress.com Internet Source	<1%

16

R. Núñez, J. Rey de Castro, E. Socarrás, J.M. Calleja, R. Rubio, F. Aizpuru, J. Durán-Cantolla. "Estudio de la validez de un equipo de poligrafía respiratoria (BREAS SC-20) para el diagnóstico del síndrome de apneas-hipopneas durante el sueño", Archivos de Bronconeumología, 2003

Publication

<1%

17

www.laboticadigital.com

Internet Source

<1%

18

www.jove.com

Internet Source

<1%

19

eprints.ucm.es

Internet Source

<1%

20

"VI Latin American Congress on Biomedical Engineering CLAIB 2014, Paraná, Argentina 29, 30 & 31 October 2014", Springer Nature America, Inc, 2015

Publication

<1%

21

bioline.org.br

Internet Source

<1%

22

www.avera.org

Internet Source

<1%

23

www.griho.udl.es

Internet Source

<1%

24 www2.ctcnet.org Internet Source <1%

25 www.medwave.cl Internet Source <1%

26 www.intangiblecapital.org Internet Source <1%

27 Ángel Sánchez-Recalde, Juan Carlos Kaski.
"Diabetes mellitus, inflamación y aterosclerosis coronaria: perspectiva actual y futura", Revista Española de Cardiología, 2001
Publication <1%

28 bases.bireme.br Internet Source <1%

29 www.fcv.unlp.edu.ar Internet Source <1%

30 Panayotis Fantidis, Antonio Fernández-Ortiz, Teresa Pérez de Prada, Marcelo Sanmartín et al. "Efecto del AMPc sobre la función de las células endoteliales y la proliferación fibromuscular tras la lesión de las arterias carótida y coronaria en un modelo porcino", Revista Española de Cardiología, 2001
Publication <1%

31 José Pacheco Romero. "RESÚMENES: Jornadas Científicas Sanfernandinas", Anales <1%

de la Facultad de Medicina, 2014

Publication

32	med.unne.edu.ar Internet Source	<1%
33	dadun.unav.edu Internet Source	<1%
34	www.ginecoendocrino.cl Internet Source	<1%
35	www.jle.com Internet Source	<1%
36	arts.units.it Internet Source	<1%
37	Lucinda Coelho Esperanca Vieira. "Association of the CYP17 gene polymorphism with risk for uterine leiomyoma in Brazilian women", <i>Gynecological Endocrinology</i> , 2008 Publication	<1%
38	futur.upc.edu Internet Source	<1%
39	addi.ehu.es Internet Source	<1%
40	onlinelibrary.wiley.com Internet Source	<1%
41	www.insisoc.org Internet Source	<1%

-
- 42 Gabor Fuerst. "Effects of fibrin sealant protein concentrate with and without platelet-released growth factors on bony healing of cortical mandibular defects. An experimental study in minipigs", *Clinical Oral Implants Research*, 6/2004
Publication <1%
-
- 43 es.scribd.com
Internet Source <1%
-
- 44 C. Nourissat, J.-C. Cartillier. "Técnica de implantación de las artroplastias totales de cadera no cementadas", *EMC - Técnicas Quirúrgicas - Ortopedia y Traumatología*, 2009
Publication <1%
-
- 45 Kenichi Matsuzaka. "Effect on the Amount of Bone-Implant Contact When Splinting Immediate-Loaded Dental Implants", *Implant Dentistry*, 2007
Publication <1%
-
- 46 copsa.cop.es
Internet Source <1%
-
- 47 www.esteve.org
Internet Source <1%
-
- 48 Luis C. Orozco, Fredy O. Quintana, Ruth M. Beltrán, Isabel de Moreno, Moises Wasserman, Gerzain Rodriguez. "The use of rifampicin and

isoniazid entrapped in liposomes for the treatment of murine tuberculosis", Tubercle, 1986

Publication

49 www.scribd.com <1%

Internet Source

50 Castillo Lara, Pedro Flores Cano, Jorge . <1%

"Dinamica sucesional del encinar de la sierra de Alvarez, San Luis Potosi, Mexico. (ARTÍCULO DE INVEST", Madera Y Bosques, Spring 2008 Issue

Publication

51 repositorio.unican.es <1%

Internet Source

52 "Pósters", Gastroenterología y Hepatología, 2002 <1%

Publication

53 pure.uva.nl <1%

Internet Source

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography On