



Dr. Francisco Romero-Gavilán

Departamento de Ingeniería de Sistemas Industriales y Diseño. Universitat Jaume I (UJI). Investigador UJI.

Dr. Nuno Araújo-Gomes

Departamento de Ingeniería de Sistemas Industriales y Diseño y Departamento de Medicina. Investigador. UJI.

Dra. Ana María Sánchez-Pérez

Departamento de Medicina. Profesora titular UJI.

Dr. Iñaki García-Arnáez

Facultad de Ciencias Químicas. Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Investigador EHU.

Dr. Mikel Azkargorta

Proteomics Platform, CIC bioGUNE, CIBERehd, ProteoRed-ISCI. Dr. Especialista Proteómica CIC bioGune.

Dr. Ibon Iloro

Proteomics Platform, CIC bioGUNE, CIBERehd, ProteoRed-ISCI. Dr. Especialista Proteómica CIC bioGune.

Dr. Félix Elortza

Proteomics Platform, CIC bioGUNE, CIBERehd, ProteoRed-ISCI. Responsable plataforma proteómica CIC bioGUNE.

Dra. Mariló Gurruchaga

Facultad de Ciencias Químicas. Universidad del País Vasco. Catedrática universitaria EHU.

Dra. Isabel Goñi

Facultad de Ciencias Químicas. Universidad del País Vasco. Catedrática universitaria EHU.

Dr. Julio Suay

Departamento de Ingeniería de Sistemas Industriales y Diseño. Universitat Jaume I. Catedrático universitario UJI.

OSTEOINTEGRACIÓN DE IMPLANTES DE TITANIO CON SUPERFICIES ACTIVAS

Un estudio proteómico

RESUMEN

El titanio es un biomaterial ampliamente empleado en la fabricación de implantes dentales, sin embargo, como consecuencia de su baja bioactividad se han desarrollado distintos tratamientos superficiales buscando una mejora en su capacidad de osteointegración. De esta forma, se ha extendido el uso de implantes de titanio con un mayor grado de rugosidad gracias a la aplicación de un tratamiento de granallado, al que le sigue un tratamiento de ataque ácido. En este artículo se ha llevado a cabo un estudio de discos de titanio con dos tipos de superficie: sin tratamiento alguno y con tratamiento de granallado más ataque ácido. El estudio reveló diferencias físico-químicas (rugosidad, hidrofilia y composición química) tras la aplicación del tratamiento superficial, pero también en cuanto al perfil de proteínas adheridas a cada superficie (estudio

proteómico). Así, la espectrometría de masas permitió la caracterización de las proteínas adsorbidas en ambos tipos de superficies. El análisis permitió la identificación de 218 proteínas distintas, pudiendo relacionar 37 de ellas con el proceso de regeneración ósea y en consecuencia con la osteointegración de un implante dental. Además, tras la cuantificación diferencial entre proteínas asociadas, antes y después de aplicar el tratamiento superficial mencionado, se observó que tras su aplicación se producía un aumento en la afinidad de las proteínas APOE, ANT3 y PROC, directamente relacionadas con el proceso de regeneración ósea. Por el contrario, la proteína CO3 se adhería a esta superficie en menor proporción. Estas variaciones de los perfiles de proteínas podrían explicar la diferencia encontrada en la respuesta de las distintas superficies al ser caracterizadas en cuanto a su comportamiento *in vivo*.

Palabras clave: Osteointegración, implante dental, apolipoproteína E, complemento C3, osteoimmunología.

ABSTRACT

Titanium is a biomaterial largely used on dental implant manufacturing. However, as a consequence of its intrinsically low bioactivity, the development of distinct superficial treatments in order to enhance its osseointegration properties is being studied. In this sense, the use of titanium implants with a higher level of roughness has been broadened, recurring to the application of sand-blasted acid-etched surface treatments. In this article, a study of two distinct titanium surface treatments has been carried out, regarding the physico-chemical properties (roughness, hydrophilicity and chemical composition) of each, as well as the pattern of adhered proteins onto each surface (proteomic study). Hence, mass spectrometry analysis allowed the detection of 218 distinct adsorbed proteins, being 37 of those related to bone regenerative processes and dental implant integration. Moreover, using differential quantification between associated proteins, comparing surfaces, it was observable a greater affinity of APOE, ANT3 and PROC proteins to the treated surface, directly linked to the bone regenerative process. On the other hand, the treated surface displays lower affinity of CO3 protein. The variations between the adsorbed protein profiles could be an explanation for distinct *in vivo* outcomes.

Key Words: Osseointegration, dental implant, apolipoprotein E, complement C3, osteoimmunology.

INTRODUCCIÓN

El titanio es empleado como biomaterial para la elaboración de implantes dentales por sus buenas propiedades mecánicas, su alta resistencia a la corrosión y su excelente biocompatibilidad. Con el objetivo de mejorar la capacidad de osteointegración de los implantes dentales de Ti, se han desarrollado tratamientos que

buscan obtener una morfología superficial que favorezca el contacto íntimo entre el nuevo hueso y el implante. En este sentido, la combinación de un tratamiento de granallado con partículas cerámicas y un ataque ácido ha reemplazado al Ti sin tratar, al haber sido relacionado con un aumento de la rugosidad y a su vez de la integración del implante en el hueso (1).

Tras la implantación de un biomaterial, los tejidos y fluidos corporales, como por ejemplo la sangre, interaccionan con su superficie (2). Como consecuencia de esta interacción, una gran variedad de proteínas

de la sangre se adhieren a la superficie del implante, formando una capa de proteínas que podría condicionar el desarrollo de los posteriores procesos biológicos (3). La adsorción de proteínas es un proceso dinámico que conlleva interacciones no covalentes como fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals (4). Estas interacciones son controladas por multitud de parámetros dependientes de las proteínas como su tamaño, polaridad o pI (5). La composición, concentración y conformación de esta capa de

proteínas formada sobre el biomaterial podría variar en función de sus características físico-químicas, ya que propiedades superficiales, tales como, su composición química, grado de hidrofilia, carga y morfología, influyen su proceso de adsorción (6). Simultáneamente, las características de la capa de proteínas podrían llegar a marcar la iniciación e intensidad de la respuesta inmune, inflamatoria o incluso la coagulación (7), pudiendo llegar a determinar la biocompatibilidad del sistema (8). Este hecho supone que el estudio de las características de esta capa de proteínas, así como el análisis de los mecanismos que gobiernan las interacciones entre estas proteínas y las superficies de los biomateriales adquiera gran relevancia.

