

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II**



**TESIS DOCTORAL**

**Proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2): producción y evaluación de su actividad osteoinductora *in vitro* e *in vivo***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Carolina Moreno Vicente**

Directores

José Luis López Lacomba, Ander Abarrategui López

**Madrid, 2015**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



**PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSEA 2 (BMP-2):  
PRODUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD  
OSTEOINDUCTORA *IN VITRO* E *IN VIVO***

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

CAROLINA MORENO VICENTE

Bajo la dirección de:

Dr. Jose Luis López Lacomba

Dr. Ander Abarrategi López

Instituto de Estudios Biofuncionales

**MADRID, 2015**



## INFORME DE LOS DIRECTORES

El Dr. Jose Luis López Lacomba, Profesor Titular del Departamento de Química-Física II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, director del Instituto de Estudios Biofuncionales y director responsable del grupo de Ingeniería de Tejidos de la Universidad Complutense de Madrid.

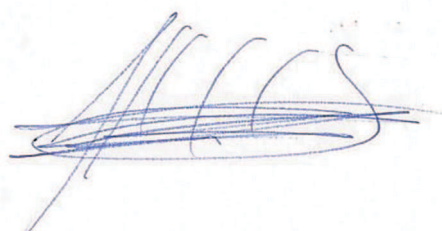
El Dr. Ander Abarrategi López, investigador postdoctoral del “London Research Institute, Cancer Research UK” y miembro del grupo de Ingeniería de Tejidos de la Universidad Complutense de Madrid.

### CERTIFICAN:

Que la Licenciada Dña. Carolina Moreno Vicente ha realizado la labor investigadora correspondiente a la Tesis Doctoral titulada “Proteína Morfogenética Ósea 2 (BMP-2): producción y evaluación de su actividad osteoinductora *in vitro* e *in vivo*” bajo su dirección en el Instituto de Estudios Biofuncionales y reuniendo los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizan su presentación para que sea juzgado por el tribunal correspondiente nombrado a tal efecto. Y para que conste, a los efectos oportunos, firman el presente documento.

Madrid, 17 de Noviembre de 2014



Dr. Jose Luis López Lacomba



Dr. Ander Abarrategi López



✧ *ÍNDICE*

---



❖ <b>ABREVIATURAS</b>	15
❖ <b>ABSTRACT</b>	17
❖ <b><u>INTRODUCCIÓN</u></b>	23
1. REGENERACIÓN ÓSEA	25
2. TEJIDO ÓSEO	27
2.1. Morfología del hueso	27
2.2. Histología del hueso	30
3. FISIOLOGÍA Y HOMEOSTASIS DEL HUESO	33
3.1. Remodelación ósea	34
3.2. Fractura y regeneración ósea	35
4. INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO	36
4.1. Proteínas Morfogenéticas Óseas	38
4.1.1. Miembros de la familia de BMP	39
4.1.2. Estructura de las BMPs	41
4.1.3. Mecanismos de señalización de BMPs	42
4.1.3.1. Receptores	42
4.1.3.2. Ruta de señalización Smad	44
4.1.3.3. Ruta de señalización Smad independiente.	44
4.1.3.4. Regulación de la señalización de BMPs	45
4.1.4. BMP-2	45
4.1.5. Aplicación en clínica de las BMPs	49
❖ <b>ANTECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN</b>	53
❖ <b>OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL</b>	54
❖ <b><u>CAPÍTULO 1: OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE rhBMP-2</u></b>	55
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	57
1. <i>Escherichia coli</i> COMO SISTEMA DE PRODUCCIÓN	58
1.1 Aislamiento y solubilización de cuerpos de inclusión	60
1.2 Renaturalización de la proteína solubilizada	62
1.2.1 Condiciones de renaturalización	64
1.2.2 Formación de puentes disulfuro durante el plegamiento	65
1.2.3 Agregación vs plegamiento	66
2. PRODUCCIÓN DE BMP-2	67

3. OBJETIVO PARCIAL: OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE rhBMP-2	70
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	71
1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES	71
2. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS	71
3. MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS PARA <i>E.coli</i>	72
4. CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS	72
5. PRODUCCIÓN DE rhBMP-2 EN <i>E. coli</i>	75
5.1. Transformación de la cepa BL21 de <i>E. coli</i> con pT7.7-rhBMP-2	75
5.1.1. Caracterización del plásmido insertado	76
5.2. Expresión de rhBMP-2	77
5.3. Obtención y solubilización de los cuerpos de inclusión	78
5.4. Purificación por cromatografía	79
5.5. Plegamiento de proteína	80
6. CONCENTRACIÓN Y DIAFILTRACIÓN DE LAS MUESTRAS	81
7. DIÁLISIS	81
8. PROTEÓLISIS DE rhBMP-2	81
9. CONSERVACIÓN DE PROTEÍNA FINAL	82
10. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS POR GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	82
10.1. Análisis de los geles de electroforesis SDS-PAGE	83
11. CULTIVO CELULAR. LÍNEAS CELULARES PARA ENSAYOS DE ACTIVIDAD	83
11.1. Línea celular C2C12	83
11.2. Línea celular UMR 106	84
11.3. Línea celular ROS 17/2.8	84
11.4. Cultivos primarios de hMSC	84
12. ENSAYOS CELULARES	85
12.1. Contenido total de proteínas. Ensayo de Bradford	85
12.2. Ensayo de actividad de rhBMP-2. Ensayo de fosfatasa alcalina	86
13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	87

<b>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	89
1. ESTUDIO DE OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE rhBMP-2	91
1.1. Purificación previa al plegamiento	91
1.2. Estudios de mejora del proceso de plegamiento/renaturalización	94
1.2.1. Plegamiento de las distintas formas de la proteína	94
1.2.2. Tiempo de plegamiento	96
1.2.2.1. Evaluación de la actividad de distintos tiempos de plegamiento de rhBMP-2	102
1.2.3. Aprovechamiento de las fracciones obtenidas	104
2. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE ALMACENAMIENTO DE rhBMP-2	108
3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE rhBMP-2 OBTENIDA SOBRE DISTINTOS TIPOS CELULARES	112
4. PROTEÓLISIS DE rhBMP-2	114
4.1. Actividad de rhBMP-2 lisada	120
<b>IV. CONCLUSIONES</b>	123
❖ <b><u>CAPÍTULO 2: EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR DE hMSC AL TRATAMIENTO CON rhBMP-2</u></b>	125
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	127
1. DIFERENCIACIÓN ÓSEA	128
1.1. Expresión de marcadores óseos	128
1.1.1. Factores de transcripción	129
1.1.2. Marcadores tempranos de diferenciación ósea	131
1.1.3. Otros marcadores de diferenciación osteoblástica	133
1.1.4. Marcadores de fenotipo mioblástico	135
2. OBJETIVO PARCIAL: EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR DE hMSC AL TRATAMIENTO CON rhBMP-2	136
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	137
1. OBTENCIÓN DE rhBMP-2	137
2. CULTIVO CELULAR	137

3.	ESTUDIO DE PROLIFERACIÓN CELULAR	137
3.1	Ensayo de Etidio-Homodímero	137
3.2	Ensayo de MTT	138
3.3	Ensayo de cuantificación de contenido proteico total. Ensayo Bradford	138
4.	ENSAYO DE ACTIVIDAD DE rhBMP-2. ENSAYO DE FOSFATASA ALCALINA	138
5.	ESTUDIO DE DIFERENCIACIÓN	139
5.1	Ensayo de mineralización. Tinción de Alizarín Red	139
6.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE MARCADORES IMPLICADOS EN LA DIFERENCIACIÓN ÓSEA	139
6.1	Cultivo celular para extracción de RNA	139
6.2	Extracción de RNA	140
6.3	Evaluación de los cebadores diseñados para qPCR	141
6.3.1	Síntesis de cDNA	141
6.3.2	PCR estándar	142
6.3.3	Gel de DNA	144
7.	PCR CUANTITATIVA	144
8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	145
<b>III.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	147
1.	INFLUENCIA DE LOS SUBCULTIVOS CELULARES EN hMSC	147
1.1	Proliferación celular	147
1.2	Mineralización	149
1.3	Efecto de rhBMP-2	150
2.	DIFERENCIACIÓN Y MINERALIZACIÓN EN RESPUESTA A rhBMP-2 Y MEDIO DE DIFERENCIACIÓN ÓSEO	153
2.1	Expresión de marcadores óseos bajo el efecto de rhBMP-2	153
2.2	Efecto sobre la mineralización del tratamiento de rhBMP-2 y Medio de diferenciación óseo	157
2.3	Evaluación de la inducción de la mineralización de hMSC	161
3.	EVALUACIÓN DE LA DESDIFERENCIACIÓN TRAS EL TRATAMIENTO CON rhBMP-2	164
3.1.	Desdiferenciación en hMSC	164
3.2.	Desdiferenciación en un modelo ectópico	168
<b>IV.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	173

✧ <b><u>CAPÍTULO 3: APLICACIÓN CLÍNICA DE rhBMP-2</u></b>	175
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	177
1. POLÍMEROS NATURALES	179
2. POLÍMEROS SINTÉTICOS	180
3. MATERIALES INORGÁNICOS	181
4. OBJETIVO PARCIAL: APLICACIÓN CLÍNICA DE rhBMP-2	183
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	185
1. FABRICACIÓN “SCAFFOLDS”	185
2. INCORPORACIÓN DE rhBMP-2 A LAS CERÁMICAS	186
3. CARACTERIZACIÓN DE LAS CERÁMICAS	186
3.1. Tomografía microcomputarizada ( $\mu$ -CT)	186
3.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	187
4. ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD DE LAS CERÁMICAS <i>IN VITRO</i>	187
4.1. Estudio de la morfología celular	187
4.2. Ensayo de viabilidad celular	188
4.3. Ensayo de proliferación celular	188
5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i> DE rhBMP-2 INCORPORADA EN LAS CERÁMICAS	189
6. ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	189
6.1. Experimentación en modelo de conejo	190
6.2. Experimentación en modelo de cerdo	190
6.3. Evaluación histológica	191
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	192
<b>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	193
1. MORFOLOGÍA DE LOS SOPORTES CERÁMICOS	193
2. ENSAYOS <i>IN VITRO</i> DE BIOCOMPATIBILIDAD	194
3. ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DE ACTIVIDAD TRAS LA INCORPORACIÓN DE rhBMP-2	198
4. ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	200
4.1. Modelo de implantación en músculo de conejo	200
4.2. Modelo de implantación en hueso de conejo	201
4.3. Modelo de implantación en maxilar de cerdo	204
<b>IV. CONCLUSIONES</b>	209

✧ <b>BIBLIOGRAFÍA</b>	211
✧ <b>ANEXO I</b>	247
✧ <b>PRODUCTIVIDAD</b>	253

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología del hueso.	28
Figura 2. Representación de los distintos tipos de células óseas y la interacción entre ellas.	33
Figura 3. Secuencia de las fases del remodelado óseo.	34
Figura 4. Etapas de la reparación de una fractura ósea.	36
Figura 5. Diagrama del “cysteine-knot”.	41
Figura 6. Esquema de la ruta de señalización celular de la BMP-2.	43
Figura 7. Esquema del procesamiento de la BMP-2 y su secuencia de aminoácidos.	46
Figura 8. Estructura de la BMP-2.	48
Figura 9. A) Radiografía de implantes dentales colocados en tibia de conejo B) Reconstrucción tridimensional de uno de los implantes activados.	53
Figura 10: Esquema de tipos de cromatografía para la purificación de la proteína de interés desde los cuerpos de inclusión.	62
Figura 11. Modelo simplificado del plegamiento correcto de una proteína contra la agregación.	66
Figura 12. Topografía de plegamiento de la BMP-2 cristalizada.	68
Figura 13: Mapa de restricción del vector B.S. (SK-).	73
Figura 14: Representación del mapa de restricción de la construcción pT7.7-BMP-2.	74
Figura 15. Representación del gen de BMP-2.	74
Figura 16. Representación de la inducción de expresión del gen de BMP-2 mediante IPTG.	75
Figura 17. Ejemplo fotografía de electroforesis de agarosa.	77
Figura 18. Gel SDS-PAGE 15% del contenido total de proteínas celulares del cultivo de <i>E.coli</i> con y sin inducir con IPTG.	78
Figura 19. Ejemplo de recta patrón con cantidades conocidas de IgG correspondiente al ensayo de MicroBradford.	86
Figura 20. Esquema del proceso de producción de rhBMP-2 en <i>E.coli</i> .	90
Figura 21. Perfiles cromatográficos (A) y geles de SDS-Page (B) de los procesos de separación por cromatografía.	92

Figura 22. Gel SDS-Page de los distintos plegamientos realizados con cada una de las fracciones obtenidas en el proceso de cromatografía.	95
Figura 23. Espectro UV-Visible de cada uno de los plegamientos realizados con las distintas fracciones de proteína.	96
Figura 24. Gel de SDS-Page de los plegamientos realizados a distintos días.	97
Figura 25. Gráficos obtenidos mediante el programa <i>Image J</i> de cada uno de los carilles del gel de SDS-Page de la figura 24.	98
Figura 26. Representación de las proporciones de dímero y monómero presentes en cada uno de los plegamientos realizados.	99
Figura 27. Proceso de purificación final de la muestra de 14 días de plegamiento.	100
Figura 28. Representación y datos de los porcentajes exactos de cada una de las formas de rhBMP-2 presentes en los plegamientos a distintos días.	101
Figura 29. Gel de SDS-Page de las muestras dializadas empleadas en el ensayo celular.	103
Figura 30. Ensayo de actividad FA/Bradford de C2C12 bajo el tratamiento de las muestras sometidas al proceso de plegamiento durante distintos días.	104
Figura 31. Ensayo de actividad FA/Bradford de C2C12 bajo el tratamiento del monómero de rhBMP-2 frente al dímero.	105
Figura 32. A. Gel de SDS-Page. B. Espectro de absorción UV-Visible.	106
Figura 33. Esquema del rendimiento obtenido en las distintas etapas del proceso de producción de rhBMP-2.	107
Figura 34. Datos de la actividad FA/Bradford de C2C12 con distintas dosis de rhBMP-2 antes y después de someterla al proceso de liofilización.	109
Figura 35. Datos de la actividad FA/Bradford de C2C12 con distintas dosis de rhBMP-2 almacenada en diferentes condiciones durante 6 meses.	110
Figura 36. Datos de la actividad FA/Bradford de C2C12 con distintas dosis de rhBMP-2 almacenada en diferentes condiciones durante 1 año.	111
Figura 37. Datos del ensayo de actividad FA/Bradford de distintos tipos celulares bajo el tratamiento de 1 µg de rhBMP-2.	113
Figura 38. Datos de la actividad FA/Bradford inducida bajo el tratamiento de rhBMP-2 de dos líneas celulares.	114
Figura 39. Secuencia aminoacídica del precursor de BMP-2.	115
Figura 40. Secuencia aminoacídica de la forma madura de rhBMP-2.	116

Figura 41. Análisis mediante gel de SDS-Page de las muestras obtenidas tras los tratamientos de proteólisis del dímero de rhBMP-2.	117
Figura 42. Gel SDS-Page de las muestras obtenidas tras los tratamientos de proteólisis del monómero de la rhBMP-2.	117
Figura 43. Análisis mediante cromatografía de afinidad y gel de SDS-Page de las muestras obtenidas tras la proteólisis del dímero de rhBMP-2.	119
Figura 44. Datos de la actividad FA/Bradford inducida en C2C12 bajo el tratamiento de rhBMP-2 control y rhBMP-2 lisada.	120
Figura 45. Ensayo de actividad FA/Bradford del efecto, en hMSC, de 10 µg de rhBMP-2 control y sometida a proteólisis.	121
Figura 46. Proceso mesengénico. Diagrama de la capacidad de diferenciación de las MSC.	127
Figura 47. Relación regulatoria entre Dlx5, Runx2 y Osx en la inducción de osteogénesis por BMP-2.	131
Figura 48. Modelo de la diferenciación osteogénica inducida por BMP en células madre mesenquimales.	134
Figura 49. Chequeo de la integridad y pureza del RNA mediante electroforesis (RNA 6000 NanoChips, Agilent 2100 Bioanalyzer).	141
Figura 50. Expresión relativa de β-Actina y RPLP0 en un estudio de seis réplicas biológicas.	145
Figura 51. Ensayos de proliferación celular de hMSC.	148
Figura 52. Morfología y mineralización de hMSC a pase corto (pase 3) y pase largo (pase 10).	150
Figura 53. Proliferación celular de hMSC tratadas con rhBMP-2 en distintos subcultivos.	151
Figura 54. Datos de actividad FA de hMSC tratadas con rhBMP-2 en distintos subcultivos.	152
Figura 55. Ensayo de actividad FA/Bradford de células hMSC control y células tratadas durante 28 días con rhBMP-2.	154
Figura 56. Expresión relativa de Runx2, Osteopontina, Fibromodulina y Osteonectina a distintos días durante el tratamiento o no de hMSC con rhBMP-2.	155
Figura 57. Morfología celular de hMSC sometidas a distintos tratamientos durante 7, 14 y 21 días.	158
Figura 58. Tinción de Alizarín Red de hMSC sometidas a distintos tratamientos durante 7, 14 y 21 días.	159

Figura 59. Tinción de Alizarín Red de hMSC sometidas a distintos tratamientos durante 21 días.	162
Figura 60. Modelo de la diferenciación hacia el linaje osteoblástico desde células madre.	163
Figura 61. Esquema explicativo del ensayo de desdiferenciación.	165
Figura 62. Expresión relativa de Runx2, Osteopontina y Fibromodulina a distintos días y distintos tratamientos de hMSC con rhBMP-2.	167
Figura 63. Expresión relativa de varios genes a distintos días en células C2C12 control y tratadas con rhBMP-2.	169
Figura 64. Expresión relativa de varios genes a distintos días y distintos tratamientos en células C2C12.	171
Figura 65. Esquema del proceso de fabricación de cerámicas por el método de robocasting.	185
Figura 66. Estructura de la sal de tetrazolio y el producto de formazán.	188
Figura 67. Estructura de los compuestos presentes en la reacción del ensayo de Alamar Blue.	189
Figura 68. Radiografía del maxilar del cerdo.	191
Figura 69. Cerámicas fabricadas por SFF.	193
Figura 70. Imágenes de SEM.	195
Figura 71. Imagen de microscopio confocal de la cerámica sembrada con células.	195
Figura 72. Ensayos de viabilidad celular.	196
Figura 73. A) Representación esquemática de la cerámica de SFF. B) Histología del corte de la cerámica.	197
Figura 74. Ensayos colorimétricos de cuantificación celular.	198
Figura 75. Ensayo de actividad fosfatasa alcalina.	199
Figura 76. Implantación de cerámicas en músculo de conejo.	201
Figura 77. Implantación de cerámicas en hueso de conejo.	203
Figura 78. Imágenes del procedimiento quirúrgico realizado en cerdo.	204
Figura 79. Implantación de cerámicas fabricadas por robocasting en el maxilar superior de cerdo.	205
Figura 80. Implantación de cerámicas Bio-Oss® en el maxilar superior de cerdo.	205

Figura 81. Resultados de la implantación de cerámicas en defectos en el maxilar superior de cerdo.	206
Figura 82. Datos del modelo de implantación de cerámicas en maxilar en cerdos.	207

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas de la sustancia osteoide.	30
Tabla 2. Miembros de la familia de las BMPs y su principal función fisiológica.	40
Tabla 3. Ventajas e inconvenientes de la producción de proteínas en los distintos compartimentos celulares de <i>Escherichia coli</i> .	58
Tabla 4. Genotipo/Fenotipo de las cepas bacterianas empleadas.	71
Tabla 5. Cebadores empleados para la obtención de la secuencia de rhBMP-2 madura a partir de placenta humana.	73
Tabla 6. Tabla indicativa de los sitios de corte de cada enzima.	76
Tabla 7. Valores obtenidos en diferentes procesos de producción de rhBMP-2.	93
Tabla 8. Listado de cebadores para hMCS empleados en los ensayos de expresión.	142
Tabla 9. Listado de cebadores para la línea celular C2C12 empleados en los ensayos de expresión.	143
Tabla 10. Materiales empleados para la preparación de soportes en ingeniería de tejidos.	179

## ABREVIATURAS

$\mu$ -CT	Microtomografía computarizada (del inglés <i>microcomputerized tomography</i> )
$\beta$ -G	$\beta$ -Glicerofosfato
$\beta$ -TCP	Fosfato $\beta$ -tricálcico (del inglés <i>beta tricalcium phosphate</i> )
A	Absorbancia
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
A.U.	Unidades de Absorbancia
Asc	Ácido ascórbico
BMPs	Proteínas morfogenéticas óseas (del inglés <i>Bone Morphogenetic Proteins</i> )
cDNA	DNA complementario
Ct	Ciclo umbral (del inglés <i>cycle threshold</i> )
D.O.	Densidad óptica
Dex	Dexametasona
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Et-H	Etidio homodímero
FA	Fosfatasa alcalina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HAP	Hidroxiapatita
hMSC	Células madre mesenquimales humanas (del inglés <i>Human Mesenchymal Stem Cell</i> )
IgG	Inmunoglobulina G
IH	Interacción hidrofóbica
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-tiogalactorpiranosido
LB	<i>Luria Bertani</i> (medio de cultivo)
MSCBM	<i>Mesenchymal Stem Cell Basal Medium</i>
MTS	Sal de tetrazolio (del inglés <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphenyl) 2H-tetrazolium</i> )
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (del inglés <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> )
NaCl	Cloruro sódico

PBS	Tampón fosfato salino (del inglés <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>polymerase chain reaction</i> )
RT-qPCR	PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (del inglés <i>reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i> )
rhBMP-2	Proteína morfogenética ósea 2 recombinante humana (del inglés <i>recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2</i> )
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero
SDS	Dodecil sulfato sódico
SEM	Microscopía electrónica de barrido (del inglés <i>Scanning Electron Microscopy</i> )
SFF	Del inglés <i>Solid Free Form</i>
SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Sulfato amónico
TB	<i>Terrific Broth</i> (medio de cultivo)
TBE	Tris-Borato-EDTA
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta (del inglés <i>transforming growth factor beta</i> )
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

## **BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 2 (rhBMP-2): PRODUCTION AND EVALUATION OF ITS OSTOINDUCTIVE ACTIVITY *IN VITRO* AND *IN VIVO***

### **INTRODUCTION**

The requirement for new bone to replace or restore the function of traumatized, damaged, or lost bone is a major clinical and socioeconomic need. Bone regeneration is a complex, well-orchestrated physiological process of bone formation which can be seen during normal fracture healing, and is involved in continuous remodeling throughout adult life. However, there are complex clinical conditions in which bone regeneration is required in large quantity. Bone tissue engineering has been heralded as the alternative strategy to regenerate bone providing “living” constructs that possess the potential to integrate with the surrounding native tissue. In essence, the discipline aims to combine progenitor or mature cells with biocompatible materials or scaffolds, with or without appropriate growth factors, to initiate repair and regeneration (Dimitriou et al. 2011).

Growth factors are cytokines that are secreted by many cell types and act as signaling molecules. They promote and/or prevent cell adhesion, proliferation, migration and differentiation by up-regulating or down-regulating the synthesis of proteins, growth factors and receptors. Major players in the skeletal tissue engineering are members of the TGF $\beta$  superfamily notably the bone morphogenetic proteins (BMPs). Although initially detected by their ability to direct ectopic bone formation, BMPs are now known to be involved in so many developmental processes (Urist 1965, Bragdon et al. 2011). There are more than 20 members known that can be subgrouped according to the homology in their sequence. Among all, BMP-2 is the most widely used growth factor to stimulate osteogenesis (Rosen 2009). Native BMP-2 is a homodimeric protein with 114-residue each subunits. It has six cysteines to form intrapolypeptide disulfide bonds and one cysteine to form an interchain disulfide bridge connecting the two monomers to form a dimer (Celeste et al. 1990). BMP-2 has been isolated directly from bones with low yields and a complicated purification scheme. Cloning and genetic engineering tools allow rhBMP-2 be produced from mammalian cell cultures and from virus infected insect cells. However, the best choice in terms of yield is to produce the rhBMP-2 in *Escherichia coli* (*E.coli*).

Clinically, bone morphogenetic proteins have demonstrated the potential to replace the use of autogenous bone in many applications so rhBMP-2 has been approved by the FDA in 2002 for spinal fusion, repair of long bone fracture and non-unions, and periodontal therapy (Lo et al. 2012). However, the widespread therapeutic use of BMPs has been hindered by difficulties in obtaining large quantities of pure, biologically active BMP-2 at a cost-effective price.

## **OBJECTIVES**

The first aim of the present work is to enhance the process for the production of active recombinant BMP-2 in *E.coli* system.

The second objective is demonstrating the biological activity and osteoinductive properties of the rhBMP2 produced using the improved protocol.

The third objective is providing a potential clinical application to produced rhBMP2. The proposed application based on a ceramic scaffold carrier for hBMP-2 and in vivo testing of the implants in different animal models.

## **MATERIALS AND METHODS**

rhBMP-2 was produced in *E.coli* cells based on previous protocols. Briefly, the procedure is based on the following steps: production of rhBMP-2 inclusion bodies in *E. coli*; purification of inclusion bodies by chromatography techniques; denaturalization; refolding; and a second purification by chromatography. The process was modified in two of these steps: purification of inclusion bodies and refolding time of the protein. Moreover, intermediate waste compound was refolded to achieve higher performance. Additionally, rhBMP-2 lacking its N-terminal was obtained by a process of enzymatic proteolysis.

The biological activity of rhBMP-2 was tested by the induction of alkaline phosphatase activity in myoblastic cells (C2C12), osteoblastic cells (UMR 106, Ros 17/2.8) and human mesenchymal stem cells (hMSC). Different rhBMP2 treatment regimens were performed on hMSCs and then osteogenic markers were studied by RT-qPCR. Additionally, the mineralization of hMSC with rhBMP-2 or Osteogenic Differentiation medium was evaluated by Alizarin Red staining.

*In vivo* experiments were performed with ceramic scaffolds activated with rhBMP-2. The preparation of the scaffolds by solid free form (SFF) fabrication methods was developed by Miranda et al. (Miranda et al. 2006). Firstly, the morphology and biocompatibility of these scaffolds was evaluated by microcomputed tomography ( $\mu$ CT), microscopic techniques (Scanning Electronic Microscopy (SEM) and Confocal Microscopy) and colorimetric assay (MTS, Alamar Blue). *In vitro* activity of the scaffold-adsorbed rhBMP-2 was quantified through the colorimetric alkaline phosphatase assay. *In vivo* studies were performed in New Zealand male rabbits (muscle implantation and bone implantation procedures) and in pig (bone implantation procedure). Samples were harvested and evaluated by histological technics and by  $\mu$ CT.

**RESULTS AND DISCUSSION**

The process of rhBMP-2 production was improved by modifications in several steps. First, due to an improved purification of dimeric fraction from inclusion bodies, the new protocol here reported is able to increase in 10% the yield in refolding process. This results showed that protein refolding in the presence of impurities may result in decreased yields. Second, optimal refolding time was determined by SDS-Page and cellular assays. Results indicated that 14 days is the optimal time in which the greater amount of biologically active protein is obtained. These studies increase the yield on this process in 10% compared to previous protocol. On the other hand, intermediate compounds such as protein monomer or aggregates were not refolding successfully. In summary, these improvements in rhBMP2 production process allow an increase in the yield thereby decreasing the time and cost of an entire production batch.

The biological activity of rhBMP-2 was tested by induction of alkaline phosphatase activity in several cell lines. The produced rhBMP-2 induced osteogenic differentiation in mioblastic, osteoblastic and hMSCs.

rhBMP-2 lacking its N-terminal was obtained by enzymatic digestion from mature rhBMP-2 and thus the loss of heparin-binding site was induced. Cells treated with this protein showed greater alkaline phosphatase activity than those treated with mature rhBMP-2. These results suggested that the N-terminal reduces the specific activity of BMP-2, probably by interacting with heparinic sites in the extracellular matrix (Ruppert, Hoffmann & Sebald 1996).

The relative expression of four important bone-related genes was investigated during 28 days of hMSC with rhBMP-2. The expression of osteopontin presented a peak on day 7 and fibromodulin on day 21 compared with hMSC without treatment. This result indicated the capacity of rhBMP-2 to induce expression of osteogenic differentiation markers. However, Alizarin Red assay showed that rhBMP-2 was not enough for inducing matrix mineralization on hMSC. Dexamethasone and  $\beta$ -glycerophosphate were needed to achieve formation of calcified extracellular matrix. In addition, there was a synergistic effect on calcium deposition due to the combined treatment of dexamethasone and rhBMP-2 (Kim et al. 2008, Park 2012).

To determine whether the effects of rhBMP-2 on the muscle cells and hMSC differentiation are heritable, RT-qPCR assay was performed after cultivating both cell lines with rhBMP-2 and removing treatment. A fast reduction of osteogenic differentiation markers expression was observed. Results suggested that release controlled protein is needed to maintain osteoinductive effect of rhBMP-2.

Experiments related with the clinical applicability of rhBMP-2 were performed using SFF ceramic scaffolds. SEM and confocal microscopy permitted the visualization of a fully cell-covered scaffold surface after the seeding of C2C12 cells on them and a 7 day culture-period. Moreover, cell migration into the inner surface of the scaffold was observed. Alkaline phosphatase activity of C2C12 cells cultured on this kind of rhBMP2 activated scaffolds indicated a strong *in vitro* cell differentiation towards osteoblastic lineage. These results showed that scaffolds are adequate for cell attachment, proliferation and colonization of entire structure, thereby confirming that these SFF-designed materials have appropriate biological properties.

*In vivo* histological results on rabbit ectopic models showed bone formation inside the scaffold with generation of fatty marrow spaces. On the other hand, in defects created directly in rabbit bone tissue, a high amount of new bone onto and around the implanted material was observed. In addition,  $\mu$ CT and histological results on pig bone implants indicated that tested SFF scaffold had similar osteoconductive properties to an already clinically available material (Bio-Oss) and showed similar osteoinduction due to rhBMP-2 activation (Abarrategi et al. 2012).

## CONCLUSION

This work demonstrates that it is possible to produce biologically active rhBMP-2 by its expression in *E.coli* cells with increased yield and decreased costs over other expression systems. rhBMP-2 induces the expression of bone markers in several cells while rhBMP-2 alone is insufficient for the induction of *in vitro* matrix mineralization in hMSC. This weak effect of rhBMP-2 on *in vitro* matrix mineralization may not accurately represent the situation *in vivo*, as bone-inducing capacity of rhBMP-2 is broadly demonstrated in this study. Finally, scaffolds-adsorbed rhBMP-2 show excellent osteoinductive and osteoconductive properties *in vivo*, providing a potential clinical application of produced rhBMP-2.

## REFERENCES

Abarrategi, A., Moreno-Vicente, C., Martínez-Vázquez, F.J., Civantos, A., Ramos, V., Sanz-Casado, J.V., Martínez-Corriá, R., Perera, F.H., Mulero, F. & Miranda, P. 2012, "Biological properties of solid free form designed ceramic scaffolds with BMP-2: in vitro and in vivo evaluation", *PloS one*, vol. 7, no. 3, pp. e34117.

Bragdon, B., Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J. & Nohe, A. 2011, "Bone morphogenetic proteins: a critical review", *Cellular signalling*, vol. 23, no. 4, pp. 609-620.

Celeste, A.J., Iannazzi, J.A., Taylor, R.C., Hewick, R.M., Rosen, V., Wang, E.A. & Wozney, J.M. 1990, "Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 87, no. 24, pp. 9843-9847.

Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D. & Giannoudis, P.V. 2011, "Bone regeneration: current concepts and future directions", *BMC medicine*, vol. 9, pp. 66-7015-9-66.

Kim, I.S., Song, Y.M., Cho, T.H., Park, Y.D., Lee, K.B., Noh, I., Weber, F. & Hwang, S.J. 2008, "In vitro response of primary human bone marrow stromal cells to recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the early and late stages of osteoblast differentiation", *Development, growth & differentiation*, vol. 50, no. 7, pp. 553-564.

Lo, K.W., Ulery, B.D., Ashe, K.M. & Laurencin, C.T. 2012, "Studies of bone morphogenetic protein-based surgical repair", *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, no. 12, pp. 1277-1291.

Miranda, P., Saiz, E., Gryn, K. & Tomsia, A.P. 2006, "Sintering and robocasting of  $\beta$ -tricalcium phosphate scaffolds for orthopaedic applications", *Acta Biomaterialia*, vol. 2, no. 4, pp. 457-466.

Park, J. 2012, "The effects of dexamethasone, ascorbic acid, and  $\beta$ -glycerophosphate on osteoblastic differentiation by regulating estrogen receptor and osteopontin expression", *Journal of Surgical Research*, vol. 173, no. 1, pp. 99-104.

Rosen, V. 2009, "BMP2 signaling in bone development and repair", *Cytokine & growth factor reviews*, vol. 20, no. 5, pp. 475-480.

Ruppert, R., Hoffmann, E. & Sebald, W. 1996, "Human Bone Morphogenetic Protein 2 Contains a Heparin-Binding Site which Modifies Its Biological Activity", *European Journal of Biochemistry*, vol. 237, no. 1, pp. 295-302.

Urist, M.R. 1965, "Bone: formation by autoinduction", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 150, no. 3698, pp. 893-899.



## ✧ *Introducción*

---



## 1. REGENERACIÓN ÓSEA

La reparación de lesiones óseas es un problema al que se enfrenta a diario la cirugía traumatológica y maxilofacial. Las opciones para su tratamiento son limitadas, dependiendo en gran medida de la naturaleza y localización de la lesión a reparar. Se han conseguido avances notables en aquellos casos donde es posible el uso de métodos osteoconductores basados en el empleo de prótesis sustitutorias de la región afectada. Un gran número de lesiones, sin embargo, no permite este tipo de solución quirúrgica, como ocurre en los casos de grandes defectos óseos encontrados, por ejemplo, en la cirugía oncológica, o incluso en el caso de pequeñas lesiones o defectos óseos o cartilagosos (Habal 1992).

Los problemas mencionados plantean la necesidad de desarrollar diferentes sistemas de regeneración y reparación de defectos óseos, respetando la anatomía original y recuperando al mismo tiempo el máximo de funcionalidad. Algunas de las técnicas utilizadas para la regeneración ósea abarcan la utilización de injertos de origen animal o humano. Por ello se pueden definir tres tipos de injertos:

- **Autoinjertos:** se refiere a un trasplante de tejido dentro del mismo individuo. Las mayores tasas de éxito dentro del área de los injertos óseos se han alcanzado con los autoinjertos debido a sus propiedades osteoconductivas, osteoinductivas y osteogénicas. Osteoconductivas, porque proveen una matriz en la cual las células óseas pueden proliferar. Osteoinductivas, porque proveen factores esenciales que inducen la proliferación de células indiferenciadas y su diferenciación a osteoblastos (es decir, el cambio de fenotipo de un estado primitivo a otro tipo de células que cumplan funciones especializadas). Osteogénicas, dado que son un depósito de células que tienen la capacidad de formar hueso nuevo. Además, no provocan reacción de tipo inmunológico o de rechazo al pertenecer al mismo individuo. La mayor desventaja que presenta esta técnica es que el procedimiento para la extracción del tejido a injertar, requiere de intervenciones quirúrgicas bastantes complejas y costosas, sumado a que en muchos casos no es posible su uso debido, ante todo, a la cantidad limitada de tejido que puede ser tomada.
- **Alloinjertos:** se refiere a un trasplante de tejidos u órganos entre individuos de la misma especie. En el caso de injertos óseos, se suelen utilizar tejidos de donantes que hayan fallecido recientemente. Este tipo de injerto es acelular y presenta

resultados mucho peores que en el caso de los autoinjertos, ya que su tasa de incorporación es menor debido a la ausencia de células osteoprogenitoras. La mayoría de los aloinjertos se realizan para la reconstrucción de defectos óseos provocados por una lesión o trauma o por extirpación de un tumor. Antes de ser implantados estos tejidos deben ser sometidos a una serie de tratamientos con el fin de evitar reacciones inmunológicas o la contaminación cruzada debida a cualquier enfermedad alojada en el tejido a implantar. Además la disponibilidad de un donante sigue siendo un gran obstáculo para el empleo de dicha técnica.

- **Xenoinjertos:** referido al trasplante de tejidos entre dos especies diferentes. Su uso se encuentra prácticamente limitado al relleno de orificios óseos, como material inorgánico, más que a la consecución de estructuras definidas. Este tipo de injertos presentan una gran limitación debida al riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas.

Los problemas planteados de disponibilidad de tejido y/o rechazo del mismo por parte del paciente son comunes a cualquier tipo de cirugía sustitutoria. Debido a ello se comenzó a desarrollar el término de **Ingeniería de Tejidos**.

La Ingeniería de tejidos es un campo de investigación emergente multidisciplinar. El objetivo de esta ciencia es reparar, reemplazar, mantener o mejorar la función particular de un órgano o tejido. Su fundamento esencial es el uso de células vivas que se multiplican en matrices extracelulares de distinta naturaleza, creando sustitutos biológicos para su consecuente implantación en el cuerpo (Ashammakhi N. 2003, Falke, Atala 2000).

El papel de la Ingeniería de Tejidos en este contexto supone un nuevo paso adelante en la evolución de los tratamientos sustitutorios. No se trata tanto de reparar, sino de regenerar, de estimular mecanismos ya presentes de forma natural en el organismo. Con este fin, se propone estudiar la estructura o función dañada y tratar de dar una respuesta clínicamente aplicable, recopilando para ello los conocimientos disponibles en las diferentes ramas de la ciencia (Rose, Oreffo 2002).

## 2. TEJIDO ÓSEO

Desde un punto de vista histológico, el hueso es un tejido conectivo especializado que se caracteriza por presentar una matriz extracelular mineralizada que le confiere rigidez y fuerza al tiempo que conserva cierta elasticidad. En conjunto, el cartílago y el hueso forman el sistema esquelético.

El tejido óseo es el único tejido capaz de repararse a sí mismo de manera completa por medio de la reactivación de los procesos que tienen lugar durante la embriogénesis. De esta manera, cuando aparece una lesión ósea, se ponen en marcha de inmediato los mecanismos osteoformadores con la finalidad de restaurar el tejido óseo en el lugar de la lesión.

Tiene tres funciones principales: mecánica (soporta el cuerpo y es zona de unión de la musculatura); protectora (de los órganos vitales y la médula ósea); y metabólica (como reserva de iones, especialmente calcio y fosfato) (Baron 2003).

### 2.1. Morfología del hueso

Desde un punto de vista anatómico, en el esqueleto se pueden distinguir dos tipos de hueso: los **huesos planos** (como los huesos craneales, la escápula, la mandíbula, el ilion, etc.) y los **huesos largos** (como la tibia, el fémur, el húmero, etc.). La estructura del hueso puede analizarse considerando las partes de un hueso largo (figura 1):

- **diáfisis**, porción principal del hueso.
- **epífisis**, extremos del hueso
- **metáfisis** constituye la región de un hueso maduro donde se unen la epífisis y la diáfisis. En un hueso en crecimiento es la región donde se encuentra la placa epifisaria, en la que el cartílago es sustituido por el hueso.

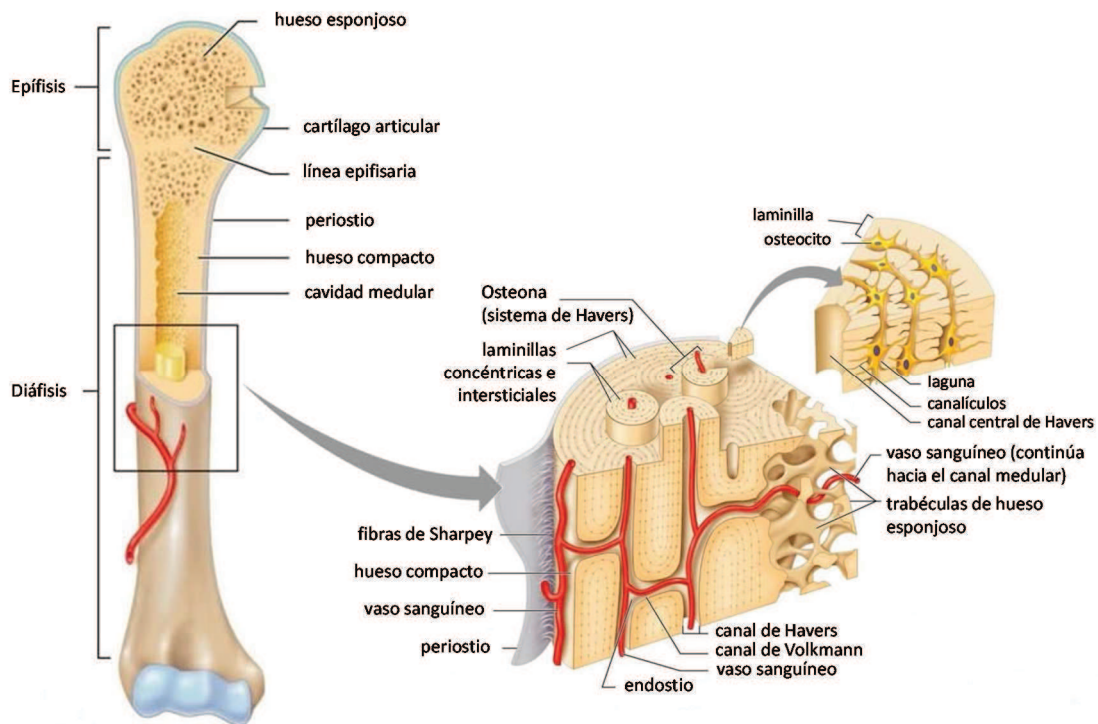
- **cartílago articular**, fina capa de cartílago hialino que recubre la epífisis en las zonas de articulación.

- **periostio**, membrana que rodea la superficie del hueso sin cubrir al cartílago articular. Está formada por dos capas, la capa fibrosa externa que contiene los vasos sanguíneos, linfáticos y nervios que irrigan al hueso y la capa osteogénica que contiene fibras elásticas, vasos sanguíneos y varios tipos de células óseas. El periostio es esencial para el crecimiento en diámetro, la reparación y la nutrición del hueso.

- **cavidad medular o médula**, es el espacio interior de la diáfisis que contiene la **médula ósea amarilla** en los huesos del estado adulto (formada fundamentalmente por células adiposas y algunas células sanguíneas diseminadas).

- **endostio**, membrana que recubre la cavidad medular y que contiene células osteoprogenitoras.

El esqueleto del individuo adulto está formado por **hueso cortical o compacto** que es el principal responsable de la integridad mecánica (80% del volumen total del hueso) y por **hueso trabecular o esponjoso** que es el responsable fundamental de las demandas metabólicas (20% del volumen total del hueso). Dependerá de la forma en que estén organizadas su matriz y sus células ya que la diferencia fundamental entre ellos es que el hueso compacto adulto tiene una estructura en anillos concéntricos, mientras que el hueso esponjoso aparece con un encaje irregular (Robling, Castillo & Turner 2006, Allori, Sillon & Warren 2008).



**Figura 1. Morfología del hueso.** Imagen de hueso largo e imagen ampliada de varias osteonas (sistemas de Havers) del hueso compacto (Adaptado de la referencia (Marieb, Hoehn 2007)).

El tejido óseo compacto forma parte de la capa externa de todos los huesos del esqueleto y la mayor parte de la diáfisis de los huesos largo. Está constituido por una unidad básica llamada **osteona (sistema de Havers)**, la cual está formada por:

- laminillas, anillos concéntricos de matriz compuestos por sales minerales, que proporcionan al hueso dureza, y fibras de colágeno, que le confieren resistencia.

- lagunas o pequeños espacios entre las laminillas que contienen las células óseas maduras llamadas **osteocitos**.

- canalículos que se proyectan desde las lagunas y proporcionan numerosas vías por las que los elementos nutritivos pueden alcanzar a los osteocitos y a su vez eliminar los residuos de la actividad celular.

- un canal central llamado **canal de Havers** que contiene los vasos sanguíneos, linfáticos y los nervios.

A su vez los canales Haversianos están conectados entre sí por otros canales llamados **canales de Volkmann**. Las áreas comprendidas entre las osteonas contienen laminillas intersticiales. Éstas son fragmentos de osteonas antiguas que han sido parcialmente destruidas durante el proceso de sustitución ósea.

Al contrario que el hueso compacto, el esponjoso no contiene verdaderas osteonas. Está formado por laminillas dispuestas irregularmente de finas placas de hueso llamadas **trabéculas**. Los espacios entre las trabéculas de algunos huesos están ocupados por la **médula ósea roja** productora de células sanguíneas. En el interior de las trabéculas existen osteocitos, situados en lagunas de las que parten conductillos radiales. Los osteocitos de las trabéculas reciben su nutrición directamente de la sangre que circula por las cavidades medulares (figura 1).

El hueso esponjoso constituye la mayor parte del tejido óseo de los huesos cortos, planos y de forma irregular, y de la epífisis de los huesos largos (Tortora, Derrickson 2013).

Además de esta diferenciación debida a su estructura tridimensional entre hueso cortical y trabecular, el tejido óseo se puede clasificar dependiendo del grado de madurez en fibrilar y laminar. El **hueso fibrilar** está considerado como un hueso inmaduro o primitivo y normalmente se encuentra en los embriones y recién nacidos, en los callos formados en el período de remodelación después de una fractura y en la región de la metáfisis de los huesos en crecimiento. Este tipo de huesos tiene fibras gruesas que no están orientadas uniformemente, tiene más células por unidad de volumen que el hueso laminar, su contenido mineral varía y las células están dispersas al azar. Sin embargo, el hueso laminar es más maduro que el fibrilar y se forma a partir del proceso de remodelación del hueso inmaduro. Es por esto por lo que se empieza a formar un mes después del nacimiento y se encuentra a lo largo del esqueleto maduro tanto en el hueso esponjoso como en el

cortical. A diferencia que en el hueso fibrilar, las fibras de colágeno están altamente organizadas y orientadas.

### 2.2. Histología del hueso

El tejido óseo contiene una abundante matriz que rodea a células ampliamente separadas unas de otras. La **matriz ósea** es la responsable de las propiedades biomecánicas del hueso y se encuentra mineralizada. Está formada aproximadamente por un 20% de agua, un 50% de sales minerales y un 30% de matriz orgánica. Dicha matriz orgánica o **sustancia osteoide** está compuesta principalmente por proteínas entre las que destaca el colágeno tipo I (un 90% de las proteínas totales) (tabla 1). La fase mineral está formada por calcio, fosfato y carbonato en forma de cristales de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) entre las fibras de colágeno. En menor proporción también se encuentran el magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor. Las fibras de colágeno proporcionan flexibilidad y resistencia a la tensión mientras que las sales minerales confieren dureza, rigidez y resistencia a la compresión.