Multitud de estudios han focalizado sus esfuerzos en evaluar las cinéticas de adsorción de proteínas sobre biomateriales como el Ti al ser expuestos a una única proteína o mezclas de determinadas proteínas

“ SE HA EXTENDIDO EL USO DE IMPLANTES DE TITANIO CON UN MAYOR GRADO DE RUGOSIDAD

(9–12). Sin embargo, el proceso de adsorción de éstas es un fenómeno complejo que depende de multitud de parámetros que no son considerados en este tipo de estudios. De hecho, en sistemas multi-proteína como, por ejemplo, el suero sanguíneo, se observa que en un inicio, como consecuencia de una mayor concentración o por efecto del tamaño, ciertas proteínas presentan una mayor difusión/desplazamiento y consecuentemente logran adsorberse antes a la superficie del material. Sin embargo, a medida que transcurre el tiempo, proteínas que no presentan esta mayor capacidad de difusión, pero muestran gran afinidad con la superficie, logran desplazar a estas moléculas iniciales; este fenómeno es conocido como efecto Vroman (13).

La espectrometría de masas en tándem acoplada a la cromatografía de líquidos (LC-MS/MS) está mostrando gran potencial en la realización de estudios proteómicos en biomateriales, permitiendo la identificación de proteínas como la fibronectina, la albúmina, el fibrinógeno, inmunoglobulinas y complemento C3 en una superficie tratada de Ti, tras su incubación en suero humano (14). Este mismo trabajo revela que la adsorción de proteínas depende de la rugosidad de dicha superficie. Sugimoto et al. estudiaron mediante LC/MS/MS la capa de proteínas adheridas a TiO₂ tras ser expuesto a proteínas óseas de cerdo, detectando proteínas de la matriz extracelular, enzimas y factores de crecimiento con potencial para favorecer la mineralización ósea (15). La composición de la capa de proteínas adsorbidas sobre una superficie de Ti granallada, tras ser expuesta a plasma humano fue caracterizada por Dodo et al. El estudio mostró que esta capa estaba compuesta principalmente por proteínas relacionadas con la adhesión celular, la coagulación y procesos de transporte (16). Sin embargo, no se han llevado a cabo estudios comparativos entre superficies con y sin tratamiento de granallado y ataque ácido, que intenten explicar el mejor comportamiento ya descrito *in vivo* cuando se utilizan las superficies de titanio tratadas.

El objetivo de este estudio fue la caracterización y comparación físico-química y proteómica de ambos tipos de superficies de titanio, titanio liso y titanio granallado y atacado con ácido (GAA). En particular, y gracias a la caracterización proteómica de ambas superficies tras haber estado en incubación con suero humano, se intenta dar una explicación a

la mejora de osteointegración lograda con los tratamientos de granallado y ataque ácido. Para lograr la caracterización proteómica se empleó la cromatografía de fase reversa a escala nano acoplada en línea a la espectrometría de masas en tándem (nLC-MS/MS).

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Preparación de los discos de Ti

Discos de Ti (12 mm de diámetro, 1 mm de espesor) fueron fabricados a partir de Ti puro grado-4 (GM-Implant S.L., Lleida, España). Una parte de los discos fue tratada superficialmente por una de sus caras. El tratamiento consistió en un proceso de granallado con partículas de óxido de aluminio de 4 µm y un ataque ácido sumergiendo los discos en ácido sulfúrico durante 1 h, con el objetivo de simular los tratamientos aplicados sobre implantes dentales. Todos los discos fueron posteriormente lavados con ultrasonidos en acetona, etanol y agua purificada (18.2 Ω) sucesivamente (20 min en cada baño); y finalmente secados a vacío. Además, todos los discos de Ti fueron esterilizados usando radiación UV.

2.2 Caracterización físico-química

La caracterización de la morfología superficial de los discos de titanio se llevó a cabo a través de la microscopía electrónica de barrido (SEM; Leica-Zeiss LEO, Wetzlar, Alemania), siendo empleada en tándem con el microanálisis por dispersión de energías Inca 250 (EDX; Oxford Instruments, Abingdon, UK) que permitió el análisis de su composición química. Las micrografías de SEM fueron analizadas mediante el programa de tratamiento de imágenes ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) con el objetivo de determinar la presencia de residuos del proceso de granallado. La rugosidad de las muestras fue determinada utilizando un perfilómetro mecánico Dektak 6M (Veeco, NY, USA). Fueron analizadas dos muestras de cada superficie, llevando a cabo un total de tres mediciones en cada una de ellas con el objetivo de obtener el valor medio y la desviación del parámetro Ra. El grado de hidrofilia de las superficies fue evaluado mediante medidas del ángulo de contacto, usando un medidor de ángulos de contacto automático OCA 20 (Dataphysics Instruments, Filderstadt, Alemania). Fue empleado para realizar la medida un volumen de gota de 10 µL de agua destilada. La velo-

cidad empleada en la formación de la gota fue de 27.5 $\mu\text{L s}^{-1}$ y los ángulos de contacto fueron determinados usando el programa SCA 20 (<http://www.data-physics.de/startseite/produkte/software-module>). Los valores medios y sus desviaciones se obtuvieron tras analizar 5 discos de cada material, depositando dos gotas en cada uno de ellos.

2.3. Obtención de la capa de proteínas adheridas

Cada disco (12 mm \varnothing) fue incubado en un pocillo de una placa de 24 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) con 2 mL de suero humano, obtenido de plasma AB masculino (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), durante 180 min a 37 $^{\circ}$ C y un 5 % de CO₂. Transcurrido este tiempo, el suero fue retirado y las muestras fueron sometidas a un proceso de cinco lavados consecutivos con 200 μL de agua milli-Q y un lavado final con 200 μL de 100 mM NaCl en 50 mM Tris-HCl, a pH 7, con el objetivo de eliminar las proteínas no adsorbidas. La elución final se obtuvo sumergiendo el disco en una disolución de 4% SDS, 100 mM DTT y 0.5 M TEAB. Se llevaron a cabo un total de 3 réplicas independientes para cada tipo de superficie, estando cada réplica constituida por la mezcla de la elución de 4 discos distintos. Además, se cuantificó la cantidad de proteína total del suero antes del ensayo, empleando el kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una concentración de 51 mg mL⁻¹ fue determinada.

2.4. Ensayo de proteómica

Las muestras con las eluciones de proteína fueron resueltas respecto a su peso molecular en un 10% de gel de poliacrilamida, empleando una célula de electroforesis Mini-Protean II (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). El gel fue teñido empleando la tinción comercial SYPRO Ruby (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Seguidamente el gel fue lavado y cada calle fue cortada en 4 bandas. Cada una de estas ban-

das fue sometida a un proceso de digestión con tripsina siguiendo un protocolo estándar el cual consta de reducción y alquilación (17). Los péptidos obtenidos fueron resuspendidos en 0.1 % de ácido fórmico y analizados mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (nLC-MS/MS). La separación de los péptidos fue llevada a cabo en un sistema de cromatografía líquida nanoAcquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) conectado a un espectró-

metro SYNAPT G2-Si (Waters). Las muestras fueron cargadas en precolumnas Symmetry 300 C18 UPLC (5 μm , 180 $\mu\text{m} \times 20$ mm, Waters) conectadas a columnas BEH130 C18 (1.7 μm , 75 $\mu\text{m} \times 200$ mm, Waters). Las columnas fueron equilibradas con un 3% de acetonitrilo y 0.1% de FA. Los péptidos fueron eluidos usando un gradiente creciente del 3 %-50% de acetonitrilo en 60 min con un flujo de 300 nL min⁻¹. Un espectrómetro SYNAPT G2-Si ESI Q-Mobility-TOF (Waters) equipado con una cámara de

movilidad iónica (T-Wave-IMS) fue utilizado para el análisis de los péptidos. Los datos de LC-MS fueron recogidos en modo HDDA, el cual mejora las intensidades de señal usando la separación por movilidad iónica. La identificación de las proteínas se llevó a cabo usando el buscador MASCOT Search Engine (Matrix Science, London, UK; <http://www.matrixscience.com>) a través del software Proteome Discoverer v.1.4 (Thermo Fisher Scientific). La tolerancia en la medida de la masa de los péptidos fue de 10 ppm, y de 0.2 Da para los fragmentos. La carbamidometilación de cisteínas fue seleccionada como modificación fija y la oxidación de la metionina como modificación variable. El programa informático Progenesis LC-MS (Nonlinear Dynamics, Newcastle-upon-Tyne, UK) fue empleado para llevar a cabo el análisis diferencial de las proteínas identificadas entre las superficies estudiadas. Los archivos originales fueron importados al programa y se seleccionó una de las muestras como referencia, con la cual se alinearon las masas precursoras en el resto de muestras. Éstas se agruparon en

EL ESTUDIO ANALIZA DOS SUPERFICIES DE TITANIO EMPLEADAS EN LA FABRICACIÓN DE IMPLANTES DENTALES

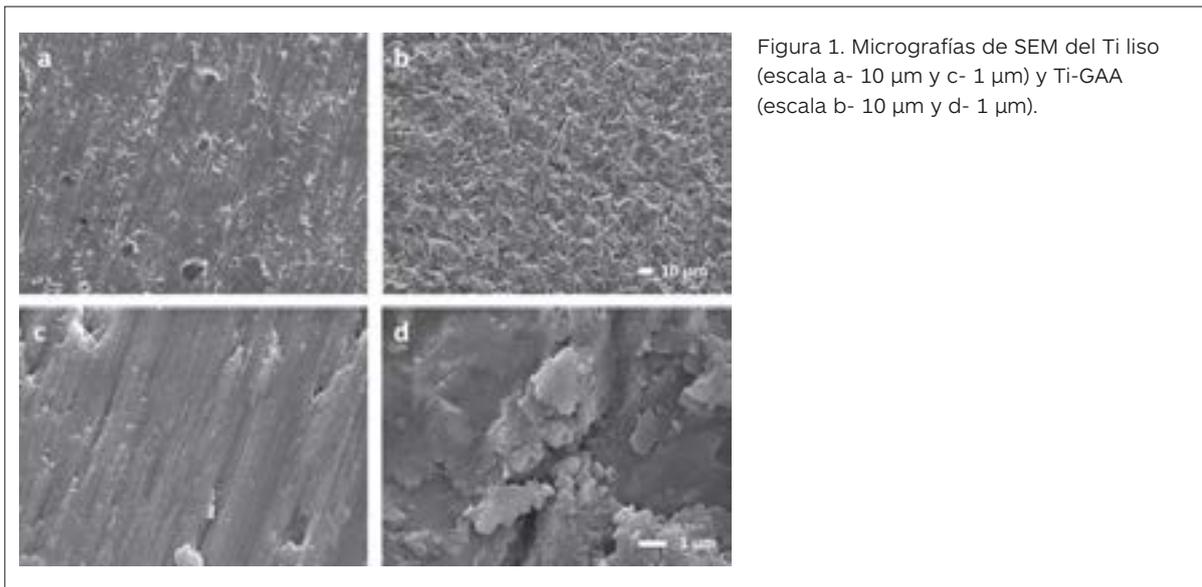


Figura 1. Micrografías de SEM del Ti liso (escala a- 10 μm y c- 1 μm) y Ti-GAA (escala b- 10 μm y d- 1 μm).

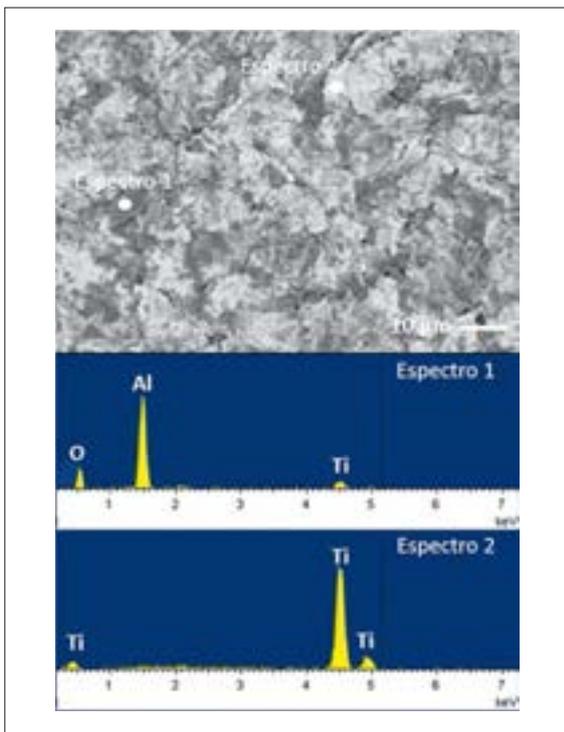


Figura 2. Identificación de partículas de alúmina mediante SEM/EDX.

las categorías experimentales apropiadas y se compararon. Las diferencias entre los grupos solo se consideraron para las abundancias de péptidos con un valor de ANOVA $p < 0.05$ y un ratio > 1.5 en cualquier dirección. Se generó una lista de picos que contenía los diferentes péptidos para cada comparación y se

realizó una búsqueda en la base de datos Swiss Prot, empleando el buscador Mascot Search Engine (www.matrixscience.com). Las proteínas con ANOVA $p < 0.05$ y un ratio mayor a 1.5 en cualquier dirección fueron consideradas como diferenciales. Además, las proteínas detectadas fueron clasificadas respecto a las funciones empleando la base de datos PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships, www.pantherdb.gov/).