**Tabla 1. Proteínas de la sustancia osteoide (Fernández-Tresguerres Hernández-Gil et al. 2006).**

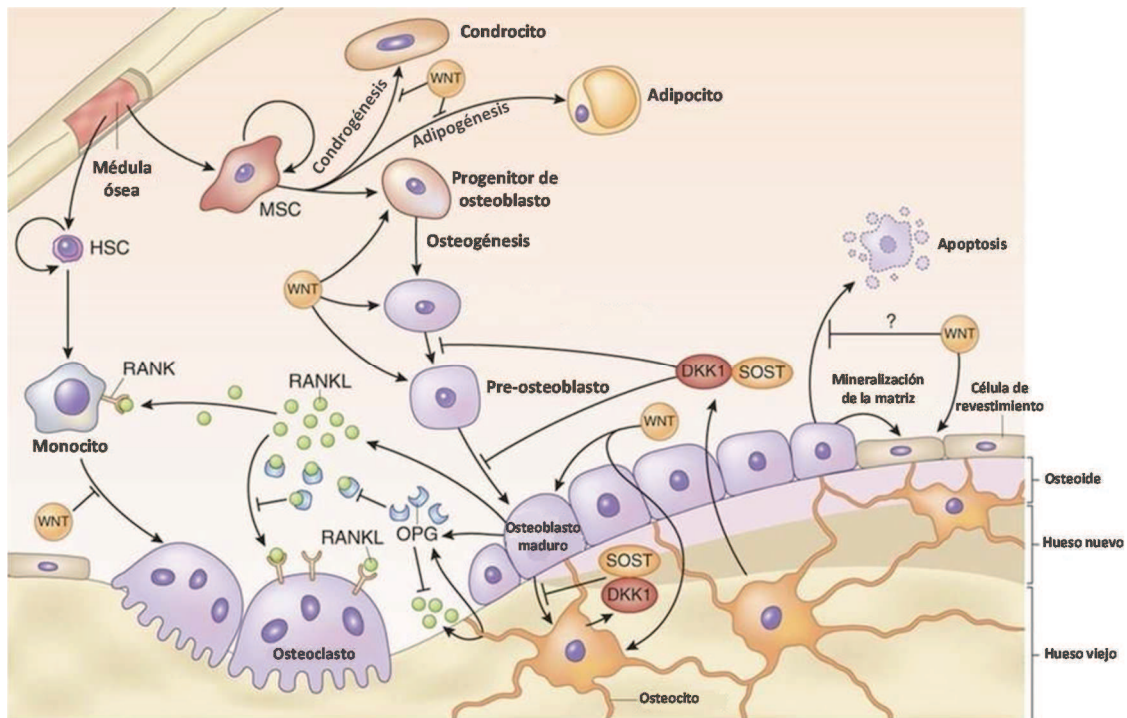
<b>COLÁGENO</b>	Tipo I, III, V, XII	
<b>PROTEOGLICANOS</b>	condroitin sulfato	decorina
	biglicano	hialuronano
<b>PROTEÍNAS CON ÁCIDO <math>\gamma</math>-CARBOXI-GLUTÁMICO</b>	osteocalcina proteína de la matriz con ácido $\gamma$ -carboxi-glutámico	
<b>GLICOPROTEÍNAS</b>	osteonectina / fosfatasa alcalina / fibronectina / osteopontina / vitronectina / sialoproteínas óseas	
<b>PROTEÍNAS DEL PLASMA</b>	albúmina	$\alpha$ 2-SH-glicoproteína
<b>FACTORES DE CRECIMIENTO</b>	IGF-I y II (Insulin growth factor I y II)	
	TGF- $\beta$ (transforming growth factor-beta)	
	PDGF (Platelet derived growth factor)	

Además de esta matriz ósea mineralizada el hueso contiene principalmente cuatro tipos celulares (figura 2):

- **Células osteoprogenitoras.** Son células especializadas que derivan del mesénquima susceptibles de diferenciarse hacia osteoblastos. Se encuentran en la porción más interna del periostio, en el endostio y en los canales del hueso que contienen los vasos sanguíneos.
- **Osteoblastos.** Proceden de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea. Son células grandes (20-30  $\mu\text{m}$ ) de forma poliédrica cuboidal y con un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugosos bien desarrollados. Los osteoblastos y osteocitos se comunican entre sí por proteínas transmembrana o integrinas, que actúan de enlace entre células o entre una célula y la matriz extracelular. Se sabe que sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso, dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular, contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide, median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas y sintetizan factores de crecimiento. Existen cuatro estadios en la diferenciación de los osteoblastos: pre-osteoblastos, osteoblastos, osteocitos y **células de revestimiento** ("bone-lining cell"). Todos ellos son positivos a la tinción de fosfatasa alcalina, sin embargo, sólo los osteoblastos maduros tienen la capacidad de producir la mineralización del tejido aunque dicho mecanismo no está claramente elucidado (Parra-Torres et al. 2013). Tanto las células de revestimiento como los osteocitos representan estadios más avanzados de maduración. Las células de revestimiento son células elongadas y planas, con un núcleo en forma de huso, sin apenas organelas. Pueden expresar los marcadores osteoblásticos y permanecen a lo largo de la superficie endóstica, constituyendo con el endostio una capa protectora de la superficie ósea, que juega un papel importante en la activación del remodelado óseo (Fernández-Tresguerres Hernández-Gil et al. 2006).
- **Osteocito.** Son células diferenciadas terminalmente derivadas de los osteoblastos. No tienen capacidad proliferativa y se encuentran en el interior de la matriz mineralizada. Son las células más abundantes del hueso (10 veces más que los osteoblastos). Poseen una forma estrellada pero tienen disminuido el volumen celular con respecto a los osteoblastos. Los osteocitos se organizan formando un sincitio de células interconectadas que representa una única estructura, con la ventaja de que existe una gran superficie de contacto en el interior y hacia la superficie ósea, para asegurarse oxígeno y nutrientes (Andrades et al. 2013). Se ha

descrito que los osteocitos son uno de los principales tipos celulares responsables de la detección de la tensión mecánica y por tanto, de la activación del remodelado óseo (Parra-Torres et al. 2013) (Bozal 2006).

- **Osteoclastos.** Son las células encargadas de la reabsorción ósea. Tiene un gran tamaño (100  $\mu\text{m}$ ), son multinucleadas y ricas en mitocondrias y vacuolas. Contienen fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) que permite la desfosforilación de las proteínas. Además la actividad de TRAP es aprovechada para su identificación en estudios *in vitro* e *in vivo*. Los osteoclastos, a diferencia del resto de células óseas, proceden de la fusión de progenitores mononucleares derivados de células madre hematopoyéticas medulares denominadas “Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (CFU-GM), en un proceso denominado osteoclastogénesis. Tienen dos especializaciones en la membrana: un borde en cepillo, que es donde tiene lugar la reabsorción y una zona clara, rica en microfilamentos, con integrinas que sirven de anclaje a la matriz. Para ello, los osteoclastos se movilizan hacia la zona a reabsorber y se adhieren a la superficie ósea mineralizada por el ribete en cepillo sellando los bordes del área mediante las integrinas. En este momento secretan ácidos generados por la anhidrasa carbónica II y enzimas proteolíticas que van a originar la reabsorción del hueso mediante la solubilización de la matriz orgánica y de la mineral (Mundy 1993). Los osteoclastos se encuentran en regiones de reabsorción ósea llamadas lagunas de Howship. En cuanto a la osteoclastogénesis, actualmente se conoce que los osteoblastos juegan un papel fundamental en dicho proceso. Esto es debido a tres moléculas reguladoras: OPG (osteoprotegerina, proteína sintetizada por osteoblastos y pre-osteoblastos), RANKL (citoquina transmembrana perteneciente a la familia del factor de necrosis tumoral y situada en la superficie de osteoblastos y pre-osteoblastos) y RANK (receptor de RANKL presente en la membrana de osteoclastos y pre-osteoclastos). La interacción de RANKL y su receptor RANK produce una activación de la diferenciación de la actividad osteoclástica, aumentando la reabsorción. Asimismo, los efectos de RANKL son a su vez inhibidos por la OPG. Por tanto, cuando se unen OPG y RANKL se inhibe la diferenciación osteoclástica (Simonet et al. 1997).



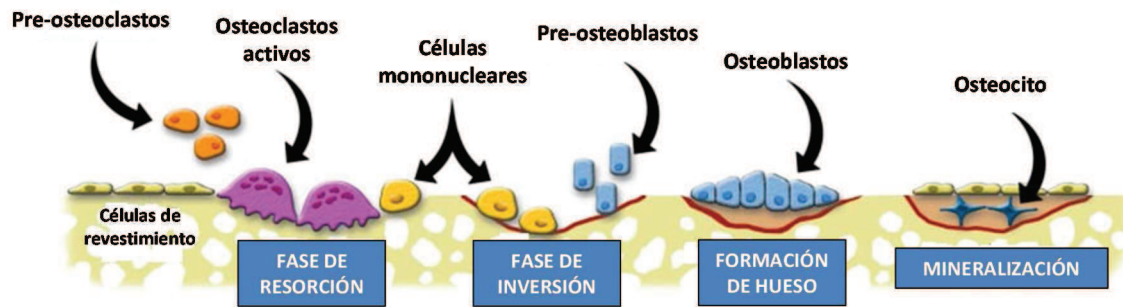
**Figura 2. Representación de los distintos tipos de células óseas y la interacción entre ellas.** La vía de señalización Wnt interviene en la diferenciación de MSC hacia osteoblastos y se inhibe la condrogénesis y adipogénesis. A su vez, por medio de RANKL y OPG se regula la diferenciación de osteoclastos desde monocitos. La expresión de SOST y DKK1 por osteocitos también regula el proceso de diferenciación ósea (Adaptado de la referencia (Baron, Kneissel 2013)).

### 3. FISIOLÓGÍA Y HOMEOSTASIS DEL HUESO

El desarrollo del hueso durante la etapa embrionaria se inicia con la formación de hueso nuevo mediante un proceso denominado **osificación**. Existen dos tipos de osificación: intramembranosa o endocondral. Ambos procesos no generan diferencias en la estructura de los huesos maduros. La **osificación intramembranosa** se produce por la condensación de las células mesenquimales en áreas específicas del mesénquima o tejido conectivo donde se formará el hueso. En estas localizaciones comenzará a aumentar la vascularización y las células se transformarán en osteoblastos que posteriormente formarán el osteoide. Por otro lado, la **osificación endocondral** tiene lugar por la diferenciación de las células mesenquimales a condroblastos. Éstos producirán una matriz cartilaginosa que posteriormente se mineralizará formando el tejido óseo (Bostrom 1998, Einhorn 1995, Marks, Hermey 1996, Sciadini et al. 2000).

### 3.1. Remodelación ósea

El hueso está sometido a un proceso continuo de renovación que se conoce con el nombre de **remodelación ósea**. Este proceso se lleva a cabo por la actividad coordinada y acoplada de osteoclastos y osteoblastos que constituyen un conjunto denominado **Unidad Básica Multicelular** conocida como **BMU** (“Bone Multicellular Unit”). El proceso comienza con el reclutamiento de los precursores de los osteoclastos a un determinado foco (**fase de activación**) que al transformarse en osteoclastos maduros comienzan a reabsorber la matriz ósea (**fase de resorción**), formando una cavidad tuneliforme en el hueso cortical (cono de apertura) o lagunar en el trabecular (laguna de Howship) (Baron 2003). El final de reabsorción ósea y el inicio de la formación de hueso se producen a través de un mecanismo de acoplamiento con un periodo de aparente inactividad (**fase de inversión**). Posteriormente, los osteoblastos tapizan la cavidad formada y empiezan a formar lamelas concéntricas hacia el interior dejando un canal central que contiene los vasos sanguíneos. Como resultado se obtiene una osteona secundaria en cuyo centro se encuentra el canal de Havers, también conocida como **unidad básica estructural o BSU** (**fase de formación**) (Martin, Burr & Sharkey 1998).



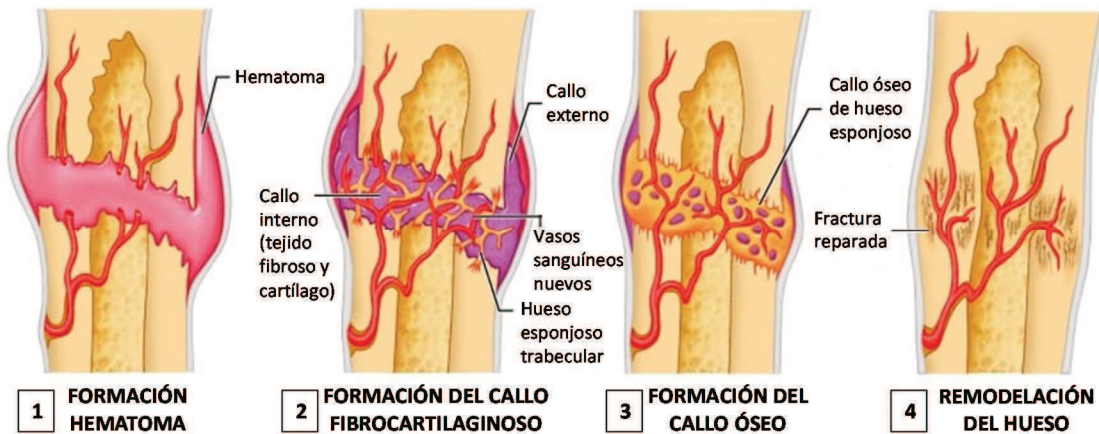
**Figura 3. Secuencia de las fases del remodelado óseo.** Comienza con la diferenciación de los precursores de osteoclastos y la activación de éstos provocando la resorción ósea. Posteriormente, dichos osteoclastos entran en apoptosis y tras un periodo de aparente inactividad los osteoblastos inician el proceso de formación del hueso que termina con la mineralización del osteoide. (Adaptado de la referencia (Deal 2009))

En adultos no patológicos hay un equilibrio entre la cantidad de hueso reabsorbido por los osteoclastos y la cantidad de hueso formado por los osteoblastos. Este balance óseo tiene un valor igual a cero hasta los 30-40 años, y de aproximadamente -3% a partir de dicha edad. Un balance óseo anormal puede producir una gran variedad de enfermedades como es el caso de la osteoporosis, osteomalacia o enfermedad de Paget (aceleración anormal del proceso de remodelación) (Baron 2003, Parra-Torres et al. 2013) (figura 3).

### **3.2. Fractura y regeneración ósea**

El tejido óseo se caracteriza porque mantiene la capacidad de regenerarse totalmente en el estado adulto tras una fractura. El proceso de reparación deber restaurar la geometría original, la matriz biológica y las propiedades biomecánicas del tejido óseo dañado. Para conseguir dicha regeneración es necesaria la implicación del proceso de angiogénesis y osteogénesis, ambos estimulados por una combinación de citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, células y componentes de la matriz extracelular.

La reparación de una fractura ósea comienza con la rotura de los vasos sanguíneos en el lugar de la lesión. Como consecuencia de dicha rotura se forma un coágulo (**hematoma**) que impide la circulación de la sangre, provocando la necrosis del tejido circundante. De este modo, el hematoma actúa como foco de atracción para la invasión celular. Tras la formación del hematoma se produce una tumefacción e inflamación y el sistema de vascularización en desarrollo permite la llegada de fagocitos y osteoclastos que empiezan a retirar el tejido dañado de la fractura, así como el drenaje de los metabolitos y productos de degradación. Posteriormente, los fibroblastos del periostio invaden la zona lesionada y comienzan a producir fibras de colágeno que conectarán los extremos fracturados del hueso, formando una matriz reticular que provee de soporte mecánico al nuevo sistema vascular. A su vez, se inicia la migración de células osteoprogenitoras que se diferencian a condroblastos en las zonas más avasculares (más alejadas del tejido óseo sano) produciendo fibrocartílago, y a osteoblastos en las zonas más vascularizadas produciendo trabéculas de hueso esponjoso. La conversión del fibrocartílago a hueso esponjoso forma el denominado **callo óseo**. La fase final de la regeneración consiste en la remodelación del callo donde las porciones muertas de los fragmentos originales son gradualmente reabsorbidas por los osteoclastos y el hueso compacto sustituye al esponjoso en la periferia de la fractura (Gerber, Ferrara 2000, Shirley et al. 2005)(figura 4).



**Figura 4. Etapas de la reparación de una fractura ósea.** Comienza con la formación de un hematoma seguido de un proceso de angiogénesis localizada. Posteriormente se forma un callo fibrocartilaginoso que da lugar al callo óseo finalizando con la remodelación completa del hueso fracturado (Adaptado de la referencia (Marieb, Hoehn 2007)).

La reparación de fracturas óseas es un proceso muy regulado y coordinado tanto a nivel celular como a nivel molecular. En los últimos años los principales avances en la biología del hueso han revelado más información acerca de los mecanismos moleculares implicados en la regeneración ósea. Esto será de gran ayuda en la búsqueda de nuevos tratamientos para la reparación de fracturas óseas, defectos congénitos y enfermedades degenerativas. Así, se ha descrito que las BMPs juegan un papel muy importante en el proceso de reparación ósea. Estas proteínas son expresadas y liberadas a la matriz extracelular del hueso fracturado en las primeras etapas de la reparación puesto que activan la diferenciación hacia osteoblastos y condrocitos para la formación del tejido óseo nuevo (Onishi et al. 1998).

#### 4. INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO

Como se ha hecho referencia anteriormente, la Ingeniería de Tejidos es una de las áreas con mayor potencial dentro de la Medicina Regenerativa. Propone alternativas para la reparación, reemplazamiento y mantenimiento o mejora del tejido dañado. Para conseguir dicho objetivo es fundamental la confluencia de tres elementos básicos: una matriz adecuada, un aporte celular suficiente y la presencia de las señales específicas que permitan la formación del tejido deseado.

Por tanto, cada diseño que se estudia, cada combinación de factores, ha de ser específico para el sistema a reparar. En este sentido, el gran número de variables a estudiar,

así como la cantidad de aplicaciones potenciales, hacen de esta disciplina un gran reto científico con prometedoras expectativas de éxito.

En el caso de la ingeniería de tejido óseo es necesario el empleo de matrices capaces de mantener la estabilidad biomecánica del hueso y que faciliten la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Además es fundamental la correcta integración del material empleado o su degradación gradual y predecible, de forma que permita la formación del nuevo tejido (Sikavitsas, Temenoff & Mikos 2001).

Por otra parte se tiende hacia el diseño de terapias basadas en cultivos celulares, ya que aumentan la posibilidad de formar una masa de tejido nuevo considerable. Generalmente se opta por células autólogas, más seguras desde el punto de vista inmunológico. Sin embargo, el problema fundamental para este tipo de terapias es encontrar la fuente celular adecuada que no implique una nueva área quirúrgica (Goessler, Hormann & Riedel 2005, Mauney, Volloch & Kaplan 2005). Por este motivo las células madre mesenquimales (MSC: "Mesenchymal Stem Cell") parecen ser las mejores candidatas para la regeneración de tejido óseo (Kang et al. 2008). Esto es debido a su alta capacidad para diferenciarse hacia el fenotipo osteogénico y a sus múltiples fuentes de obtención, ya que pueden aislarse de numerosos tejidos adultos como sangre periférica, fluido sinovial, pulpa dental, tejido adiposo o médula ósea entre otros. Sin embargo, en el proceso de obtención de células madre mesenquimales es necesaria una caracterización de éstas para asegurar las propiedades del cultivo celular obtenido. Además, para el empleo de dichas células es importante tener que en cuenta su alta variabilidad en la proliferación y en su potencial de diferenciación dependiendo tanto del origen como del estado del cultivo en el que se encuentren ya que se trata de cultivos primarios que llegan a senescencia y cuyas características varían durante su tiempo de cultivo. Por este motivo, los mecanismos moleculares de la regulación de las MSC y la importancia del efecto de factores de crecimiento específicos durante las diferentes etapas de la diferenciación osteogénica, son objeto de numerosos estudios en la actualidad (Andrades et al. 2013, Abarrategi et al. 2013).

Las células actúan y responden a los diferentes factores de su entorno (mecánicos, eléctricos, estructurales o químicos). En este sentido, los factores de crecimiento desempeñan un papel fundamental ya que regulan acciones celulares tales como la migración, la proliferación o la morfogénesis. Estos factores juegan un papel importante en los procesos de remodelado y reparación ósea, por lo que el uso de estos factores es necesario en la ingeniería de tejido óseo. Los factores de crecimiento son normalmente

proteínas secretadas a bajas concentraciones con efecto local y que interactúan con los receptores de membrana de las células diana. Esta interacción desencadena una cascada de señalización intracelular que induce la expresión de determinados genes. Algunos de estos factores de crecimiento implicados en la regeneración ósea son las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), factor de crecimiento insulínico (IGFs), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Andrades et al. 2013).

De entre todos los factores que intervienen en este proceso, las BMPs son sin duda las que más interés han despertado en numerosos estudios, puesto que son el factor de crecimiento más efectivo en la regeneración ósea. Actualmente el único material comercializado con capacidad osteoinductiva contiene BMP (Lo et al. 2012).

### 4.1. Proteínas Morfogenéticas Óseas

Las Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMPs), forman un único grupo de proteínas dentro de la superfamilia de Factores Transformantes de Crecimiento beta (TGF- $\beta$ ) junto con otras proteínas como las activinas/inhibinas, o los factores de crecimiento y diferenciación (GDF). Se descubrieron por casualidad cuando en 1965 Urist implantó como control extractos de hueso desmineralizado en tejido muscular de ratones, debido a que durante décadas, se había atribuido la capacidad auto-reparadora del hueso a la matriz inorgánica de éste. Sorprendentemente, tras varias semanas post-implantación observó la formación de hueso en dichas muestras control. Este descubrimiento demostró que la capacidad de producir tejido óseo se debía a sustancias presentes en la matriz orgánica del hueso por lo que las definió como proteínas morfogenéticas óseas (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs) (Urist 1965, Urist, Strates 1971). En años posteriores Sampath y Reddi realizaron diversos estudios en los que analizaban la reproducibilidad de las BMPs para generar la formación de hueso ectópico. Para ello medían tanto la actividad de la enzima fosfatasa alcalina como el contenido de calcio en el hueso neoformado. De este modo, comprobaron como las BMPs eran las responsables de desencadenar una serie de acontecimientos por los cuales las células progenitoras de la médula ósea se diferenciaban hacia células osteoblásticas que provocaban la regeneración del hueso (Sampath, Reddi 1981, Reddi, Huggins 1972, Reddi 1981). Tras todos estos estudios, las BMPs inicialmente se definieron por su capacidad para inducir la formación de hueso y cartílago en lugares ectópicos *in vivo* (Celeste et al. 1990). Actualmente se sabe que regulan el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis celular, y que juegan un papel importante en el desarrollo de

varios órganos y tejidos, así como en el desarrollo embrionario (Mabie, Mehler & Kessler 1999, Reddi 1998). Además, son capaces de formar tejido óseo durante la embriogénesis, en el crecimiento y en el estado adulto del ser vivo incluyendo la curación de fracturas óseas (Kirker-Head 2000).

#### **4.1.1. Miembros de la familia de BMP**

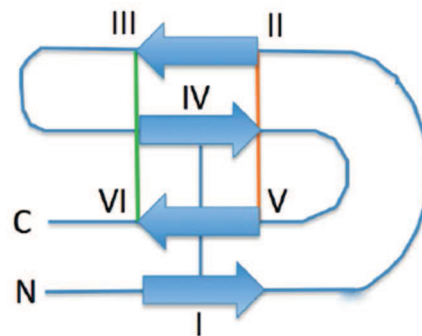
Actualmente se han identificado al menos veinte BMPs (tabla 2) y, a excepción de la BMP-1 que es una metaloproteasa, todas ellas son citoquinas multifuncionales que se engloban en la súper familia de TGF- $\beta$  (Hoffmann et al. 2001, Kessler et al. 1996). Las BMPs están altamente conservadas en las diferentes especies animales. Se pueden dividir en varias subfamilias en función de la similitud de su secuencia de aminoácidos del dominio maduro de la proteína. Así, podrían clasificarse en 4 grupos: BMP-2 y BMP-4 (con un 80% de homología en su secuencia); BMP-5, 6, 7 y 8 (con un 78% de homología); BMP-9 y 10; BMP-12, 13 y 14. La BMP-11 y BMP-15 son miembros más distantes de la familia de las BMPs y a su vez son similares a GDF 8 y 9 respectivamente. Lo mismo ocurre con la BMP-16, 17 y 18. Éstas últimas podrían formar parte de un grupo diferente dentro de la superfamilia de TGF- $\beta$ . Actualmente, la manipulación genética permite a los investigadores determinar la función fisiológica de cada una de ellas. La BMP-2, 4, 6, 7 y 9, destacan por su actividad osteoinductora y su capacidad para la formación de hueso ectópico (Bessa, Casal & Reis 2008b, Bragdon et al. 2011).

**Tabla 2. Miembros de la familia de las BMPs y su principal función fisiológica.**

BMP	Función fisiológica principal	Referencia
BMP-1	Metaloproteasa	(Kessler et al. 1996, Suzuki et al. 1996)
<b>Proteínas morfogenéticas óseas</b>		
BMP-2	Reparación y regeneración ósea y de cartílago/ formación corazón	(Nakase, Yoshikawa 2006, Wang et al. 1990)
BMP-3 (osteogenina)	Regulador negativo de la morfogénesis del hueso	(Hino et al. 2004)
BMP-3b (GDF-10)	Regulador de la diferenciación celular	(Hino et al. 2004)
BMP-4 (BMP-2b)	Reparación y regeneración ósea y de cartílago/ formación riñón	(Oxburgh et al. 2005, Luyten, Chen & Paralkar 1994)
BMP-5	Desarrollo de las extremidades/ morfogénesis de hueso y cartílago	(Hahn et al. 1992, King et al. 1994)
BMP-6 (Vrg1, Dvr6)	Hipertrofia del cartílago/ morfogénesis de hueso/ desarrollo del sistema nervioso	(Hahn et al. 1992, Kang et al. 2004)
BMP-7 (OP-1)	Reparación y regeneración ósea y de cartílago/ formación riñón y ojos / desarrollo del sistema nervioso	(Nakase, Yoshikawa 2006, Reddi 1998, Luo et al. 1995)
BMP-8 (OP-2)	Morfogénesis de hueso / espermatogénesis	(Zhao et al. 1996, Ozkaynak et al. 1992)
BMP-9 (GDF-2)	Morfogénesis de hueso / desarrollo del sistema colinérgico nervioso / metabolismo de la glucosa	(Kang et al. 2004, David et al. 2008)
BMP-11 (GDF-11)	Modelado del tejido neuronal y mesodérmico / desarrollo páncreas y ojo /formación de riñón	(Nakashima et al. 2003, Harmon et al. 2004)
<b>Proteínas morfogenéticas derivadas de cartílago</b>		
BMP-12 (CDMP3, GDF-7)	Desarrollo de los tendones y ligamentos / desarrollo del sistema neuro-sensorial	(Reddi 2003)
BMP-13 (CDMP2, GDF-6)	Desarrollo del cartílago e hipertrofia	(Reddi 2003)
BMP-14 (CDMP1, GDF-5)	Condrogénesis / angiogénesis	(Reddi 2003, Yamashita et al. 1997)
<b>Otros</b>		
BMP-8b (OP-3)	Espermatogénesis	(Zhao et al. 1996)
BMP-10	Morfogénesis del corazón	(Chen et al. 2004b)(Hillier et al. 2005)
BMP-15 (GDF-9b)	Fisiología del ovario	(Knight, Glistler 2006)
BMP-16	Modelado embrionario / regeneración y reparación esquelética	(Feiner et al. 2009)
BMP-17	Modelado embrionario	(Celeste, Murray 2000)
BMP-18	Modelado embrionario	(Celeste, Murray 2000)

#### 4.1.2. Estructura de las BMPs

Las BMPs son sintetizadas como un precursor inmaduro de gran tamaño de 400 a 500 aminoácidos de longitud aproximadamente. El precursor (pre-pro-péptido) consta de un péptido señal amino terminal (N-terminal), un pro-dominio y una proteína madura extremo carboxilo terminal (C-terminal). La proteólisis de dicho precursor tiene lugar en el aparato de Golgi donde se formará la proteína madura (Wozney et al. 1990, Hogan 1996). El dominio maduro de dichas proteínas contiene siete residuos de cisteína altamente conservados evolutivamente. Seis de ellos se unen mediante tres puentes disulfuro intracatenarios formando un nudo conocido como “cysteine-knot” (Scheufler, Sebald & Hülsmeier 1999) (figura 5). La séptima cisteína está implicada en la unión de dos cadenas independientes de proteína mediante la formación de un puente disulfuro intercatenario (Bragdon et al. 2011). De este modo, se produce la dimerización dando lugar a homodímeros (si las cadenas polipeptídicas son iguales) o heterodímeros (si son cadenas que pertenecen a distintas BMPs como por ejemplo el heterodímero formado por BMP-2/-7). Estas diferencias químicas y estructurales pueden ser las responsables de las variaciones de su potencial biológico (Sykaras, Opperman 2003). El proceso de dimerización es necesario para que las BMPs presenten su capacidad osteoinductora (Groeneveld, Burger 2000).



**Figura 5. Diagrama del “cysteine-knot”.** En la figura se representan: las láminas  $\beta$  con flechas, los residuos de cisteína con los números del I al VI desde el extremo N-terminal al C-terminal, y los puentes disulfuro con las líneas roja, verde y azul. Como consecuencia de las uniones entre Cys43/Cys111 (II-V) y Cys47/Cys113 (III-VI) se forma un anillo y a través de éste pasa el tercer puente disulfuro entre Cys14/Cys79 (I-IV) (Adaptada de “Cyclotide Webpage”: [www.cyclotide.com/knots.html](http://www.cyclotide.com/knots.html)).

A lo largo de los años se han conseguido aislar y secuenciar las distintas BMPs, por lo que mediante técnicas de ingeniería genética se ha logrado expresar dichas proteínas en diversos organismos modelo (Maruoka et al. 1995, Israel et al. 1992, GAO et al. 2006, Johnson, Urist & AM Finerman 1992, Rosen et al. 1989, Bessa et al. 2007). De este modo, no sólo se han obtenido estas proteínas de forma masiva, sino que se ha podido estudiar exhaustivamente el mecanismo de acción y la respuesta celular de cada una de ellas.

### **4.1.3. Mecanismos de señalización de BMPs**

#### **4.1.3.1. Receptores**

Las BMPs desarrollan su actividad biológica mediante la unión a los receptores de superficie de las células diana. Las BMPs se unen a complejos heteroméricos compuestos por dos tipos de receptores serina-treonina-quinasa: tipo I y tipo II. Ambos están formados por un dominio extracelular que contiene de 10-12 residuos de cisteína, un dominio transmembrana y una región intracelular con actividad serin/treonin quinasa. Se han identificado cinco receptores de tipo I: Alk1 (Acvrl1), Alk2 (ActRIa), Alk3 (BRIa), Alk4 (ActRIb) y Alk6 (BRIb); y tres tipo de receptores tipo II: BRII, ActRIIa y ActRIIb (Bragdon et al. 2011). Los receptores de tipo I presentan dos estructuras adicionales: una región rica en glicina/serina que precede al dominio quinasa (GS-box) y dentro de dicho dominio una región de ocho aminoácidos denominada L45. La activación del receptor tipo I requiere de la unión del ligando y como consecuencia la fosforilación de su GS-box por medio del receptor tipo II. Este último receptor, sin embargo, tiene actividad por sí solo (Shimasaki et al. 2004).

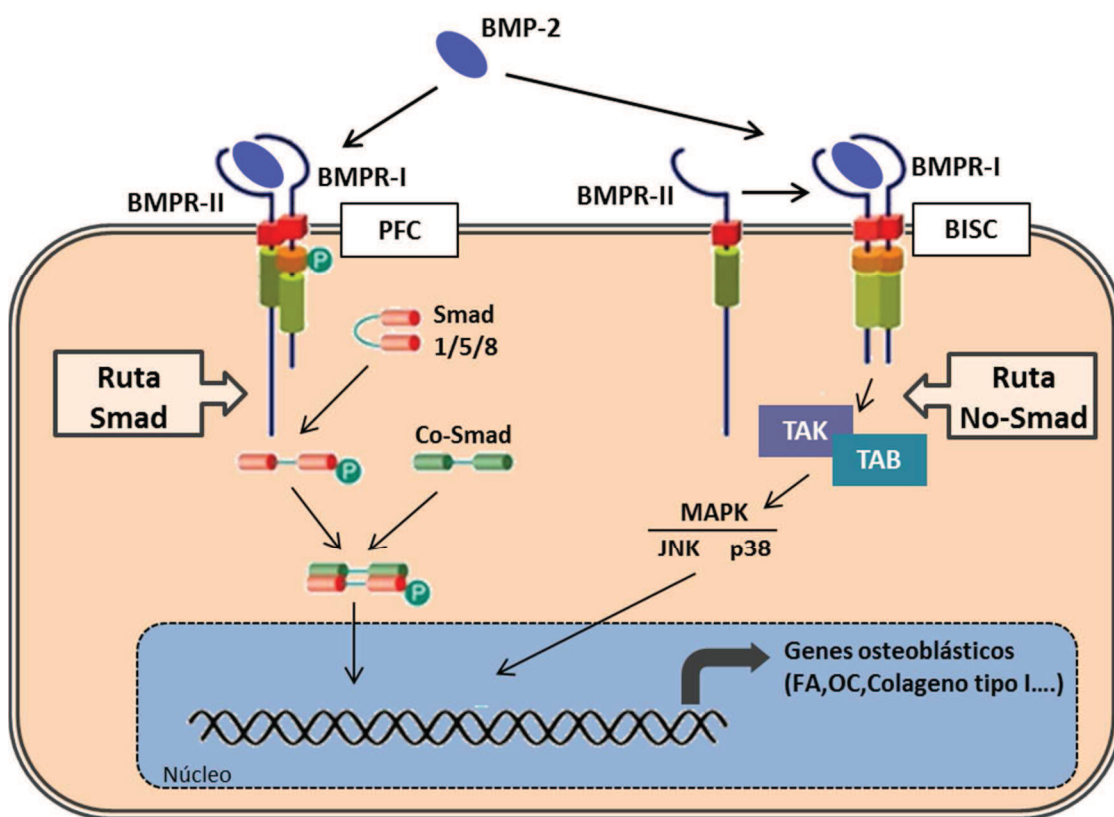
Las BMPs se unen al receptor de tipo I o tipo II con diferente afinidad. De este modo, la BMP-2 y la BMP-4 muestran una mayor afinidad por el receptor de tipo I mientras que la BMP-7 presenta dicha afinidad hacia el receptor de tipo II (Koenig et al. 1994, Greenwald et al. 2003). Estas diferencias son las responsables de la formación del complejo receptor de forma específica y por tanto de la activación de las distintas cascadas de señalización. Además la afinidad del ligando por el receptor no es la única variable responsable de la diversidad en la señalización de BMP sino que también influirán factores como el nivel de expresión del ligando y de los receptores, la presencia de co-factores, la existencia del complejo receptor preformado en la superficie celular, etc... (Sieber et al. 2009)

Diversos estudios demuestran que las BMPs pueden activar distintas rutas de señalización en respuesta a la unión con su receptor. Asimismo, la BMP-2 puede

desencadenar su respuesta transcripcional de dos formas diferentes (Wan, Cao 2005, Nohe et al. 2004):

- mediante la unión del ligando con un complejo receptor previamente formado (PFC) constituido por la asociación del receptor de tipo I y el receptor de tipo II. Esta unión desencadena la vía de señalización Smad.

- mediante la unión con alta afinidad al receptor de tipo I que a su vez provoca la formación del complejo receptor con la unión de receptor de tipo II. Dan lugar, por tanto, al complejo de señalización inducido por BMP (BISC) que desencadena la ruta de señalización Smad independiente.



**Figura 6. Esquema de la ruta de señalización celular de la BMP-2** (Rudarakanchana, Morrell 2004). BMP-2 puede desencadenar su cascada de señalización por dos rutas diferentes: 1) unión a un complejo receptor previamente formado (PFC) que desencadenará la vía de señalización Smad; 2) unión al receptor tipo I que provoca la formación del complejo receptor con la unión de receptor de tipo II formando un complejo de señalización inducido por BMP (BISC) que desencadenará la ruta de señalización Smad independiente.

Esto demuestra la versatilidad de la señalización de las BMPs y sugieren que la activación de distintas vías depende en gran medida de la disponibilidad de receptores específicos y sus complejos en la superficie celular (figura 6).

### 4.1.3.2. Ruta de señalización Smad

Existen tres tipos de proteínas Smad: las reguladas por receptores de membrana (R-Smad, como Smad-1, Smad-5 y Smad-8), las mediadoras (Co-Smad, como Smad-4) y las inhibidoras (I-Smad, como Smad-6 y Smad-7). Las R-Smad una vez fosforiladas por el receptor de tipo I, dimerizan en el citoplasma con una Co-Smad, dando lugar a un complejo que se transloca al núcleo, actuando como factor transcripcional e iniciando la expresión de genes de respuesta a la BMP (Massague, Seoane & Wotton 2005).

Las R-Smad presentan dos dominios altamente conservados: MH1 o dominio N-terminal responsable de la unión al DNA y MH2 o dominio C-terminal que regula la especificidad de la R-Smad, el reconocimiento del receptor y la región denominada SXSS objeto de fosforilación (Wrana 2000).

### 4.1.3.3. Ruta de señalización Smad independiente

Además de la ruta de señalización Smad, se ha descrito que las BMPs son capaces de inducir la transcripción de genes independientes de dicha ruta.

Como se ha indicado anteriormente, cuando debido a la unión del ligando con el receptor se origina la formación del complejo constituido por el receptor tipo I y tipo II, se induce la activación de la ruta de señalización MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases). En dicha ruta, la asociación del receptor de tipo I con TAK1 (TGF- $\beta$  activated kinase 1) y TAB1 (TAK1 binding protein) produce la activación de NF $\kappa$ B (nuclear factor kappa beta), MAP quinasa p38 y JNK (C-jun N-terminal kinase). Estas quinazas se translocan al núcleo donde activan ATF2, c-Jun o c-Fos que regularán la transcripción de determinados genes diana como osteopontina, fosfatasa alcalina o colágeno tipo I (Yamaguchi et al. 1999).

Además se ha descrito que las BMPs son capaces inducir la activación de ERK (extracelular signal-regulated kinase), PI3K (phosphoinositide 3-kinase), PKA (protein kinase A), PKC (protein kinase C) y PKD (protein kinase D). Aunque no se conoce el mecanismo exacto de la iniciación de dicha activación, esta ruta es la responsable de la influencia de las BMPs en la supervivencia celular, la apoptosis, la migración y la diferenciación celular (Bragdon et al. 2011).

Recientemente se ha demostrado en condrocitos que TAK1 es capaz de fosforilar Smad1. Por tanto, TAK1 actúa en la activación de la ruta Smad además de sus funciones ya conocidas en la activación de la vía MAPK. Esto señala que existe una interrelación entre las distintas rutas de señalización intracelulares (Shim et al. 2009).

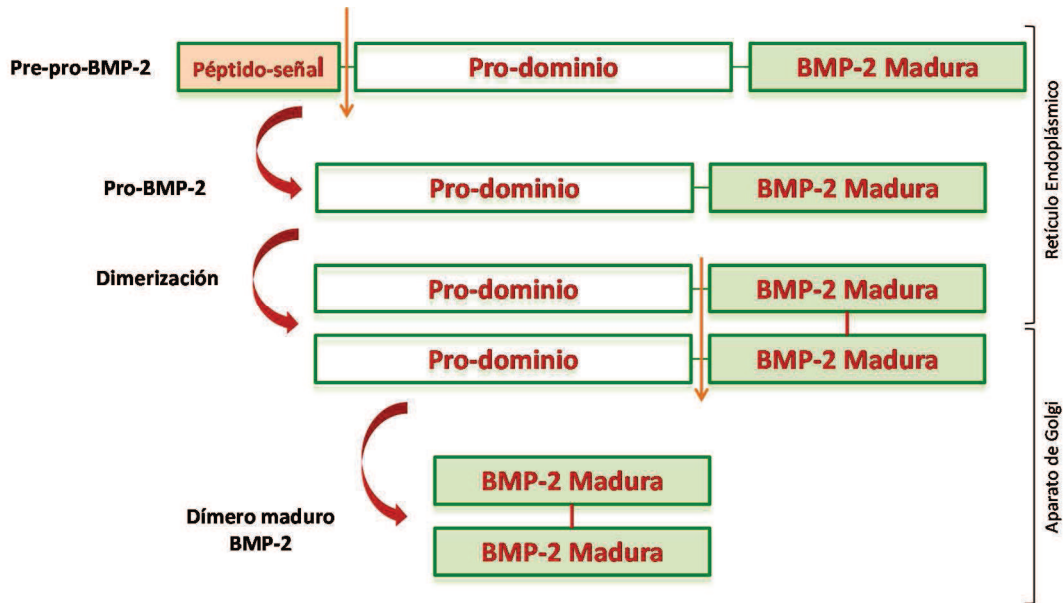
Cabe destacar que en los últimos años numerosos autores se han centrado en el estudio de la interacción de las diferentes rutas de señalización intracelulares con la ruta activada por las BMPs (Wan, Cao 2005, Nohe et al. 2004, Rosen 2009, Rawadi et al. 2003).

#### **4.1.3.4. Regulación de la señalización de BMPs**

La señalización de BMP puede estar modulada a varios niveles. En el entorno extracelular, existen antagonistas de BMP que se unen al ligando inhibiendo el reconocimiento al receptor. El antagonista más estudiado es Noggin. Además están presentes los llamados co-receptores que pueden regular la interacción de la BMP con el complejo receptor de forma positiva (Dragon, Betaglicano) o negativamente (BAMBI) (Sieber et al. 2009). Intracelularmente, la señalización de la BMP puede estar modulada por la activación de las I-Smad o por Smurf-1 (Smad ubiquitin regulatory factor) entre otras. Las I-Smad inhiben la fosforilación de las R-Smad y la posterior formación del complejo con la Co-Smad. Smurf-1, sin embargo, provoca la degradación de las proteínas Smad. Por otro lado, en el núcleo celular, existen un diverso número de co-activadores requeridos para la activación de genes específicos y a su vez, su transcripción puede estar inhibida por distintos co-represores (Šimić, Vukičević 2007, Chen, Zhao & Mundy 2004).

#### **4.1.4. BMP-2**

De las diferentes BMPs, la BMP-2 es una de las proteínas que presenta mayor capacidad de inducir la regeneración ósea y de formar hueso ectópico en vertebrados adultos. Por ese motivo se considera de gran interés en el campo de la Ingeniería de Tejidos, donde estudios clínicos recientes han demostrado que, cuando se libera adecuadamente, la BMP recombinante humana resulta ser eficaz en la diferenciación de tejido óseo, y, por tanto, una alternativa adecuada a los aloinjertos (Sykaras, Opperman 2003). Actualmente, sólo la BMP-2 y BMP-7 forman parte de productos disponibles para su uso en clínica en el tratamiento de pacientes con enfermedades o defectos óseos.



MVAGTRCLLA	LLLPQVLLGG	AAGLVPELGR	RKFAAASSGR	PSSQPSDEVL	50
SEFELRLISM	FGLKQRPTPS	RDAVVPYML	DLYRRHSGQP	GSPAPDHRLE	100
RAASRANTVR	SFHHEESLEE	LPETSGKTTR	RFFFNLSIP	TEEFITSAEL	150
QVFREQMQDA	LGNSSFHHR	INIEYIIPKA	TANSKFPVTR	LLDTRLVNQN	200
ASRWESFDVT	PAVMRWTAQG	HANHGFVVEV	AHLEEKQGVV	KRHVIRISRL	250
HQDEHSWSQI	RPLLVTFGHD	GKGHPLHKRE	KRQAKHKQRK	RLKSSCKRHP	300
LYVDFSDVGW	NDWIVAPPGY	HAFYCHGEC	FPLADHLNST	NHAIVQTLVN	350
SVNSKIPKAC	CVPTELSAIS	MLYLDENEKV	VLKNYQDMVV	EGCGCR	396

**Figura 7. Esquema del procesamiento de la BMP-2 y su secuencia de aminoácidos.**

En la imagen superior se muestra la proteólisis, tanto del péptido señal como de la pro-BMP-2 y su dimerización (Adaptado de la referencia (Wozney et al. 1990)). En la imagen inferior se muestra la secuencia de la pre-pro-BMP-2. Se representa: en azul secuencia del péptido señal, en rojo secuencia del prodominio y en negro la secuencia de la proteína madura. Sombreado en verde se indica los sitios potenciales de glicosilación (sólo uno de ellos en la secuencia madura) y en amarillo las cisteínas responsables de la formación de los puentes disulfuro (Shore et al. *PubMed protein sequence search*).

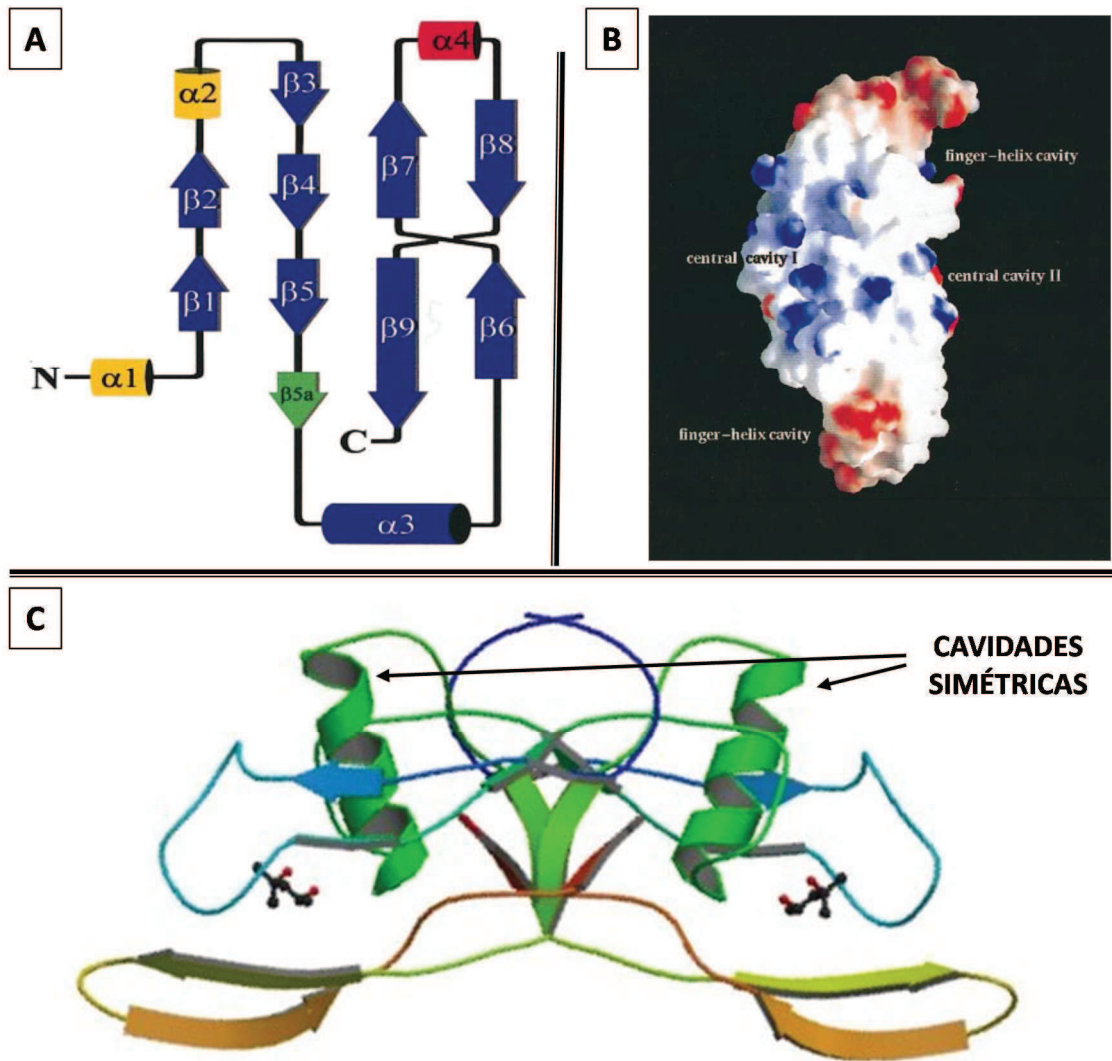
La BMP-2 está implicada en múltiples procesos. Posee un papel muy importante en la embriogénesis y durante el desarrollo postnatal por lo que está involucrada en la morfogénesis de diferentes órganos y tejidos como son el sistema nervioso y el corazón entre otros {{737 Callis,T.E. 2005; 738 White, Patricia M 2001}}. Además, como ya se ha indicado anteriormente, juega un papel fundamental en la formación del hueso, cartílago y otros tejidos conectivos. Esto implica, a su vez, formar parte en el proceso de reparación ósea siendo unas de las proteínas que se expresan en los primeros días tras una fractura.

Además, a nivel fisiológico regula el crecimiento, la diferenciación, la quimiotaxis y la apoptosis celular (Hallahan et al. 2003, Fiedler et al. 2002).

La BMP-2 es sintetizada dentro de la célula en forma de un precursor de 396 aminoácidos, que después de procesos de glicosilación y proteólisis se dimeriza dando lugar a la proteína homodimérica madura formada por dos subunidades (monómeros) que corresponden al extremo C-terminal del precursor (Celeste et al. 1990, Israel et al. 1992). Cada una de las subunidades de la forma madura de la BMP-2 presenta un peso molecular de 13 KDa y está formada por 114 aminoácidos (figura 7). Mediante estudios cristalográficos, se pudo definir la estructura terciaria de la proteína comprobando que está formada un nudo cistina, dos láminas  $\beta$  antiparalelas separadas y una  $\alpha$ -hélice prácticamente perpendicular a las láminas mencionadas (Scheufler, Sebald & Hülsmeier 1999). Una de las láminas  $\beta$  adopta una conformación denominada "crossover-twisted". Por otro lado, como se ha descrito anteriormente, el nudo cistina está constituido por los seis residuos de cisteína formando tres puentes disulfuro intracatenarios. Esta topografía de plegamiento se asemeja a una mano donde la  $\alpha$ -hélice mimetiza la muñeca, el centro del nudo de cistina simula la palma y las láminas- $\beta$  de doble hebra los dedos (Daopin, Li & Davies 1993) (figura 8).

La unión de los monómeros de la BMP-2 se realiza covalentemente mediante la formación de un puente disulfuro adicional entre la Cys78 de cada subunidad. Las dos subunidades se asocian de forma antiparalela cara a cara, dando lugar a una estructura con un peso molecular de 26KDa altamente estable (Sampath, Reddi 1981, Wozney et al. 1988).