RESULTADOS

3.1. Caracterización físico-química de los discos de titanio

Las micrografías de las superficies de los discos de Ti liso y Ti granallado y atacado con ácido obtenidas mediante SEM se muestran en la **Figura 1**. En las imágenes se observa claramente la distinta morfología que presentan ambas superficies. Los discos sin tratamiento (**Figura 1a y c**) muestran una topografía más lisa, a pesar de presentar una serie de surcos consecuencia del propio proceso de mecanizado del disco. En cambio, tras el proceso de granallado y el ataque ácido la topografía es significativamente más rugosa (**Figura 1b y d**). Las marcas iniciales del mecanizado han sido eliminadas y se ha generado una nueva morfología, consecuencia del marcado logrado con la proyección de partículas de alúmina y el posterior ataque con ácido. Además, se observa que en la superficie del Ti rugoso hay partículas incrustadas. El EDX demostró que estas partículas son alúmina del proceso de granallado

(Figura 2). Se calculó mediante un programa de tratamiento de imagen que el área de disco cubierta por las partículas de Al_2O_3 alcanzaba el 13.8 % de su superficie. Los resultados observados en el SEM concuerdan con los datos del perfilómetro mecánico, que muestran un valor del parámetro Ra de $0.14 \pm 0.04 \mu m$ en el Ti liso y de $1.15 \pm 0.10 \mu m$ en la superficie con tratamiento superficial. El grado de mojabilidad de ambos materiales se determinó mediante la medida del ángulo de contacto. Valores de $94.53 \pm 2.59^\circ$ y $79.55 \pm 7.51^\circ$ fueron obtenidos en el Ti liso y GGA, respectivamente. De modo que la aplicación del granallado y el ataque ácido supone una disminución del ángulo de contacto y consecuentemente una mayor hidrofilia.

3.2. Análisis proteómico

3.2.1 Identificación de las proteínas adsorbidas a las superficies de Ti

El análisis mediante LC-MS/MS de las proteínas eluidas en ambas superficies de titanio resultó en la detección de un total de 218 proteínas distintas. De este listado un grupo de 37 proteínas pudo ser relacionado de algún modo con el proceso de regeneración ósea (Tabla 1). Entre las proteínas seleccionadas se encuentra un grupo de apolipoproteínas (APO1, APOB, APOC1, APOC3, APOC4, APOD, APOE, APOH, APOM). Del mismo modo, se ha detectado un grupo de proteínas cuyas funciones estarían ligadas al sistema inmune (C1S, C1RL, C1QC, CO3, CO4A, C4BPA, CO5, CO6, CO8B, CFAH, SAMP, CLUS). Por otro lado, se han identificado proteínas relacionadas con los procesos de coagulación y fibrinólisis (PLMN, FA12, HRG, PROC, THBR, ANT3, KNG1). Adsorbidas al titanio se pudieron encontrar también proteínas envueltas en la adhesión celular y la matriz extracelular, importantes para la integración del implante, como son la VTNC, TETN y PRG4. La técnica LC-MS/MS permitió además la detección de proteínas relacionadas en cierto grado en el desarrollo de nuevo hueso como son la PON1, VTDB y la PEDF. También fueron identificados componentes celulares/citoplasmáticos de unión y adhesión celular como las proteínas PLEC, GELS y ACTB.

3.2.2. Clasificación por funciones mediante PANTHER

Las proteínas identificadas en el análisis de proteómica en ambas superficies de Ti fueron clasificadas en base

a sus funciones, usando el programa PANTHER. Los resultados de esta clasificación, respecto a las funciones en procesos biológicos, se muestran en la Figura 3. En el gráfico se comprueba que los procesos biológicos en los que están envueltas las proteínas identificadas en cada una de las superficies son similares. Muestran una mayor presencia, con valores del 19.3% en el Ti sin tratar y del 16.4% en el tratado (GAA), los procesos metabólicos y con un 14.7% y un 16.0% en el Ti sin tratar y tratado, respectivamente, los procesos celulares.

En la Figura 4 se muestra la clasificación respecto a las funciones de las proteínas en vías de señalización. Se observa que las proteínas adheridas al Ti no tratado intervienen en un mayor número de vías que aquellas que fueron detectadas en el Ti granallado y atacado con ácido. De este modo, por ejemplo, en el Ti tratado no se detectan funciones en la señalización de la glucosis, de la apoptosis o de la activación de la cascada del Plasminógeno. Sin embargo, se observa un aumento significativo, al pasar del 28.5% al 43.4%, en la afinidad del Ti a proteínas relacionadas con la coagulación sanguínea tras la aplicación del tratamiento superficial GAA. Del mismo modo, se observa un incremento de adhesión de proteínas relacionadas con los procesos de inflamación mediados por citoquinas, del 11.9 % al 17.3%, y de proteínas que intervienen en la vía de señalización de integrinas, del 4.7% al 13.3%.

3.2.3. Análisis diferencial libre de marcaje mediante Progenesis

Para analizar si existen proteínas estadísticamente más adheridas a alguna de las dos superficies de Ti estudiadas, se llevó a cabo un análisis diferencial denominado libre de marcaje mediante el programa Progenesis. El resultado de esta comparación se muestra en la Tabla 2. Un total de 5 proteínas fueron identificadas como características del Ti sin tratar: 3 inmunoglobulinas (IGHG1, IGHM, LV301), una enzima oxidoreductasa (CATA) y la proteína del sistema del complemento CO3 constituyen esta lista. Por otro lado, 6 proteínas fueron identificadas como más afines a la superficie del Ti tratado: las apolipoproteínas APOA1, APOA4 y APOE, la PROC, la ANT3 y la PLEC.

DISCUSIÓN

Este estudio se centra en la caracterización de la capa de proteínas adsorbidas sobre dos superficies

Proteína	Código	Spectral counts					
		Ti no tratado			Ti GAA		
		1	2	3	1	2	3
Apolipoprotein A-I	APOA1_HUMAN	49	18	61	60	37	46
Apolipoprotein B-100	APOB_HUMAN	37	0	33	32	18	25
Apolipoprotein C-I	APOC1_HUMAN	1	0	0	2	0	1
Apolipoprotein C-III	APOC3_HUMAN	1	0	2	1	1	2
Apolipoprotein C-IV	APOC4_HUMAN	0	0	0	2	0	1
Apolipoprotein D	APOD_HUMAN	2	1	2	5	2	3
Apolipoprotein E	APOE_HUMAN	57	20	55	64	43	65
Beta-2-glycoprotein 1	APOH_HUMAN	5	2	1	2	0	1
Apolipoprotein M	APOM_HUMAN	1	0	1	1	0	0
Complement C1s subcomponent	C1S_HUMAN	5	1	4	2	2	4
Complement C1r subcomponent-like protein	C1RL_HUMAN	1	0	1	1	1	1
Complement C1q subcomponent subunit C	C1QC_HUMAN	3	4	5	6	4	6
Complement C3	CO3_HUMAN	135	31	115	88	58	75
Complement C4-A	CO4A_HUMAN	54	14	37	34	17	14
C4b-binding protein alpha chain	C4BPA_HUMAN	6	0	3	4	1	0
Complement C5	CO5_HUMAN	1	0	1	0	0	0
Complement component C6	CO6_HUMAN	0	0	1	1	0	2
Complement component C8 beta chain	CO8B_HUMAN	2	0	0	0	0	0
Complement factor H	CFAH_HUMAN	10	1	8	7	5	2
Serum amyloid P-component	SAMP_HUMAN	6	0	7	6	2	6
Clusterin	CLUS_HUMAN	9	2	7	7	9	4
Plasminogen	PLMN_HUMAN	7	0	2	3	3	7
Coagulation factor XII	FA12_HUMAN	3	0	1	0	0	0
Histidine-rich glycoprotein	HRG_HUMAN	14	0	6	8	4	3
Vitamin K-dependent protein C	PROC_HUMAN	0	0	0	1	3	0
Prothrombin	THRB_HUMAN	0	0	1	3	2	0
Antithrombin-III	ANT3_HUMAN	31	3	11	29	9	24
Kininogen-1	KNG1_HUMAN	4	0	4	0	0	0
Vitronectin	VTNC_HUMAN	14	3	6	15	10	12
Tetranectin	TETN_HUMAN	2	2	2	4	0	2
Plectin	PLEC_HUMAN	0	0	0	3	3	7
Proteoglycan 4	PRG4_HUMAN	1	0	3	2	0	3
Gelsolin	GELS_HUMAN	12	2	6	6	6	6
Serum paraoxonase/arylesterase 1	PONI_HUMAN	2	0	8	7	0	0
Vitamin D-binding protein	VTDB_HUMAN	2	0	4	1	0	0
Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	10	5	11	19	53	22
Pigment epithelium-derived factor	PEDF_HUMAN	5	0	2	2	0	0