La estructura cristalina del dímero de la BMP-2 presenta dos cavidades que se corresponden con dos centros hidrofóbicos no presentes en los monómeros, y en cuya composición están involucrados residuos de ambas subunidades (Scheufler, Sebald & Hülsmeier 1999) (figura 8). La cavidad I presenta un exceso de carga positiva debido a la presencia de residuos con cadena básica (Arg9, Lys11, Lys15, Lys73, Lys76) así como a las cinco cargas positivas del extremo amino terminal de ambos monómeros. Este extremo es el responsable del lugar de unión a heparina de la proteína (Ruppert, Hoffmann & Sebald 1996). Por otro lado, la cavidad II tiene un predominio de cargas negativas debido a las cadenas ácidas de Glu83 y Asp105 y al extremo carboxilo, que se ha descrito como la posible área de interacción con los receptores transmembrana.



**Figura 8. Estructura de la BMP-2.** A) Estructura secundaria del monómero. Las  $\alpha$ -hélices se representan con cilindros y las láminas  $\beta$  con flechas. Coloreado en verde se señala la estructura lámina- $\beta$  específica de la BMP-2. Las  $\alpha$ -hélices coloreadas en amarillo indican estructuras no presentes en la BMP-2 pero sí en la familia TGF- $\beta$  y en rojo una estructura única de BMP-7 (Scheufler, Sebald & Hülsmeier 1999). B) Estructura terciaria del dímero de BMP-2 y las cavidades de la proteína dimérica (Scheufler, Sebald & Hülsmeier 1999). C) Estructura terciaria del dímero de BMP-2. Se señalan las cavidades simétricas resultantes de la unión del dímero (Protein Data Bank: [www.rcsb.org/pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/)).

Además de estas cavidades, y como consecuencia de la interacción del bolsillo hidrofóbico de cada monómero con el extremo C-terminal de la hélice  $\alpha 3$  de la otra subunidad, se forman dos cavidades simétricas. Esta región se podría corresponder a un epítipo de interacción con los receptores.

Con un punto isoeléctrico de  $8,2 \pm 0,4$ , la BMP-2 es una proteína básica. Es soluble a pH por debajo de 5,0 mientras que a pH fisiológico (pH 7,4) necesita de agentes caotrópicos para su manipulación debido a su baja solubilidad (Abbatiello, Porter 1997).

Por otro lado la BMP-2 tiene una vida media corta en condiciones *in vivo*, siendo rápidamente degradada por enzimas y otras condiciones del organismo tales como el pH, concentración iónica etc... Además difunde rápidamente desde el sitio de implantación. Estas condiciones afectan directamente a la eficacia, biodisponibilidad y estabilidad de la BMP-2. Por este motivo, para un máximo efecto clínico son necesarias altas dosis de dicha proteína y el empleo de un transportador adecuado que actúe como un sistema de liberación controlada para permitir la exposición de la BMP-2 en una localización determinada durante un período de tiempo específico en función de las necesidades del organismo (Kang et al. 2008, Abarategi et al. 2008b, Zara et al. 2011, Yun et al. 2014, Guzmán et al. 2014).

#### 4.1.5. Aplicación en clínica de las BMPs

Debido a la gran capacidad de algunas BMPs de estimular la regeneración ósea y de formar hueso ectópico en vertebrados adultos, actualmente existen varios productos comercializados aprobados por la Agencia de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA: Food and Drugs Administration) y por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) (Lissenberg-Thunnissen et al. 2011, Walsh 2010). Estos productos están basados en el empleo de la BMP-2 y BMP-7 (obtenidas de forma recombinante en células de mamíferos) para su aplicación en clínica en el tratamiento de fracturas de huesos largos, fusión espinal y cirugía maxilofacial:

-**INFUSE®** (Medtronic, Minneapolis, EEUU): fue aprobado en 2002 por la FDA como un kit para implante formado por un polvo que contiene la rhBMP-2 (1,5 mg/mL), un disolvente y una matriz (esponjas de colágeno). Está indicado para el tratamiento de enfermedades degenerativas de disco vertebral. Más recientemente se aprobó su uso en el tratamiento de fracturas de tibia en adultos, como adyuvante al tratamiento estándar (2004) y cirugía maxilofacial (2007) (Lo et al. 2012). Sin embargo, dicho producto presenta algunos inconvenientes ya que se han encontrado distintos efectos adversos debidos a las altas dosis necesarias de BMP-2 para suplir la rápida liberación desde las esponjas de colágeno. Estos efectos adversos incluyen incrementos transitorios en los anticuerpos para BMP, edemas a nivel local, dolores severos, dificultades respiratorias, etc... Todo esto unido

a su vez, a los altos costes derivados del tratamiento (Cahill et al. 2009). En la Unión Europea se ha comercializado con el nombre de **InductOs**<sup>®</sup> aprobado por la EMEA en 2002. Tiene las mismas indicaciones que el Infuse<sup>®</sup> a excepción de su aplicación en cirugía maxilofacial (<http://www.ema.europa.eu/>) (<http://www.vademecum.es/>).

- **OP-1**<sup>®</sup> (rhBMP-7, Stryker Biotech, EEUU; comercializado por Olympus Biotech desde diciembre del 2010): **OP-1**<sup>®</sup> **Implant** fue aprobado en 2001 para su aplicación en el tratamiento de fracturas de huesos largos. Su forma farmacéutica es un polvo que contiene rhBMP-7 (3,3 mg) y colágeno bovino, para formar una suspensión implantable. En la Unión Europea se comercializa con el nombre de **Osigraft**<sup>®</sup> aprobado por la EMEA en 2001 para el tratamiento de fracturas de tibia como alternativa a los autoinjertos. Posteriormente OP-1<sup>®</sup> se aprobó en 2004 como **OP-1 Putty**<sup>®</sup> para el tratamiento de fusión vertebral posterolateral. La diferencia con el anterior, es que además de contener colágeno bovino como excipiente, contiene también carboximetilcelulosa (carmelosa). En la Unión Europea se comercializa con el nombre de **Opgenra**<sup>®</sup> aprobado por la EMEA en 2009 para su aplicación en la fusión espinal lumbar posterolateral en el tratamiento de pacientes con espondilolistesis (Lo et al. 2012, Bessa, Casal & Reis 2008a) (Walsh 2010, White et al. 2007) (<http://www.fda.gov>) (<http://www.ema.europa.eu/>).

Además, existen diversos productos en fase de experimentación clínica basados en el empleo de BMPs. Los avances en el estudio de las BMPs junto con el desarrollo de nuevos materiales favorecerán la elaboración de implantes con factores bioactivos con una gran perspectiva para su aplicación en la medicina regenerativa clínica.

✧ *Antecedentes y Objetivos*

---



## ANTECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

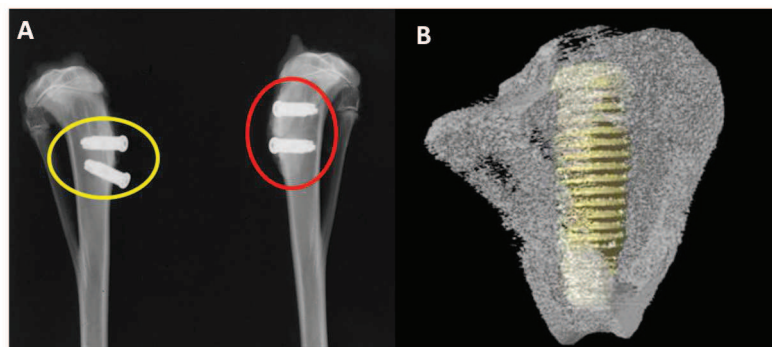
Desde 1996, el Grupo de Ingeniería de Tejidos y Regeneración Ósea de la Universidad Complutense de Madrid a cargo del Doctor José Luis López Lacomba, lleva trabajando en el desarrollo de nuevos materiales para su aplicación en la regeneración de tejido óseo.

Los trabajos anteriormente realizados en el grupo permitieron desarrollar un protocolo para obtener diferentes tipos de proteínas activas (rhBMP-2, rhBMP-4 y rhBMP-7) y desarrollar un biomaterial en forma de película con elevada adherencia celular capaz de inmovilizar dichos factores (Patente Internacional PCT/ES01/00322).

Paralelamente, se han realizado numerosos estudios en el laboratorio empleando otros materiales como cerámicas de  $\beta$ -TCP e hidroxiapatita, discos de titanio con diferentes tratamientos superficiales, andamiajes de policaprolactona, nanotubos de carbón e incluso hidrogeles. Dichos materiales se estudian tanto *in vitro* como *in vivo* mediante ensayos sobre distintos cultivos celulares y en experimentación animal.

Como consecuencia de las diferentes líneas de investigación iniciadas, se están obteniendo numerosos resultados materializados en contribuciones a congresos, artículos científicos, proyectos de investigación y colaboraciones con diferentes grupos y empresas.

Los desarrollos hasta ahora realizados han permitido la creación de una Empresa de Base Tecnológica, Noricum S.L., cuyo fin último es la comercialización de implantes dentales recubiertos con filmes de quitosano activados para la oseointegración de los mismos, tras realizar las correspondientes pruebas clínicas y recibir la autorización de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.



**Figura 9. A) Radiografía de implantes dentales colocados en tibia de conejo. En círculo rojo los implantes activados con quitosano/rhBMP-2, y en círculo amarillo, los implantes control. B) Reconstrucción tridimensional de uno de los implantes activados.**

## **OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL**

El objetivo general de este trabajo de investigación se ha centrado en la optimización de la producción de la proteína morfogenética ósea 2 humana (rhBMP-2) para aumentar el rendimiento y disminuir los costes de su obtención y de este modo, poder facilitar su empleo en aplicaciones clínicas, y en especial, en tratamientos de regeneración ósea.

Dicho objetivo general se ha dividido en varios objetivos parciales:

1. Mejorar, simplificar, incrementar y economizar el proceso de producción de rhBMP-2 mediante su expresión en *E.coli*, evaluando para ello la actividad biológica de la proteína producida en distintos tipos celulares.
2. Evaluar el efecto de rhBMP-2 sobre células madre mesenquimales humanas. Analizar mediante estudios de expresión génica la existencia o no de desdiferenciación tanto en cultivos primarios como en células comprometidas, tras el tratamiento con rhBMP-2 y su posterior privación.
3. Evaluar los beneficios de la incorporación de rhBMP-2 a soportes cerámicos experimentales para su aproximación a la posible aplicación clínica, mediante ensayos *in vivo* tanto en lugares ectópicos como en modelos quirúrgicos superiores.

✧ **CAPÍTULO 1:**

*Optimización del proceso de producción de rhBMP-2*

---



## I. INTRODUCCIÓN

La información estructural y funcional que caracteriza a los seres vivos está codificada en su DNA. Para que esta información se exprese es necesaria su traducción a proteínas, responsables de las características fenotípicas de los organismo vivos.

El desarrollo de la Ingeniería de DNA recombinante ha permitido la obtención de fragmentos de DNA portadores del gen o genes objeto de estudio. A su vez, el uso de vectores adecuados tales como plásmidos, bacteriófagos, etc... ha hecho posible la expresión de los genes clonados en diferentes organismos o células hospedadoras y con ellos la producción de las proteínas que codifican dichos genes.

Pronto se observó que las características de la célula hospedadora tienen una gran influencia en la calidad y cantidad de la proteína recombinante producida. Por ejemplo, la obtención de proteínas recombinantes en cultivos de células de mamífero se caracteriza por producir proteínas en su conformación nativa, pero también por el bajo rendimiento de producción, largos tiempos de cultivo y un alto coste debido a la necesidad de biorreactores. Por el contrario, con la expresión de genes clonados en bacterias, básicamente *Escherichia coli*, se obtiene gran cantidad de proteína recombinante de forma rápida y con un bajo coste, ya que el crecimiento de bacterias es un proceso rápido y requiere de medios más económicos para su cultivo.

Durante mucho tiempo fue preferible realizar la expresión de proteínas recombinantes complejas en hospedadores eucarióticos, y no en hospedadores bacterianos, ya que estos últimos no eran adecuados para la producción de proteínas con puentes disulfuro o aquellas que necesiten modificaciones postraduccionales. Sin embargo, desde el punto de vista económico *Escherichia coli* es el organismo de elección, y por tanto, sigue siendo interesante el desarrollo de estos procesos para mejorar la producción de aquellas proteínas que no requieran un procesamiento postraducciona y la de aquellas proteínas recombinantes que puedan recuperar su actividad por un proceso de plegamiento *in vitro* (Choi, Keum & Lee 2006).

El uso al que va a estar destinada la proteína es el principal factor que determina la elección del sistema de producción empleado, ya que definirá la pureza deseada y de este modo, los costes de dicha producción. Por ejemplo, enzimas empleadas en determinados procesamientos industriales se pueden necesitar en grandes cantidades, interesando un bajo coste, pero puede no ser imprescindible un alto grado de pureza. Sin embargo, proteínas empleadas para el tratamiento terapéutico de enfermedades humanas pueden ser

necesarias en pequeñas cantidades, pero deben cumplir un estricto criterio en términos de pureza, actividad y autenticidad de la secuencia.

### 1. *Escherichia coli* COMO SISTEMA DE PRODUCCIÓN

La expresión de genes clonados en bacterias, básicamente *Escherichia coli*, se emplea actualmente en la industria para la producción de proteínas de uso farmacéutico y en investigación en cantidades ilimitadas. El producto de interés en este proceso se deposita normalmente en forma de agregados insolubles e inactivos, generalmente como cuerpos de inclusión. Esto implica que para la obtención de la proteína activa es necesario el aislamiento y lavado de los cuerpos de inclusión, la solubilización de la proteína agregada y finalmente el plegamiento de ésta. La eficiencia de este último proceso puede verse limitada por la obtención de especies mal plegadas e inactivas y la aparición de agregados, lo que disminuye el rendimiento de producción de proteínas recombinantes en especies bacterianas.

**Tabla 3. Ventajas e inconvenientes de la producción de proteínas en los distintos compartimentos celulares de *Escherichia coli* (Choi, Keum & Lee 2006)**

	Ventajas	Inconvenientes
<b>Citoplasma:</b> producción citosólica	Rendimiento alto Expresión por plásmido Cuerpos de inclusión: · fácil purificación · proteína inactiva (no tóxica)	Purificación compleja (en formas solubles) No formación de puentes disulfuro Cuerpos de inclusión: · necesidad de plegamiento
<b>Periplasma:</b> producción secretora	Purificación simple Plegamiento mejorado. Producción proteína soluble	Posibilidad de formar cuerpos de inclusión Lisis celular Escisión incorrecta del péptido señal
<b>Espacio extracelular:</b> producción excretora	Purificación simple Plegamiento mejorado Producción proteína soluble	Lisis celular Excreción poco frecuente Bajos rendimientos de proteína Dilución del producto

La expresión de proteínas en *E.coli* puede producirse en distintos compartimentos celulares: el citoplasma, el periplasma y el espacio extracelular. La elección de un sistema de expresión para la producción de grandes cantidades de proteínas recombinantes depende de muchos factores como son las características del crecimiento celular, los niveles de expresión, la actividad biológica de la proteína diana, etc... Esto hace que la expresión de proteínas en cada uno de estos compartimentos presente una serie de ventajas e inconvenientes.

Cuando la producción de proteínas recombinantes en altos niveles se desarrolla en el citoplasma celular, normalmente se depositan en forma de cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión son formaciones de acúmulos de productos intermedios de plegamiento o de proteínas desplegadas. Actualmente se han desarrollado diversas técnicas para evitar la formación de dichos cuerpos de inclusión y de este modo favorecer la expresión de la proteína plegada en su conformación activa. Algunas de estas estrategias incluyen la co-expresión de moléculas tipo chaperonas (Bessette et al. 1999, Wall, Plückthun 1995), el uso de cepas deficientes en tioredoxina para mantener un potencial redox favorable (Derman et al. 1993, Proba, Ge & Plückthun 1995), la reducción de los niveles de síntesis (Bowden, Georgiou 1990), condiciones de cultivo a bajas temperaturas (Studier 2005) y el uso de polipéptidos altamente solubles para la fusión con la proteína diana. Sin embargo, muchas de estas técnicas no parecen ser adecuadas para todas las proteínas. Además la purificación de la proteína recombinante en forma soluble del citoplasma celular es relativamente complicada ya que es el compartimento que contiene la mayor parte de las proteínas bacterianas.

La presencia de cuerpos de inclusión de proteínas recombinantes como consecuencia de su expresión elevada (sobre-expresión) se ha observado en diferentes sistemas de hospedador como son organismos procariotas, levaduras y diversas líneas celulares de eucariotas superiores. No existe una correlación directa entre la tendencia a formar cuerpos de inclusión y las propiedades intrínsecas de la proteína, por lo que la formación de éstos parece ser en muchos casos consecuencia de altos niveles de expresión e independiente del sistema y de la proteína expresada (Gribskov, Burgess 1983). Sin embargo, en el caso de proteínas con puentes disulfuro, se puede prever la formación de cuerpos de inclusión si la proteína se produce en el citoplasma de la bacteria, ya que la formación de estos puentes no es factible en este compartimento reductor de la célula, y como consecuencia, se produce un plegamiento incorrecto que conlleva la agregación de la proteína (Lilie, Schwarz & Rudolph 1998).

Aunque la producción de proteínas inactivas en forma de cuerpos de inclusión tiene importantes inconvenientes, también presenta ventajas como son la protección que esta

conformación ofrece frente a degradaciones proteolíticas y la posibilidad de producir proteínas recombinantes que pudiesen resultar tóxicas o incluso letales para la célula hospedadora, ya que su acumulación en forma de cuerpos de inclusión resulta un método adecuado para mantener el producto en su forma inactiva (Vallejo, Rinas 2004b). Además, las propiedades físicas de estos cuerpos de inclusión permiten que puedan ser acumulados en gran medida en el citoplasma celular, más que cualquier proteína soluble y a su vez, pueden ser aislados por simple centrifugación permitiendo una purificación sencilla de los mismos y en consecuencia, de la proteína de la que están formados mayoritariamente. De este modo, se reduce el procesamiento posterior para eliminar contaminantes de dichos cuerpos de inclusión (Choi, Keum & Lee 2006).

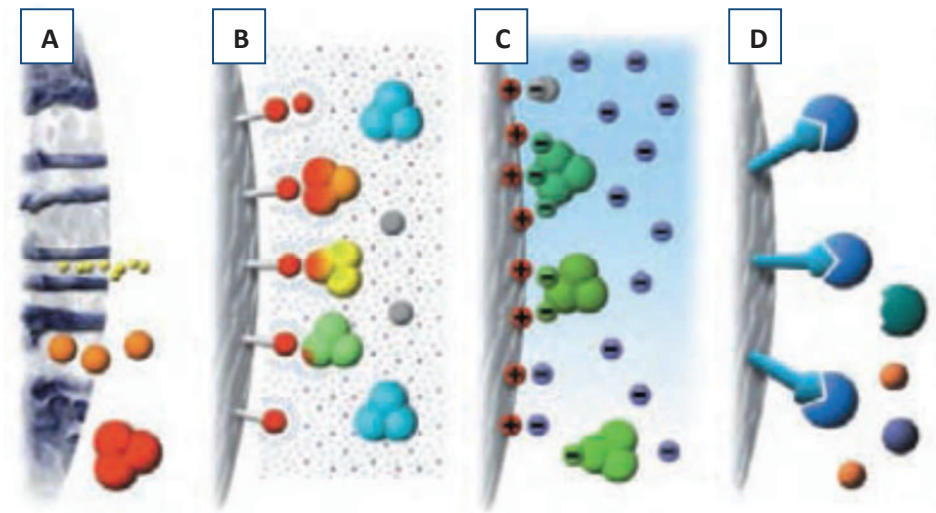
### **1.1. Aislamiento y solubilización de cuerpos de inclusión**

Los cuerpos de inclusión son partículas densas de proteína agregada que presentan una estructura amorfa o paracristalina (Oberg et al. 1994). Mediante estudios de caracterización se ha visto que los agregados poseen cierto grado de estructura secundaria, demostrando así que la naturaleza insoluble de los cuerpos de inclusión puede ser debida a su contenido de lámina  $\beta$  no presente en su forma nativa (Fink 1998, Seshadri, Khurana & Fink 1999). Para el aislamiento de dichos cuerpos de inclusión es necesaria la rotura previa de las células que los contiene. Esto puede lograrse mediante homogeneizadores de alta presión o procesos de sonicación o una combinación de métodos mecánicos, químicos y enzimáticos (como es el caso de la adición de lisozima que aumenta la eficacia de dicho proceso). La suspensión resultante de estos procesos se centrifuga a baja velocidad para separar y descartar la fracción soluble celular. Posteriormente se realizarán procesos de lavado para eliminar otros contaminantes y aquellas proteínas procedentes de la membrana celular que han precipitado junto con los cuerpos de inclusión al ser liberadas en la rotura de la célula. Estos lavados se realizan con soluciones tamponadoras que pueden contener EDTA y detergentes como el Tritón X-100 o deoxicolato sódico. De forma alternativa también se pueden usar gradientes de sacarosa para la separación de componentes celulares (Cardamone, Puri & Brandon 1995). Al realizar estos procesos de lavado con sucesivas centrifugaciones obtenemos la proteína de interés en un alto grado de pureza, posiblemente debido a las diferentes densidades de los contaminantes de la célula y los cuerpos de inclusión (De, B.C. 2001).

Existen una variedad de métodos para solubilizar los cuerpos de inclusión, sin embargo, la elección de dicho método puede influir notablemente en el plegamiento posterior de la proteína y en el coste del proceso. Los agentes solubilizantes más empleados

son los agentes caotrópicos o desnaturalizantes como el cloruro de guanidinio o la urea. Aunque tiene un alto coste, generalmente se prefiere el empleo de cloruro de guanidinio ya que las soluciones de urea pueden producir espontáneamente cianatos y éstos pueden carbametilizar grupos amino de la proteína. Además la solubilización con urea es pH dependiente por lo que se han de determinar las condiciones óptimas de pH para cada proteína en concreto (Estape, Rinas 1996). Algunos estudios han demostrado que los cuerpos de inclusión pueden ser solubilizados a pH extremos en presencia de bajas concentraciones de desnaturalizantes. Sin embargo, el tratamiento con pH extremos puede provocar modificaciones irreversibles de la proteína (Iwakura et al. 1992, Patra et al. 2000, Thatcher, Hitchcock 1994). También se han empleado diversos detergentes para solubilizar los cuerpos de inclusión. Este último método permite la posibilidad, en algunos casos, que la proteína solubilizada presente su actividad biológica, y por tanto, evitar la necesidad de realizar un proceso de plegamiento posterior. Sin embargo, dichos detergentes presentan la desventaja de poder interaccionar en las posteriores purificaciones de la proteína (Patra et al. 2000, De, B.C. 1998, Kim, Lee 2000, Gergiou, Valax 1999). A su vez, un agente quelante, como el EDTA o el EGTA, puede incluirse en la solución tamponadora solubilizadora para formar complejos con iones divalentes, cofactores de proteasas. Además es necesaria generalmente la adición de agentes reductores como el DTT o el 2-mercaptoetanol. Esto permite mantener los residuos de cisteína en su forma reducida y así prevenir y/o eliminar la formación de puentes disulfuro inter- e intramoleculares que no den lugar a la conformación nativa de la proteína y que se hayan podido generar por oxidación durante la rotura de las células. Alternativamente, los residuos reducidos de los grupos tioles pueden protegerse por la adición de mezclas de disulfuros, resultando así como sulfonatos (Lilie, Schwarz & Rudolph 1998, De Bernardez Clark 1998).

Como hemos indicado anteriormente, los cuerpos de inclusión solubilizados pueden estar contaminados por diferentes tipos de proteínas de la bacteria, ácidos nucleicos y componentes de la membrana. La presencia de estos contaminantes microbianos puede producir la agregación durante el plegamiento, reduciéndose así el rendimiento total. Para evitar este hecho, en muchas ocasiones se incluye un proceso de purificación previo a la renaturalización. Este proceso de purificación generalmente se realiza mediante algún tipo de cromatografía.



**Figura 10. Esquema de tipos de cromatografía para la purificación de la proteína de interés desde los cuerpos de inclusión.** A. cromatografía de exclusión molecular; B, cromatografía de interacción hidrofóbica; C, cromatografía de intercambio iónico; D, cromatografía de afinidad.

## 1.2. Renaturalización de la proteína solubilizada

En general, los métodos empleados para la solubilización de los cuerpos de inclusión dan lugar a una proteína soluble desprovista de su conformación nativa. Para conseguir dicha conformación, y por tanto su actividad biológica, debe exponerse dicha proteína a condiciones que favorezcan su renaturalización. Para ello pueden utilizarse diferentes métodos, entre los que se incluyen la dilución, diálisis, diafiltración, métodos cromatográficos o inmovilización en un soporte sólido, que permitan eliminar el exceso de agente desnaturizante y de agentes reductores. Además también pueden ser necesarias condiciones redox específicas para aquellas proteínas que contengan en su estructura nativa puentes disulfuro. En todo caso, el estudio y elección de un correcto método de renaturalización es fundamental en estos procesos de producción, puesto que repercuten directamente en el rendimiento, y por tanto, en el coste final de la proteína producida.

Debido a su simplicidad, la **dilución** de la proteína desnaturizada en la solución tamponadora de plegamiento es el método más empleado a pequeña escala. Su principal desventaja es la necesidad de grandes volúmenes de solución tampón y la realización de un proceso de concentración posterior. Sin embargo, tiene la ventaja de mantener la proteína en bajas concentraciones, por lo que previene la agregación de ésta. Por otro lado, en el método de **diálisis** o **diafiltración**, al contrario de lo ocurre en la dilución, el cambio de la solución tamponadora ocurre de forma gradual y se ha descrito que la exposición de la

proteína a concentraciones intermedias del agente desnaturizante durante el proceso puede causar la agregación de ésta (De Bernardez Clark et al. 1999). En el caso de la **diafiltración**, aunque es un proceso más rápido, puede producirse una acumulación de la proteína desnaturizada sobre la membrana de filtración, debido a que se fuerza a través de ella el intercambio de la solución, por lo que puede limitar su aplicación (West, Chaudhuri & Howell 1998). La utilización de métodos cromatográficos como la **cromatografía de exclusión molecular** o la **cromatografía de interacción hidrofóbica** permiten, además del cambio de solución de plegamiento, cierto grado de purificación de la proteína de interés. En la cromatografía de exclusión molecular, la solución de proteína desnaturizada es inyectada a la columna previamente equilibrada con la solución tamponadora de plegamiento. Posteriormente, la elución con dicha solución tampón permite recuperar la proteína renaturalizada a altas concentraciones comparando con las obtenidas en el método de dilución, aunque los rendimientos obtenidos son bajos. La posible agregación de la proteína puede dificultar el flujo de la cromatografía, sin embargo, dichos agregados pueden verse reducidos por simple separación física al forzar su paso por la estructura porosa de la columna e incluso por su resolubilización con el volumen remanente de desnaturizante, permitiendo así otra oportunidad para su correcto plegamiento (Batas, Chaudhuri 1996, Muller, Rinas 1999). En el caso de la cromatografía de interacción hidrofóbica, la proteína desnaturizada es inyectada a la columna a altas concentraciones de sales. Ésta se adsorbe por sus regiones hidrofóbicas a la matriz de la columna creando micro-dominios, alrededor de los cuales se pueden formar los elementos estructurales de la conformación nativa de la proteína. Durante la migración a través de la columna con un gradiente decreciente de sales, la proteína sufrirá diversas etapas de adsorción y desorción controladas por la hidrofobicidad de los intermediarios, resultando finalmente en la formación de la estructura nativa (Geng, Quan 2002). En el método de **inmovilización a un soporte sólido**, la unión de la proteína desnaturizada a la matriz debe formar un complejo matriz-proteína estable en presencia de agentes caotrópicos. Posteriormente el cambio a la solución tamponadora de plegamiento debe realizarse mediante los métodos anteriormente citados, como la dilución, diálisis, etc... Además es necesario que la separación de la matriz de la proteína renaturalizada sea un proceso sencillo. Debido a la unión selectiva de este método, se puede conseguir a su vez la purificación de la proteína (Schlegl et al. 2003, Stempfer, Holl-Neugebauer & Rudolph 1996).

### 1.2.1. Condiciones de renaturalización

Aparte de las técnicas anteriormente mencionadas, para establecer las condiciones de plegamiento adecuadas se deben tener en cuenta una serie de parámetros físicos y químicos que pueden ser críticos en el rendimiento final de la obtención de la proteína activa. Estos parámetros son el pH y la fuerza iónica de la solución tamponadora, la temperatura y el tiempo de incubación, y la concentración, pureza y naturaleza de la proteína de interés. Es importante minimizar la exposición de la proteína a condiciones que puedan degradar la cadena polipeptídica, como por ejemplo valores de **pH** alcalinos. La **temperatura** tiene un efecto doble, por una parte influye en la velocidad del proceso de plegamiento y por otra, condiciona la tendencia a la agregación de la proteína. Existe un rango de temperatura en el cual cada proteína es estable termodinámicamente en una solución tampón. En general, bajas temperaturas evitan la agregación pero a su vez, incrementan el tiempo requerido para la renaturalización de la proteína (Vallejo, Rinas 2004b). Sin embargo, los parámetros más críticos en el rendimiento del proceso de plegamiento son la **concentración** y la **pureza** de la proteína. El plegamiento correcto de la proteína implica interacciones intramoleculares y cinéticas de primer orden mientras que la agregación de la proteína es un fenómeno de interacciones intermoleculares y cinéticas de segundo orden o mayores. Esto último depende íntimamente de la concentración de proteína. Por lo tanto, la forma más inmediata de disminuir la agregación es disminuyendo la concentración de la proteína en el proceso de renaturalización. No obstante, esto supone elevados volúmenes de solución de plegamiento, y por tanto, una mayor dificultad de manipulación y un mayor coste.

También existen aditivos químicos que pueden favorecer el proceso de renaturalización. Por ejemplo, la L-arginina es actualmente el más utilizado e impide la formación de agregados mejorando la solubilidad de las especies intermedias de plegamiento. Otros aditivos de bajo peso molecular como detergentes, agentes estabilizadores como el glicerol o incluso bajas concentraciones de desnaturalizantes favorecen dicho proceso (De, Schwarz & Rudolph 1999). No siempre bajas concentraciones de agentes desnaturalizantes resultan efectivos en el plegamiento de proteínas, por ejemplo en el caso del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) concentraciones del rango de 0,25M de cloruro de guanidinio inhiben la dimerización oxidativa de dicha proteína (Muller, Rinas 1999). También la proteína BMP-2 presenta dificultades en el proceso de plegamiento a bajas concentraciones de urea (Biron 1999).

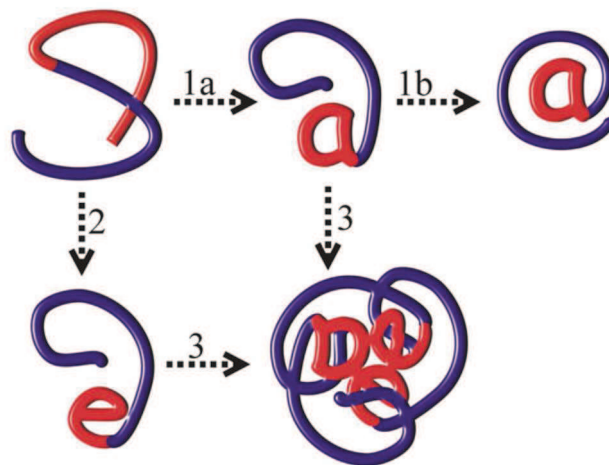
Dado que la competición entre agregación y plegamiento en sistemas *in vivo* está modulada por la presencia de chaperonas, no sorprende que tales proteínas puedan haber sido empleadas en procesos de renaturalización *in vitro*. La principal chaperona de *E. coli* es GroEL y está implicada en el plegamiento *in vivo* del 10% de las proteínas de nueva síntesis en condiciones normales de crecimiento y el 30% en condiciones de estrés. Sin embargo, la aplicación de estas chaperonas está limitada debido a que son proteínas que necesitan ser eliminadas de la solución de renaturalización al final del proceso y son costosas de producir, a menos que se implante un esquema de recuperación y reutilización (Altamirano et al. 1999, King 1997).

### 1.2.2 Formación de puentes disulfuro durante el plegamiento

En el caso de las proteínas con puentes disulfuro, la solución tamponadora de plegamiento debe promover la formación de los mismos (oxidación). Algunos de los métodos más comunes utilizados durante el proceso de plegamiento son la oxidación con aire u oxígeno y el uso de agentes químicos en forma de sistemas rédox. Aunque la oxidación con aire y oxígeno en presencia de trazas de iones metálicos es un método simple y económico, el nivel de plegamiento es muy bajo ya que la transferencia de oxígeno a través de soluciones acuosas es un proceso lento. Se puede mejorar incrementando la agitación pero esto puede aumentar a su vez el riesgo de agregación de la proteína. Los niveles más altos de oxidación así como de renaturalización pueden obtenerse utilizando reactivos rédox, normalmente tioles de bajo peso molecular en su forma oxidada y reducida que permiten la formación y el remodelado de los puentes disulfuro. Estas condiciones provocan una serie de rápidas reacciones de intercambio de grupos tioles hasta que la proteína alcanza la conformación de puentes disulfuro más estable, que suele coincidir con el estado nativo de la misma (Choi, Keum & Lee 2006). Los agentes rédox más comunes son el glutatión reducido y oxidado, aunque los pares cisteína/cistina, cisteamina/cistamina y DTT/glutatión oxidado también se han utilizado con éxito. Una desventaja de este método de sistema rédox es el alto coste de algunos reactivos especialmente el glutatión (Lilie, Schwarz & Rudolph 1998). Se ha mejorado el rendimiento del plegamiento por el empleo, junto con el sistema rédox, de la proteína disulfuro isomerasa. Dicha proteína cataliza *in vivo* el plegamiento mediante la formación de puentes disulfuro y ha sido utilizada en sistemas *in vitro*. Sin embargo, hay que tener en cuenta que concentraciones residuales de agentes caotrópicos en la solución tamponadora de plegamiento reducen notablemente la actividad de dicha enzima (Gilbert 1997, Hawkins, Freedman 1995).

### 1.2.3 Agregación vs plegamiento

La formación de especies mal plegadas y agregados es la principal causa de la disminución del rendimiento de renaturalización. El conocimiento del mecanismo de formación de la agregación puede ser la clave para poder plegar una proteína a concentraciones moderadas. Se cree que los intermedios de plegamiento poseen un porcentaje significativo de estructura secundaria, pero poca estructura terciaria de la proteína nativa. Los intermedios, con zonas hidrofóbicas expuestas al solvente, juegan un papel crucial en el desplazamiento del equilibrio que se forma entre el estado agregado y el estado plegado. Estas zonas hidrofóbicas suelen encontrarse en la zona interna de la conformación nativa. Cuando las cadenas polipeptídicas se encuentran separadas, estas regiones hidrofóbicas interactúan entre sí como consecuencia de su exposición a un solvente generalmente acuoso haciendo que el proceso se desvíe hacia el estado agregado en vez de hacia el estado nativo.



**Figura 11. Modelo simplificado del plegamiento correcto de una proteína contra la agregación.** (1) indica el plegamiento correcto. (2) y (3) indican la agregación. Las líneas azules representan las partes hidrofílicas de la proteína mientras que las líneas rojas muestran las partes hidrofóbicas (Vallejo, Rinas 2004b).

A pesar de que se han desarrollado muchos procesos de plegamiento eficaces utilizando diferentes aditivos que interfieren con las interacciones intermoleculares responsables de la agregación, el plegamiento *in vitro* de cada proteína recombinante es hasta el momento, un proceso que debe determinarse empíricamente, ya que las condiciones que funcionan para una proteína pueden no funcionar para otras.

## **2. PRODUCCIÓN DE BMP-2**

La BMP-2 humana es una proteína con actividad osteoinductora, con multitud de aplicaciones potenciales en campos como traumatología y odontología, y por tanto, de alto interés tanto clínico como comercial. Actualmente, la BMP-2 está disponible comercialmente para ser empleada en clínica en el tratamiento de fracturas severas de tibia, fusión espinal, cirugía maxilofacial, etc... (Govender et al. 2002, Burkus et al. 2003). Se necesitan altas dosis de BMP-2 para el tratamiento clínico y los rendimientos de producción de rhBMP-2 descritos hasta la fecha son relativamente bajos, lo que incrementa los costes de su aplicación (Yano et al. 2009) (Bessho et al. 2000). En el caso de las BMPs, el hueso y otros tejidos contienen bajas cantidades de dichas proteínas. Se estima que la cantidad de BMP-2 presente en el hueso es de dos microgramos por kilogramos de hueso cortical. De este modo, aunque la BMP-2 ha sido aislada directamente del hueso, se obtienen muy bajos rendimientos. Además se trata de un proceso de gran complejidad para conseguir la proteína purificada y se limita su aplicación clínica por el alto riesgo asociado a los donantes alogénicos (Wang et al. 1988, Bessho et al. 1999, Urist et al. 1987, HU et al. 2009).

La BMP-2 humana, como otras proteínas de este grupo, ha sido clonada y actualmente se puede obtener de manera recombinante (rhBMP-2) utilizando diferentes sistemas de expresión en varios hospedadores como bacterias, células de mamífero, células de insecto infectadas por baculovirus, etc... Sin embargo, la dificultad de producción de BMP-2 radica en la complejidad de la proteína. Se han realizado numerosos estudios para mejorar la producción en masa de BMP-2, pero el alto grado de complejidad dificulta enormemente esta tarea.



**Figura 12. Topografía de plegamiento de la BMP-2 cristalizada:** las  $\alpha$ -hélice se indican como espirales y las hebras- $\beta$  como flechas; los puentes disulfuro se muestran como líneas verdes. Cada subunidad se ha coloreado de azul y naranja. (Scheufler, Sebald & Hülsmeier 1999)

Uno de los métodos más empleados para la obtención de rhBMP-2 es mediante células de mamíferos. Éstas son capaces de producir proteínas heterólogas o proteínas que normalmente no son sintetizadas por dichas células. De este modo, mediante el uso de vectores adecuados, es posible introducir el gen de interés en las células y controlar su transcripción y traducción. Además, con este sistema de expresión se produce el plegamiento correcto de la proteína y las modificaciones postraduccionales necesarias. La línea celular más empleada en la producción de proteínas recombinantes es las células CHO (Chinese hamster ovarian) (Wang et al. 1990, Israel et al. 1996, Bessho et al. 2000). Alternativamente, se han utilizado otras líneas celulares como células de riñón embrionarias humanas (HEK-293T), células de mieloma de ratón (NS0), células de riñón de cría de hámster (BHK), y otras. Actualmente las células de mamífero son el sistema más empleado en la producción de proteínas recombinantes para aplicaciones clínicas ya que en el caso de las BMPs, las que están aprobadas para su uso clínico están producidas en células

CHO (rhBMP-2 en el caso de Infuse® y rhBMP-7 en OP-1®). Sin embargo, los principales inconvenientes de este sistema de expresión son los bajos rendimientos del proceso y su coste elevado (reactivos para la transfección, medios especializados y personal cualificado) (Israel et al. 1992).

Existen otros sistemas de expresión unicelulares tales como células de insectos infectadas mediante baculovirus que portan el material genético de la proteína BMP-2. En este caso, las proteínas expresadas mediante este método suelen tener diferentes patrones de glicosilación postraducciona l e igualmente presentan bajos rendimientos y un coste elevado. (Maruoka et al. 1995, Hazama et al. 1995, Goosen, Daugulis & Faulkner 1993, Kost, Condreay & Jarvis 2005, Hu 2005).

También se han empleado organismos multicelulares para la expresión de rhBMP-2. Es el caso del uso de plantas transgénicas como la planta del tabaco. Este sistema de expresión tiene la ventaja de su bajo coste y la posibilidad de que la proteína de interés pueda ser acumulada en diferentes orgánulos. Sin embargo, su principal inconveniente es el bajo nivel de acumulación y por tanto la dificultad de la purificación. (Gao et al. 2006).

Otra alternativa para la producción de rhBMP-2 es el empleo de *Escherichia coli*. Como se ha indicado anteriormente, dicho sistema de expresión, a pesar de ser un proceso de bajo coste y en el que se obtienen grandes cantidades en comparación con otros métodos de expresión, tiene varios inconvenientes que suscitan el interés en mejorar dicho procedimiento. Así numerosos estudios se han centrado en la mejora de diferentes partes de este proceso.

En la etapa del **cultivo** de *E. coli* se han desarrollado técnicas para mejorar el rendimiento de la producción de la proteína. Es el caso del cultivo en alta densidad celular (HCDC) (Korz et al. 1995, Vallejo et al. 2002) que se basa en emplear un biorreactor donde se controla todos los parámetros que pueden afectar al proceso como la temperatura, el pH e incluso el aporte de nutrientes y de oxígeno. De este modo, en sucesivos trabajos (Vallejo et al. 2002, Bessa et al. 2007) se ha empleado dicho método para la producción de rhBMP-2 consiguiendo gran cantidad de células por litro de cultivo.

Otra etapa del proceso de producción de rhBMP-2 en *E. coli* altamente estudiada es la **renaturalización** de la proteína. Esto es debido a que es necesario controlar muchos parámetros que influyen en gran medida en la formación correcta de los puentes disulfuro de la BMP-2 y, por tanto, en su actividad *in vitro* e *in vivo* (Ruppert, Hoffmann & Sebald 1996, Wozney et al. 1988, Von Einem, Schwarz & Rudolph 2010). Se han examinado exhaustivamente variables como el pH, las condiciones rédox, la concentración de la

proteína, la temperatura e incluso la presencia de aditivos de carácter desnaturizante (urea, cloruro de guanidinio) que eviten la agregación durante el proceso (Vallejo, Rinas 2004a, Long et al. 2006).

Curiosamente no existen trabajos expresamente centrados en estudiar y mejorar los procesos de **purificación** de la proteína, procesos que influyen estrechamente en el resto de las etapas de la producción. Puesto que la rhBMP-2 nativa tiene un lugar de unión a heparina, la columna de cromatografía más ampliamente utilizada es la de afinidad por heparina (Vallejo, Rinas 2004a, Long et al. 2006, Gueorguieva et al. 2006). Además, se han empleado otro tipo de cromatografías como la His-Trap (IMAC), pero para ello es necesario proporcionarle (mediante el vector de clonación) a la cadena polipeptídica de la proteína una cola de histidina capaz de unirse a dicha columna (Bessa et al. 2007).

### **3. OBJETIVO PARCIAL: OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE rhBMP-2**

La mejora en la producción de rhBMP-2 en *E. coli* es objeto de estudio en el grupo de Ingeniería de Tejidos de la Universidad Complutense de Madrid. Anteriormente al trabajo que aquí se presenta, en nuestro laboratorio se estableció un proceso de producción de rhBMP-2 en *E. coli*, y se estudiaron las condiciones óptimas en la etapa de renaturalización (González Muñoz 2004). Paralelamente, se creó una empresa de base tecnológica para la producción de rhBMP-2 a escala comercial.

En este apartado se presentan los estudios realizados para continuar con la mejora del rendimiento del proceso, estudios que están centrados principalmente en los procesos de purificación, el gran olvidado en los estudios publicados, pero de suma importancia tanto para una correcta renaturalización como para la puesta en el mercado del producto. En concreto, se describen nuevos parámetros en columnas de cromatografía y en la etapa de renaturalización, que permiten obtener mejores rendimientos disminuyendo así los costes del proceso. Además, se incluyen estudios para la recuperación de proteína de aquellas fracciones que inicialmente eran desechadas durante la producción de rhBMP-2. Todos estos trabajos han ido dirigidos a mejorar, simplificar, incrementar y economizar la producción de rhBMP-2 biológicamente activa mediante su expresión en *E. coli*.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

Todos los reactivos que se emplearon en este trabajo fueron suministrados por Sigma-Aldrich® España, a no ser que se especifique lo contrario. Todas las disoluciones se prepararon con agua desionizada ultrapura (Milli-Q Advantage, Millipore) y se filtraron por un tamaño de poro de 0,45 µm y/o 0,22 µm.

### 2. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS

En este trabajo se utilizaron dos cepas bacterianas de *Escherichia coli*:

- DH5α: One Shot® MAX Efficiency® DH5α™-T1R Competent Cells (Invitrogen™).
- BL21: One Shot® BL21(DE3) Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen™).

La cepa DH5 α se empleó tanto para la propagación de la secuencia, debido a su gran capacidad replicativa, como para la conservación, en forma de gliceroles, de dichos clones transformados con el gen de rhBMP-2. La cepa BL21 se empleó para la expresión y producción de la proteína recombinante.

**Tabla 4. Genotipo/Fenotipo de las cepas bacterianas empleadas.**

Cepa	Genotipo/Fenotipo
DH5α™-T1R	F-φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA</i> (confiere resistencia al bacteriofago T1 y T5)
BL21 (DE3)	F- <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (rB-mB <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3)(portador del gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor <i>lacUV5</i> )

Junto con *E. coli* se emplearon dos plásmidos diferentes:

- El plásmido pBluescript (BS), que es específico para obtener un gran número de copias y que se utilizó siempre junto con la cepa DH5α.
- El vector plasmídico pT7.7, que contiene un promotor específico para expresar proteínas y que se utilizó junto con la cepa DH5α para su propagación y con la cepa BL21 para la expresión de la proteína de interés.

### 3. MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS PARA *E.coli*

Para la preparación de los medios se siguieron las indicaciones del manual de laboratorio "Molecular Cloning" (Sambrook 1989). Los cultivos de *E. coli* en medio sólido se realizaron con medio LB (Luria-Bertani: compuesto por 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de cloruro sódico) complementado con agar al 2% (masa/volumen) y ampicilina a una concentración de 0,1 mg/mL. Los cultivos de *E. coli* en medio líquido se realizaron con medio TB (Medio Terrific Broth: compuesto por 12 g/L de triptona, 24 g/L de extracto de levadura, 4 mL/L de glicerol, dihidrógeno fosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a una concentración de 0,17M e hidrógeno fosfato de potasio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) a una concentración 0,72M).

Todos los medios de cultivo empleados en el crecimiento de *E.coli* se prepararon con agua desionizada (Milli-Q Advantage, Millipore) y se esterilizaron por calor húmedo en autoclave a 121°C durante 20 minutos. La ampicilina se añadió posteriormente filtrada en condiciones de esterilidad con filtros estériles de tamaño de poro de 0,22 µm (Millipore).

### 4. CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS

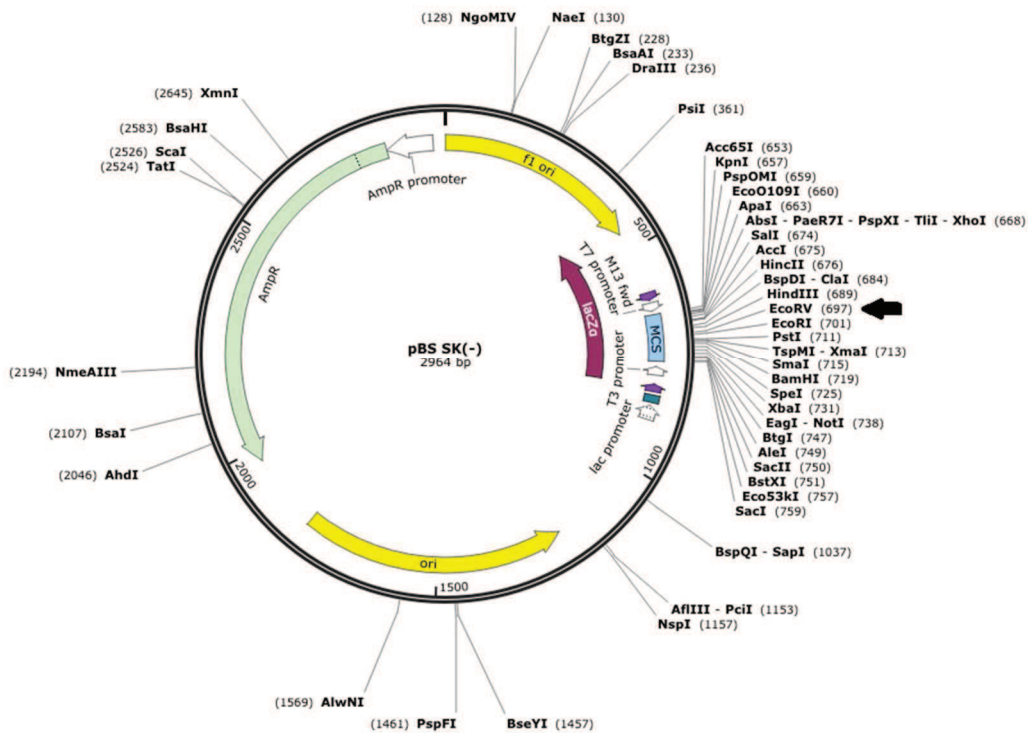
Las construcciones aquí descritas fueron generadas por el doctor Jesús García-Cantalejo. La secuencia de DNA codificante de la proteína BMP-2 humana se obtuvo mediante amplificación por PCR a partir de una librería genómica de placenta humana (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA). Las secuencias de los cebadores se dedujeron de las secuencias previamente descritas por Wozney, 1988 (Wozney et al. 1988). En un extremo de cada oligonucleótido se añadió la secuencia correspondiente al sitio de restricción **EcoRV**. Tras resolver los productos de PCR, el fragmento con el tamaño esperado fue digerido con EcoRV, clonado en el vector B.S. (SK-) y con él se transformó la cepa DH5α de *E.coli*.

A partir de este vector B.S. con la secuencia completa de BMP-2 se obtuvo la secuencia de la proteína BMP-2 madura. Para ello se realizó una segunda amplificación de DNA con el mismo cebador 3' utilizado anteriormente y con un nuevo oligonucleótido 5' que además introduce un codón de iniciación y un sitio de restricción **NdeI**. Así se obtuvo el fragmento esperado para la secuencia que codificaría la BMP-2 madura (0,34 Kb). Este fragmento se insertó en el plásmido pT7.7 mediante digestión previa con EcoRV y NdeI. La construcción se utilizó para transformar la cepa DH5α y se secuenció (ABI Prism 3730,

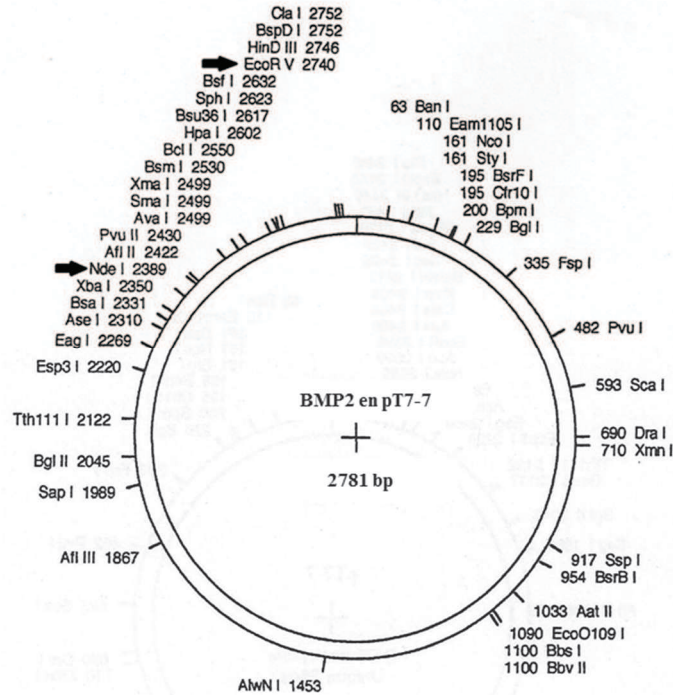
Applied Biosystems) para comprobar que la secuencia de nucleótidos clonada era idéntica a la descrita.

**Tabla 5. Cebadores empleados para la obtención de la secuencia de rhBMP-2 madura a partir de placenta humana.** Subrayado se indica la secuencia reconocida por la enzima de restricción.

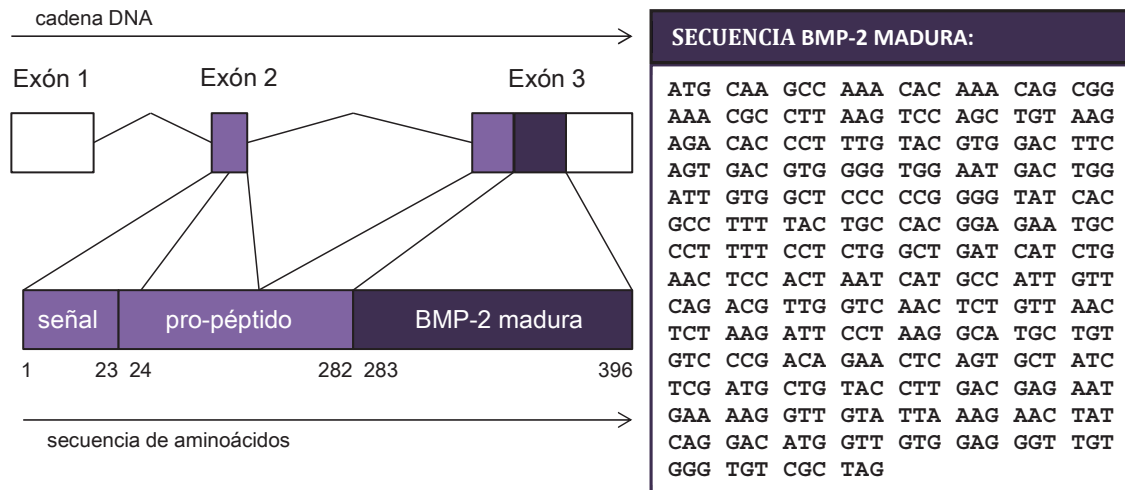
	Sitio de restricción	Secuencia	Sentido
1º clonaje (pre-proteína)	EcoRV	TAA <u>GAT ATC</u> ATG GTG GCC GGG ACC CGC	directo
	EcoRV	AAA <u>GAT ATC</u> CTA GCG ACA CCC ACA ACC CTC	reverso
2º clonaje (proteína madura)	NdeI	AAG AGA <u>ACA TAT GCA</u> AGC CAA ACA C	directo
	EcoRV	AAA <u>GAT ATC</u> CTA GCG ACA CCC ACA ACC CTC	reverso



**Figura 13. Mapa de restricción del vector B.S. (SK-).** La flecha indica el sitio de restricción EcoRV donde se clonó el inserto de la BMP-2.



**Figura 14. Representación del mapa de restricción de la construcción pT7.7--BMP-2.** Las flechas indican los extremos del inserto de la BMP-2 madura (sitios de restricción de las enzimas Nde I y EcoRV).



**Figura 15. Representación del gen de BMP-2.** Contiene 3 exones representados por cuadrados y dos intrones representados por líneas. La región codificante está representada en color localizada en los exones 2 y 3. El dominio maduro de la BMP-2 humana (secuencia nucleotídica indicada a la derecha) está íntegramente localizada en el exón 3 correspondiendo a los aminoácidos 283-396 (Bessa et al. 2007).

Para la conservación a largo plazo de cepas bacterianas generadas se congelaron alícuotas de aproximadamente 1 mL en el medio de cultivo correspondiente con glicerol al 15% (v/v) y se mantuvieron a -80°C.

## 5. PRODUCCIÓN DE rhBMP-2 EN *E. coli*

Como se ha indicado anteriormente la clonación de rhBMP-2 se realizó en el vector pT7.7. Dicho vector requiere de la actuación de la RNA polimerasa del fago T7, cuya secuencia se encuentra en el cromosoma de la cepa BL21 (DE3) y codificada bajo el control del promotor *lac UV5*. Así, para la expresión de rhBMP-2 en *E. coli* es necesario introducir el plásmido pT7.7-BMP-2 en esta cepa BL21 y además una posterior inducción de la expresión de la RNA polimerasa del fago T7 mediante IPTG, que actuará sobre el promotor *lac UV5* (Figura 16). Indicar también que en dicho sistema de expresión la RNA polimerasa es tan activa que niveles basales de dicha enzima pueden dirigir a una expresión mínima de la proteína clonada, incluso en ausencia de agente inductor (Studier 2005, Romano et al. 2009).

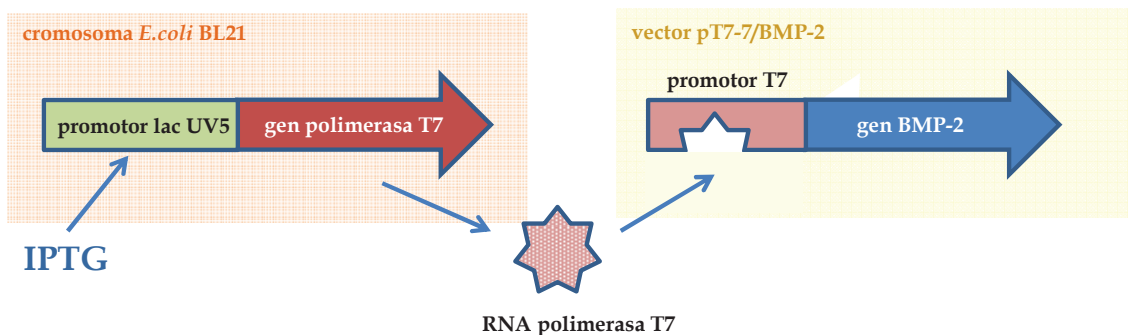


Figura 16. Representación de la inducción de expresión del gen de BMP-2 mediante IPTG.

### 5.1. Transformación de la cepa BL21 de *E. coli* con pT7.7-rhBMP-2

En condiciones estériles se sembró en medio TB la cepa de *E. coli* DH5α con el plásmido pT7.7 portador de la secuencia de rhBMP-2 (glicerol conservado a -80°C). Se incubó en agitación a 37°C y 160 rpm durante toda la noche. Se recogió todo el volumen en eppendorf y se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto para recoger el sedimento de células. Posteriormente se realizó la extracción de DNA plasmídico con el Kit "QIAprep Spin Miniprep Kit" (Quiagen). Se obtuvo un volumen final de 50 µL de DNA.

Para la transformación de la cepa BL21 con nuestro vector plasmídico se siguieron las indicaciones del fabricante de las células competentes empleadas. Dichas condiciones se detallan a continuación:

Se toma una alícuota de células competentes y se mantiene en hielo. Se añade a las células entre 5 y 10 ng del DNA de interés en un volumen de entre 1 y 5  $\mu\text{L}$  y se mezcla suavemente (sin pipetear). Se incuba el vial durante 30 minutos en hielo. Posteriormente se incuba en un baño de agua a  $42^{\circ}\text{C}$  sin agitación durante 30 segundos e inmediatamente se vuelve a pasar al hielo durante al menos 3 minutos. Con esto se provocará el choque térmico que permitirá que el plásmido se introduzca en la célula bacteriana. Se añaden 250  $\mu\text{L}$  del medio de cultivo atemperado al vial de células y se incuba durante 1 hora en un agitador a  $37^{\circ}\text{C}$  y 225 rpm. Pasado este tiempo se siembran entre 20 y 200  $\mu\text{L}$  en placas Petri con LB-Agar y se incuban en posición invertida a  $37^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche.

Tras dicho crecimiento las placas se guardaron a  $4^{\circ}\text{C}$  y se consideraron viables para su uso durante un máximo de 2 meses. Se seleccionaron 3 o 4 colonias y se caracterizaron para asegurarse de la correcta transformación.

### 5.1.1. Caracterización del plásmido insertado

Se llevó a cabo una digestión del plásmido insertado en BL21 para comprobar que el plásmido contiene el inserto de la rhBMP-2 y, por tanto, que es el que debemos emplear para la posterior expresión de la proteína. Conociendo el mapa de restricción del plásmido pT7.7 con el inserto de rhBMP-2 y la secuencia de éste, y apoyándonos en herramientas como “NEBcutter V2.0, BioLabs<sup>®</sup>inc”, se seleccionaron tres enzimas para realizar tres digestiones paralelas de dicho DNA: Hind III, Xba I y HinC II. Las enzimas fueron suministradas por Invitrogen<sup>™</sup>. Tanto Hind III como Xba I poseen un único sitio de corte en el plásmido de interés por lo que deberíamos obtener un fragmento lineal de 2.781 pares de bases. Sin embargo, la enzima HinC II posee 3 sitios de corte por lo que se deberían obtener tres fragmentos de 1.939, 833 y 9 pares de bases.

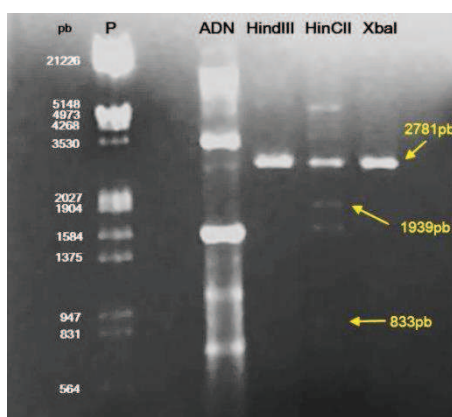
**Tabla 6. Tabla indicativa de los sitios de corte de cada enzima.**

Hind III	Xba I	HinCII
5'-A↓AGCTT-3'	5'-T↓CTAGA-3'	5'-GT(T/C)↓(A/G)AC-3'
3'-TTCGA↑A-5'	3'-AGATC↑T-5'	3'-CA(A/G)↑(T/C)TG-5'

Por tanto, se transfirió una colonia bacteriana obtenida en el proceso de transformación en aproximadamente 5 mL de medio TB y se incubó en agitación a 37°C y 160 rpm durante toda la noche. Se recogió todo el volumen en eppendorf y se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto para recoger el sedimento de células. Posteriormente se realizó la extracción de DNA plasmídico con el Kit “*QIAprep Spin Miniprep Kit*” (Quiagen). Se obtuvo un volumen final de 50 µL de DNA.

La digestión del DNA se llevó a cabo mezclando 1 µL de enzima, 2 µL de sales necesarias a concentración 10X suministradas con la propia enzima, ≤ 1 µg de DNA y agua destilada ultra-pura hasta un volumen total de 20 µL. En el caso de la enzima Xba I además se añadió 2 µL de albúmina de suero bovina a una concentración de 0,1%. Dicha mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C.

Se realizaron geles de electroforesis para visualizar los fragmentos de DNA obtenidos tras la digestión con las enzimas citadas anteriormente. De este modo, se prepararon geles de agarosa al 1% (p/v) en la solución tamponadora Tris-Borato-EDTA (TBE) a una concentración 1X. Se añadieron 3 µL de bromuro de etidio (Fluka, al 1% en agua) por cada 50 mL de gel. Se cargaron 5 µL de muestra en cada pocillo del gel en una proporción de 4:1 (muestra:tampón de carga) y un patrón de DNA para analizar el tamaño de las bandas (Lambda DNA+EcoRI+HindIII). Se aplicó una corriente de 90 voltios durante 50 minutos aproximadamente. Posteriormente, para la visualización y análisis de los geles se observó el resultado en un transiluminador de luz ultravioleta y se realizó una fotografía con una cámara digital Kodak para su posterior análisis con el “Kodak Science software” (figura 17).



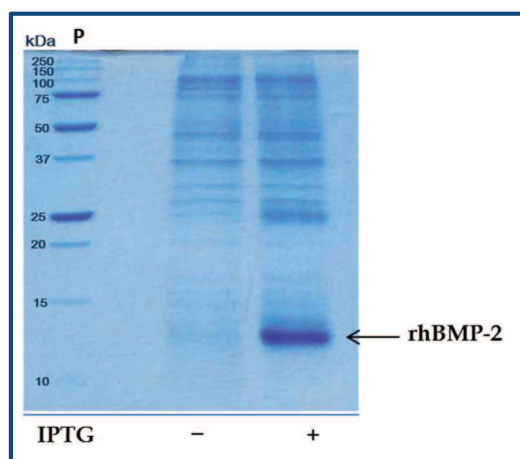
**Figura 17. Ejemplo fotografía de electroforesis de agarosa.** Se representan las digestiones de la construcción pT7.7-BMP-2 con tres enzimas de restricción. **P:** patrón molecular. En amarillo el tamaño de los fragmentos obtenidos.

## 5.2. Expresión de rhBMP-2

Para el crecimiento de *E.coli* transformada con nuestro plásmido de interés se utilizó material de laboratorio estéril. Se transfirió una colonia de las placas transformadas a un

pequeño volumen (~150 mL) de medio TB con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL, y se cultivó a 37°C y una agitación constante de 125 rpm durante 13 horas. El crecimiento se determinó midiendo la D.O. a 600nm empleando un espectrofotómetro de longitud de onda fija (Biochrom WPA CO8000). Dicho preinóculo se diluyó en matraces más grandes consiguiendo un D.O.<sub>600nm</sub> de 0,05 y se incubó en las mismas condiciones que el preinóculo de partida. Una vez alcanzada una D.O.<sub>600nm</sub> de entre 0,8-1 se produjo la inducción de la expresión de proteína añadiendo IPTG a una concentración final de 0,25 mM y se dejó incubando durante toda la noche. Se desecharon aquellos cultivos que no alcanzaron la D.O.<sub>600nm</sub> requerida en menos de 4 horas, puesto que el rendimiento de estos cultivos se mostró mucho menor.

El gel de electroforesis de la figura 18 muestra el contenido total de proteínas celulares obtenido en un cultivo de *E.coli* con y sin inducir con IPTG. Así, se puede observar la presencia de rhBMP-2 en el extracto de cultivo inducido con IPTG, mientras que en ausencia de inducción por IPTG la aparición de la proteína es mínima.



**Figura 18. Gel SDS-PAGE 15% del contenido total de proteínas celulares del cultivo de *E.coli* con y sin inducir con IPTG. P: marcador de pesos moleculares.**

La concentración empleada de dicho reactivo es de 0,25 mM ya que se ha descrito que altas concentraciones de IPTG pueden inhibir el crecimiento celular y la producción de proteínas recombinantes (Choi, Keum & Lee 2006).

### 5.3. Obtención y solubilización de los cuerpos de inclusión

Las células de *E.coli* cultivadas se recogieron mediante centrifugación a 4.000 rpm durante 15 minutos (centrífuga Eppendorf A.G. 5810R). Se realizaron varios lavados de dichas células con una solución tampón de tris 50 mM y EDTA 2mM a pH 8,0. Finalmente el sedimento de células se congeló a -20°C durante al menos 1 hora para favorecer la rotura posterior de la membrana celular.

Las células congeladas se suspendieron en una solución de sacarosa 0,375M, tris 10mM, EDTA 1mM y pH 8,0 y se sometieron a un proceso de lisado. En algunos casos dicha lisis celular se realizó indistintamente por sonicación (Soniprep 150, Sanyo) o mediante la aplicación de una presión homogénea de 15.000 psi (aproximadamente 100.000 kPa) en una prensa de French (French Press Cell Disrupter, Thermo Electron Corporation). Posteriormente, se recogieron los cuerpos de inclusión por centrifugación a 12.000 rpm durante 25 minutos y a 4°C. Se realizaron varios lavados de dichos cuerpos de inclusión con la misma solución tampón con la que se lavaron las células.

Finalmente se solubilizaron los cuerpos de inclusión en 30 volúmenes del peso del sedimento obtenido con una solución de urea 6M, tris 50 mM, EDTA 1mM a pH 8,0. Se dejó incubando toda la noche a temperatura ambiente. Por último, los cuerpos de inclusión solubilizados se centrifugaron a 12.000 rpm durante 25 minutos y a 4°C para eliminar restos insolubles. Se recogió el sobrenadante y se estimó la concentración de proteína en un espectrofotómetro UV/Vis (Specord 205, Analytic Jena) midiendo la absorbancia a 280nm. Se conservaron a una temperatura de 4°C.

#### 5.4. Purificación por cromatografía

Se realizaron distintos tipos de cromatografías de baja presión durante el proceso de producción de rhBMP-2. Dichos procesos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Para purificar los cuerpos de inclusión obtenidos y de este modo, obtener mejores rendimientos en el proceso de plegamiento (Vallejo, Rinas 2004a), se realizó una cromatografía de intercambio catiónico (*UNOsphere™ S Cation Exchange Support*, Bio-Rad). Los cuerpos de inclusión solubilizados se filtraron por 0,45 µm. Se cargó en la columna de cromatografía la cantidad correspondiente de proteína cumpliendo una proporción de 60 mg de proteína por mL de relleno de columna. Dicha columna fue equilibrada previamente con una solución idéntica a la empleada para solubilizar los cuerpos de inclusión. La rhBMP-2 se eluyó de la columna por un gradiente de concentraciones crecientes de cloruro sódico en urea 6M, tris 50 mM, a pH 8,0. Una vez determinado el perfil de elución, la rhBMP-2 fue eluida en tres pasos de concentraciones crecientes de cloruro sódico. Todos los contaminantes celulares presentes en forma soluble con los cuerpos de inclusión se eliminaron principalmente durante la elución de carga consiguiendo una purificación de la proteína mucho mayor.

Por otra parte, para purificar el dímero de rhBMP-2 obtenido tras el proceso de plegamiento, se realizó una columna de cromatografía de interacción hidrofóbica (*Phenyl Sepharose 6 Fast Flow*, GE Healthcare Life Science). La solución de plegamiento se mezcló a

partes iguales con una solución de sulfato amónico 2M, urea 6M, tris 50 mM a pH 8,0 para obtener una concentración de sulfato amónico 1M y de este modo, conseguir que la proteína quede adherida a la columna. Dicha columna fue equilibrada previamente con una solución de sulfato amónico 1M, urea 6M, tris 50mM a pH 8,0. Se cargó en la columna de cromatografía la cantidad correspondiente de proteína cumpliendo una proporción de 30 mg de proteína por mL de relleno de columna. Las distintas formas de la proteína (monómero, dímero y agregados) se eluyeron de la columna en tres pasos por concentraciones decrecientes de sulfato amónico.

Todas las eluciones obtenidas de las distintas columnas se conservaron a 4°C y se analizaron en un espectrofotómetro de UV/Vis para estudiar tanto su espectro de absorción entre 250 nm y 600 nm, como para determinar la concentración de la proteína a una longitud de onda de 280 nm.

Dicha concentración se calculó según la ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon_{\lambda} l C$$

donde "A" es la absorbancia medida, " $\epsilon_{\lambda}$ " es el coeficiente de extinción molar a la longitud de onda  $\lambda$ , "l" es el paso de luz (en nuestro caso se emplearon cubetas de 1 cm de paso de luz) y "C" es la concentración. Empleamos un coeficiente de extinción molar de 18.620 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, calculado anteriormente en nuestro laboratorio según Gill y von Hippel, (Gill, von Hippel 1989). Cambiando dicho coeficiente de unidades nos da un valor de 0,700 L g<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

### **5.5. Plegamiento de proteína**

El proceso de plegamiento de proteína se realizó según los protocolos propios empleados por la empresa Noricum S.L. para la producción de rhBMP-2. Por este motivo no se detallan las condiciones exactas de dicho proceso.

Para el plegamiento se empleó la fracción de dímero de la proteína obtenida en el proceso de cromatografía de intercambio catiónico. Para ello, previamente se expuso a la proteína a condiciones reductoras rompiendo de este modo todos los puentes disulfuro presentes y obteniendo toda la proteína en forma de monómero. Posteriormente, se llevó a cabo la dilución de dicha proteína en condiciones óptimas de agentes desnaturalizantes y sistemas rédox que favorecen la formación de los puentes disulfuro y por tanto, el correcto plegamiento de la misma. También se controló tanto la fuerza iónica como la temperatura del proceso.

## **6. CONCENTRACIÓN Y DIAFILTRACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Para la concentración de muestras, principalmente de la solución del proceso de plegamiento, se empleó un sistema de filtración tangencial de Millipore con membranas de filtración con un corte de peso molecular de 1 kDa (Pellicon 2 Módulo de ultrafiltración PLAC C 0,5 m<sup>2</sup>, celulosa regenerada). Para volúmenes más pequeños (1.000-100 mL) se empleó un sistema de filtración tangencial de Sartorius (Vivaflow 200) con membranas de 5 kDa de corte de peso molecular (Membrana 5.000 MWCO polietersulfona).

Para realizar la diafiltración de las muestras se fue añadiendo a la solución a diafiltrar el volumen necesario de solución tampón (principalmente urea 6M, tris 50mM a pH 8.0) hasta conseguir la concentración de agente desnaturizante deseada y hasta haber eliminado las sales presentes en la muestra. Dicho proceso de diafiltración se realizó tras el plegamiento de la proteína, para eliminar todos los reactivos empleados en dicho plegamiento y que nos pudieran interferir en los procesos posteriores. Además, se llevó la solución de proteína hasta una concentración de urea de 6M para evitar su precipitación durante el proceso de cromatografía.

## **7. DIÁLISIS**

Se realizaron diálisis para intercambiar el solvente en el que tenemos disuelta nuestra proteína de interés y de este modo, conservar la proteína y poder realizar los ensayos celulares correspondientes. Se emplearon membranas de diálisis con un corte de peso molecular de 10 kDa (Sigma-Aldrich® España). Las membranas antes de su uso, se lavaron con 3 ciclos de 15 minutos de carbonato potásico a una concentración de 0,2M en ebullición y posteriores lavados con agua desionizada.

La diálisis se realizó frente a ácido acético a una concentración 50mM a una temperatura de 4°C. Se efectuaron cambios de solución cada 8-12 horas para asegurar el equilibrio entre la solución de proteínas y la solución de diálisis. Se realizaron tantos cambios de diálisis como fueron necesarios para alcanzar la concentración de solvente deseada.

## **8. PROTEÓLISIS DE rhBMP-2**

Se realizó una digestión con tripsina de la rhBMP-2 tras su plegamiento y purificación. Según datos de la bibliografía tras el tratamiento con tripsina de rhBMP-2 se

consigue obtener un dímero sin el dominio amino-terminal (Ruppert, Hoffmann & Sebald 1996, Hillger et al. 2005).

Para la realización de la proteólisis, la rhBMP-2 se llevó a una concentración de 0,5 mg/mL disuelta en urea 4M, cloruro sódico 0,1M y tris 50mM pH 8,0. Posteriormente se trató con distintas cantidades de tripsina y se incubó durante distintos tiempos a 37°C (Koenig et al. 1994). Pasado este tiempo se dializó la mezcla de la reacción frente a urea 6M, tris 50mM pH 8,0 para eliminar la tripsina. Para analizar la fracción de rhBMP-2 obtenida, se realizó un gel SDS-PAGE y una cromatografía de afinidad de baja presión (columna de heparina "Heparin Sepharose 6 Fast Flow" GE Healthcare).

### **9. CONSERVACIÓN DE PROTEÍNA FINAL**

De forma general, cuando las proteínas se utilizaron en un corto periodo de tiempo se conservaron en disolución de ácido acético 50mM a 4°C. Para un periodo de conservación mayor, la rhBMP-2 se liofilizará y se guardará a -20°C.

### **10. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS POR GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)**

Para analizar las distintas fracciones obtenidas, así como su grado de pureza, durante todos los procesos de producción de la proteína rhBMP-2 se realizaron geles de SDS-PAGE al 15 %. Se llevaron a cabo siempre en condiciones desnaturalizantes en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS) y a una concentración de muestra de 1 mg/mL. En caso necesario las muestras se concentraron a la concentración proteica mencionada mediante ultrafiltración (Amicon Ultra-0.5, Ultracel-10 Membrane, 10 kDa y Amicon Ultra-15, membrana PLGC Ultracel-PL, 10 kDa, Millipore, a 10.000 rpm durante 5 minutos y 4.000 rpm durante 10 minutos respectivamente)

Se realizaron las mezclas del gel separador y del gel concentrador siguiendo las indicaciones del manual "Current Protocols in Protein Science" y se dejaron polimerizar. Las muestras se mezclaron con la solución tampón de carga (Tris-HCl 0,05M pH 6,8, 20% Glicerol, 2% SDS, 0,005% azul de bromofenol) en una proporción 4:1 (muestra:tampón de carga) y se hirvieron durante 5 minutos a 100°C. Se cargaron en los pocillos del gel de electroforesis las muestras y un patrón de proteínas para poder analizar el tamaño de las bandas (*Precision Plus Protein™ Unstained Standards*, Bio-Rad, *Unstained Natural Standards Broad Range*, Bio-Rad). La electroforesis se realizó a temperatura ambiente y se sometió a un voltaje de 200 V (corriente constante) durante aproximadamente 45 minutos utilizando

un electrolito que contenía 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glycine, 0,1% SDS (Tris/Glycine/SDS: TGS, Bio-Rad).

Las proteínas en los geles se detectaron mediante la tinción con azul de Coomassie (*Coomassie Brilliant Blue R-250*, Bio-Rad). Dicha tinción se dejó actuar como mínimo una hora y posteriormente se destiñó con una solución compuesta por 10% ácido acético, 45% etanol y 45% agua desionizada. Después de un corto periodo de tiempo (unos 30 minutos) se pudieron distinguir sobre el gel las bandas azules correspondientes a la proteína.

### 10.1. Análisis de los geles de electroforesis SDS-PAGE

Cuando fue necesario se realizaron análisis de las distintas fracciones obtenidas en los geles de electroforesis de proteínas. Se efectuó el análisis de la imagen de los geles escaneados empleando el programa "Image J" (Image Processing and Analysis) y obteniendo los gráficos correspondientes a los distintos pocillos del gel. Así se pudo conseguir mediante una estimación de áreas del gráfico, las proporciones presentes en las distintas bandas del gel.

## 11. CULTIVO CELULAR. LÍNEAS CELULARES PARA ENSAYOS DE ACTIVIDAD

Para evaluar la actividad de la rhBMP-2 producida en *E.coli* se realizaron varios ensayos con distintas líneas celulares de diferente procedencia: C2C12, ROS 17/2.8, hMSC y UMR 106. Los reactivos para el cultivo de dichas células se obtuvieron de Lonza, excepto el medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) que fue suministrado por Invitrogen (Gibco®).

Antes de cada ensayo, las células se sembraron en frascos de 75 cm<sup>2</sup> para obtener suficiente cantidad de células.

### 11.1. Línea celular C2C12

La línea celular mioblástica de ratón C2C12 (American Type Culture Collection (ATCC®) CRL-1772™, Manassas, Virginia) se mantuvo en cultivo en frascos de 25 cm<sup>2</sup> de superficie, con medio DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina y 100 µL/ml de sulfato de estreptomicina. Se incubaron en una estufa de cultivo a 37°C y una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Su propagación se realizó en condiciones estériles cada 3-4 días, cuando las células llegaban a confluencia (cubrían un 80-90% de la superficie). Para ello, se eliminó el medio

de cultivo, se lavaron las células con PBS, se añadió tripsina (0,5 mL por cada 25 cm<sup>2</sup>) para despegar las células de la superficie de cultivo y se incubaron durante 10 minutos a 37°C. Pasado este tiempo para inactivar la tripsina, se añadió medio DMEM suplementado y se midió el número de células obtenidas empleando una cámara de Neubauer. En cada propagación, la concentración inicial de células fue de 3.000 células por cm<sup>2</sup> de superficie de cultivo.

### **11.2. Línea celular UMR 106**

La línea celular UMR106 procede del epitelio de hueso de rata (ATCC® CRL-1661™). Sus condiciones de cultivo y propagación son las mismas que en el caso de la línea celular C2C12.

### **11.3. Línea celular ROS 17/2.8**

La línea ROS 17/2.8 procede de una línea celular de osteosarcoma de rata y se mantuvo en cultivo en las mismas condiciones que la línea celular C2C12.

Su propagación se realizó en condiciones estériles cada 6-7 días ya que el crecimiento es más lento que en el caso de C2C12. El procedimiento de propagación fue idéntico que el llevado a cabo para C2C12.

### **11.4. Cultivos primarios de hMSC**

Las células hMSC comerciales utilizadas fueron células madre mesenquimales humanas obtenidas a partir de la médula de hueso (Human Mesenchymal Stem Cell, Lonza).

Se mantuvieron en cultivo, en frascos de 25 cm<sup>2</sup> de superficie con medio MSCBM (*Mesenchymal Stem Cell Basal Medium*) suplementado con 10% suero fetal bovino, L-glutamina, sulfato de gentamicina y anfotericina B (MSCGM, *hMSC SingleQuot Kit*). Se incubaron en una estufa de cultivo a 37°C y una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Su propagación se realizó en condiciones estériles cada 6-7 días, cuando las células llegaban a confluencia. El procedimiento de propagación fue el mismo que el descrito para la línea celular C2C12 con la excepción del medio de cultivo que en este caso sería MSCBM suplementado. En todos los casos las células hMSC se desecharon aproximadamente en el pase 10.

## 12. ENSAYOS CELULARES

Los ensayos celulares se llevaron a cabo en placas de cultivo celular de 48 pocillos (Corning Costar). Los ensayos se realizaron por triplicado con sus correspondientes controles. Se sembraron las células a una densidad de 10.000 células por pocillo y se añadió 0,4 mL del medio suplementado correspondiente. Se cultivaron en una estufa de cultivo a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### 12.1. Contenido total de proteínas. Ensayo de Bradford

El contenido total de proteínas de cada ensayo se determinó por el método de MicroBradford (reactivo suministrado por Bio-Rad). Dicho ensayo se empleó como método indirecto de cuantificación de la proliferación celular, ya que podríamos interpretar que a mayor contenido proteico, mayor cantidad de células.

Este ensayo se basa en la afinidad del colorante azul de Coomassie G250 por las proteínas, produciendo una coloración que es posible cuantificar a una longitud de onda de 590 nm.

Para realizar el ensayo se lisaron las células sembradas en las placas de 48 pocillos. Para ello se retiró el medio de cultivo de las placas y se lavaron los pocillos con PBS (0,2 mL) para eliminar los posibles restos de proteína del suero fetal bovino. Posteriormente, se añadió 0,1 mL por pocillo de solución de lisis previamente preparada y compuesta por 50mM Tris pH 6,8, 0,1 % Tritón X-100, 10mM MgCl<sub>2</sub>. Se taparon las placas con papel adhesivo y se realizaron tres ciclos de congelación-descongelación (a -80°C y a 37°C respectivamente) para favorecer la lisis celular. Se retiró 10 µL del lisado y se pasó a una placa de 96 pocillos (Corning Costar), donde se añadió 60 µL del reactivo de Bradford y 230 µL de agua desionizada ultra pura. Se incubaron las placas durante al menos 15 minutos y se determinó la absorbancia a 590 nm en un lector de placas (Biotek FL-600).

Para cuantificar la cantidad de proteína de los distintos pocillos objeto de estudio se realizaron blancos sin células y rectas patrón con cantidades conocidas de una proteína estándar (en este caso Inmunoglobulina G, Bio-Rad) y de este modo, poder asociar absorbancia con microgramos de proteína. Dichos controles se efectuaron en cada uno de los ensayos para evitar cualquier tipo de variabilidad.

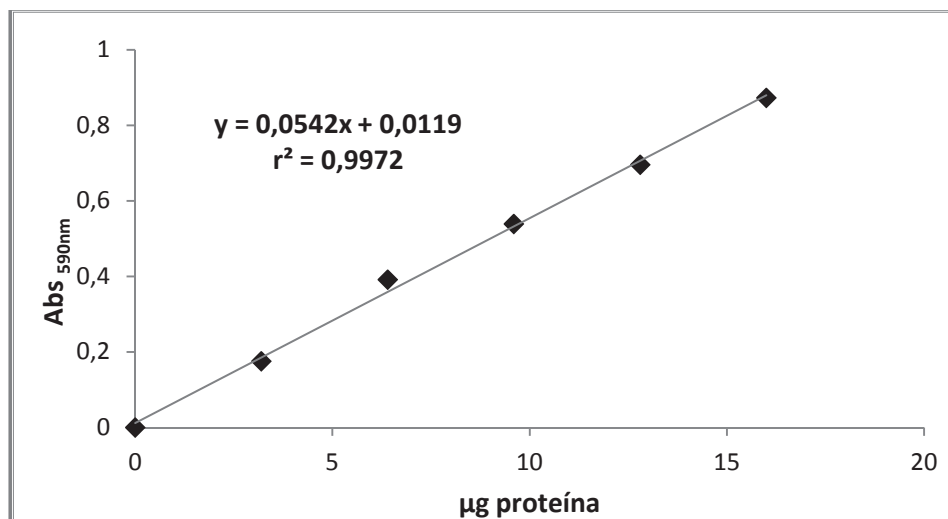
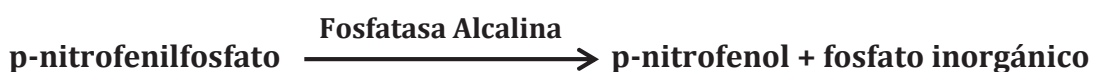


Figura 19. Ejemplo de recta patrón con cantidades conocidas de IgG correspondiente al ensayo de MicroBradford.

## 12.2. Ensayo de actividad de rhBMP-2. Ensayo de fosfatasa alcalina

La actividad de la proteína rhBMP-2 producida en *E.coli* se evaluó mediante el ensayo colorimétrico de fosfatasa alcalina. Esta enzima es un marcador temprano de la diferenciación ósea por lo que únicamente está presente en células osteoblásticas o en aquellas que se están diferenciando hacia el fenotipo osteoblástico. La rhBMP-2 favorece dicha diferenciación por lo que con este método evaluamos su actividad y por tanto, el correcto plegamiento en el proceso de producción.

La actividad de dicha enzima se determinó de manera colorimétrica, empleando un sustrato que, tras la acción de la enzima, da lugar a un producto de intenso color amarillo (p-nitrofenol) que es posible cuantificar midiendo la absorbancia a 405 nm.



Para la realización del ensayo se obtuvieron los lisados celulares del mismo modo que lo descrito en el ensayo de Bradford. Se recogieron 10 µL en placas de 96 pocillos y se añadieron 100 µL de sustrato compuesto por 50 µL de sal disódica de p-nitrofenilfosfato y 50 µL de solución alcalina (2 amino-2- metilpropanol 1,5M, pH 10,3). Se incubó durante 15 minutos a una temperatura de 37°C y se frenó la reacción con 100 µL de sosa (NaOH) a una concentración 0,5M. Posteriormente se cuantificó la actividad de la enzima fosfatasa alcalina midiendo la absorbancia en un lector de placas (Biotek FL-600) a una longitud de onda de 405 nm.

### **13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  la desviación estándar. Los análisis de ajustes de datos lineales y no lineales se llevaron a cabo empleando el programa GraphPad Prism versión 4. Se realizaron distintos test estadísticos en función del ensayo y del número de datos experimentales para determinar la significancia de los datos entre los distintos tratamientos objeto de estudio. La comparación entre dos grupos fue realizada por test de Student y para analizar dos grupos de variables se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) y el test post-hoc de Bonferroni. Los ensayos de actividad a distintas dosis se ajustaron a una curva dosis-respuesta sigmoidea. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con un  $P < 0,05$ .



### **III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La proteína morfogenética ósea 2 recombinante humana (rhBMP-2) ha sido previamente clonada, expresada y plegada en nuestro laboratorio obteniendo la forma dimérica activa de la proteína (González Muñoz 2004). Sin embargo, debido a los requerimientos de dicha proteína en su utilización en clínica, es necesaria la optimización del proceso de producción de rhBMP-2 para poder obtener la mayor cantidad de dímero activo al menor coste posible.

La producción de rhBMP-2 mediante su expresión en *E. coli* comprende una serie de procesos que se detallan en la figura 20, hasta su obtención final en la forma química más adecuada para su almacenamiento y su posterior utilización.

En los resultados que se describen a continuación se contemplan modificaciones en varios de estos procesos y se evalúan alternativas y mejoras con el objetivo de obtener un mayor rendimiento del procedimiento.

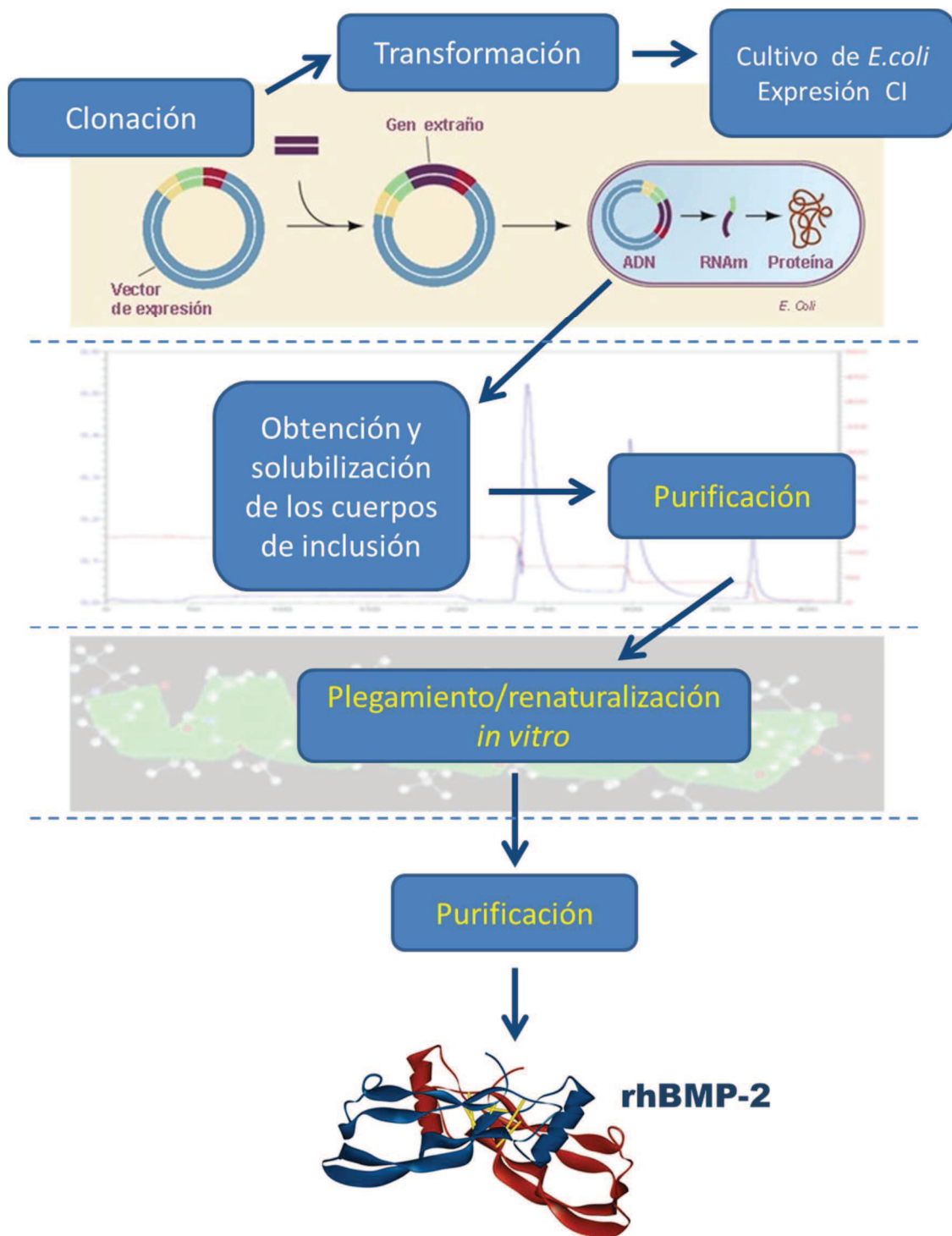


Figura 20. Esquema del proceso de producción de rhBMP-2 en *E. coli*. En color amarillo se señalan aquellos procesos que han sido objeto de estudio en el presente trabajo.

## 1. ESTUDIO DE OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE rhBMP-2

### 1.1 Purificación previa al plegamiento

Como se ha indicado en la introducción de este capítulo la presencia de contaminantes microbianos en los cuerpos de inclusión tales como proteínas de la bacteria, ácidos nucleicos y componentes de la membrana, puede producir la agregación de la proteína durante el plegamiento, reduciéndose así el rendimiento total del proceso (Vallejo, Rinas 2004b, De 2001). De este modo, tras la solubilización de los cuerpos de inclusión y justo antes del plegamiento es necesario realizar una purificación de la proteína mediante técnicas de cromatografía.

En este caso, se realizó una cromatografía de intercambio catiónico a pH 8,0. La rhBMP-2 tiene un punto isoeléctrico de  $8,2 \pm 0,4$  (Abbatiello, Porter 1997) por lo que a dicho pH la proteína se encuentra cargada positivamente y por tanto, se produce la unión de ésta a la columna de cromatografía. El proceso de purificación se realiza a una concentración de agente caotrópico (Urea) de 6 M, ya que de este modo se evita la agregación de la proteína.

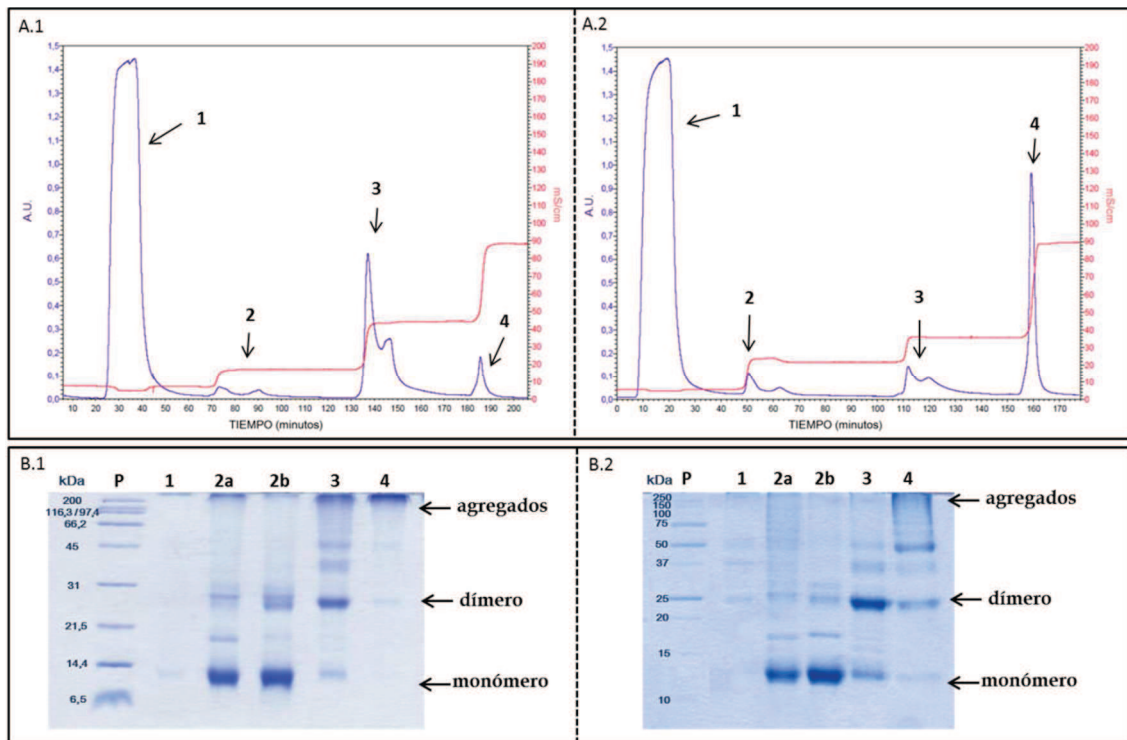
Por tanto, el protocolo para este paso de purificación se inició con el equilibrado de la columna con una solución de Urea 6M, Tris 50mM a pH 8,0. Posteriormente se cargaron los cuerpos de inclusión solubilizados y se eluyeron con diferentes concentraciones crecientes de NaCl. Durante el proceso de la carga de los cuerpos de inclusión, se eliminan todos los contaminantes celulares presentes en forma soluble, ya que los contaminantes no proteicos o los proteicos sin carga positiva no se unen a la columna de cromatografía. La rhBMP-2 en forma de monómero eluyó en primer lugar, debido a que su fuerza de unión a la columna es menor y, por tanto, se necesitan concentraciones menores de NaCl para producir su separación de la columna. A medida que aumentó la concentración de NaCl se despegaron las formas de rhBMP-2 que estarían más fuertemente unidas, como la forma dimérica y los agregados, respectivamente.

En el protocolo anterior a este trabajo, se determinaron y seleccionaron las concentraciones de NaCl a las cuales se recogía mayor cantidad de dímero a pesar de que dicha fracción no fuese lo más pura posible. Se utilizaban concentraciones de NaCl de 0,1M, 0,4M y 1M, en la que la fracción de NaCl 0,4M era donde mayoritariamente aparecía el dímero de la rhBMP-2. Dicho dímero estaba contaminado con parte de monómero pero sobre todo se apreciaba la existencia de agregados moleculares.

Tras la realización de varios gradientes de concentración de NaCl en la columna de cromatografía (datos no mostrados) se estipuló un nuevo perfil de elución en el que

prevalecía la purificación del dímero frente a la pérdida de parte de éste en las otras eluciones. Así, se definieron las eluciones de 0,15M, 0,3M y 1M de NaCl. El dímero aparecía en la concentración de 0,3M de NaCl pero esta vez con una menor proporción de agregados moleculares.

El perfil cromatográfico obtenido para las eluciones de los dos procesos se indica en la figura 21 junto con el análisis de las distintas fracciones que se realizó en geles de SDS-PAGE al 15%.



**Figura 21. Perfiles cromatográficos (A) y geles de SDS-Page (B) de los procesos de separación por cromatografía. A.1 y B1:** corresponden al primer método en el que: **1.** Elución de carga; **2a, 2b.** Primer y segundo pico respectivamente del cromatograma de la elución 0,1M; **3.** Elución 0,4M; **4.** Elución 1M. **A2 y B2:** corresponden al método mejorado en el que: **1.** Elución de carga; **2a, 2b** Primer y segundo pico respectivamente del cromatograma de la elución 0,15M; **3.** Elución 0,3M; **4.** Elución 1M. En ambos geles de electroforesis: **P.** marcador de pesos moleculares.