Tabla 1. Proteínas adsorbidas en el Ti no tratado y en el Ti GAA relacionadas con la regeneración ósea. Los Spectral counts indican el número de espectros de MS/MS obtenidos para cada proteína.

distintas de Ti: una sin tratamiento y otra tratada (granallado y ataque ácido, Ti-GAA). Los resultados de la caracterización físico-química mostraron, como era de esperar, importantes diferencias morfológicas entre ambas superficies. La mayor rugosidad observada en el Ti-GAA ha sido repetidamente ligada en la bibliografía con un mayor potencial osteointegrador (18). También se detectaron diferencias químicas entre las superficies de Ti, al identificar partículas de alúmina en el Ti-GAA resultado de la aplicación del proceso de granallado. La presencia de alúmina en la superficie también se ha llegado a asociar en bibliografía a una mejor respuesta en cuanto a osteointegración de los implantes (19). Por otro lado, se observó un comportamiento más hidrófilo de la superficie tras aplicar el tratamiento GAA. Todas estas diferencias físico-químicas y en particular la presencia de alúmina puede justificar el cambio en la afinidad de

“ LA ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEPENDE DE LA RUGOSIDAD DE LA SUPERFICIE

algunas proteínas hacia una u otra superficie de titanio.

El análisis mediante LC-MS/MS permitió caracterizar las capas de proteínas adheridas en ambas superficies, identificando una lista de 37 proteínas que podrían poseer de algún modo un papel en el proceso de regeneración ósea (Tabla 1). Es destacable la gran afinidad de ambas superficies de Ti por las proteínas de la familia de las apolipoproteínas, las cuales podrían prevenir la activación de la respuesta inmune innata y jugar un papel anti-

inflamatorio (20). Del mismo modo, se identificó un importante clúster de proteínas relacionadas con el sistema del complemento. Por un lado, proteínas como la C1S, C1QC, CO3 o CO5 son conocidas por formar parte de la activación de esta cascada. Su adhesión a la superficie del biomaterial podría iniciar una reacción inmune/inflamatoria en la experimentación *in vivo* (21). Entre el sistema inmune y el hueso

Proteína	Código	Anova (p)	Ti GAA	Ti no tratado	Ratio GGA/ no tratado
Catalase	CATA_HUMAN	8,82E-04	0,00E+00	2,30E+02	0,0
Ig gamma-1 chain C region	IGHG1_HUMAN	2,20E-02	5,06E+02	2,04E+03	0,2
Complement C3	CO3_HUMAN	1,23E-02	2,03E+03	4,40E+03	0,5
Ig mu chain C region	IGHM_HUMAN	3,37E-02	3,06E+02	6,52E+02	0,5
Ig lambda chain V-III region SH	LV301_HUMAN	1,21E-02	1,04E+03	1,52E+03	0,7
Apolipoprotein E	APOE_HUMAN	1,97E-02	7,71E+03	4,80E+03	1,6
Apolipoprotein A-I	APOA1_HUMAN	3,27E-02	2,11E+04	1,20E+04	1,8
Apolipoprotein A-IV	APOA4_HUMAN	4,48E-03	1,33E+03	4,99E+02	2,7
Vitamin K-dependent protein C	PROC_HUMAN	1,39E-02	3,11E+03	1,59E+02	19,6
Antithrombin-III	ANT3_HUMAN	5,92E-04	2,61E+03	1,33E+01	197,2
Plectin	PLEC_HUMAN	2,76E-03	8,72E+02	3,02E+00	288,2

Tabla 2. Resultado del análisis diferencial mediante Progenesis. La parte superior de la tabla muestra las proteínas diferencialmente más adsorbidas al Ti sin tratar y en la parte inferior las más adsorbidas en el Ti GGA.