Como se puede observar en la figura 21A, en los perfiles cromatográficos ya se aprecia la diferencia en los picos representados, siendo más intenso el pico de dímero del primer método correspondiente a la fracción 0,4M de NaCl y, bastante menor el pico perteneciente a la fracción 0,3M. Además la diferencia también se observa en el pico que representa la fracción de agregados. Éste a pesar de ser, en los dos procesos, la fracción

obtenida a una concentración de NaCl 1M, en el primer método el pico es mucho menor que en el caso del segundo método. Esto es debido a que parte de los agregados eluyeron en la fracción 0,4M. Sin embargo, en el caso del segundo método eluyen la gran mayoría de los agregados en la última fracción y es por esto, por lo que el pico obtenido en el cromatograma es mucho mayor.

En el caso de la fracción del monómero la diferencia entre ambos métodos es prácticamente inapreciable, ya que la diferencia de concentraciones de NaCl también lo es (de 0,1M a 0,15M).

Todo lo señalado anteriormente lo observamos en los perfiles de los geles de SDS-PAGE de la figura 21B, donde la fracción más pura de dímero se obtuvo en la fracción 0,3M del segundo método de cromatografía. La banda correspondiente al dímero de la proteína aparece a un peso molecular de unos 26 kDa mientras que el monómero presenta un peso molecular de 13 kDa.

Para comprobar que la purificación de los cuerpos de inclusión influye en el rendimiento total del proceso de producción rhBMP-2 se realizaron varios plegamientos durante 4 días con la fracción obtenida de dímero en la cromatografía de intercambio iónico, en unos casos con la fracción 0,4M y en otros, con la fracción 0,3M. Tras la finalización del proceso consistente en el plegamiento y su posterior purificación, observamos que el rendimiento se duplicaba en aquellos casos en los que se había plegado la fracción más pura del dímero, es decir, la fracción eluida con 0,3M de NaCl (tabla 7).

**Tabla 7. Valores obtenidos en diferentes procesos de producción de rhBMP-2.**

FRACCIÓN CROMATOGRAFÍA	mg proteína para plegamiento	mg proteína final activa	Rendimiento plegamiento
FRACCIÓN 0,4M	960,42	53,63	5,58 %
	569,84	28,78	5,05 %
FRACCIÓN 0,3M	416,50	44,86	10,77 %
	776,16	78,40	10,10 %
	807,03	81,12	10,05 %

Además en concordancia con estos datos, no sólo aumenta el porcentaje de dímero obtenido en el proceso de plegamiento, sino que al estar más pura la fracción proveniente de la cromatografía previa, tendremos menor cantidad de proteína y por tanto, menores

volúmenes de trabajo con la consiguiente reducción del tiempo de trabajo y del gasto económico.

Por tanto, estos datos indican que los agregados presentes en la fracción destinada al plegamiento influyen negativamente en éste y como consecuencia, disminuye el rendimiento del proceso de obtención de rhBMP-2 activa.

### **1.2. Estudios de mejora del proceso de plegamiento/renaturalización**

Esta etapa de la producción de rhBMP-2 es limitante para lograr un mayor rendimiento global. Mientras que la eficiencia de los primeros pasos del proceso de producción es relativamente elevada (producción de *E. coli* y purificación), el rendimiento del plegamiento puede verse limitado por la formación de especies mal plegadas e inactivas así como por la aparición de agregación. En el apartado anterior se demuestra como la pureza de la proteína a plegar influye en gran medida en el rendimiento total del proceso de plegamiento. En este apartado se realizan plegamientos de diferentes fracciones que normalmente se desechan en el proceso de producción. Asimismo, también se estudia la relación entre el tiempo de plegamiento y rendimiento final de dicho proceso.

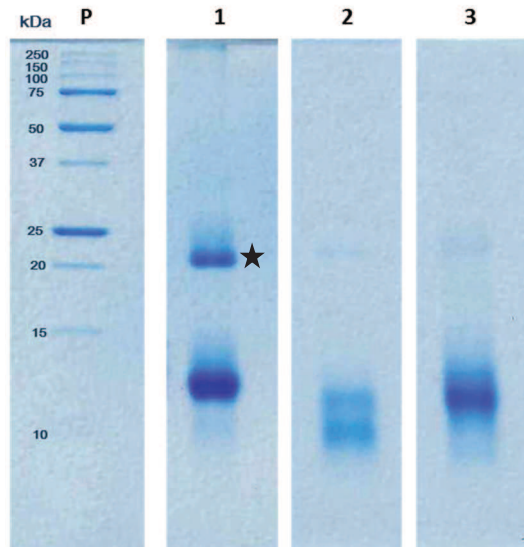
#### **1.2.1. Plegamiento de las distintas formas de la proteína**

Para poder obtener un mayor aprovechamiento de las etapas del proceso de producción de la proteína y de este modo, aumentar el rendimiento final de éste, se realizó un ensayo para comprobar si otras formas de la proteína podrían sufrir el mismo proceso de renaturalización que el dímero de dicha proteína, y como consecuencia, obtener la rhBMP-2 en su conformación activa.

Para ello, se emplearon las fracciones de monómero obtenidas en la cromatografía de intercambio iónico anterior al plegamiento (eluciones 0,15M de NaCl) y las fracciones de agregados (eluciones 1M de NaCl). Éstas se sometieron al mismo tratamiento que la fracción control (dímero de la proteína, fracción 0,3M de NaCl). Se llevaron los tres tratamientos en paralelo y una vez finalizado el procedimiento, se realizaron geles de SDS-PAGE al 15% para analizar las fracciones obtenidas y de este modo, comprobar la cantidad de dímero formado tras el proceso de renaturalización.

En la figura 22 se puede observar el tratamiento control donde se indica la fracción obtenida tras el proceso de plegamiento. Se puede apreciar que se obtuvo una fracción compuesta por dímero y parte de monómero (cuya proporción es mayor) que no ha

formado los puentes disulfuro adecuados. También, en la imagen de la figura 22 se presenta el resultado obtenido de la renaturalización del monómero y de los agregados de la proteína. Como podemos apreciar tras realizar el plegamiento no se observa una fracción similar al tratamiento control, sino que en los dos casos se obtuvo un monómero parcialmente degradado. Además, la banda de dímero es prácticamente inapreciable.



**Figura 22. Gel SDS-Page de los distintos plegamientos realizados con cada una de las fracciones obtenidas en el proceso de cromatografía.** Indicado en el gel: **P.** marcador de pesos moleculares; **1.** Muestra obtenida tras el plegamiento de la fracción 0,3M; **2.** Muestra obtenida tras el plegamiento de la fracción 0,15M; **3.** Muestra obtenida tras el plegamiento de la fracción 1M. (★) dímero de rhBMP-2.

En la figura 23 se muestran los espectros de absorción (rango 250-450 nm) de las fracciones plegadas en este estudio. En este caso se observa que el único plegamiento que mostró un espectro de fracción proteica (pico a una longitud de onda de 280 nm) es el realizado con la fracción 0,3M, correspondiente al plegamiento a partir del dímero purificado.

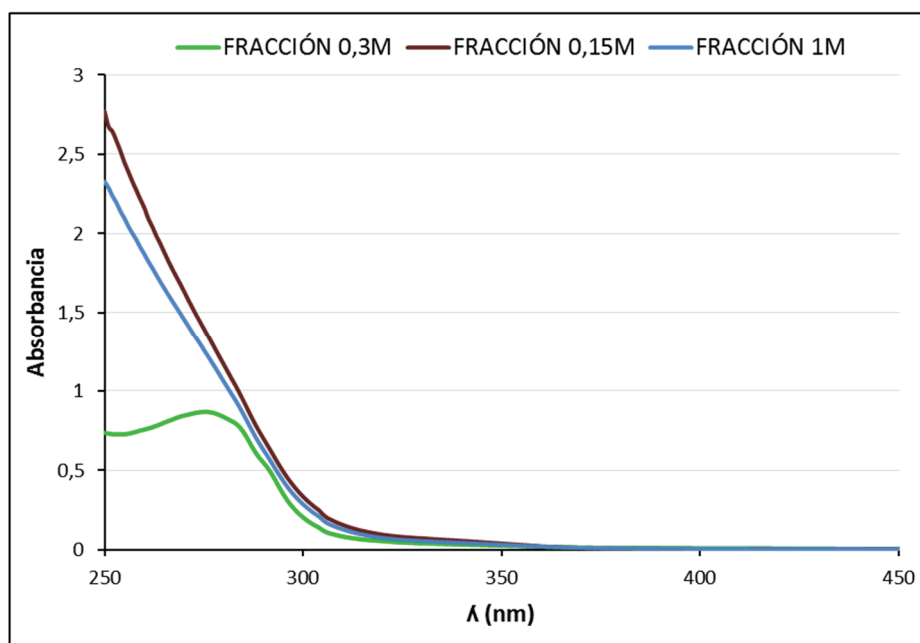


Figura 23. Espectro UV-Visible de cada uno de los plegamientos realizados con las distintas fracciones de proteína.

Estos resultados indican que las fracciones de monómero y agregados de rhBMP-2 que no se han plegado de manera espontánea durante la solubilización de los cuerpos de inclusión, no son capaces de renaturalizarse en la conformación activa de la proteína, ni siquiera sometiéndolas a condiciones óptimas para llevar a cabo el proceso. Sin embargo, aquellas fracciones de dímero solubilizadas desprovistas de su conformación activa, son capaces de formar los puentes disulfuro necesarios para la creación del dímero de rhBMP-2 en las condiciones establecidas en nuestro laboratorio.

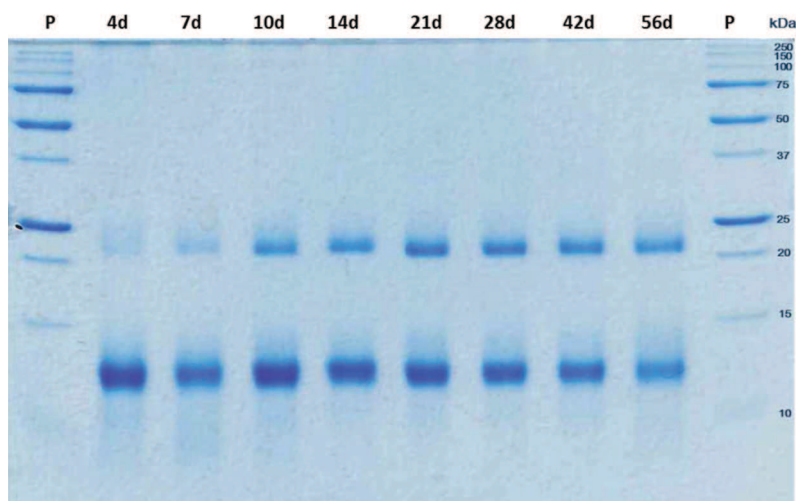
### 1.2.2. Tiempo de plegamiento

Como hemos indicado anteriormente un parámetro crítico a controlar en el proceso de plegamiento es el tiempo durante el cual la proteína está sometida a las condiciones óptimas que favorecen la formación de la estructura nativa. El protocolo anterior fijaba 4 días como tiempo mínimo para esta etapa, con el objeto de no alargar el proceso de producción. Por tanto, el objetivo final de estos ensayos es también optimizar el proceso de producción de rhBMP-2 en costes y tiempo y aumentar el rendimiento.

Para estudiar dicho parámetro se realizó un ensayo sometiendo a varias fracciones idénticas entre sí al mismo tratamiento de renaturalización pero incubándolas en la solución de plegamiento durante diferentes tiempos. Así, se estipularon los tiempos de 4, 7, 10, 14, 21, 28, 42 y 56 días. Nos centramos en estudiar primero tiempos cada 3 o 4 días

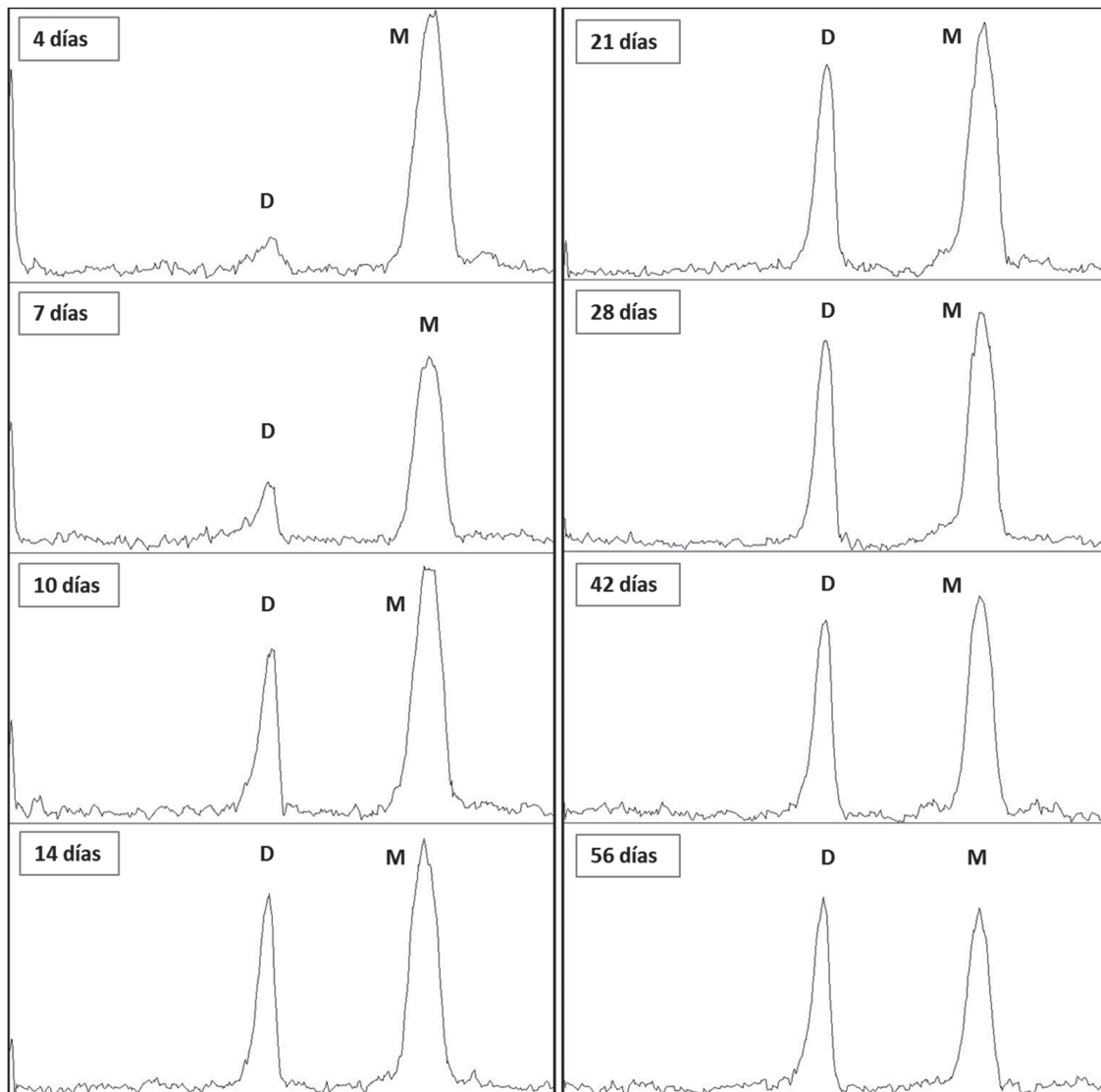
aproximadamente y posteriormente cada semana o cada dos semanas, ya que era interesante saber qué ocurría en tiempos cortos para reducir la duración del procedimiento.

Tras la realización del plegamiento de las distintas fracciones, se analizaron éstas mediante gel SDS-PAGE (figura 24). De forma cualitativa, con la simple observación del gel se pudo apreciar una notable diferencia entre los dos primeros tiempos de 4 y 7 días y el resto de condiciones.



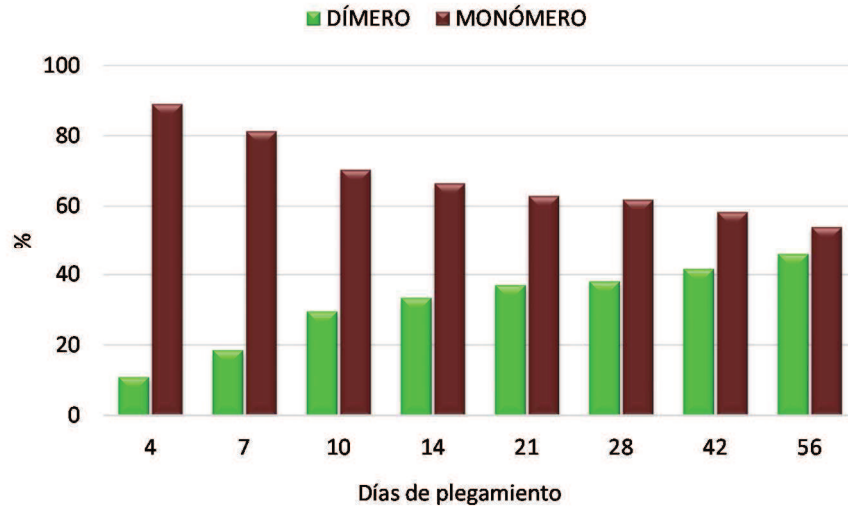
**Figura 24. Gel de SDS-Page de los plegamientos realizados a distintos días.** Indicado en el gel: P. marcador de pesos moleculares. Se cargaron 10  $\mu$ g de cada muestra.

Para poder obtener resultados más concluyentes, se analizaron las distintas fracciones cargadas en el gel mediante un software de imagen (*Image J*). Para ello, se obtuvieron gráficos de cada uno de los carriles del gel que representaban mediante picos la intensidad de las bandas mostradas (figura 25). En dichos gráficos, el primer pico corresponde a la banda de dímero presente y el segundo a la fracción de monómero. Así, se observó en los distintos gráficos como el pico correspondiente al dímero de la proteína va aumentando a medida que transcurre el tiempo de renaturalización.



**Figura 25.** Gráficos obtenidos mediante el programa *Image J* de cada uno de los carilles del gel de SDS-Page de la figura 24. (D) pico correspondiente a la banda de dímero de proteína. (M) pico correspondiente a la banda del monómero.

De este modo, evaluando las áreas de los picos del gráfico se estimó la proporción dímero/monómero de rhBMP-2 de cada uno de los distintos tiempos de tratamiento (figura 26).



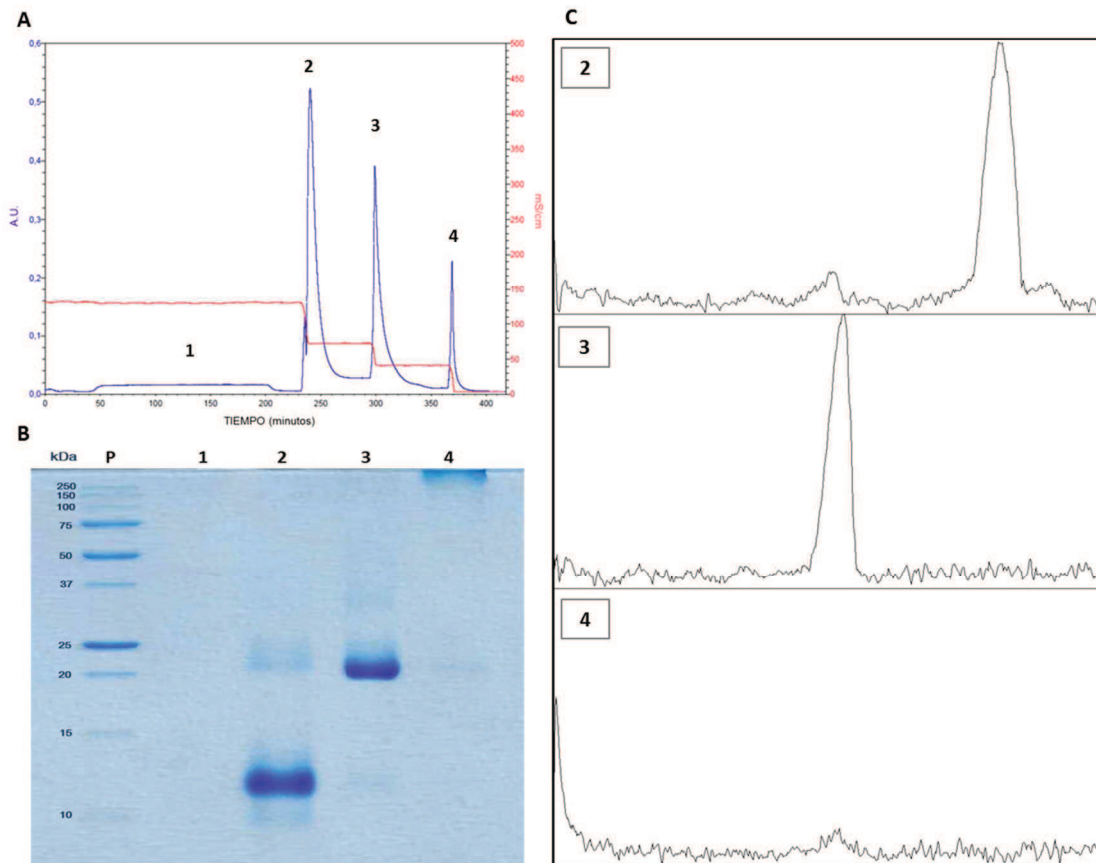
**Figura 26. Representación de las proporciones de dímero y monómero presentes en cada uno de los plegamientos realizados.**

Estos resultados nos indican que la proporción dímero/monómero va aumentando a medida que el tiempo de incubación de la proteína en la solución de plegamiento es mayor.

Posteriormente, las distintas muestras obtenidas se purificaron individualmente por cromatografía de interacción hidrofóbica según se explica en la sección de *Materiales y Métodos*, para separar el dímero activo de rhBMP-2 del monómero. La separación mediante este tipo de cromatografía está basada en la hidrofobicidad de las proteínas y por tanto, en la unión de éstas a ligando hidrofóbicos que se encuentran inmovilizados en el soporte cromatográfico. Para ello, la solución de proteína se mezcló con una elevada concentración de sal (en este caso, sulfato amónico) y se cargó en dicha columna. La elución y separación de las distintas formas de proteína se consiguió disminuyendo la fuerza iónica de la fase móvil. Por tanto, la rhBMP-2 en forma de monómero eluyó en primer lugar debido a que su carácter hidrofóbico es menor y en consecuencia la fuerza de unión a la columna. Posteriormente, a medida que disminuía la fuerza iónica de la fase móvil se despegaron el dímero y los agregados de proteína respectivamente. Del mismo modo que la columna de intercambio iónico realizada de forma previa al proceso de plegamiento, este proceso de purificación se realizó a una concentración de agente caotrópico (Urea) 6M para evitar la agregación de la proteína.

La columna más ampliamente utilizada en el caso de la BMP-2 es la columna de afinidad por heparina. En este trabajo, se sustituyó dicha columna por la de interacción hidrofóbica debido a que se obtuvieron muy buenos resultados en la purificación y a su vez, se disminuían los costes del proceso.

Tras la realización de las distintas purificaciones, se pudo determinar de forma más precisa la cantidad obtenida de cada una de las formas de la proteína y finalmente evaluar su actividad sobre distintos tipos celulares (figura 27). La figura 27B muestra un ejemplo de gel de SDS-PAGE de las distintas eluciones obtenidas en el proceso de cromatografía. Se puede observar como en una primera etapa se obtuvo el monómero de la proteína y a medida que iba disminuyendo la fuerza iónica de la solución de elución apareció el dímero purificado en más de un 95% y finalmente los agregados moleculares.

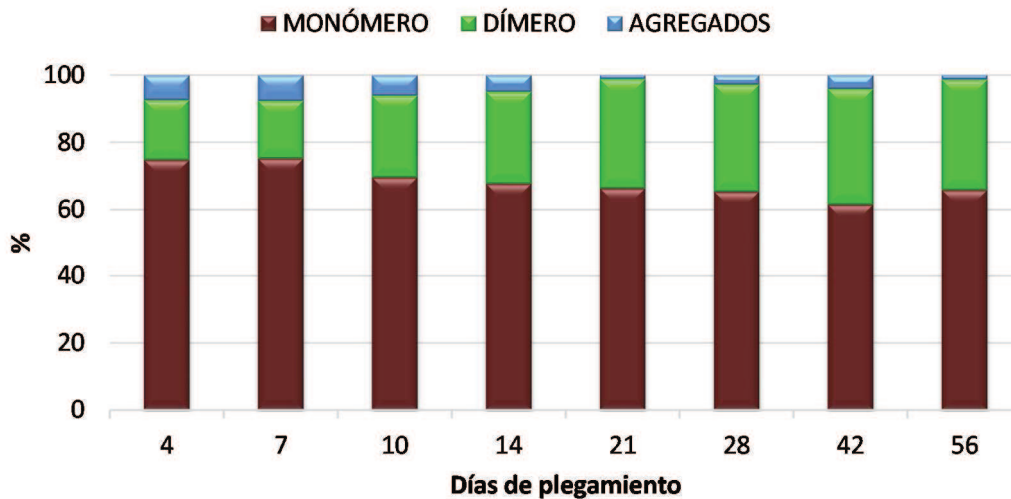


**Figura 27. Proceso de purificación final de la muestra de 14 días de plegamiento.**

**A.** Cromatograma de la columna de interacción hidrofóbica. **B.** Gel de SDS-Page de las fracciones obtenidas en la cromatografía. Se cargaron 10  $\mu\text{g}$  de cada muestra. **C.** Gráficos correspondientes al análisis de cada uno de los carriles del gel de electroforesis. Indicado como: **P.** Marcador de pesos moleculares; **1.** Elución de carga; **2.** elución 0,45M  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  (monómero); **3.** Elución 0,3M  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  (dímero); **4.** Elución 0M  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  (agregados).

Posteriormente se realizó un análisis con el programa “Image J” del mismo modo que en el caso anterior y se estimó el área de los distintos picos del gráfico obtenido (figura

27C). Con estos datos y la cantidad que se obtuvo de cada elución en el proceso de cromatografía, se pudo determinar el porcentaje exacto de cada una de las formas de la rhBMP-2 en todas las muestras del estudio de plegamiento. Estos datos se recogen en la figura 28.



Días plegamiento	4	7	10	14	21	28	42	56
MONÓMERO (%)	74,8	75,3	69,6	67,7	66,3	65,4	61,5	65,9
DÍMERO (%)	17,9	17,2	24,4	27,4	32,5	31,8	34,4	32,8
AGREGADOS (%)	7,3	7,6	6,0	4,8	1,1	2,8	4,1	1,3

Figura 28. Representación y datos de los porcentajes exactos de cada una de las formas de rhBMP-2 presentes en los plegamientos a distintos días.

Como muestran los resultados la cantidad de agregados en las diferentes muestras es mínima ya que en el proceso de plegamiento se optimizan las condiciones para evitar dicho proceso de agregación. Además podemos apreciar, al igual que indicamos anteriormente, como la cantidad de dímero formado aumenta a medida que el tiempo del proceso de renaturalización es mayor y en consecuencia, el porcentaje de monómero obtenido disminuye. Dichos porcentajes son similares a partir del día 10 de incubación, ya que aunque sigue habiendo diferencias, éstas son menores. Por tanto, se puede afirmar que el aumento del tiempo de incubación también aumenta el rendimiento de esta etapa, si bien en un proceso de producción industrial se ha de llegar a un compromiso entre el tiempo invertido en esta etapa y el rendimiento deseado.

### **1.2.2.1. Evaluación de la actividad de distintos tiempos de plegamiento de rhBMP-2**

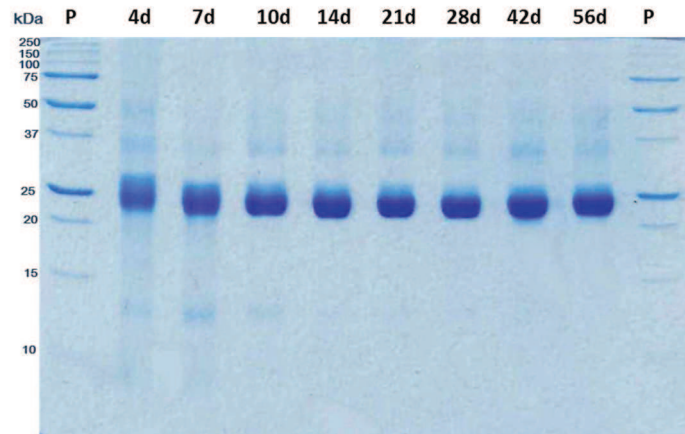
Para comprobar que la fracción de dímero obtenida en las distintas muestras ha adquirido durante el proceso de renaturalización la conformación biológicamente activa, se realizaron ensayos sobre la línea celular mioblástica C2C12.

Esta línea celular, inicialmente aislada de tejido muscular en ratón adulto, es uno de los modelos celulares más utilizados en estudios con rhBMP-2. Además, las células C2C12 son de fácil manejo y proliferan rápidamente, lo que facilita el trabajo de investigación.

La proteína rhBMP-2 induce *in vitro* la diferenciación celular hacia el fenotipo osteoblástico. En dicho proceso de diferenciación suceden diversos cambios en la expresión génica de las células pudiendo ser evaluados mediante el seguimiento de diferentes marcadores. Uno de los más utilizados es la actividad fosfatasa alcalina (FA), debido a que es un marcador temprano que se empieza a expresar en las primeras fases de la diferenciación osteoblástica. De este modo, sin el estímulo producido mediante la adición de rhBMP-2, la expresión basal de esta enzima en las células C2C12 es nula.

Se seleccionó por tanto este marcador para la evaluación inicial de la respuesta celular a la rhBMP-2. Para cuantificar dicha enzima se empleó un método colorimétrico basado en la adición de un sustrato que, tras la acción enzimática de la FA, da lugar a un producto de intenso color amarillo. Éste es posible cuantificarlo midiendo la absorbancia a 405 nm.

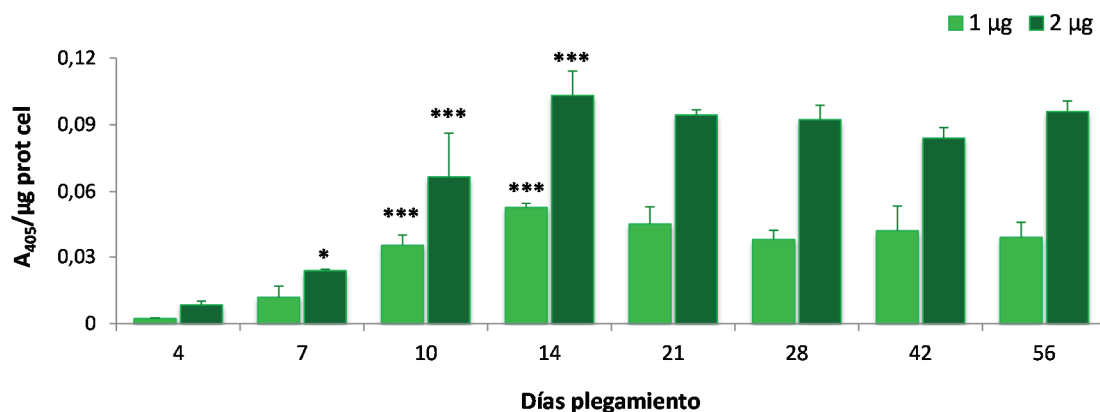
Una vez optimizado en nuestro laboratorio el periodo de cultivo necesario para obtener la máxima respuesta celular a rhBMP-2, se diseñó el experimento con distintas dosis de dicha proteína. Para ello se prepararon las fracciones de proteína destinadas al ensayo. Así, cada uno de los dímeros purificados de cada una de las muestras del estudio de plegamiento se dializó frente ácido acético 50mM, con el objetivo de eliminar los compuestos presentes en la solución tampón y que éstos no interfiriesen en la viabilidad de las células (figura 29)



**Figura 29. Gel de SDS-Page de las muestras dializadas empleadas en el ensayo celular. P:** marcador de pesos moleculares. Se cargaron 10  $\mu\text{g}$  de cada muestra.

Posteriormente se sembraron placas con células C2C12 y se añadió distintas dosis de rhBMP-2 de cada una de las muestras: 1  $\mu\text{g}$  y 2  $\mu\text{g}$ . Tras cuatro días de cultivo se midió tanto la actividad fosfatasa alcalina como la proliferación celular en todos los pocillos ( $\mu\text{g}$  de proteínas celulares totales medidas por el método de Bradford). Dichos procedimientos se llevaron a cabo según lo especificado en el apartado *Materiales y Métodos* de este capítulo.

En la figura 30 se representan los datos obtenidos de fosfatasa alcalina relativizados con respecto a los datos de Bradford. De este modo, se indica la absorbancia a 405 nm frente a los  $\mu\text{g}$  de proteínas celulares totales de cada una de las muestras. Se puede observar como la mayor actividad apareció bajo la acción de la rhBMP-2 de 14 días de plegamiento. Respecto a los 4 y 7 días de incubación los datos presentaron diferencias significativas mientras que aumentando dicho periodo de renaturalización no incrementó la expresión de FA y, por tanto, la actividad específica de la fracción de dímero formado.



**Figura 30. Ensayo de actividad FA/Bradford de C2C12 bajo el tratamiento de las muestras sometidas al proceso de plegamiento durante distintos días.** Únicamente representada la estadística con respecto al día 4 de los tiempos más relevantes para el estudio. \* P<0,05; \*\*\* P < 0,001.

Estos resultados, junto con los mostrados anteriormente, indican que cuanto mayor es el tiempo que permanece la proteína en la solución de plegamiento, aumenta no sólo la cantidad de dímero obtenido sino también la actividad de éste. Esto ocurre en un tiempo de 14 días donde se observa que se obtienen los mejores rendimientos con las condiciones estudiadas en nuestro laboratorio. Sin embargo, superando dicho tiempo de plegamiento no se aprecian mejorías importantes.

Por lo tanto, tal y como indicábamos al principio, observamos que el parámetro “tiempo de incubación” durante el proceso de plegamiento es un factor crítico en la optimización de la producción de rhBMP-2. Consideramos que a medida que aumenta el tiempo del proceso se favorece la formación de los puentes disulfuro necesarios para la correcta renaturalización de la rhBMP-2 y, de este modo, su obtención en la conformación nativa biológicamente activa.

### 1.2.3. Aprovechamiento de las fracciones obtenidas

Tras el proceso de plegamiento de la proteína, observamos que se obtiene una proporción considerable de monómero independientemente del tiempo de plegamiento estudiado. Como se ha comprobado en numerosos estudios, dicho monómero no presenta actividad biológica sino que es necesaria la dimerización para que la rhBMP-2 presente su capacidad osteoinductora (Vallejo et al. 2002, Long et al. 2006) (figura 31).

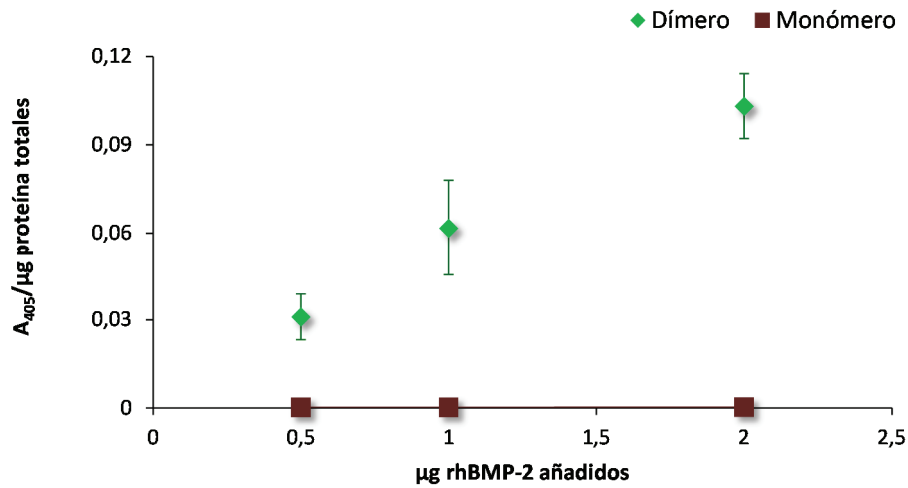
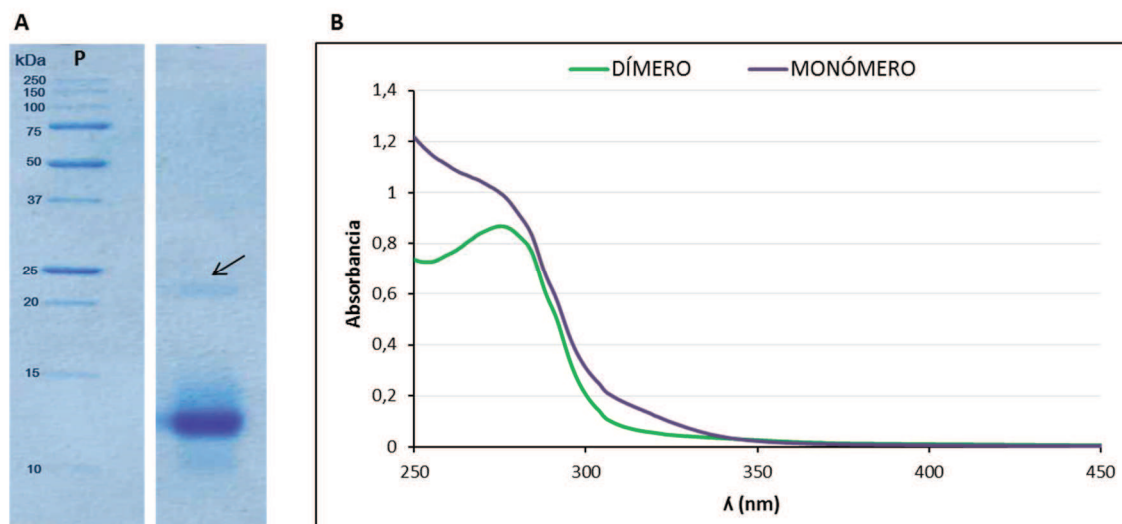


Figura 31. Ensayo de actividad FA/Bradford de C2C12 bajo el tratamiento del monómero de rhBMP-2 frente al dímero.

Según lo descrito en la bibliografía, la sucesiva exposición del monómero no plegado a las condiciones de renaturalización adecuadas da lugar a la obtención de más del 90% de dímero (Long et al. 2006). Por tanto, se realizó un ensayo destinado a someter de nuevo al mismo tratamiento de renaturalización al monómero obtenido en la cromatografía de IH que se mostró en la figura 27, para intentar evitar así dicha pérdida de proteína e intentar aumentar el rendimiento del procedimiento.

En la figura 32A se muestra mediante análisis de gel SDS-PAGE la fracción obtenida tras el plegamiento de la fracción monomérica mencionada. Se puede apreciar como la proporción de dímero formado fue muy pequeña. Además se realizó un estudio del espectro de absorción en el UV-Visible de la fracción obtenida y se observó que no muestra el mismo perfil que presenta la fracción renaturalizada de dímero (figura 32B.).



**Figura 32. A. Gel de SDS-Page** de la muestra obtenida tras el plegamiento. P: marcador de pesos moleculares. La flecha indica la banda correspondiente al dímero de rhBMP-2. **B. Espectro de absorción UV-Visible** de la muestra obtenida tras el plegamiento del monómero frente al espectro del plegamiento control (dímero).

Esto no coincide con lo esperado debido a que al contrario que el ensayo realizado con la fracción de monómero obtenida en la purificación de los cuerpos de inclusión solubilizados (ver figura 22), en este caso sería más probable esperar la formación del dímero. Cabría pensarlo puesto que antes de ser sometido al primer proceso de renaturalización se trataba de una fracción de dímero en el que los puentes disulfuro se formaron de manera espontánea, aunque sin dar lugar a la conformación activa de la proteína. Sin embargo, los resultados obtenidos indican que dicho monómero no origina la formación correcta de los puentes disulfuro existentes en la conformación nativa de la rhBMP-2.

Tras la realización de los diversos ensayos para la optimización del proceso de producción de rhBMP-2, podemos concluir que se ha conseguido aumentar el rendimiento del proceso global modificando distintos parámetros en las etapas anteriormente mencionadas de la obtención de la proteína. Además con el aumento del rendimiento se ha logrado disminuir el coste y el tiempo de dicho procedimiento.

	Rendimiento del proceso inicial	Rendimiento del proceso optimizado	Comentarios
Cultivo de <i>E.coli</i>	16 %	16 %	No modificado
Obtención de los cuerpos de inclusión	10 %	7 %	Aumento de la pureza de la muestra
Purificación previa al plegamiento	5 %	17 %	Aumento del tiempo de plegamiento y de la pureza de la muestra de partida
Plegamiento	--	--	El monómero obtenido no se renaturaliza
Purificación final			

**Figura 33. Esquema del rendimiento obtenido en las distintas etapas del proceso de producción de rhBMP-2.**

En el esquema de la figura 33 se muestran las diferencias en porcentaje del rendimiento de cada etapa del proceso de producción optimizado con respecto al método existente en nuestro laboratorio previo al presente trabajo.

Se puede observar cómo al mejorar la pureza de la muestra a plegar, dicha cantidad de proteína es menor, disminuye de un 10% a un 7%. Esto implica una reducción del volumen necesario en el proceso de renaturalización y, por tanto, una disminución del coste de los reactivos utilizados y del tiempo empleado tanto en la preparación de la solución de renaturalización como en el proceso posterior de concentración. Además, apreciamos que dicha pureza de la muestra, junto con la variación en el tiempo de plegamiento, aumenta considerablemente el rendimiento obtenido en dicho proceso ya que se incrementa de un 5% a un 17%. Este valor de rendimiento del proceso optimizado es el resultado de la suma del 10% obtenido al mejorar la pureza de la muestra destinada al plegamiento y el incremento del 7% que se alcanza al someter a la proteína durante más tiempo a las condiciones necesarias para conseguir su renaturalización (de 4 días a 14 días).

## **2. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE ALMACENAMIENTO DE rhBMP-2**

Una vez obtenida la proteína rhBMP-2 en su conformación activa y con una pureza superior al 95 %, era necesario estudiar la estabilidad de la misma durante un periodo de almacenamiento.

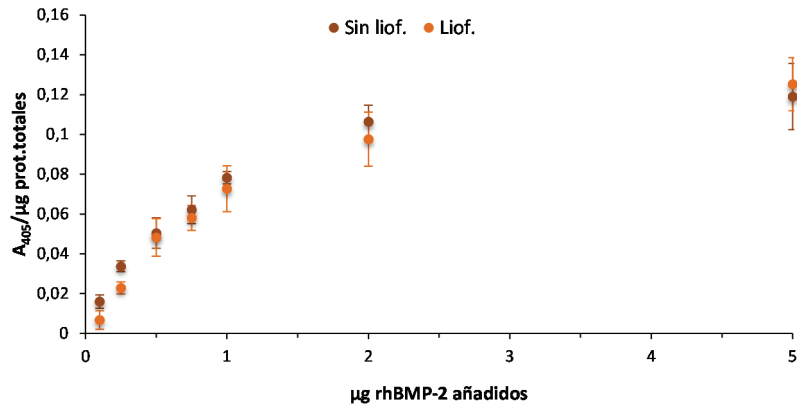
Así para un almacenamiento durante un largo periodo de tiempo es importante eliminar altas concentraciones de urea y de sales que puedan interferir en la estructura de la proteína. Además cabe destacar que la solubilidad de rhBMP-2 es muy baja en soluciones acuosas a pH neutro pero aumenta considerablemente a pH ligeramente ácido (Ruppert, Hoffmann & Sebald 1996). Por este motivo, se dializó la proteína frente a ácido acético 50mM (pH  $\approx$  3,1) para su posterior utilización (como hemos indicado anteriormente).

Otro parámetro a tener en cuenta es la concentración a la que se encuentra disuelta la proteína. Es necesario trabajar a concentraciones bajas de proteína (< 2 mg/mL) para evitar su precipitación (Vallejo, Rinas 2004b).

Para comprobar si la actividad de rhBMP-2 se veía alterada tras un periodo de almacenamiento, se realizó un estudio en el que se conservó en distintas condiciones el dímero obtenido tras su purificación. Dicha muestra dializada en ácido acético 50 mM y con una concentración de 1mg/mL fue almacenada de tres formas diferentes:

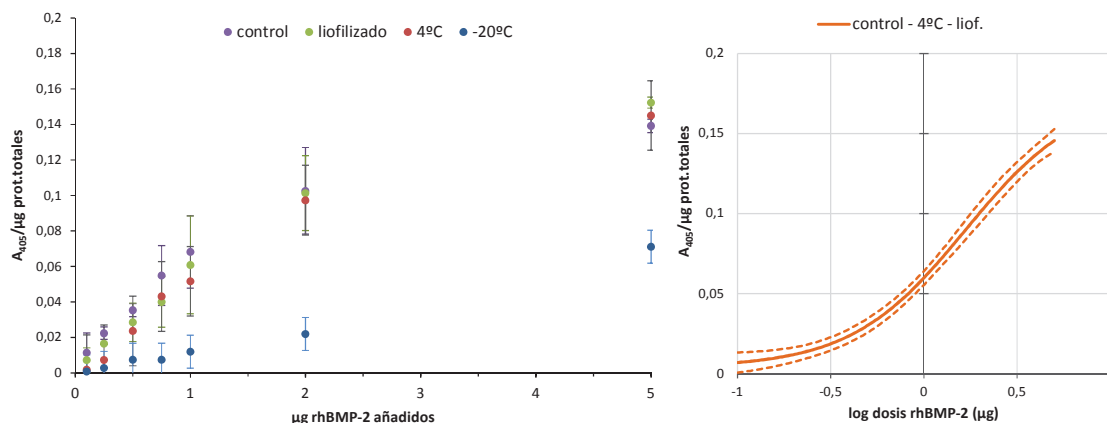
- En solución a 4°C.
- En solución congelada a -20°C.
- Liofilizada a -20°C.

Se conservaron en dichas condiciones durante un año y se hicieron ensayos de fosfatasa alcalina en células C2C12 a los 6 meses y al año para evaluar la actividad de la proteína. Se añadieron a las células distintas dosis de rhBMP-2 de cada una de las muestras almacenadas: 0,1  $\mu$ g, 0,25  $\mu$ g, 0,5  $\mu$ g, 0,75  $\mu$ g, 1  $\mu$ g, 2  $\mu$ g y 5  $\mu$ g. Tras cuatro días de cultivo se midió tanto la actividad fosfatasa alcalina como la proliferación celular en todos los pocillos. Se representaron los valores de absorbancia a 405 nm (actividad FA) relativizados a los  $\mu$ g totales de proteína. En el caso de la proteína liofilizada se reconstituyó tras el tiempo pertinente de almacenamiento con el volumen necesario de ácido acético 50mM para conseguir una concentración de proteína de 1 mg/mL.



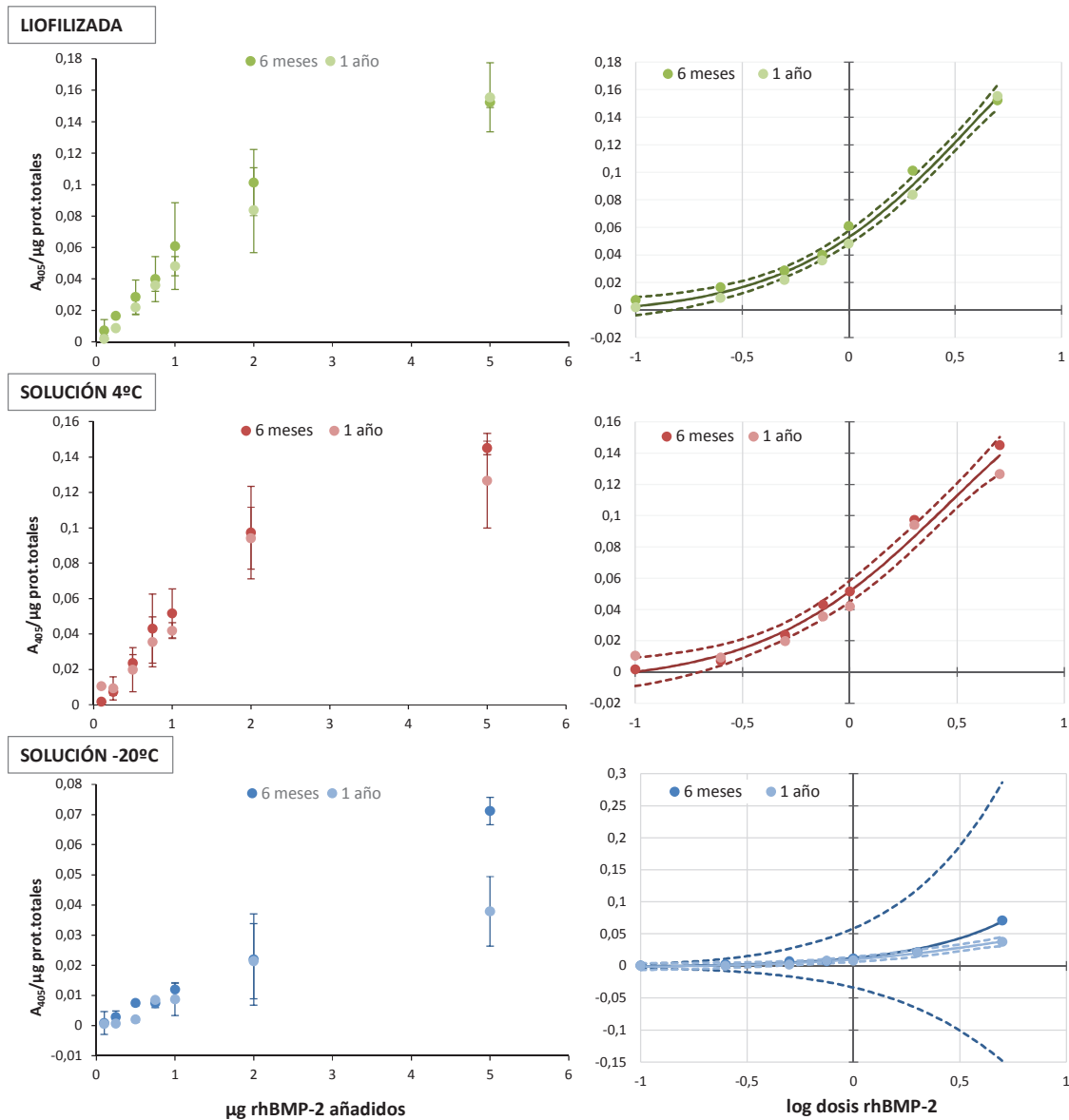
**Figura 34. Datos de la actividad FA/Bradford de C2C12 con distintas dosis de rhBMP-2 antes y después de someterla al proceso de liofilización.**

En la figura 35, podemos apreciar los datos relativos a la curva dosis-respuesta sobre células C2C12 de cada una de las muestras de proteína almacenadas durante 6 meses en distintas condiciones. Además, se representa la proteína control de partida y el ajuste estadístico de los datos. Se observa como la actividad de las muestras almacenadas a 4°C en solución y liofilizada se pueden ajustar a una misma curva dosis-respuesta junto con la proteína inicial de partida. Sin embargo, la muestra conservada en solución a una temperatura de -20°C presentó una notable pérdida de actividad FA siendo imposible ajustar los datos a una curva sigmoidea con las dosis abordadas en el ensayo. Estos datos indican que la proteína rhBMP-2 tiene una alta estabilidad si se conserva en forma de solución a 4°C a pH ligeramente ácido y en forma de liofilizado. Además se demuestra como la liofilización de la proteína y su posterior rehidratación no provoca una pérdida de actividad (Vallejo, Rinas 2004a). Esta última afirmación se confirma con la figura 34 en la cual se observa la actividad FA de células C2C12 tratadas con rhBMP-2 sin liofilizar y la misma proteína después de su liofilización y posterior rehidratación.



**Figura 35. Datos de la actividad FA/Bradford de C2C12 con distintas dosis de rhBMP-2 almacenada en diferentes condiciones durante 6 meses.** A la derecha la representación del ajuste obtenido de la curva dosis-respuesta (línea continua) junto con los niveles de confianza del 95% (línea discontinua).

Para completar estos datos, dichas muestras se almacenaron hasta un periodo de tiempo de un año. Se realizó el ensayo dosis-respuesta en células C2C12 en las mismas condiciones que en el ensayo anterior. Se comparó cada condición de almacenamiento por separado para una mejor interpretación de los datos. En la figura 36 se observa como al año de almacenamiento, la actividad de la proteína conservada a 4°C y la proteína liofilizada se mantiene. Ambas proteínas se pueden ajustar a una misma curva dosis-respuesta junto con su homóloga a los 6 meses. Sin embargo, en el caso de la proteína congelada a menos 20°C en solución, sigue disminuyendo la actividad de la misma (dato apreciable a dosis altas) ya que no es posible ajustar los datos de 1 año y 6 meses a una misma curva dosis-respuesta. Como hemos indicado anteriormente, el ajuste de los datos de almacenamiento hasta 6 meses a dicha temperatura, no es apropiado, debido a que con las dosis abordadas en el ensayo no se obtiene una curva sigmoidea. En cambio, en el caso de la proteína almacenada durante 1 año, el ajuste presenta un intervalo de confianza menor, mostrando como a las dosis altas del ensayo parece alcanzar el valor máximo de actividad. De este modo, se aprecia claramente la acusada disminución de actividad con respecto a las otras condiciones de almacenamiento.



**Figura 36. Datos de la actividad FA/Bradford de C2C12 con distintas dosis de rhBMP-2 almacenada en diferentes condiciones durante 1 año.** Se representan los valores de actividad de la proteína conservada a 6 meses y 1 año para cada una de las condiciones de almacenamiento. A la derecha la representación del ajuste obtenido de la curva dosis-respuesta (línea continua) junto con los niveles de confianza del 95% para cada una de las condiciones (líneas discontinuas).

A la vista de dichos resultados podemos reafirmar que la proteína en solución a 4°C y pH ligeramente ácido y la proteína liofilizada conserva su actividad al menos por un periodo de almacenamiento de un año. Por lo que emplearemos dichas condiciones para la conservación de la proteína obtenida en el proceso de producción.

### **3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE rhBMP-2 OBTENIDA SOBRE DISTINTOS TIPOS CELULARES**

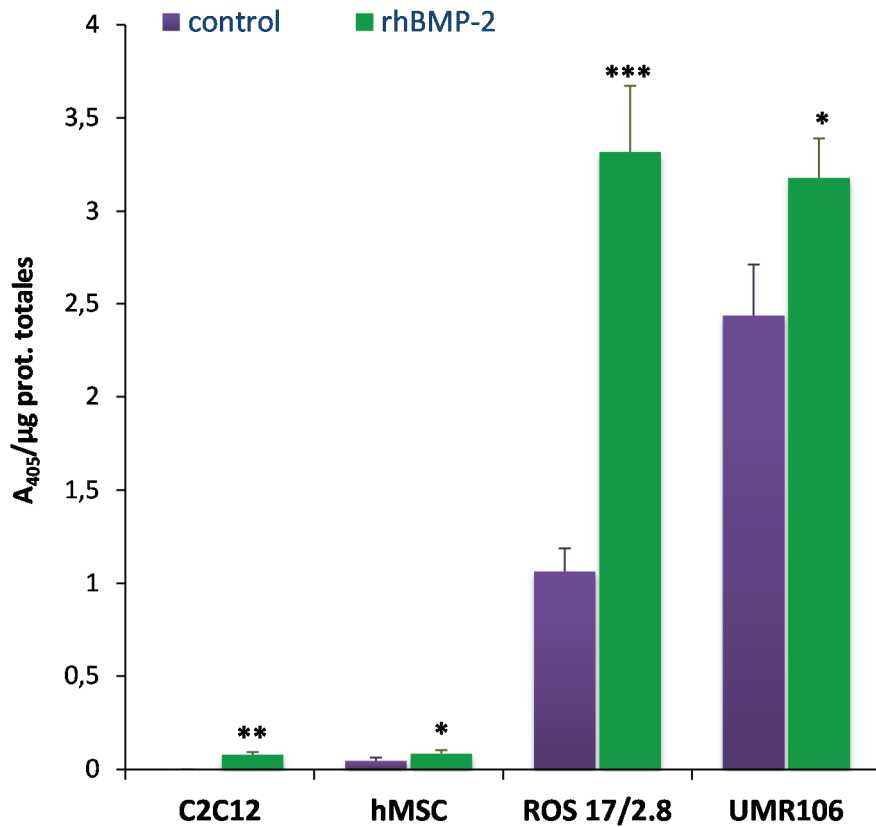
Existen muchos estudios de la rhBMP-2 sobre distintos tipos celulares aparte de la línea C2C12 (Luu et al. 2007). Por este motivo, se realizaron diversos ensayos para demostrar si la proteína obtenida en nuestro laboratorio presentaba actividad frente a otros tipos celulares y por tanto, inducían la diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico.

Se eligieron varias líneas celulares de distinta naturaleza. Se emplearon células osteoblásticas como es el caso de la línea celular ROS 17/2.8 que procede de osteosarcoma de rata y UMR 106 que proceden del epitelio de hueso de rata. Dichas líneas celulares se eligieron para comprobar si la rhBMP-2 ejercía algún efecto sobre células con fenotipo osteoblástico per se. También se estudiaron cultivos primarios como son las células madre mesenquimales humanas (hMSC) para examinar si el tratamiento con rhBMP-2 conseguía la diferenciación de las mismas.

Para analizar dicho efecto de la proteína sobre las distintas líneas celulares se evaluaron los niveles del marcador fosfatasa alcalina en las mismas condiciones que los ensayos anteriores y, por tanto, se compararon los datos obtenidos frente a los de C2C12.

En todos los casos se realizó el ensayo de FA tras la exposición de las células a una dosis de rhBMP-2 de 1  $\mu$ g y durante el tiempo en el que cada tipo celular llega a confluencia. En el caso del C2C12 y UMR 106, el ensayo se realizó a los 4 días de cultivo ya que su crecimiento es más rápido mientras que en el caso de hMSC y ROS se realizó a los 7 días de cultivo debido a que es el tiempo estimado para que dichas células lleguen a confluencia. A su vez, los datos se representaron como absorbancia a 405 nm entre  $\mu$ g de proteínas celulares totales para evitar cualquier tipo de variación por crecimiento. En todas las líneas celulares se representaron los valores obtenidos en ausencia de tratamiento con rhBMP-2.

Se puede observar en la figura 37 como los niveles de fosfatasa alcalina son mucho mayores en las células osteoblásticas. Este dato es normal ya que dichas células poseen una expresión basal de la enzima, incluso sin el estímulo producido por la adición de rhBMP-2. Al contrario que lo que ocurre en las C2C12, cuya expresión basal en el control es nula. Sin embargo, bajo el tratamiento con rhBMP-2 podemos observar que los cuatro tipos celulares aumentan sus niveles de actividad FA. Esto indica cómo incluso las líneas celulares osteoblásticas se ven alteradas bajo el estímulo de rhBMP-2.



**Figura 37. Datos del ensayo de actividad FA/Bradford de distintos tipos celulares bajo el tratamiento de 1 µg de rhBMP-2.** Representada la estadística con respecto al control de cada tipo celular. \* P<0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.

Además se realizó una curva dosis-respuesta con la línea osteoblástica ROS y se comparó con la obtenida en las células C2C12 para comprobar si tipos celulares de distinto fenotipo presentan el mismo perfil. Los datos de la figura 38 muestran como el comportamiento de ambos tipos celulares frente a dosis crecientes de rhBMP-2 es similar apreciándose valores diez veces mayores en las células osteoblásticas. Ambas líneas celulares aumentaban sus niveles de actividad fosfatasa alcalina ajustándose a una curva dosis-respuesta de tendencia sigmoidea.

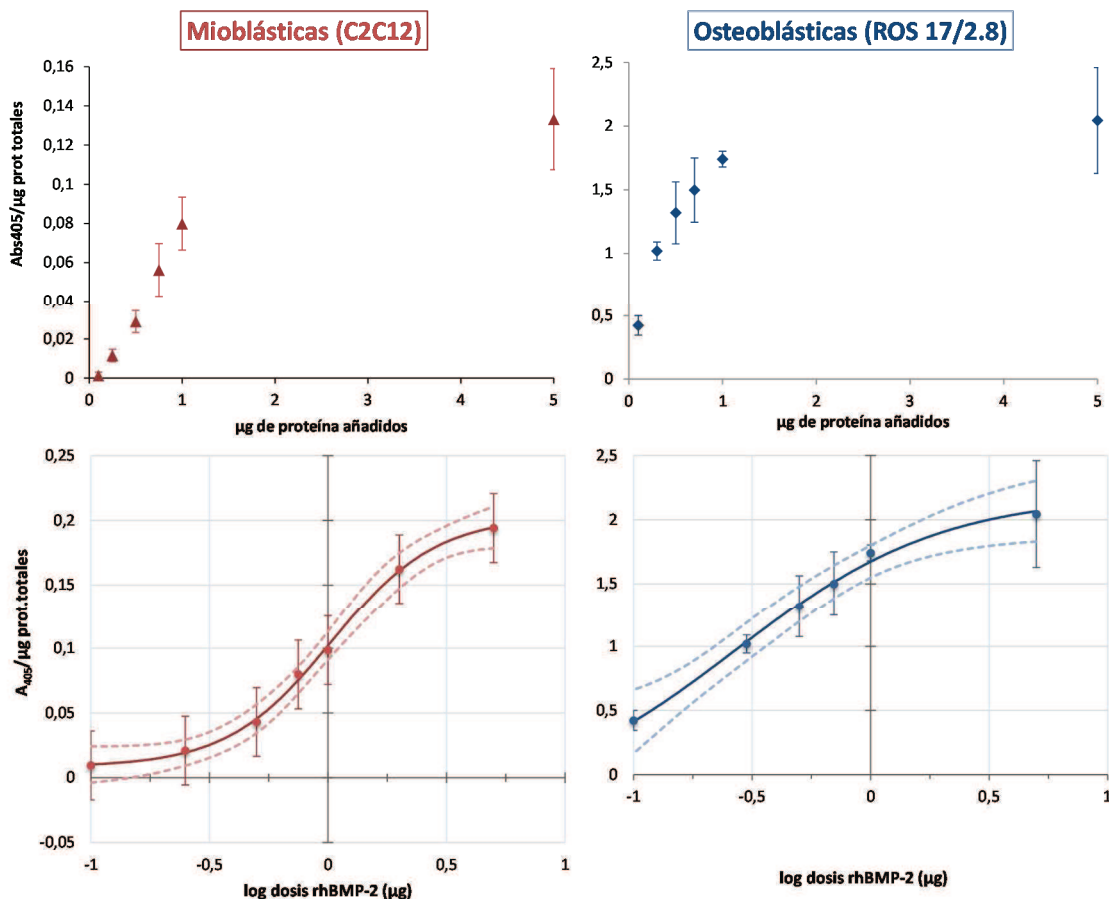


Figura 38. Datos de la actividad FA/Bradford inducida bajo el tratamiento de rhBMP-2 de dos líneas celulares. En la parte inferior se representa el ajuste obtenido de la curva dosis-respuesta (línea continua) junto con los niveles de confianza del 95% (líneas discontinuas).

#### 4. PROTEÓLISIS DE rhBMP-2

La forma final natural de la BMP-2 es un homodímero en el que cada monómero presenta tres puentes disulfuro intramoleculares, y un puente disulfuro intermolecular que une ambos monómeros. La BMP-2 es sintetizada en forma de un precursor de 396 aminoácidos, que después de procesos de glicosilación y proteólisis da lugar a la proteína madura que corresponde al extremo C-terminal del precursor. Cada una de las subunidades de la forma madura de la BMP-2 está formada por una cadena de 114 aminoácidos que presentan un peso molecular de 13 kDa (Celeste et al. 1990, Israel et al. 1992).

La proteína rhBMP-2 expresada en *E.coli* en este trabajo, se compone únicamente de la secuencia de aminoácidos pertenecientes a la forma madura de la proteína. Además carece de la glicosilación postraduccional. Sin embargo, este hecho no implica la pérdida de

su actividad, tal y como indican los estudios realizados con la proteína recombinante (Ruppert, Hoffmann & Sebald 1996).

MVAGTRCLLA	LLLPQVLLGG	AAGLVPELGR	RKFAAAASSGR	PSSQPSDEVL	50
SEFELRLLSM	FGLKQRPTPS	RDVVPPYML	DLYRRHSGQP	GSPAPDHRLE	100
RAASRANTVR	SFHHEESLEE	LPETSGKTTR	RFFFNLSSIP	TEEFITSAEL	150
QVFREQMQDA	LGNNSSFHHR	INIYEI IKPA	TANSKFPVTR	LLDTRLVNQN	200
ASRWESFDVT	PAVMRWTAQG	HANHGFEVVEV	AHLEEKQGVV	KRHVRI SRSL	250
HQDEHSWSQI	RPLLVTFGHD	GKGHPLHKRE	KRQAKHKQRK	RLKSSCKRHP	300
LYVDFSDVGW	NDWIVAPPGY	HAFYCHGECF	FPLADHLNST	NHAIVQTLVN	350
SVNSKIPKAC	CVPTELSAIS	MLYLDENEKV	VLKNYQDMVV	EGCGCR	396

**Figura 39. Secuencia aminoacídica del precursor de BMP-2.** Sombreado en gris la secuencia de la forma madura del monómero de 114 aminoácidos.

El extremo N-terminal de la forma madura de la proteína está formado por un péptido de 1-17 aminoácidos, el cual contiene 10 aminoácidos básicos, que representan el sitio de unión a heparina. Este residuo recuerda los sitios de unión a heparina en otros factores de crecimiento (Götz et al. 1994, Roghani et al. 1994) y proteínas (Shirk et al. 1994, Stone et al. 1994). Se ha descrito, que dicho residuo es importante en el almacenamiento y la estabilidad de la BMP-2 y puede directamente contribuir a la actividad biológica.

Paradójicamente la presencia del residuo N-terminal en la rhBMP-2 probablemente induce su interacción con proteoglicanos presentes en la matriz extracelular. De este modo, la proteína quedará parcialmente secuestrada en la matriz dificultando su unión al receptor y no desencadenando el efecto biológico deseado. Así, en diversos estudios, se ha procedido a escindir mediante proteólisis el residuo N-terminal (Koenig et al. 1994, Hillger et al. 2005) o incluso a sustituirlo por otra secuencia de igual longitud (Ruppert, Hoffmann & Sebald 1996, Bessho et al. 2000). Se ha comprobado como dicho dominio no es imprescindible para la activación del receptor de BMP-2 pero sin embargo su escisión sí modula positivamente su actividad biológica.

Por este motivo, se realizó un procedimiento para conseguir la escisión del extremo N-terminal de la rhBMP-2 obtenida en *E.coli* mediante el proceso de producción descrito anteriormente, y así comprobar si su actividad se veía alterada en diversos tipos celulares. Para ello, se utilizó el dímero activo y purificado y se sometió a digestión por la acción de tripsina. Según lo descrito, el extremo N-terminal de la BMP-2 madura tiene varios sitios susceptibles de lisis con tripsina mientras que el extremo C-terminal no se ve afectado. Al

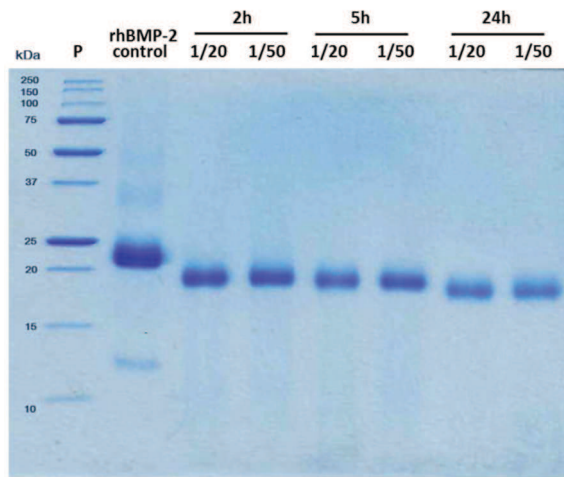
someterla a una proteólisis, se obtienen fragmentos que comienzan en la Lisina-290 y fragmentos, que por el contrario comienzan en la Leucina-292 (figura 40).

	<b>Lys 290</b>	<b>Leu 292</b>		
	↓	↙		
<b>QAKHKQRKRL</b>			KSSCKRHPLY	VDFSVDVGWND 30
WIVAPPGYHA			FYCHGECFPF	LADHLNSTNH 60
AIVQTLVNSV			NSKIPKACCV	PTELSAISML 90
YLDENEKVVV			KNYQDMVVEG	CGCR 114

**Figura 40. Secuencia aminoacídica de la forma madura de rhBMP-2.** En amarillo señalados los 17 aminoácidos del extremo N-terminal. En rojo se indican los sitios susceptibles de lisis por el efecto de la tripsina.

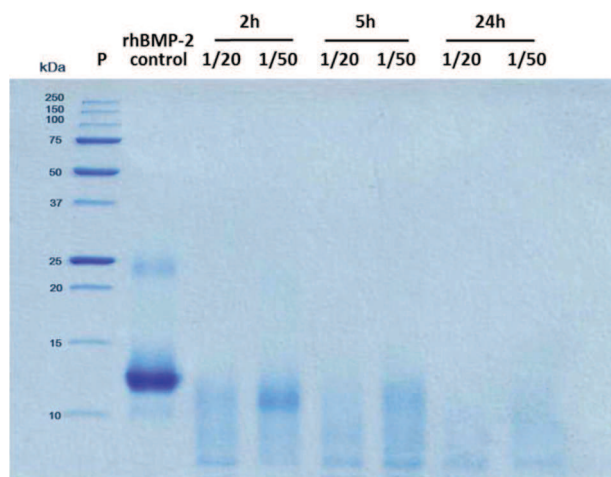
Por tanto se procedió al estudio experimental y se ensayaron varias condiciones. Siguiendo el método de Koenig et al. (Koenig et al. 1994) se disolvió la proteína y se separaron varias alícuotas para someterlas a diferentes tratamientos. Se añadió tripsina en una proporción 1/50 y 1/20 (tripsina/rhBMP-2) (peso/peso). Se incubaron las alícuotas a distintos tiempos, durante 2h, 5h y 24h.

En la figura 41 podemos observar mediante un gel de SDS-PAGE las fracciones obtenidas en los distintos tratamientos. Se muestra como la digestión parcial con tripsina produjo una forma más corta de dicha proteína. Además observamos como forzando las condiciones de la proteólisis, es decir, con una proporción 1/20 y aumentando el tiempo de incubación a 24 horas, pareció disminuir dicho peso molecular. La diferencia de dos aminoácidos en la proteólisis por tripsina descrita en la figura 40 puede ser la responsable de la pequeña variación en el peso molecular entre la rhBMP-2 sometida al tratamiento durante 2 horas y 24 horas.



**Figura 41. Análisis mediante gel de SDS-Page de las muestras obtenidas tras los tratamientos de proteólisis del dímero de rhBMP-2. P: marcador de pesos moleculares.**

En comparación con lo obtenido, se expuso a las mismas condiciones a una fracción de monómero de BMP-2. Se analizaron los resultados por SDS-PAGE (figura 42) y se pudo observar como en este caso, se produjo una fragmentación de la totalidad del monómero. Únicamente se puede ver una ligera banda un poco más corta que el monómero control en el tratamiento durante 2h y con una proporción tripsina/rhBMP-2 de 1/50, es decir, el tratamiento más débil de todos los realizados. Esto indica que tras someter la proteína en su forma reducida a un tratamiento con tripsina, ésta es susceptible de fragmentación a lo largo de toda su secuencia (Groppe et al. 1998).



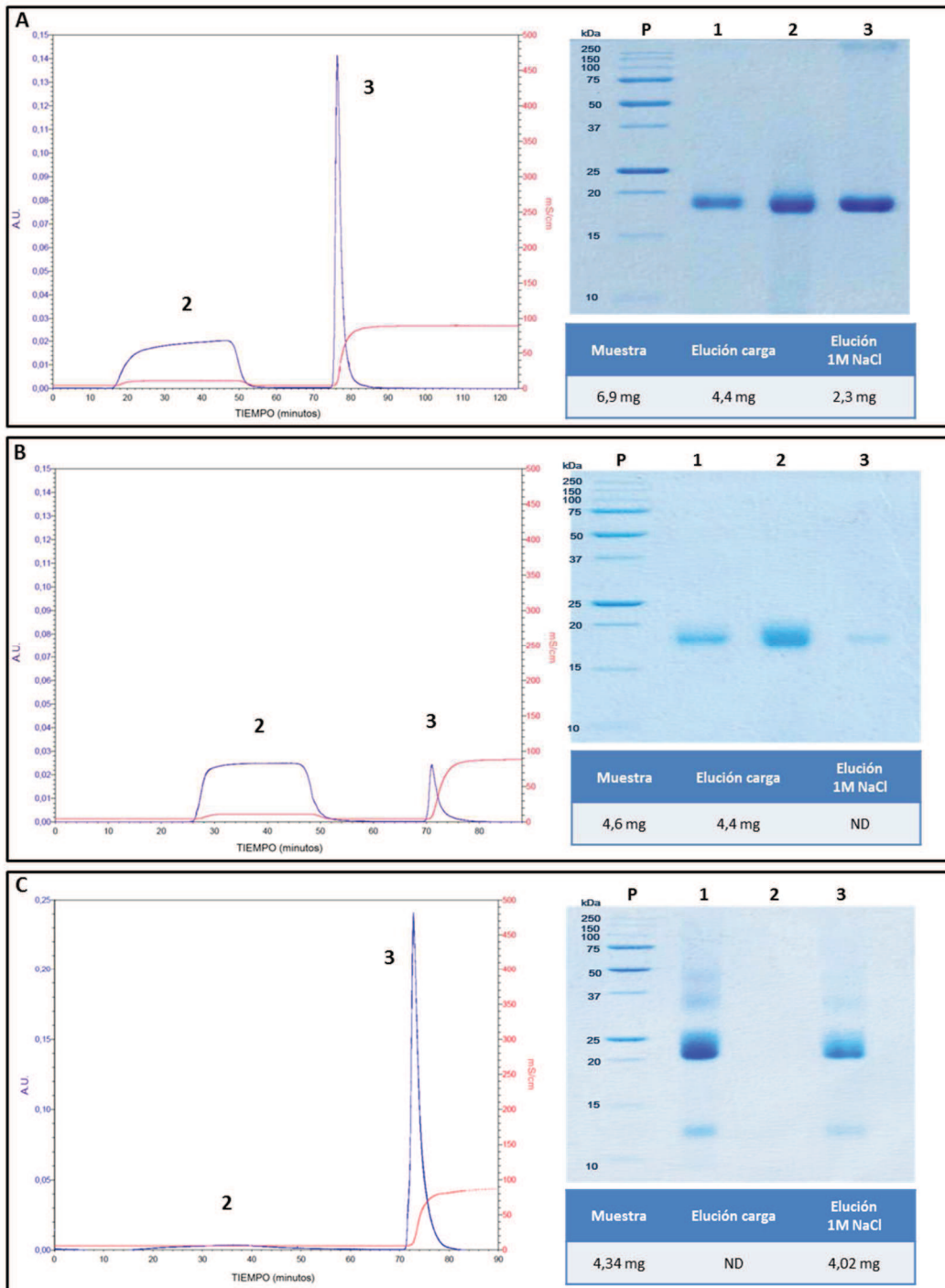
**Figura 42. Gel SDS-Page de las muestras obtenidas tras los tratamientos de proteólisis del monómero de la rhBMP-2. P: marcador de pesos moleculares. Se cargaron 10  $\mu$ g de cada muestra.**

Estos resultados destacan la resistencia adquirida de la BMP-2 debido al núcleo formado por el puente disulfuro del dímero de la proteína, ya que bajo condiciones de lisis severas la proteína sin el extremo N-terminal sigue manteniendo su conformación nativa. Así, se demuestra que la estructura de la rhBMP-2 obtenida mediante nuestro proceso de producción en *E. coli* es altamente estable y no presenta regiones accesibles a proteasas que podrían dar lugar a una lisis total de la proteína.

Posteriormente, se llevó a cabo un ensayo para confirmar que la disminución del peso molecular del dímero de rhBMP-2 era debido a la lisis del extremo N-terminal y por tanto, la pérdida del sitio de unión a heparina. Se realizaron cromatografías con un relleno de heparina para comprobar si la proteína obtenida tras la lisis con tripsina se quedaba adherida a dicha columna o por el contrario, no se producía la unión. Para ello se emplearon las muestras de los dos tratamientos extremos, el más débil cuya proporción tripsina/BMP-2 era 1/50 y la incubación durante 2h, y forzando las condiciones con una proporción 1/20 e incubada durante 24h. Además, se realizó una cromatografía control con rhBMP-2 no sometida al proceso de tripsinización.

Tras obtener los resultados se pudo comprobar como en ambos casos, la mayor parte de la proteína no se adhería a la columna de cromatografía y, por tanto, eluía directamente en el proceso de carga. De este modo, se pudo corroborar que la disminución en el peso molecular observado en el gel SDS-PAGE se debe a la pérdida del extremo N-terminal de la proteína y en consecuencia, del sitio de unión a heparina. Todo lo contrario se observó en la cromatografía control de la rhBMP-2 con el residuo N-terminal. Ésta se adhiere en su totalidad a la columna de heparina por lo que se demuestra que en dicho residuo se encuentra el sitio de unión a heparina.

Sin embargo, en las dos cromatografías realizadas con la rhBMP-2 tripsinizada se llevó a cabo una elución mediante una alta concentración de sales (cloruro sódico 1M), para desprender aquella proporción de proteína que por el contrario, sí se hubiese adherido a la heparina. Así se pudo apreciar, tanto en el cromatograma como en el análisis de las fracciones obtenidas por electroforesis una diferencia entre ambos tratamientos (figura 43). En el tratamiento con menor cantidad de tripsina y menor tiempo de incubación se observó como la cantidad de proteína adherida a la columna era mayor que en el caso del tratamiento más estricto. Esta diferencia puede verse relacionada con el fragmento escindido de la proteína ya que según lo deducido por el peso molecular, ambas se podrían diferenciar en dos aminoácidos y esto podría influir, según lo observado en estos resultados, en la adherencia a la columna de heparina.

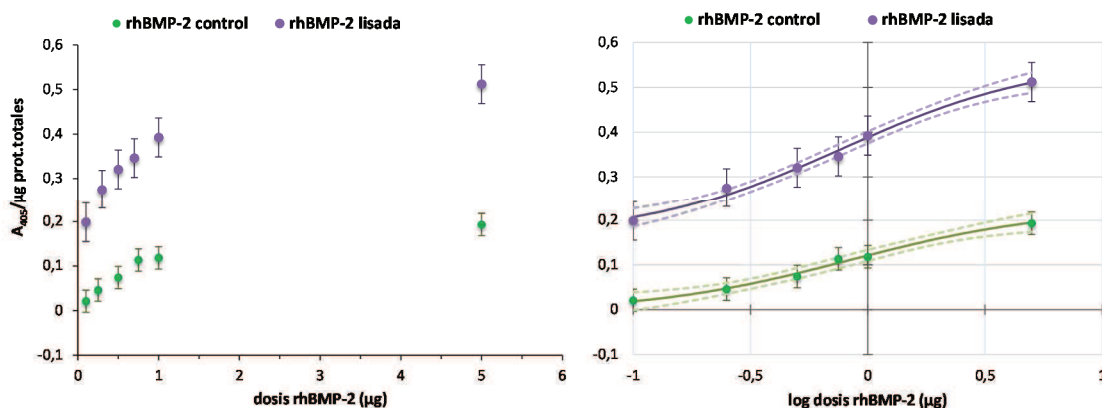


**Figura 43.** Análisis mediante cromatografía de afinidad y gel de SDS-Page de las muestras obtenidas tras la proteólisis del dímero de rhBMP-2. A la izquierda el cromatograma obtenido en la columna de heparina y a la derecha el gel SDS-Page junto con las cantidades obtenidas en cada elución de la columna. **A.** Muestra tratada con tripsina en una proporción 1/50 y durante 2h. **B.** Muestra tratada con tripsina en una proporción 1/20 y durante 24h. **C.** rhBMP-2 control. Indicado como: **P.** marcador de pesos moleculares; **1.** muestra obtenida de la proteólisis y cargada en la columna de cromatografía; **2.** elución de carga; **3.** elución 1M NaCl; **ND.** no detectado.

Como hemos indicado anteriormente, con la proteólisis provocada por la acción de la tripsina se obtiene una rhBMP-2 sin su extremo N-terminal. La proteína resultante se diferencia de la forma nativa madura en siete o nueve aminoácidos según lo esperado. Sin embargo, dicho extremo N-terminal se compone de un péptido de hasta 17 aminoácidos compuesto por 10 de ellos básicos. Al eliminar siete o nueve de ellos se pierde la afinidad de la rhBMP-2 por la heparina ya que dichos aminoácidos contribuyen al sitio de unión. Sin embargo, los aminoácidos básicos restantes podrían ser los responsables de que una pequeña proporción de rhBMP-2 se siga quedando adherida a la columna de heparina.

### 4.1. Actividad de rhBMP-2 lisada

Según lo descrito en la bibliografía, la proteína resultante de la proteólisis del extremo N-terminal sigue conservando su actividad biológica pero ésta se ve modificada. Para estudiar si la proteína obtenida en el proceso realizado anteriormente se ve alterada y en qué medida, se realizaron ensayos celulares evaluando la actividad fosfatasa alcalina.



**Figura 44. Datos de la actividad FA/Bradford inducida en C2C12 bajo el tratamiento de rhBMP-2 control y rhBMP-2 lisada.** A la derecha se representa el ajuste obtenido de la curva dosis-respuesta (línea continua) junto con los niveles de confianza del 95% (líneas discontinuas).

En primer lugar se realizó un ensayo con células C2C12 debido a que éstas son las más empleadas en el estudio de la rhBMP-2 y que carecen de actividad FA en ausencia de tratamiento. Se sometió a dichas células a cantidades crecientes de proteína tanto en su forma madura obtenida en el proceso de producción, como la resultante de la proteólisis. Se empleó la proteína lisada obtenida por el tratamiento con tripsina en una proporción 1/50

e incubada durante 2h. Así, en la figura 44 se muestran los datos obtenidos de actividad fosfatasa alcalina (absorbancia a 405nm) relativizados respecto a la proliferación celular, frente a la dosis de rhBMP-2. Se puede comprobar como existe una variación bastante significativa entre la actividad de la proteína normal con respecto a la proteína carente del extremo N-terminal.

A su vez, se estimó conveniente estudiar el efecto de rhBMP-2 lisada sobre células madre ya que éstas poseen actividad fosfatasa alcalina basal. Debido a los datos obtenidos anteriormente de la actividad de la proteína frente a hMSC, en esta ocasión se realizó el ensayo a una dosis mayor para evaluar mejor el efecto causado por la administración de rhBMP-2. Como se observa en la figura 45, la respuesta de las células madre al tratamiento de ambas proteínas es muy similar a lo ocurrido en las C2C12. Aunque este ensayo se realizó a una dosis fija de proteína, se aprecia como la rhBMP-2 sometida a la proteólisis provoca un incremento significativo de actividad fosfatasa alcalina indicando por tanto, un aumento de la actividad de la rhBMP-2 sin extremo N-terminal.

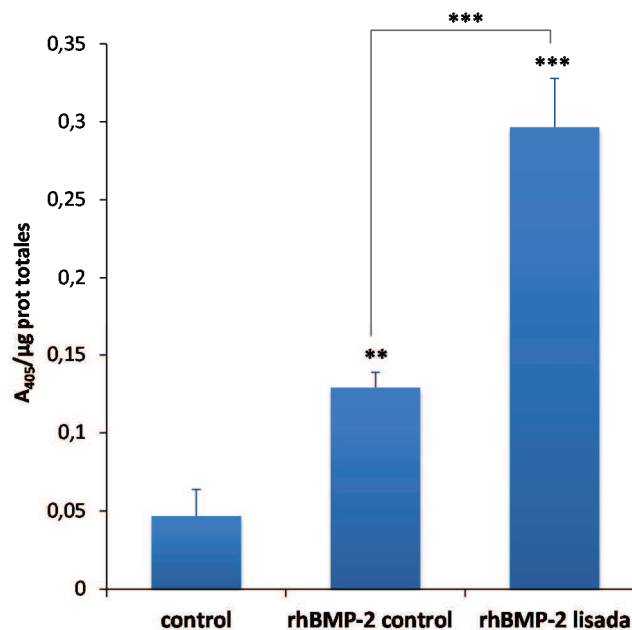


Figura 45. Ensayo de actividad FA/Bradford del efecto, en hMSC, de 10 µg de rhBMP-2 control y sometida a proteólisis. Representada la estadística con respecto al control de cada tratamiento y entre tratamientos. \* P<0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.

Con los resultados mostrados se puede confirmar que tras someter a la rhBMP-2 obtenida mediante el proceso de producción, a un tratamiento con tripsina en las proporciones indicadas, se consigue un dímero de dicha proteína carente de extremo N-terminal. De este modo, no sólo no se pierde la afinidad de la rhBMP-2 por su receptor sino que aumenta su actividad de forma significativa.

#### **IV. CONCLUSIONES**

En este apartado se han presentado los resultados de los estudios de optimización del proceso de producción de rhBMP-2 en *E. coli* para mejorar el rendimiento disminuyendo a su vez los costes del proceso. Se han obtenido las siguientes conclusiones:

- La fracción de dímero solubilizada desde los cuerpos de inclusión de *E. coli* está desprovista de su conformación activa, pero es capaz de formar el dímero de rhBMP-2 activo en las condiciones establecidas en nuestro laboratorio.
- Aumentando la purificación de la fracción destinada al proceso de plegamiento, se incrementa el porcentaje de dímero obtenido en su conformación nativa al final del proceso. Además, al aumentar la pureza se disminuye la cantidad de proteína empleada en los siguientes procesos y por tanto, se necesitan menores volúmenes de trabajo. Esto implica una reducción de tiempo de trabajo y de gasto económico.
- En el proceso propuesto, las fracciones de monómero y agregados de rhBMP-2 que no se han plegado formando dímeros de manera espontánea durante la solubilización de los cuerpos de inclusión, no son capaces de formar la proteína en su conformación activa.
- Durante el proceso de renaturalización, la proporción dímero/monómero aumenta a medida que el tiempo de incubación de la proteína en la solución de plegamiento es mayor. Por tanto, el parámetro “tiempo de incubación” durante el proceso de plegamiento es un factor crítico para el aumento del rendimiento global del proceso.
- La sucesiva exposición del monómero no plegado a las condiciones de renaturalización no origina la formación de rhBMP-2 en su conformación nativa.
- La proteína rhBMP-2 obtenida presenta actividad osteoinductora sobre células de fenotipo osteoblástico, mioblástico y cultivos primarios.
- Tras un proceso de proteólisis se obtiene una proteína rhBMP-2 sin su extremo N-terminal y en consecuencia, carente del sitio de unión a heparina. Dicha proteína resultante presenta una mayor actividad *in vitro*.



✧ **CAPÍTULO 2:**  
*Evaluación de la respuesta celular de hMSC  
al tratamiento con rhBMP-2*

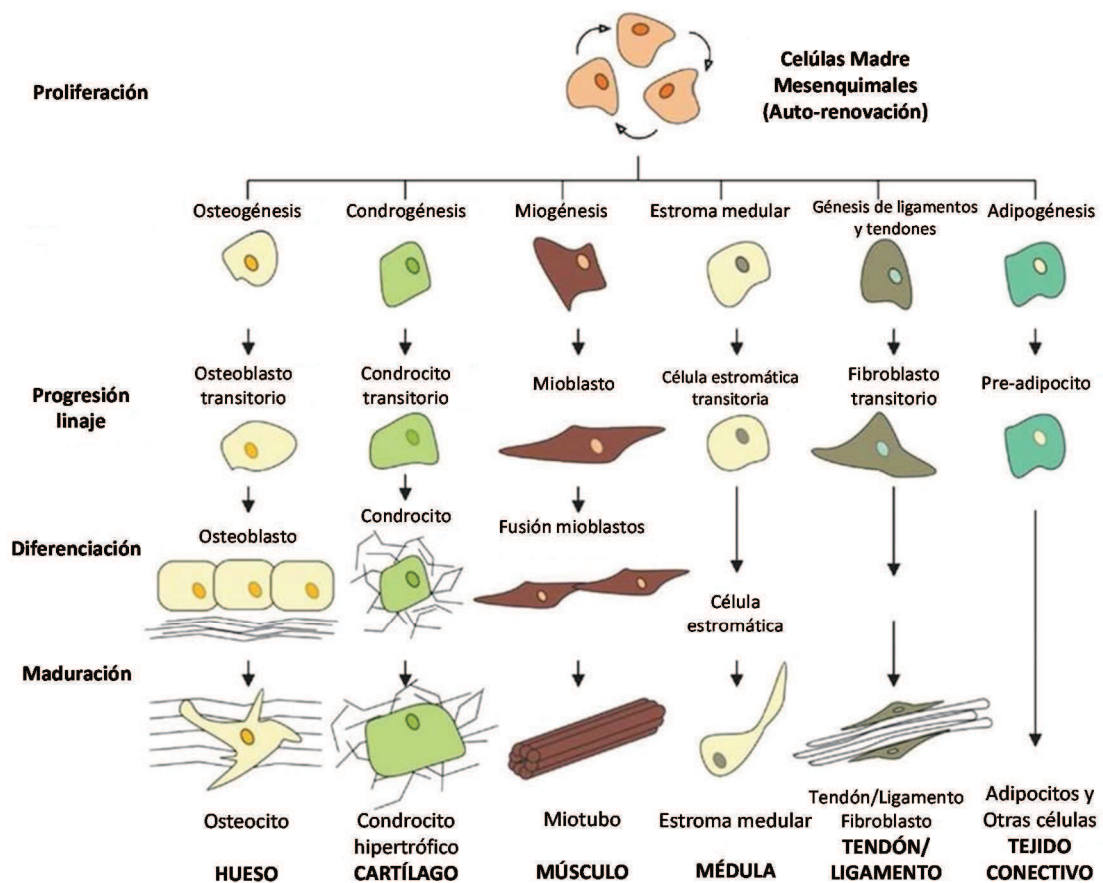
---



## I. INTRODUCCIÓN

La provisión continua de osteoblastos para el normal mantenimiento del hueso, así como para su remodelación y regeneración durante la reparación de fracturas, está asegurada por las células madre mesenquimales (MSC) osteoprogenitoras de la médula ósea.

Las MSCs son células no hematopoyéticas capaces de diferenciarse hacia tejidos mesenquimáticos como el hueso, cartílago, músculo, ligamentos, tendones y tejido conectivo como el adiposo (figura 46). Durante el proceso de diferenciación las células progenitoras adquieren por medio de factores reguladores fenotipos específicos (Chamberlain et al. 2007).



**Figura 46. Proceso mesengénico.** Diagrama de la capacidad de diferenciación de las MSC. (Adaptado de la referencia (Firth, Yuan 2012)).

## **1. DIFERENCIACIÓN ÓSEA**

La diferenciación y maduración de células osteoprogenitoras en osteoblastos está modulada por toda una serie de mediadores fisiológicos, tales como factores de crecimiento transformantes-beta (TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2) y proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs) pertenecientes a la misma familia, paratohormona, estrógeno y 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>. En el caso de los osteoblastos, su diferenciación es a partir de células mesenquimales localizadas en la superficie del periostio y en el estroma de la médula ósea. El proceso de diferenciación de los osteoblastos se podría dividir al menos en dos estadios. Uno, en el que a partir de las células mesenquimales indiferenciadas se forman los progenitores de osteoblastos, ya que éstos son células especializadas que no están diferenciadas terminalmente. Y otro es la maduración de los osteoblastos propiamente dichos, que a su vez, darán lugar a los osteocitos (Harada, Rodan 2003). Así, los osteoblastos producen altos niveles de actividad fosfatasa alcalina y grandes cantidades de proteínas de la matriz extracelular como el colágeno tipo  $\alpha$ 1, tipo  $\alpha$ 2, osteopontina, osteonectina, sialoproteína, fibronectina, y osteocalcina, requerida, esta última, para la mineralización (Milona, Gough & Edgar 2003). El control de dicha expresión está regulado por un conjunto de factores de transcripción como Runx2, Dlx5, Nmp4, AJ18, osterix, etc... cuya expresión también está sujeta al efecto de la diferenciación osteogénica.

### **1.1. Expresión de marcadores óseos**

La expresión de los diferentes marcadores óseos está determinada por las fases del desarrollo del hueso. Owen (Owen et al. 1990) propuso la secuencia de formación del tejido óseo diferenciándola en 3 etapas: la proliferación celular con secreción de la matriz extracelular, la maduración de la matriz y la mineralización. En un principio ocurre la proliferación, que asegura la expansión de la población y la síntesis de colágeno tipo I de la matriz ósea. En este momento, se expresan los genes necesarios para la activación de proliferación, progresión por el ciclo celular, proteínas de adhesión celular, biosíntesis de matriz extracelular y citoesqueleto. Posteriormente se produce la expresión de genes asociados a la maduración de la matriz ósea, como la fosfatasa alcalina y la fibromodulina. A estos genes se les denomina marcadores osteogénicos tempranos. Finalmente, la expresión de osteocalcina y sialoproteína, que son proteínas específicas de osificación, es máxima durante la mineralización de la matriz y la organización típica del tejido óseo (Dragoo et al. 2003).

En cultivos *in vitro*, la diferenciación de MSC hacia el fenotipo osteoblástico normalmente depende de varios factores como el medio de cultivo, el tiempo de cultivo y la adición de suplementos. El método clásico de inducción osteogénica en ensayos *in vitro* consiste en el tratamiento de las células con glucocorticoides como dexametasona, fosfatos orgánicos como el  $\beta$ -glicerofosfato y otros suplementos como el ácido ascórbico o la 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> durante 2-3 semanas (Tuan, Boland & Tuli 2003, Park 2012). Sin embargo, estas condiciones no reflejan la realidad fisiológica ocurrida *in vivo*. Por este motivo, existen investigaciones acerca del papel de las BMPs en el desarrollo de la osteogénesis (Kim et al. 2008, Diefenderfer et al. 2003b). Estas proteínas morfogenéticas óseas fueron inicialmente identificadas como factores que inducían la formación de hueso *in vivo* cuando eran implantadas en tejidos musculares (Wozney et al. 1988). Además no sólo estimulan la condrogenésis y osteogénesis e incluso la adipogénesis en determinadas circunstancias sino que también inhiben la miogénesis (Abarrategi et al. 2013). De la familia de las BMPs, la BMP-2 junto con la BMP-7, son las proteínas que presentan mayor capacidad de inducir la regeneración ósea y de formar hueso ectópico en vertebrados adultos.

En estudios de diferenciación osteogénica, las MSC se emplean frecuentemente (Lo et al. 2011, Zhang et al. 2013). Sin embargo, dichas células tienen limitada su capacidad proliferativa y su potencial de diferenciación disminuye con los pases de cultivo (Kim et al. 2008, Shafiee et al. 2011). Por este motivo, se han empleado otras líneas celulares para el estudio de la expresión génica inducida por el efecto de las BMPs. Así la línea celular C2C12 es un modelo *in vitro* de células de ratón muy bien caracterizado para la diferenciación celular del músculo esquelético. Ofrece un sistema modelo para estudiar el estadio temprano de la diferenciación osteoblástica durante la formación de hueso en tejidos musculares. Además la línea celular mioblástica C2C12 es una de las más utilizadas en estudios de diferenciación con BMP-2 por la ausencia inicial de la actividad fosfatasa alcalina, detectable tras su cultivo con BMP-2 activa. De este modo, la BMP-2 no sólo inhibe la diferenciación de C2C12 en miotubos multinucleados, y por tanto, su diferenciación terminal, sino que también induce a dichas células hacia el fenotipo osteoblástico (Abarrategi et al. 2009, Lee et al. 2000).

### 1.1.1. Factores de transcripción

Los genes diana de la BMP-2 incluyen factores de transcripción que son determinantes del fenotipo osteoblástico. Algunos como Runx2 y Osterix son aceptados como los principales factores osteogénicos.

**Runx2** (del inglés runt related transcription factor 2 o previamente conocido como Cbfa 1/Pebp2 $\alpha$ A/AML3) es un factor de transcripción esencial en el estadio inicial de la diferenciación de las células progenitoras hacia osteoblastos o condrocitos. Así, ratones deficientes en Runx2 muestran una ausencia completa de hueso debido a que se detiene la maduración de los osteoblastos. Diversos estudios indican que en la línea celular C2C12, Runx2 es estimulado por el tratamiento de BMP-2 (Lee et al. 2000). Por otra parte, la expresión basal de Runx2 en MSC es baja pero aumenta bajo inducción osteogénica (Shafiee et al. 2011).

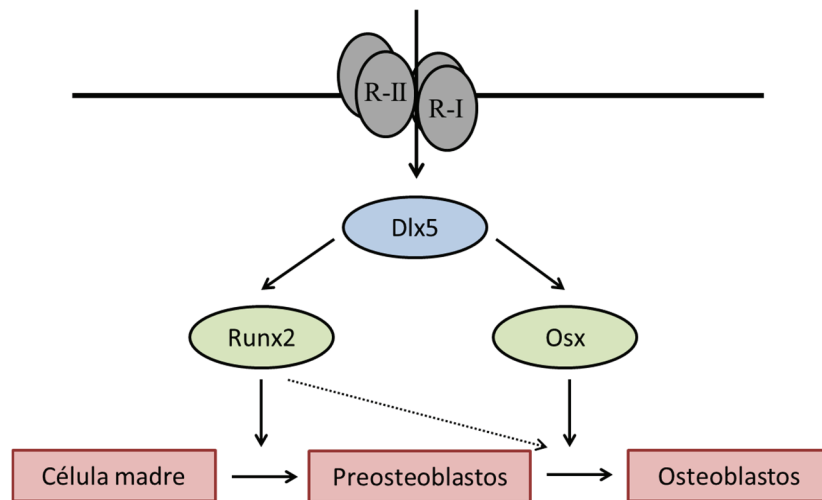
Runx2 forma parte de la vía de señalización Smad y recientemente se ha descubierto que también se encuentra en la vía de la MAPK ya que la fosforilación de Runx2 a través de esta vía parece ser importante en la inducción de la expresión de osteocalcina (Deschaseaux, Sensébé & Heymann 2009).