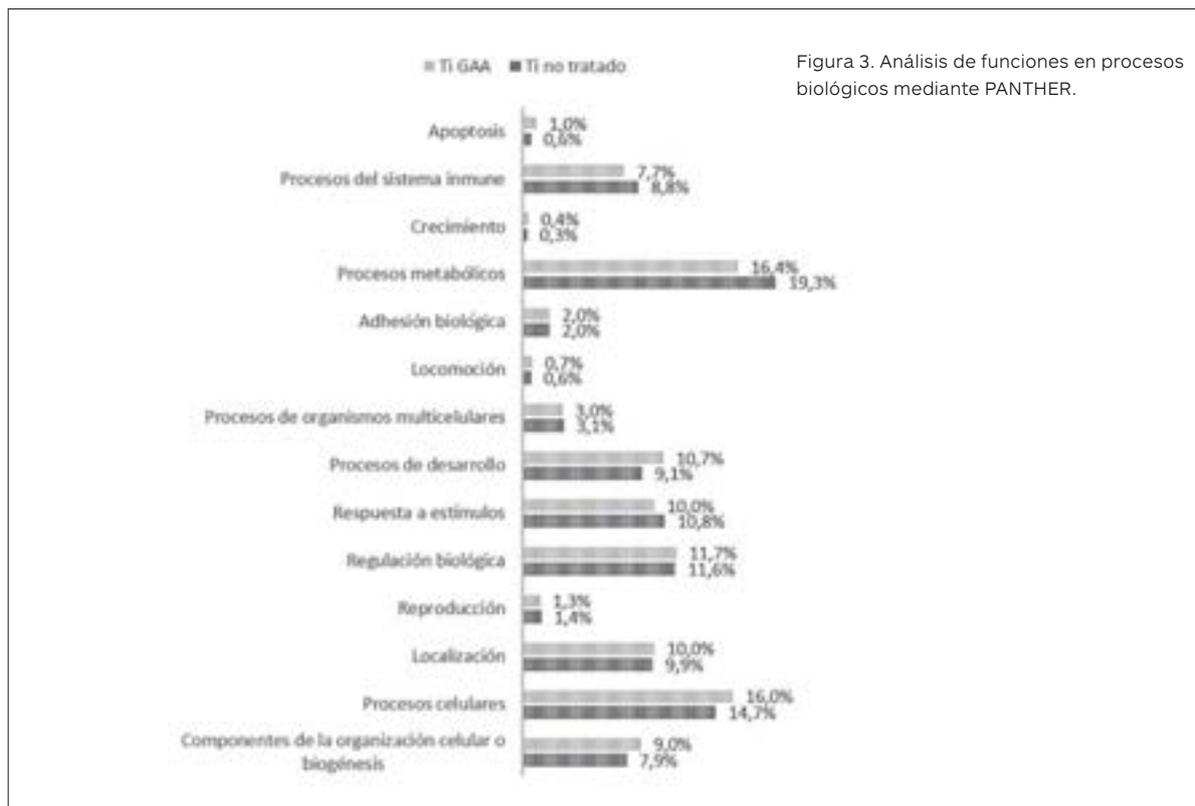


Figura 3. Análisis de funciones en procesos biológicos mediante PANTHER.

existen interacciones complejas que podrían tener un papel importante en el proceso de regeneración ósea. Así, las citoquinas y factores de crecimiento generados por el sistema inmune pueden mediar en la regulación de las actividades de las células óseas (osteoblastos y osteoclastos) (22). De este modo, esta actividad del sistema inmune, siempre que se mantenga dentro de unos límites, podría tener un efecto positivo sobre la regeneración. En esta línea, también se identificaron proteínas cuya función iría ligada a la regulación de la activación del sistema inmune/inflamación. Las proteínas C4BPA, CFAH, VTNC y CLUS son capaces de inhibir la activación de la cascada del complemento (21); sin su regulación, una reacción inmune desproporcionada podría dar lu-

gar a una inflamación crónica que supondría el fallo del implante (23). Al analizar mediante Panther

las funciones de las proteínas detectadas en ambas superficies, parece que las funciones ligadas a procesos biológicos relacionados con la respuesta inmunitaria tienen una presencia similar (Figura 3).

Se ha encontrado también proteínas que forman parte de dos importantes procesos, cuyo correcto desarrollo sería clave para la regeneración ósea: la fibrinólisis y la coagulación. Tras la implantación de una prótesis, se inicia la formación de coágulos como consecuencia del trauma efectuado. Esta coagulación iría además asociada a un efecto proinfla-

matorio y de llamada a las células necesarias para la regeneración del tejido. En una etapa posterior, el

LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EN FASE REVERSA ACOPLADA A LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM MUESTRA GRAN POTENCIAL EN LOS ESTUDIOS PROTEÓMICOS EN BIOMATERIALES

sistema del plasminógeno regularía la degradación de la matriz extracelular, permitiendo el remodelado del tejido óseo y la angiogénesis. Las proteínas PLMN, FA12, HRG, PROC, THBR, ANT y KNG1 estarían involucradas en estas etapas de la regeneración (24). El PLMN parece tener un papel fundamental en la regulación de la fibrinólisis (25). Por otro lado, FA12 y THBR participarían en la iniciación de la vía de señalización de la coagulación. Mientras que PROC, ANT3 y KNG1 actuarían en la regulación de este sistema (26). A su vez, FA12 y KNG1 son parte del sistema kallikrein-kinin responsable del inicio de la coagulación desde superficies artificiales (27). Parece ser, según el análisis con Panther, que la presencia de proteínas relacionadas con la coagulación sería

“ DE LAS 218 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS, 37 DE ELLAS SE RELACIONARON CON EL PROCESO DE REGENERACIÓN ÓSEA

mayor en el Ti-GAA (Figura 4). Por otro lado, proteínas como la TENT, PRG4, ACTB y la VTNC podrían estar directamente relacionadas con la regeneración. La VTNC, además de su papel como inhibidora de la activación de la cascada del complemento, podría interactuar con la cascada de la coagulación, contribuyendo a la regeneración del tejido. Esta proteína también podría favorecer la diferenciación osteoblástica (28). La TENT podría influir en el proceso de remodelado óseo por su influencia en la activación del sistema del plasminógeno (29). A su vez, la PRG4 ha sido valorada por ser un importante regulador del desarrollo y del remodelado esquelético (30). De otro lado, la ACTB podría estar involucrada en el control de la osteogénesis, a través de la regulación

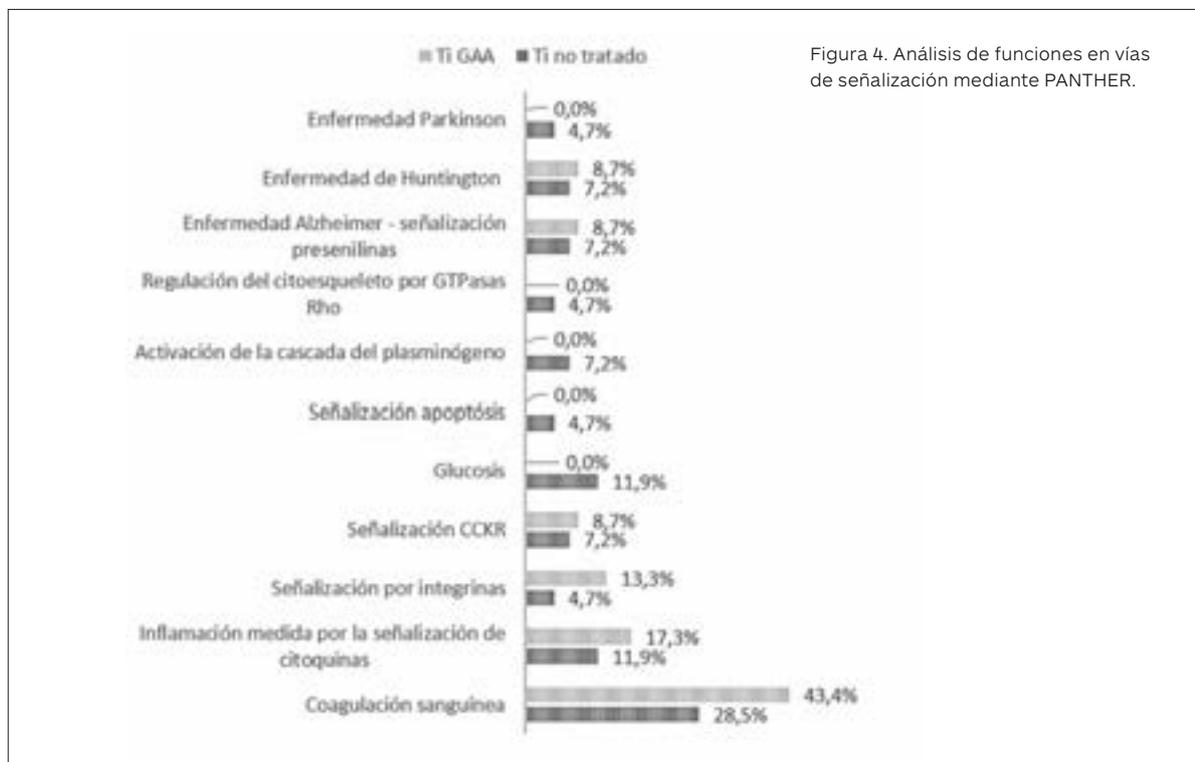


Figura 4. Análisis de funciones en vías de señalización mediante PANTHER.