Sin embargo, la expresión única de Runx2 es insuficiente para mediar la diferenciación osteoblástica inducida por BMP-2, es decir, son necesarios otros factores estimulados en la ruta de señalización de BMP para conseguir dicha diferenciación (Lee et al. 2003a).

Por otra parte, **osterix** (Osx o factor de transcripción Sp7) es un factor de transcripción expresado en osteoblastos y osteocitos en el desarrollo óseo. Osx regula la expresión de un importante número de genes osteoblásticos como osteocalcina, osteonectina, osteopontina, fibromodulina, sialoproteínas y colágeno tipo I (Milona, Gough & Edgar 2003). De este modo, ratones deficientes en osterix muestran una pérdida de la mineralización del hueso. Su expresión basal en líneas celulares miogénicas como C2C12 es nula. Sin embargo, el tratamiento con BMP-2 induce la expresión de Osx en estas células y en células madre mesenquimales (Ortuño et al. 2010).

A su vez, Osx está regulado por Runx2, de modo que la expresión de Osx *in vivo* requiere de la expresión de Runx2. Sin embargo, células mesenquimales deficientes de Runx2 y tratadas con BMP-2 son capaces de inducir la expresión de Osx y, por tanto, promover la diferenciación osteoblástica en asociación con la regulación positiva de genes que a su vez no están controlados por Runx2. Esto indica que Osx no es una diana directa de Runx2 y, por lo tanto, la expresión de Osx está regulada por BMP-2 tanto a través de un mecanismo dependiente de Runx2, como por un mecanismo independiente (Ortuño et al. 2010). Además al igual que en el caso de Runx2, la expresión única de Osx no es suficiente para la osteogénesis *in vivo* (Matsubara et al. 2008).

Ambos factores están regulados por un tercer factor de transcripción, Dlx5 (figura 47). Se ha demostrado que la sobreexpresión de Dlx5 en la línea celular C2C12 estimula la expresión de Runx2, incluso en ausencia de BMP-2, pero no de Osx. En este último caso, es necesario el tratamiento de BMP-2 para estimular dicha expresión en C2C12 (Matsubara et al. 2008). Así mismo, si se bloquea la expresión de Dlx5, no aparecerá expresión de Runx2 incluso bajo el tratamiento de BMP-2 (Lee et al. 2003a).



**Figura 47. Relación regulatoria entre Dlx5, Runx2 y Osx en la inducción de osteogénesis por BMP-2.** (Adaptado de la referencia (Lee et al. 2003b))

Por tanto, los factores de transcripción Runx2, Osx y Dlx5, junto con Periostina entre otros genes, están implicados en el comienzo de la diferenciación osteoblástica, es decir, su expresión aparece durante las primeras 24 horas después de la activación del receptor de BMP-2. En este periodo de tiempo se produce un proceso clave para conseguir que las células precursoras se dirijan hacia el linaje osteoblástico (Zhang et al. 2013, Bustos-Valenzuela et al. 2011).

### 1.1.2. Marcadores tempranos de diferenciación ósea

La **periostina** (Postn, previamente nombrado factor específico-osteoblástico 2, (Osf-2)) es una proteína que forma parte de la matriz extracelular y fue aislada de osteoblastos como un factor específico que aparecía preferentemente en el periostio. Se expresa de forma temprana en el desarrollo esquelético y se detecta en la mayoría de los huesos, sin tener en cuenta su origen embriológico ni su mecanismo de osificación. Su

función está relacionada con el reclutamiento, adhesión y expansión de osteoblastos (Balint et al. 2003).

La expresión de Postn en células C2C12 es totalmente nula ya que únicamente se expresa en células osteoblásticas como MC3T3-E1, ATDC5 y COB. Incluso su expresión en osteocitos es prácticamente indetectable sugiriendo así que los osteoblastos cesan la producción de dicha proteína durante el proceso de diferenciación (Ducy et al. 1997, Horiuchi et al. 1999). Sin embargo, el tratamiento de la línea celular C2C12 con BMP-2 induce la expresión de Postn a las 12 horas y continúa aumentando a las 24 horas. Esto indica que las células están empezando a mostrar características propias de osteoblastos diferenciados (Bustos-Valenzuela et al. 2011).

Además, actualmente se ha descubierto que la periostina puede jugar un papel importante en el establecimiento de metástasis en ratones ya que también se encuentra en el tejido de soporte de los tumores primarios. En este experimento, inyectaron a roedores con cáncer un anticuerpo que se une específicamente a la periostina, inhibiendo de este modo su acción. Las células madre cancerosas fueron incapaces de beneficiarse del sostenimiento estructural que aporta la periostina y no colonizaron el órgano diana. El resultado fue que o bien las células han desaparecido, o se quedaron en un estado latente (Malanchi et al. 2012).

Otros marcadores tempranos de diferenciación osteoblástica citados anteriormente son la fosfatasa alcalina y la fibromodulina.

La **fosfatasa alcalina** (FA) es una enzima hidrolasa que está relacionada con el inicio de la calcificación y, por tanto, desempeña un papel importante en la mineralización ósea. Esta actividad enzimática es uno de los marcadores más utilizados para evaluar la diferenciación osteoblástica puesto que se empieza a expresar en las primeras fases del proceso y su expresión basal en células C2C12 es nula. Bajo el tratamiento de dichas células con BMP-2 los niveles de expresión de fosfatasa alcalina aumentan hasta un momento en el que empiezan a disminuir. Este hecho está relacionado con el comienzo de la expresión de marcadores tardíos como es el caso de osteocalcina (OC) que está íntimamente relacionado (Luu et al. 2007).

Además la expresión basal de FA en hMSC está presente pero es baja. Dicha expresión aumenta bajo el tratamiento con medio de inducción osteogénico (Shafiee et al. 2011).

Por otra parte, la **fibromodulina** (Fmod) es un proteoglicano de la matriz extracelular expresado en tejidos conectivos incluyendo ligamentos, cartílago y tendones (Kalamajski, Oldberg 2007). Además de ser también un marcador de diferenciación condrogénica, es otro marcador temprano de diferenciación osteogénica ya que células C2C12 tratadas con BMP-2 empiezan a incrementar sus niveles de expresión a las 8 horas tras el tratamiento. A su vez, dichas células en ausencia de tratamiento tiene niveles de expresión nulos (Li et al. 2008). Esto mismo ocurre con las hMSC, ya que la expresión basal de Fmod en dichas células es nula mientras que si es estimulado con factores de crecimiento aumenta rápidamente incluso dentro de las primeras 24 horas de tratamiento (Barry et al. 2001).

### 1.1.3. Otros marcadores de diferenciación osteoblástica

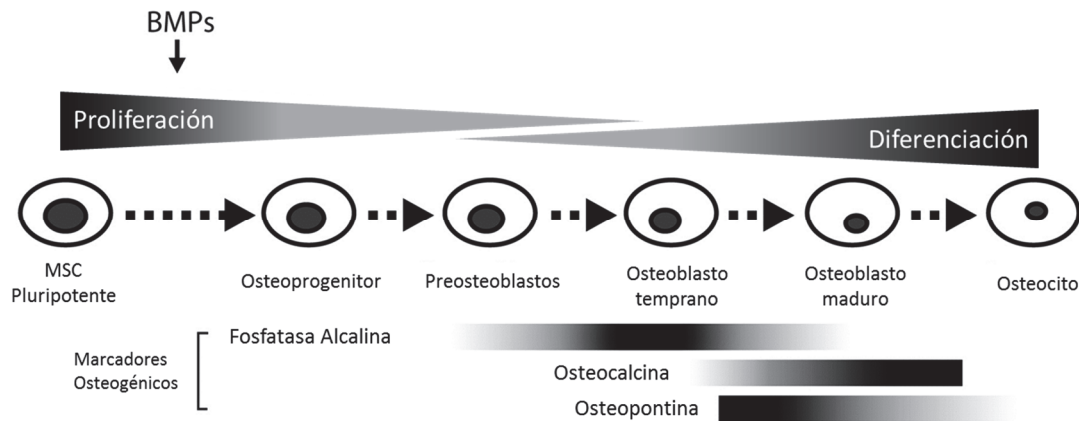
Otros marcadores presentes durante la maduración de la matriz extracelular son la osteopontina y la osteonectina.

La **osteopontina** (OPN o SPP1 del inglés Secreted phosphoprotein 1) es una fosfoproteína multifuncional con efecto estimulante sobre la síntesis de matriz extracelular. Fue inicialmente identificada como un componente adhesivo de la matriz extracelular pero posteriormente se ha descrito que es expresada por un amplio número de células incluyendo células epiteliales, linfocitos T, macrófagos, células del músculo liso, células endoteliales, etc ... (Uaesoontrachoon et al. 2008). Es capaz de unirse al calcio y tiene una elevada afinidad hacia la hidroxapatita jugando un papel importante en la mineralización del hueso y en la resorción de la matriz ósea (Reinholt et al. 1990, Chen et al. 1993). Por esto mismo, participa en la función de los osteoclastos ya que promueve la unión de éstos a la superficie del hueso por medio de la interacción de la hidroxapatita a la superficie de la célula. Además en este proceso pueden interactuar proteínas como la osteocalcina, colágeno tipo I y la fibronectina (Denhardt, Guo 1993).

La expresión de osteopontina en osteoblastos se produce durante el periodo de proliferación activa (apareciendo hasta el 25% de su máxima expresión), posteriormente decrece durante la post-proliferación y por último, alcanza sus máximos niveles de expresión durante la mineralización (a los días 16-20) (HU et al. 2009). Sin embargo, en ausencia de mineralización, tanto osteopontina como osteocalcina no se inducen hasta sus niveles más altos de expresión. En cambio, la expresión de otros marcadores óseos, como el colágeno no se ven afectados en dicha situación (Stein, Lian 1993).

Por tanto, los niveles de expresión de osteopontina en células C2C12 y células madre mesenquimales humanas aumentan considerablemente cuando estas células son tratadas

con factores de diferenciación ósea como es el caso de las BMPs (Bessa, Casal & Reis 2008b, Uaesoontrachoon et al. 2008).



**Figura 48. Modelo de la diferenciación osteogénica inducida por BMP en células madre mesenquimales.** Las BMPs inducen genes diana, los cuales regulan la proliferación y diferenciación provocando la expresión de marcadores osteogénicos. (Adaptado de la referencia (Peng et al. 2004, Luo et al. 2004))

La **osteonectina** (ON o SPARC del inglés secreted protein acidic and rich in cysteine) es una glicoproteína de la matriz extracelular. Inicialmente se describió que era secretada por osteoblastos, pero se ha encontrado su expresión en más tejidos. Es una proteína multifuncional involucrada en osteogénesis, angiogénesis, cicatrización de heridas y tumorogénesis. Es secretada por osteoblastos durante la formación del hueso iniciando la mineralización y promoviendo la formación del cristal de hidroxiapatita. Además es un mediador implicado en la deposición de colágeno en la matriz extracelular (Kos et al. 2009).

Como hemos indicado anteriormente la expresión de osteonectina depende de algunos factores de transcripción como es el caso de *Osx*. Así en células C2C12 su expresión basal es prácticamente nula, mientras que bajo el tratamiento de BMP se induce la expresión de dicho factor de transcripción y en consecuencia, el aumento de los niveles de osteonectina. Sin embargo, en el caso de hMSC sí muestran una expresión basal de esta proteína que aumenta considerablemente bajo el tratamiento de factores de crecimiento (Shafiee et al. 2011, Steck et al. 2005, Juhásová et al. 2011).

Como curiosidad cabe destacar que en últimos estudios se ha visto que la osteopontina y la osteonectina tienen una estrecha relación con el carcinoma pancreático. Se ha demostrado que osteopontina contribuye en el crecimiento metastásico de células tumorales mientras que la osteonectina tiene un papel antitumorogénico (Zhivkova-Galunski et al. 2010, Kapinas et al. 2012).

Por otra parte, existen marcadores osteoblásticos que comienzan a expresarse de forma más tardía, es decir, cuando se produce la mineralización de la matriz. Estos marcadores están en estrecha relación con los marcadores tempranos ya que como hemos indicado anteriormente en el caso de la **osteocalcina** se induce su expresión en el momento en el que la fosfatasa alcalina comienza a disminuir sus niveles. Además su expresión está regulada por los factores de transcripción explicados anteriormente como es el caso de osterix.

#### 1.1.4. Marcadores de fenotipo mioblástico

En contraposición a la expresión de los marcadores óseos, durante la diferenciación osteoblástica se producirá una disminución en los niveles de expresión de los marcadores mioblásticos. Éstos aparecen en un nivel basal en las células en ausencia de tratamiento (en el caso de células C2C12). Algunos de estos marcadores mioblásticos son la **miogenina** (Myog), la **cadherina 15** (Cdh15) o la **troponina I** (Troponina I, fast 2) (Tnni2). En diferentes estudios se ha demostrado como, en células madre mesenquimales o en células mioblásticas (C2C12) se inhibía la expresión de dichos marcadores a medida que se prolongaban las horas de exposición a BMP-2 (Luu et al. 2007, Li et al. 2008, Moran et al. 2002).

Además se ha visto como la concentración de BMP-2 requerida para conseguir la expresión de marcadores óseos, es la misma que la requerida para disminuir la expresión de los marcadores miogénicos. Esta disminución provocará la inhibición del desarrollo hacia células musculares maduras, por tanto, favorecerá su conversión hacia el fenotipo osteoblástico (Katagiri et al. 1994).

## **2. OBJETIVO PARCIAL: EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR DE hMSC AL TRATAMIENTO CON rhBMP-2**

En este apartado se presentan los estudios realizados para conocer, de forma más específica mediante ensayos *in vitro*, el efecto de la proteína rhBMP-2 obtenida en el primer capítulo de este trabajo. De este modo, una primera parte se dirige a la caracterización de la respuesta de células madre mesenquimales al tratamiento de dicha proteína. Además se compara su comportamiento al obtenido bajo la influencia de medio de diferenciación osteogénico.

En una segunda parte de este capítulo se profundiza en la posible desdiferenciación con rhBMP-2 estudiando los niveles de expresión de factores de transcripción y de proteínas implicados en el proceso de diferenciación osteoblástica. Para ello, se simulan bajo distintos tratamientos, dicha situación de desdiferenciación y se analiza la inducción o inhibición de marcadores óseos y/o musculares, tanto en una línea celular mioblástica de ratón, C2C12, como en células madre mesenquimales humanas, en un estudio preliminar.

## **II. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. OBTENCIÓN DE rhBMP-2**

Se obtuvo la rhBMP-2 recombinante humana (rhBMP-2) como se ha descrito en el capítulo 1 de este trabajo.

### **2. CULTIVO CELULAR**

Se realizaron los ensayos celulares con la línea C2C12 y hMSC, las cuales fueron propagadas y cultivadas en las mismas condiciones que se ha indicado en el Capítulo 1.

### **3. ESTUDIO DE PROLIFERACIÓN CELULAR**

Los ensayos celulares se llevaron a cabo en placas de cultivo celular de 48 pocillos (Corning Costar). Se realizaron por triplicado con sus correspondientes controles. Se sembraron las células a una densidad de 10.000 células por pocillo y se añadió 0,4 mL del medio suplementado correspondiente. Se cultivaron en una estufa de cultivo a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **3.1. Ensayo de Etidio-Homodímero**

El Etidio-Homodímero es un reactivo fluorescente normalmente empleado para medir la citotoxicidad celular. Esto es debido a que se une al DNA de aquellas células con la membrana dañada, tiñéndolo de color rojo. Sin embargo, en este caso y según el protocolo empleado lo hemos elegido para cuantificar el número total de células adheridas a la superficie de cultivo.

Para la realización del ensayo de Etidio-Homodímero se preparó PBS con el reactivo Etidio-Homodímero 2 mM (Molecular Probes®) en una proporción 1/500 (etidio/PBS). Se eliminó el medio de cultivo de todos los pocillos objeto de ensayo y se añadió 470 µL de metanol (para provocar la muerte celular y por tanto, la ruptura de la membrana). Posteriormente se añadió a cada pocillo 200 µL del PBS/etidio previamente preparado y se incubó en oscuridad en una estufa de cultivo durante 30 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se

midió la señal de excitación a 530 nm y la emisión a 645nm en un lector de placas (Biotek FL-600).

### **3.2. Ensayo de MTT**

Como método indirecto de cuantificación de la proliferación celular se empleó el ensayo de MTT, también conocido como Test de inhibición de la Succinato Deshidrogenasa (SDI). Es un ensayo colorimétrico que mide la actividad metabólica de las células en fase de proliferación activa y, por tanto, la viabilidad celular. Está basado en la rotura del anillo de tetrazolio del MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), por diferentes deshidrogenasas mitocondriales, formándose cristales de formazán. Los cristales de formazán son insolubles en agua pero pueden solubilizarse con disolventes orgánicos, siendo la cantidad de formazán formado proporcional al número de células proliferantes (metabólicamente activas) (Mosmann 1983).

Para la realización del ensayo de MTT se siguió el protocolo de proliferación celular descrito por el fabricante (*CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay*, Promega, Madison, WI, USA). Para ello, se añadió a cada uno de los pocillos 40 µL del reactivo de MTT y se incubaron en una estufa de cultivo durante 4 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se añadió la misma cantidad del volumen del pocillo (en este caso 440 µL) de la solución de solubilización previamente preparada (compuesta por 89,12% de isopropanol, 0,88% de ácido clorhídrico al 35%, y 10% de Tritón X-100) y se homogeneizó para conseguir una completa solubilización del producto de formazán. Se midió la absorbancia a 590 nm y a 630 nm en un lector de placas (Biotek FL-600).

### **3.3. Ensayo de cuantificación de contenido proteico total. Ensayo Bradford**

El ensayo de Bradford se realizó siguiendo el mismo procedimiento especificado en el capítulo 1. Se empleó únicamente con el objetivo de normalizar los datos obtenidos de actividad fosfatasa alcalina.

## **4. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE rhBMP-2. ENSAYO DE FOSFATASA ALCALINA**

La actividad de la proteína rhBMP-2 sobre las células hMSC se evaluó mediante el ensayo colorimétrico de fosfatasa alcalina y se realizó siguiendo el mismo procedimiento que el explicado en el capítulo 1. Los ensayos se realizaron por triplicado con sus correspondientes controles.

## 5. ESTUDIO DE DIFERENCIACIÓN

Para realizar los ensayos de estudio de diferenciación de hMSC se sembraron las células en placas de 48 pocillos (Corning Costar) a una densidad celular de 10.000 células por pocillo. La primera semana se cultivaron con medio de crecimiento MSCBM (*Mesenchymal Stem Cell Basal Medium*) suplementado con 10% suero fetal bovino, L-glutamina, sulfato de gentamicina y anfotericina B (*MSCGM, hMSC SingleQuot Kit*) en estufa de cultivo a 37°C y una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Tras llegar a confluencia (aproximadamente 5-7 días) se realizó el cambio de medio de crecimiento a medio de diferenciación osteogénica en los pocillos correspondientes (*Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium, Lonza*). Los ensayos se realizaron por triplicado.

### 5.1. Ensayo de mineralización. Tinción de Alizarín Red

La tinción Alizarín Red se emplea para determinar la presencia de depósitos de calcio en las células de una línea osteogénica. Por tanto, es un marcador de mineralización de matriz extracelular.

Para realizar la tinción se preparó previamente una solución de Alizarín Red (Merck) al 2% en agua destilada y con un pH 4,2. Se retiró el medio de cultivo de las placas y se lavaron los pocillos 2-3 veces con PBS (0,2 mL). Se fijaron las células durante 1 hora con etanol al 70% conservado a -20°C. Los pocillos se lavaron nuevamente con PBS y se añadió a cada uno 1 mL de la solución de Alizarín Red preparada, dejándola reaccionar durante 20 minutos. Por último se retiró la solución de tinción y se lavaron los pocillos con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante. Los resultados obtenidos se observaron con un microscopio Olympus BX51 y se realizaron las imágenes procesándolas con el programa Imagen Cell<sup>^</sup>D.

## 6. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE MARCADORES IMPLICADOS EN LA DIFERENCIACIÓN ÓSEA

### 6.1. Cultivo celular para extracción de RNA

Los ensayos celulares se llevaron a cabo con dos tipos celulares: células C2C12 en pase 7 y hMSC en pase 3 (pase al inicio del ensayo). Se realizó en placas de cultivo celular de 6 pocillos (Corning Costar, con superficie de pocillo de 9,5 cm<sup>2</sup>) y se sembraron las células

a una densidad de 75.000 células por pocillo. Posteriormente se añadió 4 mL del medio de cultivo correspondiente (DMEM o MSCBM) y se cultivaron en una estufa de cultivo a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Para las células sometidas al tratamiento de rhBMP-2, la dosis empleada fue de 1 µg por cada 10.000 células sembradas. Este procedimiento se realizó cada cuatro días, durante los 16 días de estudio en el caso de la línea celular C2C12, y cada 7 días durante los 28 días de estudio en el caso de las células hMSC. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Paralelo a esto, las células se mantuvieron en cultivo como se indica en el apartado “cultivo celular” respetando las diferentes condiciones del ensayo para poder sembrar a los días correspondientes las placas destinadas a la extracción de RNA.

## **6.2 Extracción de RNA**

La extracción de RNA se llevó a cabo con Trizol. Se retiró el medio de las placas de 6 pocillos y se realizó un lavado con PBS. Posteriormente se añadió 1 mL de Trizol (*TRI Reagent*®, Sigma) por pocillo, se homogeneizó y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante en un tubo nuevo. Se añadió 200 µL de cloroformo por pocillo y se agitó fuertemente durante 15 segundos, incubándolo durante 2-15 minutos. Se volvió a centrifugar durante 15 minutos a 4°C y la fase acuosa se recogió de nuevo en un tubo. Se añadió a cada tubo 500 µL de isopropanol para precipitar el RNA y se incubó de 5 a 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Para realizar el lavado se añadió 1 mL de etanol al 75% y se centrifugó a 7.500 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se descartó. Se dejó secar el precipitado y se disolvió en un volumen de 20-30 µL de agua libre de RNAsas. Se congeló a -80°C.

La concentración del RNA se determinó de manera espectrofotométrica midiendo la absorbancia a 260 nm. Se puede determinar la concentración de RNA considerando que 1 unidad de absorción a 260 nm equivalente a 40 µg de RNA por mL, mediante la siguiente fórmula:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times [(40 \text{ µg RNA/mL}) / 1 A_{260}] \times l \times D$$

Siendo: l= paso de luz de la cubeta en cm (normalmente 1 cm)

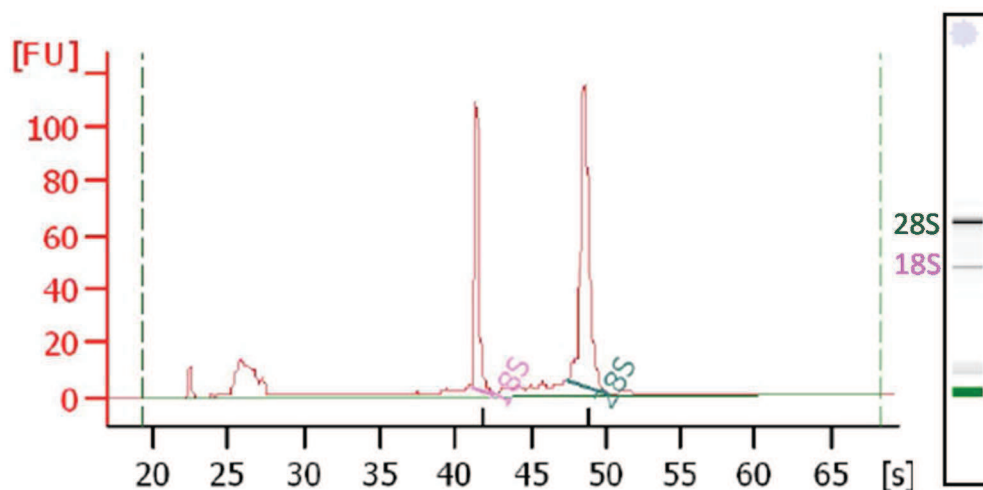
D=factor de dilución

A<sub>260</sub>= absorbancia a 260 nm

La pureza del RNA se determinó evaluando la relación A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>, de manera que se obtengan valores entre 1,8 y 2 para indicar la ausencia de contaminación proteica

(Sambrook 1989). Ambos ensayos se realizaron empelando un NanoDrop, ND-1000 Spectrophotometer.

Además la integridad del RNA se testó mediante electroforesis (RNA 6000 NanoChips, Agilent 2100 Bioanalyzer).



**Figura 49. Chequeo de la integridad y pureza del RNA mediante electroforesis (RNA 6000 NanoChips, Agilent 2100 Bioanalyzer).** En la imagen de la derecha se observan en el gel las bandas ribosomales 28S y 18S. La gráfica representa la intensidad de dichas bandas y la pureza de la muestra.

### 6.3 Evaluación de los cebadores diseñados para qPCR

#### 6.3.1. Síntesis de cDNA

La primera cadena de cDNA se sintetizó desde 1  $\mu$ g de RNA total, usando el kit "High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" (Applied Biosystems) según especificaciones del fabricante. Para ello se preparó una solución "Master Mix" que contenía todos los componentes necesarios para la reacción, a excepción de los RNAs moldes. Se preparó un "Master Mix" para n+1 reacciones, siendo "n" el número de muestras a analizar y para un volumen final de reacción de 20  $\mu$ L. Se introdujeron las muestras en un termociclador (MiniCycler™, MJ Research Inc) y se sometieron a 25°C durante 10 minutos, seguido de 37°C durante 120 minutos y por último un paso de 5 segundos a 85°C. Las reacciones obtenidas se emplearon para realizar PCR estándar.

### 6.3.2 PCR estándar

Para evaluar la validez de los cebadores diseñados antes de ser empleados en PCR cuantitativas, realizamos PCR estándar chequeando así la presencia o ausencia de amplificación. Se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 15  $\mu$ L usando un kit de DNA polimerasa (Biotools, B & M Labs, S.A.). Los cebadores directo y reverso fueron diseñados en el “UniversalProbeLibrary Assay Design Center” (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp?id=UP030000>) o en “Primer 3 Input” (<http://frodo.wi.mit.edu/>) con condiciones restrictivas a partir de la secuencia exacta que se traduce en proteína. Posteriormente fueron analizados en “Premier Biosoft, NetPrimer” (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>) para asegurarnos de la efectividad de éstos (ausencia de dimerizaciones o de formación de bucles). Los cebadores fueron suministrados por Isogen Life Science y las concentraciones finales de cebadores en el ensayo fueron de 200nM. Las secuencias de todos los cebadores específicos empleados en el ensayo se detallan en la tabla 8 y 9.

**Tabla 8. Listado de cebadores para hMCS empleados en los ensayos de expresión.**

Gen	Cebador directo Cebador reverso	Tm	Longitud amplificación (pb)
<b><math>\beta</math>-Actina</b>	AAACTGGAACGGTGAAGGTG	60,0	61
	ATTGTGAACTTTGGGGGATG	59,7	
<b>Ribosomal phosphoprotein P0 (RPLP0)</b>	ACCTCCTTTTTCCAGGCTTT	59,2	106
	TGGCTCCCACTTTGTCTCC	61,2	
<b>Runt related transcription factor 2 (Runx2)</b>	AAGAAATCCCATCCCTAAAACC	59,6	110
	AACACATAGCCAAACGCAATC	60,0	
<b>Osteopontina (SPP1)</b>	GTTTCGCAGACCTGACATCC	60,7	79
	ATTCAACTCCTCGCTTTCCA	59,8	
<b>Fibromodulina (Fmod)</b>	CCACTTCACCCACTCCACTT	60,0	109
	GGTTGTCTCCACAGGTTGCT	60,1	
<b>Osteonectina (Ostn)</b>	GGAGTTGGTGAATCGGTTGT	59,8	86
	GGGAGGGTGAAGAAAAGGAG	60,0	

Tabla 9. Listado de cebadores para la línea celular C2C12 empleados en los ensayos de expresión.

Gen	Cebador directo	Tm	Longitud amplicón (pb)
	Cebador reverso		
<b>β-Actina</b>	ATCTTGGCCTCACTGTCCAC	60,0	60
	CTCATCGTACTCCTGCTTGCT	60,0	
<b>Ribosomal phosphoprotein P0 (RPLP0)</b>	ACCTCCTTCTCCAGGCTTT	59,3	101
	CCCACCTTGTCTCCAGTCTTT	60,6	
<b>Runt related transcription factor 2 (Runx2)</b>	GCCGGAATGATGAGAACTACT	58,0	83
	AGATCGTTGAACCTGGCTACTTG	58,0	
<b>Trans-acting transcription factor 7 (Sp7)</b>	CGACTGCAGATCAGTTCC	60,0	66
	GGGGATAACCTGGTGAGGTC	60,0	
<b>Fosfatasa Alcalina (FA)</b>	CTGACTGACCCTTCGCTCTC	60,0	100
	CAATCCTGCCTCCTCCAC	60,1	
<b>Fibromodulina (Fmod)</b>	AGTCCTGCCGACACTAGACC	60,0	60
	GCATAAGGCGGACTGCATAG	60,0	
<b>Periostina (Postn)</b>	CATGCAGGGATTTTATCTCAATG	60,0	78
	GGACCCAGTCACAATGATGTT	60,0	
<b>Osteopontina (SPP1)</b>	TCACTCCAATCGTCCTACA	59,1	70
	GACCTCAGTCCATAAGCCAAG	58,8	
<b>Osteonectina (Ostn)</b>	CAAGGAGCAGGACATCAACA	59,8	133
	GAACAGCCAACCATCCAAAC	60,36	
<b>Troponina I, skeletal, fast 2 (Tnni2)</b>	CGGAGGGTGCATGTCT	60,0	76
	TCAGGTCCATGCACACCTT	60,0	
<b>Cadherina 15 (Cdh15)</b>	GGACATGTATGGACATCAGTGAG	60,0	60
	GCGTATCCACACAGCACATC	60,0	

La PCR se realizó en un Termociclador (MiniCycler™, MJ Research Inc) con un paso de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C, 60°C o 62°C (según las distintas PCR realizadas) y 30 segundos a 72°C y un paso final posterior a los ciclos de 10 minutos a 72°C. Se realizó también en el ensayo un control negativo (ausencia de cDNA).

### **6.3.3 Gel de DNA**

Para visualizar los productos de PCR obtenidos se realizaron geles de agarosa al 2% (p/v) en TBE 1X, conteniendo 3  $\mu$ L de bromuro de etidio (Fluka, al 1% en agua) en 50 mL de gel. Se cargaron 10  $\mu$ L de muestra en cada pocillo del gel en una proporción de 4:1 (muestra:tampón de carga) y se corrieron a 90 voltios durante 50 minutos. Posteriormente se observó el resultado en un transiluminador de luz ultravioleta.

## **7. PCR CUANTITATIVA**

Las diferencias entre los niveles de RNA mensajero de los diferentes genes objeto de estudio fueron analizados empleando RT-qPCR. Se emplearon los mismos cebadores descritos en las tablas 8 y 9.

Los análisis de PCR cuantitativa se realizaron en un volumen de reacción final de 10  $\mu$ L, en placas "MicroAmp Optical 384-well reaction plate". Para estas reacciones se usó el kit "Power SYBR Green PCR Master Mix" (Applied Biosystems). Las concentraciones finales de cebadores y sondas en el ensayo fueron 200 nM y 100 nM, respectivamente. La PCR cuantitativa se realizó en un equipo "7900HT Fast Real Time PCR System" (Applied Biosystems) con un paso de desnaturalización a 95°C durante 20 segundos seguido de 40 ciclos PCR con desnaturalización a 95°C durante 1 segundo y apareamiento/extensión a 60°C durante 20 segundos (Unidad de Genómica, UCM).

Todos los ensayos de RT-qPCR para todos los genes de una misma réplica se hicieron al mismo tiempo y por duplicado. Se realizaron dos réplicas para todos los ensayos de expresión.

Los niveles de expresión de los genes en estudio fueron relativizados respecto a los niveles del gen control RPLP0 (gen que codifica a la proteína ribosomal P0 de la subunidad 60s).

La expresión relativa fue cuantificada usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak, Schmittgen 2001).

Para la relativización de los datos se estudiaron dos genes control,  $\beta$ -Actina y RPLP0 para comprobar la expresión de éstos en dichas células objeto de estudio. Tras analizar los datos obtenidos se decidió relativizar los resultados frente a RPLP0 ya que los niveles de expresión de éste eran más próximos a los niveles de expresión del resto de genes implicados en el estudio (el valor de Ct de RPLP0 es más próximo al resto de muestras).

Además se realizó un análisis de la expresión de dichos genes control en seis réplicas biológicas y se obtuvo una menor variabilidad de datos en el caso del RPLP0 (figura 50).

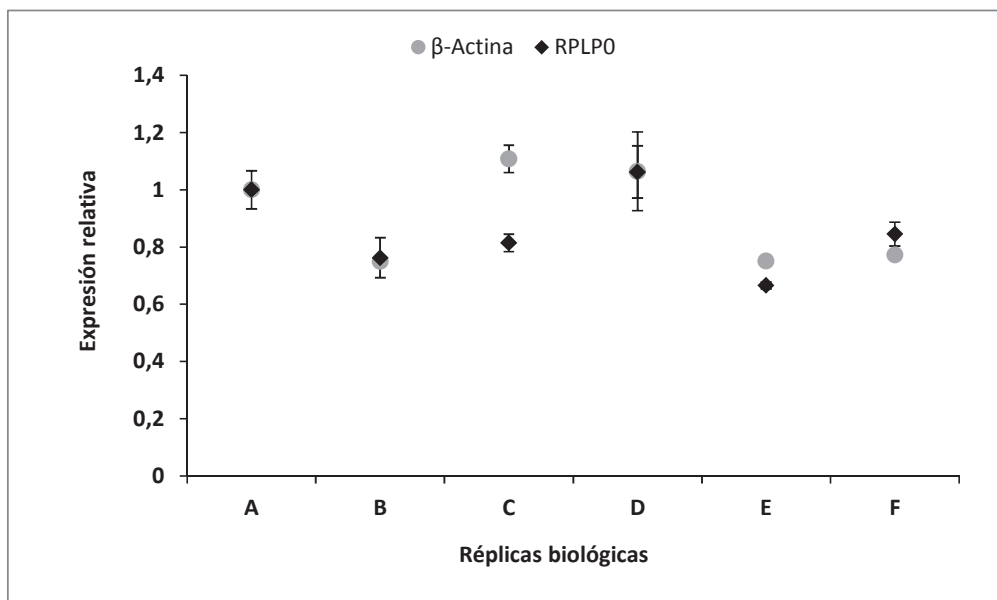


Figura 50. Expresión relativa de  $\beta$ -Actina y RPLP0 en un estudio de seis réplicas biológicas.

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  desviación estándar excepto en las qPCR que se expresó como promedio  $\pm$  error estándar. Los análisis de ajustes de datos se llevaron a cabo empleando el programa GraphPad Prism versión 4. Se realizaron distintos test estadísticos en función del ensayo y del número de datos experimentales para determinar la significancia de los datos entre los distintos tratamientos objeto de estudio. La comparación entre dos grupos fue realizada por test de Student y para analizar dos grupos de variables se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y el test post-hoc de Bonferroni o Tukey (en el caso de qPCR de C2C12). Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con un  $P < 0,05$ .



### **III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

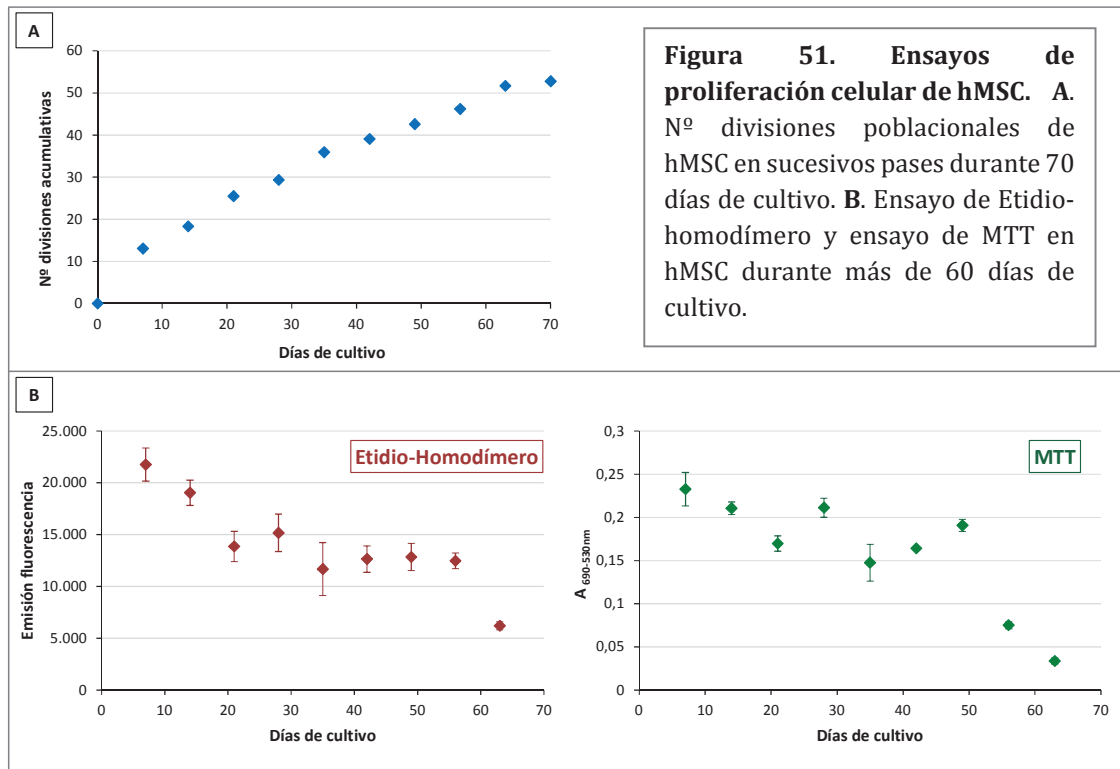
La capacidad de diferenciación de células madre mesenquimales hacia distintos fenotipos las convierte en objeto de estudios de numerosos trabajos. En nuestro caso, su capacidad para diferenciarse hacia el linaje osteoblástico hace que sean un modelo idóneo para evaluar *in vitro* la actividad de la rhBMP-2.

#### **1. INFLUENCIA DE LOS SUBCULTIVOS CELULARES EN hMSC**

##### **1.1. Proliferación celular**

En un primer lugar, para poder emplear dicho modelo celular en el estudio de la actividad de rhBMP-2 era necesario conocer sus características de proliferación en cultivos *in vitro*. Esto es debido a que se puede producir variaciones en el fenotipo de las células cuando son cultivadas por un largo periodo de tiempo y, por tanto, la evaluación del comportamiento celular es importante para seleccionar la población adecuada para los estudios *in vitro* (Coelho, Trigo Cabral & Fernandes 2000, Ter Brugge, Jansen 2002).

Para el estudio de proliferación celular, se cultivaron células madre mesenquimales humanas comerciales obtenidas a partir de médula de hueso (*Lonza*) y se mantuvieron en cultivo durante más de 60 días realizando los pases celulares cada 7 días. Cada pase se sembró a una misma densidad celular (5.000 células/cm<sup>2</sup>). Se analizó por distintos ensayos la población celular presente cada semana.



Una evaluación inicial fue el conteo visual de células en la cámara de Neubauer y el posterior cálculo del número de divisiones poblacionales en cada semana (figura 51A). En la finalización del ensayo se pudo observar cómo se obtuvieron más de 50 divisiones celulares. Sin embargo, dicho crecimiento no fue igualitario a lo largo de todo el ensayo sino que en la primera mitad del estudio ya se habían alcanzado más de 30 divisiones celulares, lo que indica que a medida que van aumentando los subcultivos celulares de hMSC va disminuyendo la capacidad de proliferación de dichas células. Además se observó cómo en los dos últimos puntos del estudio el número de divisiones es prácticamente nulo por lo que se podría decir que las células están llegando al estado de senescencia.

Para seguir estudiando la cinética de crecimiento se determinó el número de células totales evaluando por emisión de fluorescencia el contenido de DNA en cada pase celular mediante el ensayo de Etidio-homodímero. Como muestra la figura 51B, el contenido de DNA presentó un patrón de disminución a medida que aumentaban los días de cultivo. Estos resultados indican que el subcultivo de hMSC puede ejercer un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular, corroborando los datos obtenidos en la figura 51A.

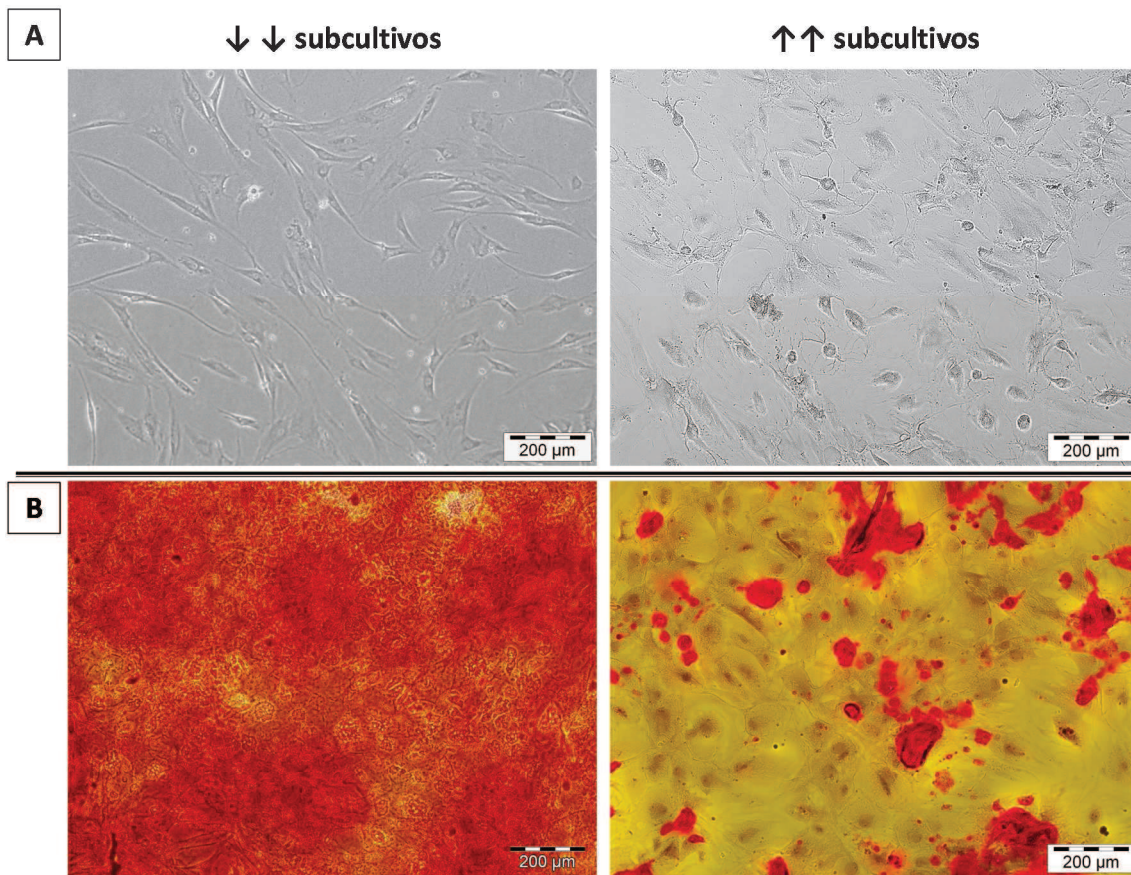
Además para completar el estudio de proliferación celular de hMSC a lo largo del tiempo se realizó un ensayo de MTT para evaluar la viabilidad celular, ya que dicho ensayo

mide la actividad mitocondrial de las células presentes en el cultivo. Los resultados presentaron el mismo patrón obtenido en los dos ensayos anteriores. A medida que aumentaba el número de subcultivos celulares disminuía el valor de actividad mitocondrial. Teniendo en cuenta los resultados anteriores, podemos decir que la disminución de los valores de MTT no es debido a un cambio en la actividad metabólica de las células sino a una disminución del número de células presentes en el cultivo.

## 1.2. Mineralización

La inducción de diferenciación osteogénica en hMSC es un proceso altamente estudiado. Durante la diferenciación las hMSC forman agregados e incrementan la expresión de fosfatasa alcalina. Además, con el tiempo se producen acúmulos de calcio que pueden ser identificados mediante distintas técnicas de tinción como von Kossa o Alizarín Red (Chamberlain et al. 2007).

Con el objetivo de seguir estudiando el comportamiento de las células madre mesenquimales humanas se realizó un ensayo de mineralización de dichas células en un pase corto y células en pase largo. Este último caso, corresponde a células que según el ensayo de proliferación anteriormente descrito tienen una capacidad de proliferación menor. Se sometió a ambas poblaciones celulares a tratamiento con medio de diferenciación comercial (*Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium, Lonza*) durante 3 semanas realizando cambios de dicho medio cada semana. Tras el tratamiento se realizó un ensayo de Alizarín Red para evaluar la presencia o no de acúmulos de calcio y por tanto, la mineralización. Se analizó la morfología celular antes del tratamiento con medio de diferenciación y se pudo observar como la estructura alargada que presentaban las células a pases cortos, se convertía en una morfología más aplanada y cuboidal cuando aumentaban el número de subcultivos. Además el tamaño de la célula parecía aumentar al igual que su contenido en gránulos (figura 52A). Por otro lado, los resultados obtenidos de la tinción de Alizarín Red tras el tratamiento de diferenciación, mostraron a pases cortos una gran presencia de acúmulo de calcio teñidos mientras que las células sometidas a un mayor número de subcultivos presentaron una tinción mucho menos intensa indicando así una menor mineralización (figura 52B).



**Figura 52. Morfología y mineralización de hMSC a pase corto (pase 3) y pase largo (pase 10).** A. Morfología celular de hMSC en pase 3 y pase 10, mantenidas con medio normal de proliferación. B. Ensayo de Alizarín Red a 21 días en células sometidas a tratamiento con medio de diferenciación osteogénico.

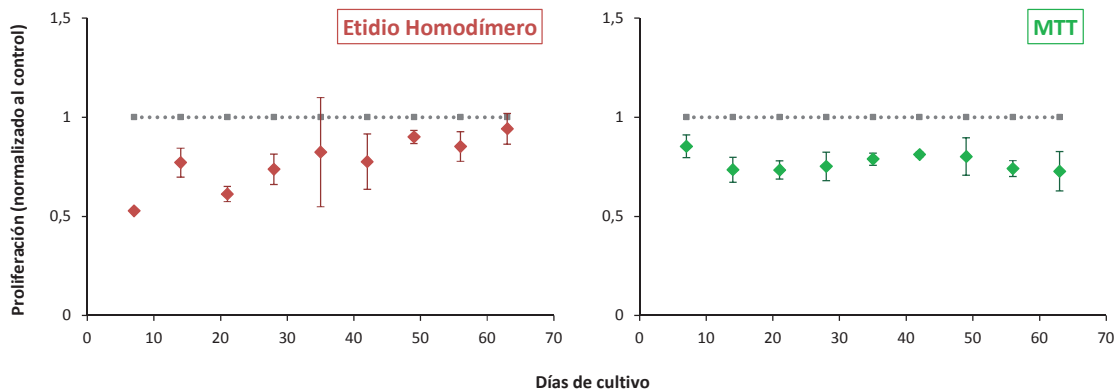
Estos resultados indican que el potencial osteogénico de las hMSC, y por tanto, su capacidad de mineralización, están probablemente influenciados por el pase celular.

### 1.3. Efecto de rhBMP-2

Con el objetivo de evaluar el comportamiento de las células hMSC bajo el tratamiento de la rhBMP-2 obtenida en nuestro laboratorio, se realizaron los mismos ensayos de proliferación en células tratadas con dicha proteína. Para ello, se mantuvieron en cultivo las células hMSC durante más de 60 días realizando pases semanales. En cada uno de dichos pases se sembró una cantidad fija de células sobre placas de cultivo ( $10.000 \text{ céls/cm}^2$ ) y se sometieron al tratamiento de rhBMP-2 durante 7 días ( $1\mu\text{g/cm}^2$  de cultivo).

De esto modo, se podrá evaluar si la respuesta de las hMSC a la rhBMP-2 depende del pase celular en el que se encuentran.