de la activación de la Runx2 (31). En la misma línea, las proteínas PON1 (32), GELS (33), VTDB (34) y PEDF (35), en cierta forma, estarían ligadas con el proceso de desarrollo óseo según algunos estudios.

Con el objetivo de identificar las proteínas con desigual afinidad a las superficies de Ti estudiadas, se llevó a cabo el análisis diferencial mediante Progenesis (Tabla 2). Su resultado mostró que 5 proteínas se adherían en mayor proporción en el Ti más liso: 3 inmunoglobulinas (IGHG1, IGHM, LV301), una enzima oxidorreductasa (CATA) y la proteína del sistema del complemento C3. Esta última proteína, como ya se ha expuesto, estaría ligada a una respuesta inmune e inflamatoria a través de su papel en la activación de la cascada del complemento. Sin embargo, también podría poseer otras funciones relacionadas con el proceso de regeneración del hueso. Así el complemento C3 podría ser clave en la diferenciación osteoclástica (36). Estas células son necesarias para la resorción ósea, de forma que un óptimo equilibrio entre osteoblastos y osteoclastos es fundamental para obtener una correcta regeneración del hueso. Sin embargo, no estaría claro como una mayor adhesión de CO₃ en la superficie de un implante podría afectar en este equilibrio. Tras la aplicación del tratamiento GAA, que conlleva una serie de cambios físico-químicos, se observó un incremento en la adsorción de las proteínas APOA1, APOA4, APOE, PROC, ANT3 y PLEC, respecto al titanio sin tratar. La PLEC es una proteína del citoesqueleto, cuya unión con proteínas como la vimentina es muy importante para preservar la integridad mecánica de los tejidos (37). Las proteínas PROC y ANT3, como se ha expuesto anteriormente, forman parte de la cascada de la coagulación; estando su actividad relacionada con la regulación de este sistema mediante la inhibición de su activación (26). Además, las apolipoproteínas APOA1, APOA4 y APOE, relacionadas con una inhibición de la reacción inmune, también se adhieren en mayor medida a la superficie más rugosa. La APOE, a su vez, podría estar directamente envuelta en la regulación del metabolismo óseo y algunos estudios apuntan su importancia en el proceso de absorción de vitamina K por los osteoblastos (38). Por otro lado, esta proteína estaría relacionada con una inhibición de la diferenciación osteoclástica (39).

Sería tentador poder correlacionar estas diferencias en las capas de proteínas formadas sobre las dos superfi-

cias y sus distintas propiedades osteogénicas observadas en modelos *in vivo* (40). En este sentido, el aumento de la afinidad de la APOE y menor adhesión superficial de CO₃ en el Ti tras el tratamiento, podrían suponer unas mejores condiciones para el desarrollo de la regeneración ósea tras la implantación de una prótesis dental de Ti. Sin embargo, serían necesarios más estudios en esta línea para poder realizar esta afirmación.

CONCLUSIONES

Dos superficies de titanio (sin tratamiento y con tratamiento consistente en granallado y ataque ácido) utilizadas en la fabricación de implantes dentales fueron físico-químicamente caracterizadas, encontrando diferencias entre ellas. A su vez, fue estudiada la composición de la capa de proteínas del suero humano adheridas a ambas superficies.

Los resultados mostraron la afinidad de ciertas proteínas, que podrían tener un papel clave en el proceso de regeneración ósea, al adsorberse en la superficie de Ti tratado. Hay datos en la bibliografía que apuntan a que este hecho podría ser vital para lograr una buena osteointegración de los implantes dentales. Además, se identificaron proteínas que se adhieren diferencialmente a cada una de las superficies. Estas variaciones podrían estar relacionadas con la distinta capacidad osteogénica *in vivo* observada entre la superficie de titanio liso y con tratamiento de granallado más ataque ácido. ■

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el MINECO, a través del proyecto MAT 2014-51918-C2-2-R; por la Universitat Jaume I, a través de P11B2014-19, y de la beca Predoc/2014/25; por el Gobierno Vasco con la beca Predoc/2016/1/0141, y por la Generalitat Valenciana con la beca Grisolia/2014/016. Además, los autores agradecen a Antonio Coso y Jaime Franco (GMI-llerimplant) su inestimable contribución en este estudio; así como a Iraide Escobes (CIC bioGUNE), Raquel Oliver y José Ortega (UJI) por su valiosa asistencia técnica.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Wennerberg A, Albrektsson T.** On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. Vol. 25, *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2010. p. 63–74.
2. **Park JY, Davies JE.** Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2000;11 (6): 530–9.
3. **Puleo D.** Understanding and controlling the bone–implant interface. *Biomaterials*. 1999; 20 (23–24): 2311–21.
4. **Andrade JD, Hlady V.** Protein adsorption and materials biocompatibility: a tutorial review and suggested hypotheses. In: *Advances in Polymer Science*. Springer-Verlag; 1987. p. 1–63.
5. **Rabe M, Verdes D, Seeger S.** Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Adv Colloid Interface Sci*. 2011; 162 (1–2): 87–106.
6. **Schmidt, D.R., Waldeck, H., Kao WJ.** Protein adsorption to biomaterials. In: *Biological Interactions on Materials Surfaces: Understanding and Controlling Protein, Cell, and Tissue*. 2009. p. 1–18.
7. **Chen Z, Klein T, Murray RZ, Crawford R, Chang J, Wu C, et al.** Osteoimmunomodulation for the development of advanced bone biomaterials. *Mater Today*. 2016; 19 (6): 304–21.
8. **Romero-Gavilán F, Sanchez-Pérez AM, Araújo-Gomes N, Azkargorta M, Iloro I, Elortza F, et al.** Proteomic analysis of silica hybrid sol-gel coatings: a potential tool for predicting the biocompatibility of implants in vivo. *Biofouling*. 2017; In press.
9. **Imamura K, Shimomura M, Nagai S, Akamatsu M, Nakanishi K.** Adsorption characteristics of various proteins to a titanium surface. *J Biosci Bioeng*. 2008; 106 (3): 273–8.
10. **Kohavi D, Badihi Hauslich L, Rosen G, Steinberg D, Sela MN.** Wettability versus electrostatic forces in fibronectin and albumin adsorption to titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2013; 24 (9): 1002–8.
11. **Pegueroles M, Tonda-Turo C, Planell JA, Gil F-J, Aparicio C.** Adsorption of fibronectin, fibrinogen, and albumin on TiO₂: time-resolved kinetics, structural changes, and competition study. *Biointerphases*. 2012; 7 (1–4): 48.
12. **Sousa SR, Lamghari M, Sampaio P, Moradas-Ferreira P, Barbosa MA.** Osteoblast adhesion and morphology on TiO₂ depends on the competitive preadsorption of albumin and fibronectin. *J Biomed Mater Res A*. 2008; 84 (2): 281–90.
13. **Kay C Dee, David A. Puleo RB.** *An Introduction To Tissue-Biomaterial Interactions*. Wiley & Sons; 2003.
14. **Sela MN, Badihi L, Rosen G, Steinberg D, Kohavi D.** Adsorption of human plasma proteins to modified titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2007; 18 (5): 630–8.
15. **Sugimoto K, Tsuchiya S, Omori M, Matsuda R, Fujio M, Kuroda K, et al.** Proteomic analysis of bone proteins adsorbed onto the surface of titanium dioxide. *Biochem Biophys Reports*. 2016; 7: 316–22.
16. **Dodo CG, Senna PM, Custodio W, Paes Leme AF, Del Bel Cury AA.** Proteome analysis of the plasma protein layer adsorbed to a rough titanium surface. *Biofouling*. 2013; 29 (5): 549–57.
17. **Anitua E, Prado R, Azkargorta M, Rodríguez-Suárez E, Iloro I, Casado-Vela J, et al.** High-throughput proteomic characterization of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret)-derived fibrin clot interactome. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015; 9 (11): E1–12.
18. **Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H.** Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res*. 1991; 25 (7): 889–902.
19. **Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B, Krol JJ.** A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. *Clin Oral Implants Res*. 1995; 6 (1): 24–30.
20. **Cho NH, Seong SY.** Apolipoproteins inhibit the innate immunity activated by necrotic cells or bacterial endotoxin. *Immunology*. 2009; 128 (1 PART 2): 479–86.
21. **Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD.** Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*. 2010; 11 (9): 785–97.
22. **Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y.** Osteoimmunology: Interactions of the bone and immune system. Vol. 29, *Endocrine Reviews*. 2008. p. 403–40.
23. **Vishwakarma A, Bhise NS, Evangelista MB, Rouwkema J, Dokmeci MR, Ghaemmaghami AM, et al.** Engineering Immunomodulatory Biomaterials To Tune the Inflammatory Response. *Trends Biotechnol*. 2016; 34 (6): 470–82.
24. **Long AT, Kenne E, Jung R, Fuchs TA, Renné T.** Contact system revisited: An interface between inflammation, coagulation, and innate immunity. *J Thromb Haemost*. 2016; 14 (3): 427–37.
25. **Wehner C, Janjić K, Agis H.** Relevance of the plasminogen system in physiology, pathology, and regeneration of oral tissues – From the perspective of dental specialties. *Arch Oral Biol*. 2017; 74: 136–45.
26. **Josic D, Hoffer L, Buchacher A.** Preparation of vitamin K-dependent proteins, such as clotting factors II, VII, IX and X and clotting inhibitor Protein C. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2003; 790 (1–2).
27. **Schmaier AH, McCrae KR.** The plasma kallikrein-kinin system: Its evolution from contact activation. *J Thromb Haemost*. 2007; 5 (12): 2323–9.
28. **Leavesley DI, Kashyap AS, Croll T, Sivaramakrishnan M, Shokohmand A, Hollier BG, et al.** Vitronectin - Master controller or micro-manager? *IUBMB Life*. 2013; 65 (10): 11–25.
29. **Iba K, Abe Y, Chikenji T, Kanaya K, Chiba H, Sasaki K, et al.** Delayed fracture healing in tetranectin-deficient mice. *J Bone Miner Metab*. 2013; 31 (4): 399–408.
30. **Novince CM, Michalski MN, Koh AJ, Sinder BP, Entezami P, Eber MR, et al.** Proteoglycan 4: a dynamic regulator of skeletogenesis and parathyroid hormone skeletal anabolism. *J Bone Miner Res*. 2012; 27 (1): 11–25.
31. **Sen B, Xie Z, Uzer G, Thompson WR, Styner M, Wu X, et al.** Intracellular Actin Regulates Osteogenesis. *Stem Cells*. 2015; 33 (10): 3065–76.
32. **Dowling P, Hayes C, Ting KR, Hameed A, Meiller J, Mitsiades C, et al.** Identification of proteins found to be significantly altered when comparing the serum proteome from Multiple Myeloma patients with varying degrees of bone disease. *BMC Genomics*. 2014; 15 (1): 904.
33. **Thouverey C, Malinowska A, Balcerzak M, Strzelecka-Kiliszek A, Buchet R, Dadlez M, et al.** Proteomic characterization of biogenesis and functions of matrix vesicles released from mineralizing human osteoblast-like cells. *J Proteomics*. 2011; 74 (7): 1123–34.
34. **Schneider G.B., Grecco K.J., Safadi F.F. PSN.** The anabolic effects of vitamin D-binding protein-macrophage activating factor (DBP-MAF) and a novel small peptide on bone. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2003; 13 (2–4 SPEC. ISS.): 277–84.
35. **Li F, Song N, Tombran-Tink J, Niyibizi C.** Pigment epithelium derived factor suppresses expression of Sost/Sclerostin by osteocytes: implication for its role in bone matrix mineralization. *J Cell Physiol*. 2015; 230 (6): 1243–9.
36. **Tu Z, Bu H, Dennis JE, Lin F.** Efficient osteoclast differentiation requires local complement activation. *Blood*. 2010; 116 (22): 4456–63.
37. **Burgstaller G, Gregor M, Winter L, Wiche G.** Keeping the vimentin network under control: cell-matrix adhesion-associated plectin 1f affects cell shape and polarity of fibroblasts. *Mol Biol Cell*. 2010; 21 (19): 3362–75.
38. **Newman P, Bonello F, Wierzbicki AS, Lumb P, Savidge GF, Shearer MJ.** The uptake of lipoprotein borne phyloquinone (vitamin K₁) by osteoblasts and osteoblast like cells: role of heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Bone Miner Res*. 2002; 17 (3): 426–33.
39. **Kim W-S, Kim HJ, Lee ZH, Lee Y, Kim H-H.** Apolipoprotein E inhibits osteoclast differentiation via regulation of c-Fos, NFATc1 and NF-κB. *Exp Cell Res*. 2013; 319 (4).
40. **Wennerberg A, Albrektsson T.** Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2009; 20: 172–84.