En la figura 53 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de Etidio-Homodímero y en el ensayo de MTT para las células tratadas con rhBMP-2. Todos los datos están normalizados con respecto al valor obtenido en cada pase celular para hMSC no tratadas. Se pudo observar como los datos obtenidos tanto en el número de células totales (ensayo de Etidio-Homodímero) como en el estudio de la actividad mitocondrial eran menores en cada uno de los pases celulares. Por este motivo, podríamos decir que la rhBMP-2 afecta al crecimiento celular cuando es administrada en un corto periodo de tiempo (7 días). Además se observó que la disminución en el número de células viables era prácticamente similar en todos los pases celulares. Únicamente vemos una disminución más notable en el número de células totales en pases cortos. Esto indica que el efecto de la rhBMP-2 en la proliferación celular quizá dependa del subcultivo en el que se encuentren dichas células.

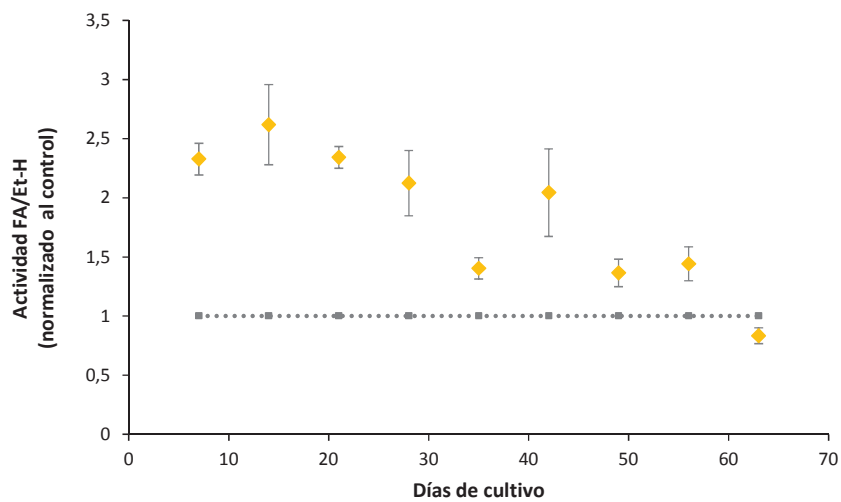


**Figura 53. Proliferación celular de hMSC tratadas con rhBMP-2 en distintos subcultivos.** Ensayo de Etidio-homodímero y ensayo de MTT. Los datos se representan normalizados a los resultados obtenidos para dichos ensayos en células hMSC sin tratamiento.

Asimismo, estos resultados del efecto de la rhBMP-2 podríamos compararlos con el que produce el medio de diferenciación osteogénico sobre hMSC ya que algunos autores describen una inhibición de la proliferación celular unida a una estimulación del potencial de diferenciación osteogénico (Ter Brugge, Jansen 2002, Jaiswal et al. 2000). Por tanto, dicho resultado tiene sentido ya que la capacidad de diferenciación de hMSC es mayor en

pases cortos (Sugiura, Kitoh & Ishiguro 2004, Sun et al. 2006) y, por tanto, las células tienden a diferenciarse hacia el linaje osteoblástico bajo el tratamiento de rhBMP-2.

Para comprobar esta última afirmación, se realizó un ensayo en las mismas condiciones que los anteriores pero en este caso, medimos la actividad fosfatasa alcalina presente en las células en cada uno de los pases. Se normalizaron los resultados obtenidos al valor de fosfatasa alcalina de las células hMSC no tratadas en cada subcultivo (figura 54). Se pudo observar, como a pesar de haber menos células la actividad fosfatasa alcalina era mayor en pases cortos para hMSC tratadas durante 7 días con rhBMP-2. Esto demuestra como el efecto de la rhBMP-2 en hMSC, en cuanto a la diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico, es mayor en células que han sufrido un menor número de subcultivos.



**Figura 54. Datos de actividad FA de hMSC tratadas con rhBMP-2 en distintos subcultivos.** Los resultados se representan entre la cantidad total de células presentes en cada subcultivo (datos del ensayo etido-homodímero) y normalizados a los datos obtenidos de FA para células hMSC no tratadas.

En este apartado hemos estudiado la cinética de crecimiento de las hMSC y su potencial de diferenciación osteogénico tanto en células en pase corto como en células que han sufrido un mayor número de subcultivos. Las células madre mesenquimales son conocidas por su capacidad para diferenciarse en múltiples fenotipos tales como osteoblastos, condrocitos, adipocitos, células musculares y células neuronales. Se ha descrito que tanto el índice de proliferación como la capacidad de diferenciación pueden variar ampliamente dependiendo del pase celular (Asari et al. 2012). Sin embargo existe controversia entre diversos estudios sobre los efectos de los sucesivos subcultivos en el

comportamiento de MSC. Conget and Minguell (Conget, Minguell 1999) publicaron que las MSC sometidas a sucesivos subcultivos conservaban su capacidad de diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico pero no hacia el linaje adiposo. Esto último lo afirmaba también DiGirolamo (DiGirolamo et al. 1999). Por otra parte, Matsubara et al. (Matsubara et al. 2004) describió que el potencial de diferenciación de las células disminuía gradualmente con el aumento de número de pases. Unos años después, Hyun Jin Sun (Sun et al. 2006) demostraba lo mismo centrándose en el fenotipo osteoblástico y presentando un análisis proteómico de dichas células en los diferentes subcultivos. Asimismo, dicha capacidad de proliferación y de diferenciación también se ha visto que puede estar condicionada por otros factores como son los microRNAs. Actualmente, numerosos estudios se centran en el papel que ejercen los microRNAs en la regulación de la expresión de múltiples genes. Así, en lo referente a la proliferación y diferenciación de MSC se ha demostrado como el microRNA miR-335 está implicado en inhibir tanto la proliferación como el potencial osteogénico o adipogénico de las células madre mesenquimales (Tomé et al. 2010, Tomé et al. 2014).

En este estudio, hemos observado que la proliferación disminuye a medida que aumenta el número de subcultivos. Además las células con mayor número de pases tienen reducida su capacidad para mineralizar bajo el tratamiento de medio de diferenciación osteogénico. Por este motivo, los sucesivos ensayos se realizarán con células hMSC con un bajo número de subcultivos.

Cabe destacar, que la discrepancia entre los resultados obtenidos y los de algunos autores podrían deberse a la naturaleza de las MSC y a variaciones en las condiciones de cultivo como son la densidad celular, los días entre pases, el número de subcultivos, la composición del medio, etc... ya que es difícil comparar los resultados por la ausencia de datos en numeroso casos.

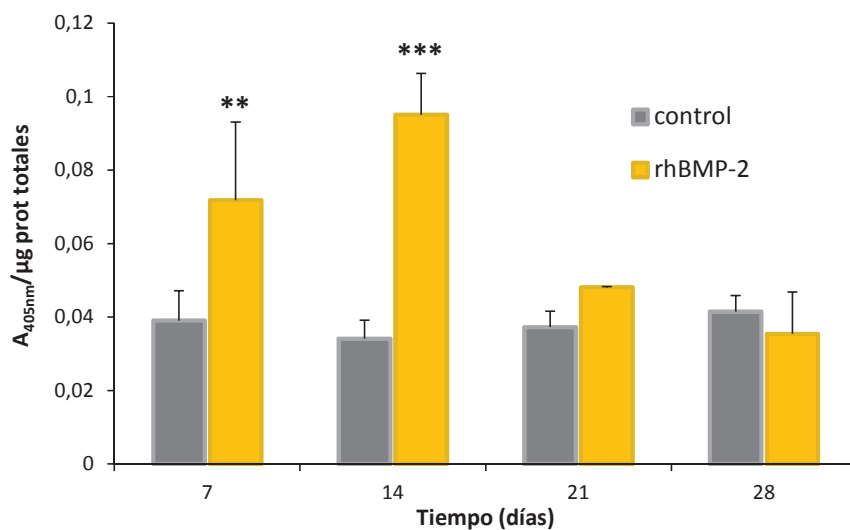
## **2. DIFERENCIACIÓN Y MINERALIZACIÓN EN RESPUESTA A rhBMP-2 Y MEDIO DE DIFERENCIACIÓN ÓSEO**

### **2.1. Expresión de marcadores óseos bajo el efecto de rhBMP-2**

Las condiciones en ensayos *in vitro* para conseguir la diferenciación osteoblástica de células madre mesenquimales humanas están muy estudiadas y dependen del aporte de determinados suplementos. Sin embargo, estas condiciones, no reflejan las señales fisiológicas que las células reciben para la inducción de la osteogénesis *in vivo* (Chamberlain

et al. 2007). Por este motivo, las BMPs son objeto de numerosos estudios para analizar el efecto osteoinductivo sobre hMSC (Chamberlain et al. 2007, Tuan, Boland & Tuli 2003).

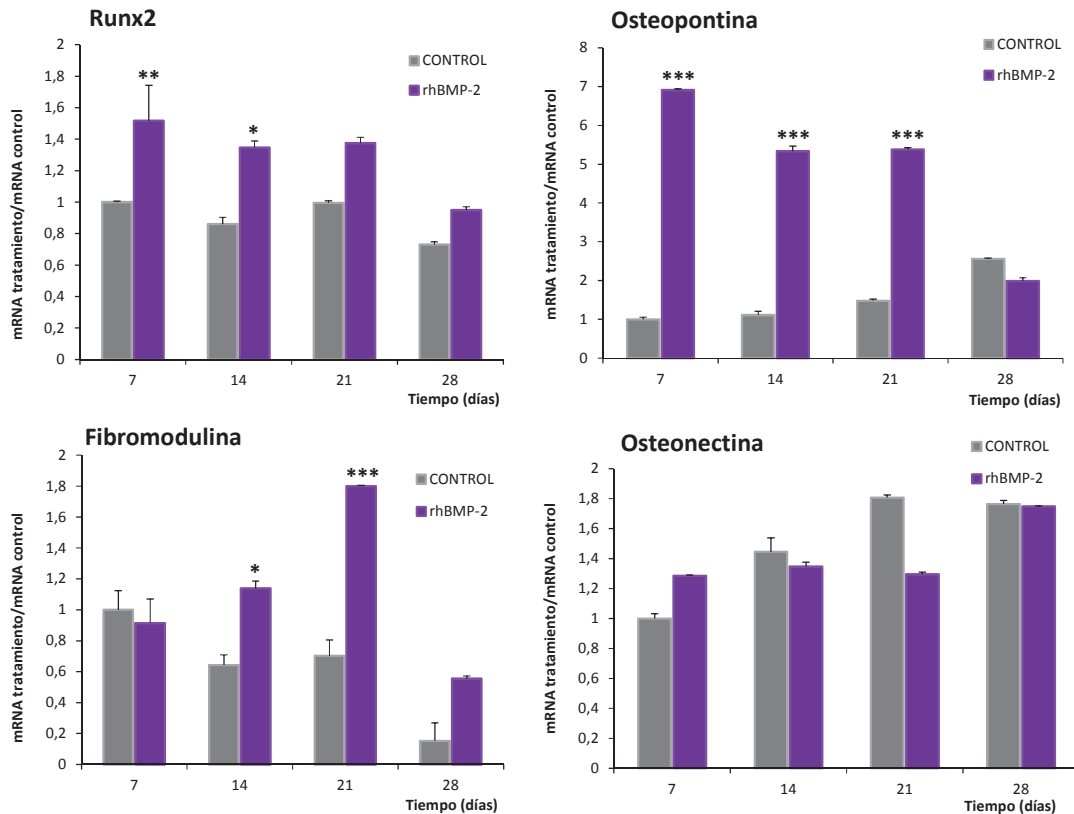
En el capítulo anterior de este trabajo hemos podido comprobar como la rhBMP-2 producida en nuestro laboratorio, aumenta la actividad fosfatasa alcalina de células hMSC sometidas a tratamiento con dicha proteína durante 7 días. Para completar dicha información se realizó un ensayo sometiendo a células madre mesenquimales al tratamiento de rhBMP-2 durante 28 días realizando pases celulares cada semana y estudiando diferentes parámetros de diferenciación ósea. La dosis empleada fue de 1 µg por cada 10.000 células sembradas. Se analizó la actividad fosfatasa alcalina y la expresión de distintos genes, que dichas células presentaban a los 7, 14, 21 y 28 días comparándola con células control (no sometidas a ningún tratamiento). Se representaron los datos como absorbancia a 405 nm entre microgramos de proteínas celulares totales para evitar cualquier tipo de variación por proliferación (figura 55).



**Figura 55. Ensayo de actividad FA/Bradford de células hMSC control y células tratadas durante 28 días con rhBMP-2. \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 con respecto a las células control.**

Se observó que la actividad fosfatasa alcalina de las células tratadas con rhBMP-2 era mayor con respecto a las células control. Esta diferencia aumentaba a los 7 y 14 días de tratamiento, mientras que a los 21 la diferencia entre células control y células con rhBMP-2 no era significativa.

Para poder profundizar más en el efecto que la rhBMP-2 obtenida ejerce sobre esta línea celular, se realizó un análisis de expresión de determinados genes implicados en la diferenciación osteoblástica.



**Figura 56. Expresión relativa de Runx2, Osteopontina, Fibromodulina y Osteonectina a distintos días durante el tratamiento o no de hMSC con rhBMP-2.**

Los datos fueron relativizados a la expresión del gen control RPLP0 y normalizados respecto al valor obtenido para hMSC a día 7 sin tratamiento. \* P<0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 con respecto a las células control.

Del mismo modo que en el caso anterior, se sometió a células madre mesenquimales al tratamiento con rhBMP-2 durante 28 días realizando pases cada semana. Se analizó mediante RT-qPCR la expresión de 4 genes marcadores del linaje osteoblástico tanto en células con tratamiento como en células control (figura 56). Los resultados mostraron que en células tratadas con rhBMP-2 fue mayor la expresión del factor de transcripción Runx2. Dicho incremento fue significativo a día 7 y 14. A su vez, la expresión de Osteopontina aumentó de manera mucho más significativa en células bajo el efecto de rhBMP-2 que en células control. El mayor pico de expresión se observó a día 7 y fue disminuyendo hasta que en los 28 días era mayor la expresión de dicho marcador en células sin tratamiento. Por otra

parte, los niveles de fibromodulina presentaron un máximo en el día 21 en las células con rhBMP-2. Un efecto diferente se observó en la osteonectina, ya que los niveles de expresión de células tratadas no aumentaron de forma significativa con respecto a las células control.

Estos resultados de expresión génica junto con los datos de actividad fosfatasa alcalina indican que la rhBMP-2 tiene un efecto osteoinductivo sobre las células madre mesenquimales. Sin embargo, por los valores de expresión podemos ver que el efecto no es tan acusado como cabría esperar. En el caso del factor de transcripción Runx2, su expresión es esencial en el estadio inicial de la diferenciación de células osteoprogenitoras. En los resultados obtenidos dicho aumento de expresión con respecto a las células control es mayor a 7 días y posteriormente va disminuyendo. Esto hace pensar que probablemente alcance sus niveles más altos de expresión antes de los 7 días de tratamiento y el ensayo aquí planteado no abarca dicho rango de tiempo (Lo et al. 2011). La expresión de osteopontina sí presenta un aumento más significativo durante los primeros 21 días de tratamiento. Esto es porque se trata de una fosfoproteína que tiene dos picos de expresión, una en el periodo de proliferación activa de osteoblastos y otro durante la mineralización. En este caso, dicho aumento se debe al principio de diferenciación de las células madre mesenquimales (Dragoo et al. 2003, Kim et al. 2008, Barradas et al. 2012). Se puede apreciar cómo en células sin tratamiento el aumento de expresión es a día 28, momento en el cual la expresión es menor en células sometidas a tratamiento con rhBMP-2. Esta disminución puede ser debida a que las células tratadas con rhBMP-2 a lo largo del tiempo van evolucionando en su estadio de diferenciación y por tanto, irán expresando otros factores osteoblásticos. Por otro lado, la expresión de fibromodulina presenta el pico más alto de expresión con respecto a las células control a los 21 días. Este resultado difiere con lo esperado ya que al igual que la fosfatasa alcalina es un marcador temprano de la diferenciación osteogénica y debería presentar sus mayores niveles de expresión hasta los 14 días de tratamiento, hecho que sí observamos en el ensayo de actividad fosfatasa alcalina (Shafiee et al. 2011, Barradas et al. 2012, Müller et al. 2008). Al contrario que con los marcadores anteriormente mencionados, la expresión de osteonectina parece no verse alterada bajo el tratamiento de rhBMP-2. Dicho resultado se debe a que se trata de una glicoproteína que posee una expresión basal en hMSC y que alcanza sus niveles más altos de expresión al inicio de la mineralización y parece que el tratamiento con rhBMP-2 no es suficiente para influir en dicho nivel de expresión (Jäger et al. 2008, zur Nieden et al. 2005).

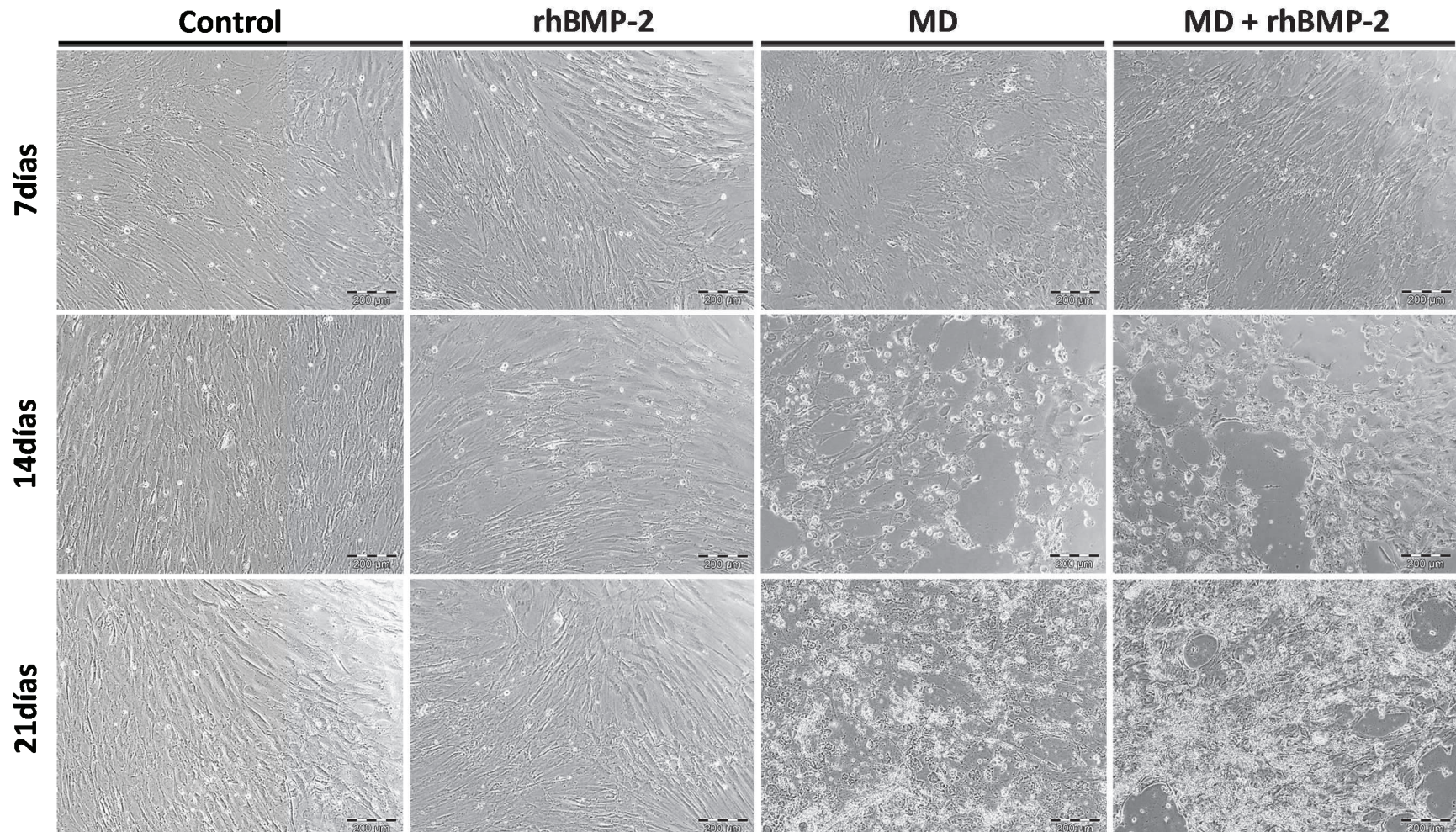
Si comparamos los resultados obtenidos con lo descrito en bibliografía podremos observar como los niveles de expresión obtenidos en nuestros ensayos son menores que los alcanzados en los diferentes estudios publicados (Park 2012, Ji et al. 2000, Jørgensen et al.

2004, Park et al. 2012). Esto se debe al aporte de suplementos en el medio de cultivo de las hMSC tales como  $\beta$ -glicerofosfato, el ácido ascórbico o la 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> y/o dexametasona. En este estudio únicamente, se sometieron a las células al tratamiento con rhBMP-2, sin el aporte de ningún suplemento, para evitar enmascarar el efecto específico de dicha proteína sobre las células madre mesenquimales. De este modo, se comprobaría si la rhBMP-2 administrada sola sin ningún suplemento produce la diferenciación a lo largo del tiempo en dichas células.

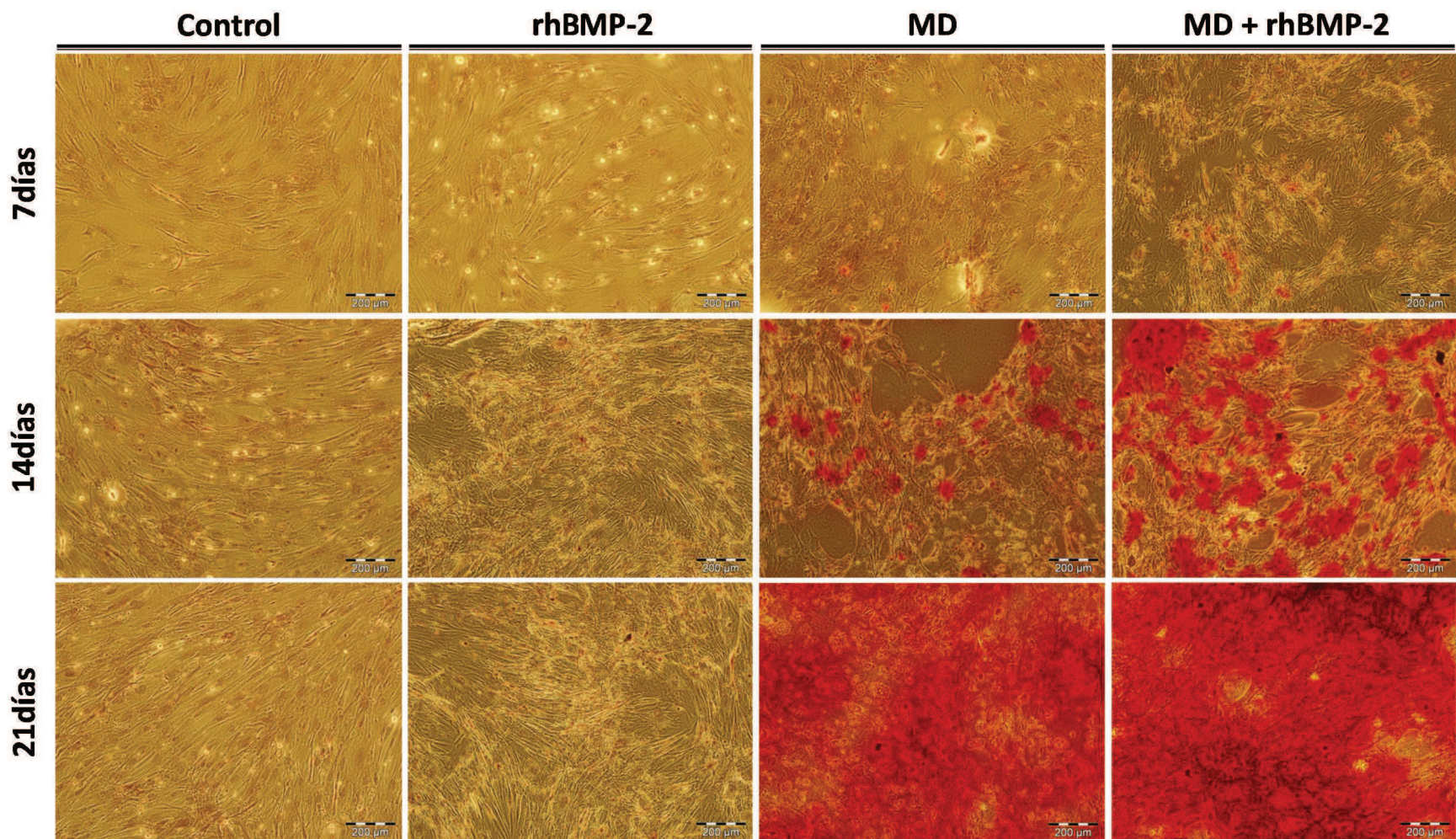
Además, se conoce que la expresión de marcadores osteogénicos está influenciada también por las condiciones de cultivo como la densidad celular o los días de cultivo, o la heterogeneidad de la población celular. En este caso, se realizaron pases celulares cada 7 días manteniendo el tratamiento con rhBMP-2 durante 28 días. Los datos obtenidos pueden estar influenciados por los sucesivos subcultivos realizados cada semana durante los 28 días, debido a que las células que se hayan diferenciado a causa del tratamiento de rhBMP-2, tengan disminuida su capacidad proliferativa y por lo tanto, en el siguiente subcultivo la mayor parte de las células en proliferación serán células indiferenciadas. En consecuencia, esto provoca un descenso del porcentaje de células diferenciadas en el cultivo (Ter Brugge, Jansen 2002). Otro factor a tener en cuenta es la densidad celular del cultivo. En estos ensayo se realizó sembrando a 10.000 células por cm<sup>2</sup> y se ha podido comprobar como un aumento de la densidad celular del cultivo se traduce en una disminución en su capacidad de diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico (Wang et al. 2011).

## **2.2. Efecto sobre la mineralización del tratamiento de rhBMP-2 y Medio de diferenciación óseo**

Tras analizar los resultados obtenidos, se observa que existen marcadores osteoblásticos que se ven influenciados por el efecto de la rhBMP-2, mientras que los relacionados con etapas más avanzadas del proceso de diferenciación no se ven alterados. Por este motivo, es importante conocer si la rhBMP-2 ejerce un efecto positivo en un estadio tardío de la fase de diferenciación. Así, se analizó la capacidad para provocar la mineralización de la matriz, etapa final del proceso de diferenciación osteogénica.



**Figura 57. Morfología celular de hMSC sometidas a distintos tratamientos durante 7, 14 y 21 días.** Control: medio normal de proliferación; rhBMP-2: 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de cultivo; MD: Medio de diferenciación osteogénico; MD+rhBMP-2: combinación de medio de diferenciación osteogénico y rhBMP-2. Las imágenes mostradas son representativas de todos los experimentos.



**Figura 58. Tinción de Alizarín Red de hMSC sometidas a distintos tratamientos durante 7, 14 y 21 días.** Control: medio normal de proliferación; rhBMP-2: 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de cultivo; MD: Medio de diferenciación osteogénico; MD+rhBMP-2: combinación de medio de diferenciación osteogénico y rhBMP-2. Las imágenes mostradas son representativas de todos los experimentos.

En bibliografía existe controversia acerca de este hecho, ya que se piensa que la mineralización de la matriz ósea está iniciada por la expresión de fosfatasa alcalina (Wennberg et al. 2000, Zernik, Twarog & Upholt 1990). Sin embargo, al contrario del claro efecto osteogénico de la BMP-2 en células de rata y ratón, en células humanas se han obtenido diferentes resultados (Park 2012, Jäger et al. 2008, Jørgensen et al. 2004, Park et al. 2012, Hoemann, El-Gabalawy & McKee 2009, Diefenderfer et al. 2003a). Dado que las diferencias encontradas en muchos de estos estudios son debidas a la administración o no de un suplemento junto con la BMP-2, se decidió realizar un estudio de mineralización *in vitro* sobre células madre mesenquimales humanas bajo el tratamiento de rhBMP-2 o medio de diferenciación osteogénico comercial o una combinación de ambos. La dosis empleada de rhBMP-2 fue alta en base a los resultados de algunos estudios que indicaban que a mayor dosis, mayor efecto de diferenciación (Ji et al. 2000, Park et al. 2012). Para ello se sembraron hMSC y se mantuvieron en cultivo hasta que formaran una monocapa. Fue entonces cuando se les cambió el medio de cultivo y se mantuvieron durante 3 semanas. A cada semana se observó la morfología de las células al microscopio y se realizó un ensayo de Alizarín Red para poder evaluar la presencia de mineralización.

En la figura 57 se observa como a los 7 días de tratamiento la morfología celular era similar en los cuatro tratamientos. Sin embargo, a los 14 y 21 días de tratamiento ya presentaron claras diferencias en aquellas células que fueron tratadas con medio de diferenciación. Mientras que las células control y las células tratadas con rhBMP-2 siguieron presentando una morfología fibroblástica, las células sometidas a tratamiento con medio de diferenciación o incluso combinado con rhBMP-2, presentaron una forma menos alargada y con aspecto de cubo. Además se apreció gran cantidad de regiones con estructuras cristalinas que corresponden a los acúmulos de calcio producto de la mineralización. Estas estructuras empezaron a aparecer a los 7 días de tratamiento aunque de forma escasa y a pesar de que la morfología celular seguía presentando un aspecto alargado. Por tanto, se aprecian signos morfológicos de diferenciación progresivos en aquellas células que han sido sometidas al tratamiento de medio de diferenciación con o sin suplemento de rhBMP-2.

Para completar estos resultados, se realizó el ensayo de Alizarín Red en cada uno de los supuestos anteriores. Se puede observar (figura 58) como empezaron a aparecer nódulos de mineralización aislados a los 7 días de tratamiento con medio de diferenciación. Estos nódulos abarcaron la totalidad de la superficie de cultivo a los 21 días de tratamiento. Por otra parte, se apreció algunas diferencias a los 21 días entre las células cultivadas con medio de diferenciación con respecto a las que dicho medio se suplementaba con rhBMP-2.

Parecía existir un efecto sinérgico de ambos compuestos a los 14 y 21 días de tratamiento ya que se observó un mayor número de acúmulos positivos a la tinción en aquellas células tratadas de forma combinada. Esto coincide con lo descrito por algunos autores (Kim et al. 2008, Jørgensen et al. 2004). Por el contrario, las células control y las células tratadas únicamente con rhBMP-2 no presentaron formación de nódulos de calcio a lo largo de los 21 días de tratamiento. A la vista de los resultados, podríamos decir que el tratamiento de rhBMP-2 es ineficiente para inducir la mineralización de la matriz por si sola mientras que combinada con medio de diferenciación sí se produce la formación de nódulos de calcio y, por tanto, se inicia el proceso de mineralización.

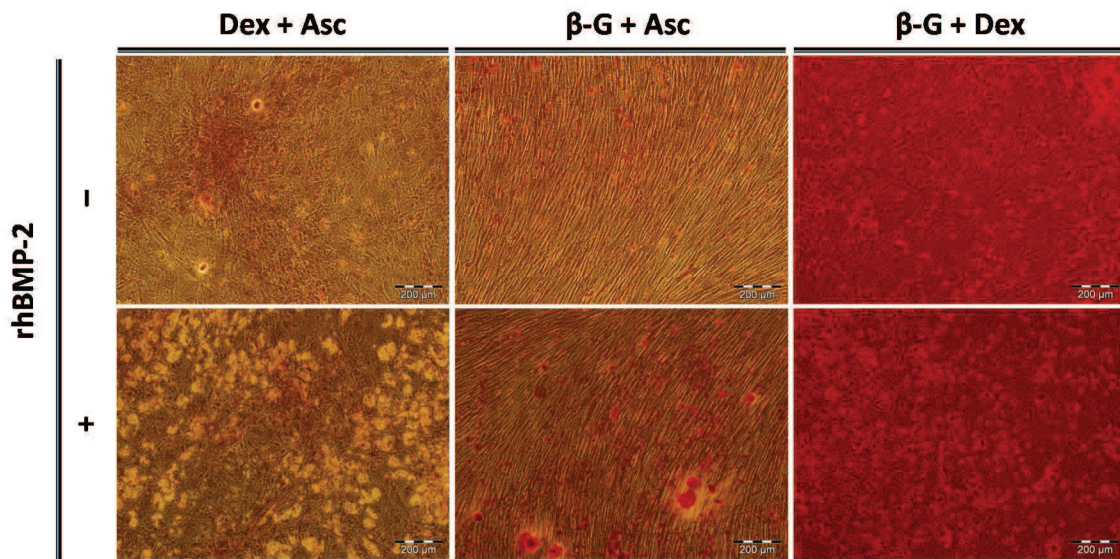
Se han comparado los efectos de la rhBMP-2 sola o combinada con el medio de diferenciación en las etapas tempranas y tardías del proceso de diferenciación osteogénico. Tras comprobar cómo tanto la actividad fosfatasa alcalina como la expresión de marcadores específicos aumenta bajo el tratamiento de rhBMP-2, se puede deducir que dicha proteína ejerce un efecto positivo en la diferenciación osteoblástica de las hMSCs en las primeras etapas del proceso. Sin embargo, los resultados del estudio de mineralización muestran como el continuo tratamiento con rhBMP-2 sola y a dosis altas resulta en una ausencia de mineralización en ensayos *in vitro*. Por lo tanto, se podría decir a la vista de los resultados que el efecto de la rhBMP-2 sobre células madre mesenquimales es diferente dependiendo de la etapa de diferenciación objeto de estudio. Estos resultados coinciden con lo descrito por varios autores (Kim et al. 2008, zur Nieden et al. 2005, Kurata et al. 2007, Koch, Jadowiec & Campbell 2005). Sin embargo, la ausencia de mineralización *in vitro* no tiene por qué ser representativa del efecto que dicha proteína provoca *in vivo*.

### 2.3. Evaluación de la inducción de la mineralización de hMSC

Como se ha observado anteriormente las células madre mesenquimales mineralizan únicamente cuando son sometidas al tratamiento con medio de diferenciación osteogénico. Dicho medio contiene varios compuestos necesarios para la mineralización de las células osteoblásticas. Estos compuestos son glucocorticoides como dexametasona, fosfatos orgánicos como el  $\beta$ -glicerofosfato y otros suplementos como ácido ascórbico o la 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>. El glucocorticoide sintético más empleado es la dexametasona. Dicho compuesto tiene un efecto dual en el metabolismo óseo, por una parte promueve la diferenciación osteoblástica y al mismo tiempo, es un factor catabólico que induce la pérdida de hueso u osteoporosis cuando se administra de forma prolongada en humanos (Canalis, Delany 2002, Canalis, Pereira & Delany 2002). Los fosfatos orgánicos también

promueven la osteogénesis por jugar un papel importante en la mineralización y por modular la actividad osteoblástica. Por último, otros suplementos como el ácido ascórbico o la 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> también son empleados para la inducción osteogénica estando este último relacionado en el aumento de la actividad fosfatasa alcalina y en la producción de osteocalcina (Tuan, Boland & Tuli 2003, zur Nieden et al. 2005). Además varios estudios muestran como el ácido ascórbico estimula la escisión del pro-péptido de colágeno tipo I e incrementa su secreción (Franceschi, Iyer & Cui 1994).

El medio de diferenciación comercial empleado en los ensayos anteriores posee, además de los compuestos básicos del medio de crecimiento de células madre mesenquimales, un aporte de dexametasona,  $\beta$ -glicerofosfato y ácido ascórbico. Para comprobar qué compuesto de los anteriormente mencionados es esencial en la inducción de la mineralización de la matriz, se realizó un ensayo en el cual se cultivaron hMSC durante 21 días privándolas en cada caso de uno de los compuestos objeto de estudio. Además, en una segunda parte del ensayo, se suplementó dicha privación con el aporte de rhBMP-2, para examinar si en presencia de la proteína obtenida en el laboratorio se llegaba a alcanzar el mismo efecto que con el medio de diferenciación completo (figura 59).

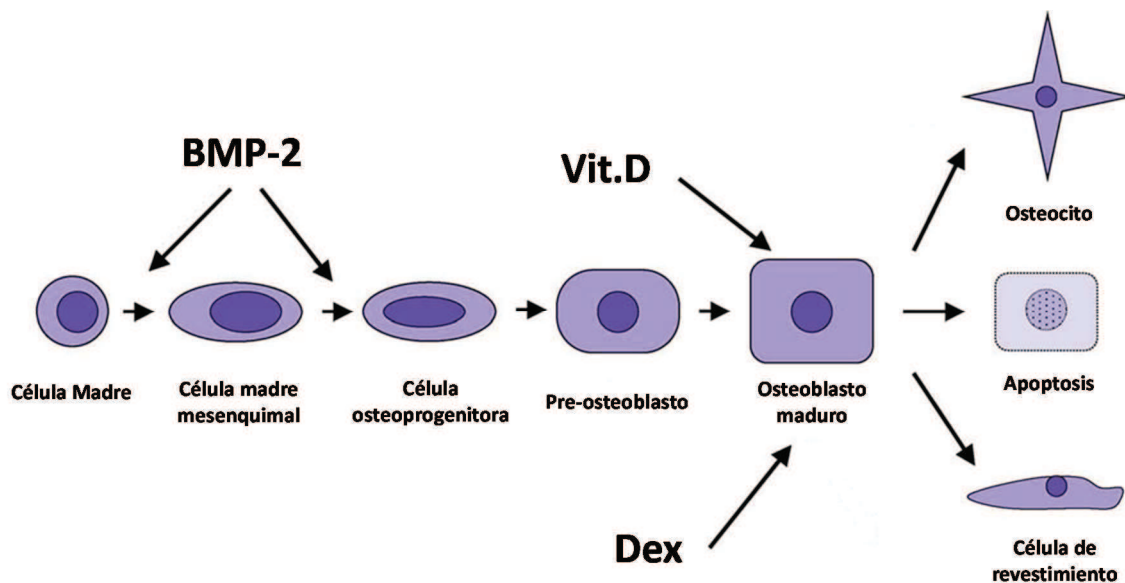


**Figura 59. Tinción de Alizarín Red de hMSC sometidas a distintos tratamientos durante 21 días.** Dex: dexametasona; Asc: ácido ascórbico;  $\beta$ -G:  $\beta$ -glicerofosfato. Las imágenes inferiores son el resultado de tratar las células hMSC con un suplemento de rhBMP-2 (1  $\mu$ g/ cm<sup>2</sup> de cultivo).

A la vista de los resultados se observó una completa mineralización en aquellos casos en los que se habían cultivado las células en presencia de dexametasona y  $\beta$ -glicerofosfato.

Esto indica que el ácido ascórbico es un suplemento que mejora la mineralización pero que no es fundamental para que ésta ocurra. Por otra parte, se pudo observar que en ausencia de dexametasona las células conservaban su morfología fibroblástica característica del estado indiferenciado, a pesar de que en el caso del suplemento con rhBMP-2 la tinción de Alizarín Red era algo más intensa. Por último, cabe destacar como las células cultivadas en ausencia de  $\beta$ -glicerofosfato cambiaban ligeramente su morfología hacia una estructura más compacta. Sin embargo, aunque se apreció pequeños acúmulos, éstos no parecían ser positivos a la tinción de Alizarín Red.

Estos resultados indican que la dexametasona es un aditivo determinante para la inducción de la mineralización de la matriz extracelular. Además es necesario un aporte de fosfato para conseguir la completa formación de nódulos con hidroxiapatita. También, se ha podido comprobar como la rhBMP-2 no ejerce un efecto significativo en la mineralización puesto que al suplementar el medio con la proteína, en ausencia de dexametasona o  $\beta$ -glicerofosfato, no induce la formación de nódulos de calcio.



**Figura 60. Modelo de la diferenciación hacia el linaje osteoblástico desde células madre.** Se muestra el posible efecto estimulador de la BMP-2 y de suplementos como dexametasona o vitamina D. (Adaptado de la referencia (Jørgensen et al. 2004))

Actualmente no podemos explicar por qué la rhBMP-2 ejerce un efecto positivo en la diferenciación osteoblástica en etapas tempranas de dicho proceso mientras que no

produce el mismo resultado en la mineralización de la matriz. Para poder explicar este hecho es necesario conocer el mecanismo molecular exacto del proceso de mineralización ya que a día de hoy no está bien definido. Por este motivo, es interesante conocer el compuesto que promueve *in vitro* la mineralización de la matriz tras la diferenciación de células madre mesenquimales. Tras los ensayos realizados hemos podido comprobar que la dexametasona es la responsable de inducir la formación de nódulos de calcio tras el tratamiento durante 2-3 semanas y por tanto, el desencadenante de la expresión de los marcadores tardíos de la diferenciación osteoblástica. Los mecanismos moleculares por los cuales los glucocorticoides y los miembros de la familia de TGF- $\beta$  ejercen su influencia en las hMSC no son iguales por lo que no sorprenden los distintos efectos de la dexametasona y la rhBMP-2 en la diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico (Jørgensen et al. 2004). Por tanto, los resultados obtenidos sugieren que en condiciones fisiológicas será otro factor diferente a la rhBMP-2 el responsable de la inducción del proceso de mineralización.

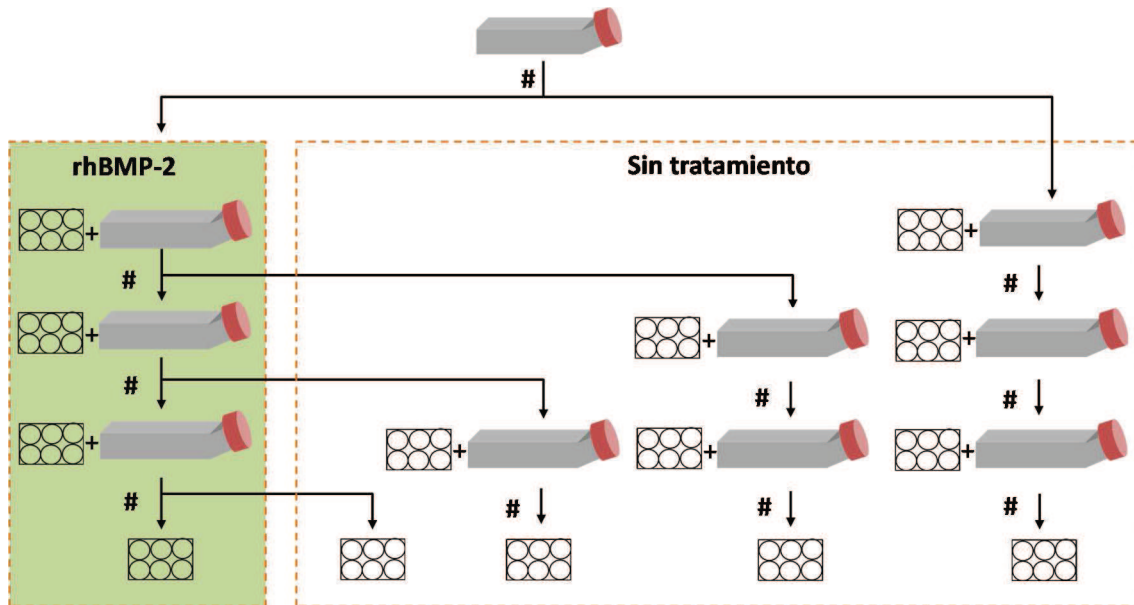
### **3. EVALUACIÓN DE LA DESDIFERENCIACIÓN TRAS EL TRATAMIENTO CON rhBMP-2**

#### **3.1. Desdiferenciación en hMSC**

Como hemos observado anteriormente, el tratamiento de rhBMP-2 sobre células madre mesenquimales desencadena la expresión de determinados marcadores osteogénicos. En este trabajo, se han evaluado cuatro de ellos correspondientes a diferentes etapas del proceso de diferenciación osteoblástica.

Además de analizar el aumento en los niveles de expresión de proteínas o factores de transcripción relacionados con el fenotipo osteoblástico, nos planteamos la necesidad de conocer si el efecto provocado por el aporte de rhBMP-2 era permanente o si, por el contrario, cesaba en el momento en el que se retiraba el tratamiento. Este efecto es relevante para el desarrollo de posibles estudios posteriores *in vivo* con implantes portadores de rhBMP-2, ya que se ha demostrado la idoneidad de una liberación sostenida y controlada de BMP-2 para la formación de hueso (Kang et al. 2008, Abarrategi et al. 2008b, Zara et al. 2011, Yun et al. 2014, Guzmán et al. 2014). De este modo, dosis similares de BMP-2 en diferentes materiales no siempre desencadenan los mismos resultados. Por ejemplo, dosis elevadas pero cortas de BMP-2 (inyección subcutánea de BMP-2 en suero salino) no induce la formación de hueso *in vivo*, pero la misma dosis implantada en un material biodegradable sí promueve la osteogénesis (Zara et al. 2011).

Por lo tanto, se realizó un ensayo para evaluar la desdiferenciación en hMSC sometidas a tratamiento con rhBMP-2 y posteriormente cultivadas en ausencia de dicha proteína. Además, se ensayaron distintos tratamientos para analizar si la existencia o no de desdiferenciación podría estar influenciada por el número de días de tratamiento con rhBMP-2 o por el número de días de cultivo posteriores al tratamiento.



**Figura 61. Esquema explicativo del ensayo de desdiferenciación.** Representados los cultivos propagados a lo largo de los pases semanales (#) y las placas de cultivo sembradas destinadas a realizar los ensayos de expresión génica en cada condición.

Para ello, se realizó un estudio preliminar en el que se mantuvieron dos cultivos diferenciados durante 28 días. En uno, se cultivaron las células con medio normal de crecimiento y en el otro se suplementó con rhBMP-2. Cada semana se realizaron los subcultivos necesarios para mantener la propagación de las células y se mantuvieron con su tratamiento inicial. En el momento del pase semanal, parte de las células tratadas con rhBMP-2 se mantuvieron en un nuevo cultivo pero privándolas de dicho tratamiento. Esto se llevó a cabo durante 28 días realizando pases cada 7 días y por tanto, aumentando el número de cultivos propagados cada semana (figura 61). Se analizaron a los 7, 14, 21 y 28 días la expresión de los marcadores osteogénicos estudiados anteriormente excepto en el caso de la osteonectina ya que no apreciamos diferencias en su expresión entre el tratamiento o no con rhBMP-2 (figura 62). El periodo estudiado fue de 28 días debido a que según la experiencia en estudios previos en el laboratorio, se ha comprobado que la formación de hueso *in vivo* inducido por rhBMP-2 depende del modelo animal y comprende

desde los 14 días en ratón hasta los 30 aproximadamente en estudios en cerdo. Por este motivo, es importante conocer la cinética de determinados marcadores óseos inducidos por rhBMP-2 en dicho periodo de tiempo.

En los resultados obtenidos se observó como para el factor de transcripción Runx2, sus niveles de expresión disminuyeron cuando se retiró el tratamiento de rhBMP-2. Dicha disminución fue de forma progresiva alcanzando sus niveles más bajos a los 28 días de cultivo. Además tal y como se indicó anteriormente dicho factor de transcripción es probable que alcance sus niveles más altos de expresión en los primeros días de tratamiento. Por este motivo, la diferencia en los valores alcanzados no era tan acusada entre el tratamiento de rhBMP-2 y las células control. En los tres supuestos de retirada de tratamiento, los niveles de expresión disminuyeron. Con este resultado podemos deducir que para dicho gen y para los tiempos planteados no influyen los días en contacto con rhBMP-2.

El aumento de expresión de la osteopontina bajo el tratamiento de rhBMP-2 fue mucho más acusado en los días analizados que para Runx2. En las células sometidas a tratamiento durante los 28 días se apreció un pico más alto de expresión a los 7 días y una disminución progresiva hasta los 28 días donde los niveles fueron más bajos incluso que en las células sin tratamiento. Se conoce que la osteopontina alcanza sus niveles más altos en la etapa de la mineralización, sin embargo en el modelo de estudio aquí planteado no se pudo observar puesto que como hemos indicado anteriormente el tratamiento único de las hMSC con rhBMP-2 no es suficiente para alcanzar dicho efecto. Para aquellas células privadas de tratamiento, tras haber sido sometidas a éste en días previos, se apreció como los niveles de expresión disminuyeron bruscamente cuando se les retiró la rhBMP-2 y mantuvieron niveles similares al control si dichas células se conservaban en cultivo. Al contrario que lo que ocurría con Runx2, en este caso, dicha disminución no fue progresiva. Únicamente en el caso del tratamiento durante 7 días se pudo apreciar que manteniendo el cultivo hasta los 28 días, los niveles de expresión de osteopontina volvieron a presentar un aumento. Esto puede ser debido a que, una vez retirado el tratamiento de rhBMP-2 y manteniendo su cultivo, sigue el patrón de expresión de las células control.

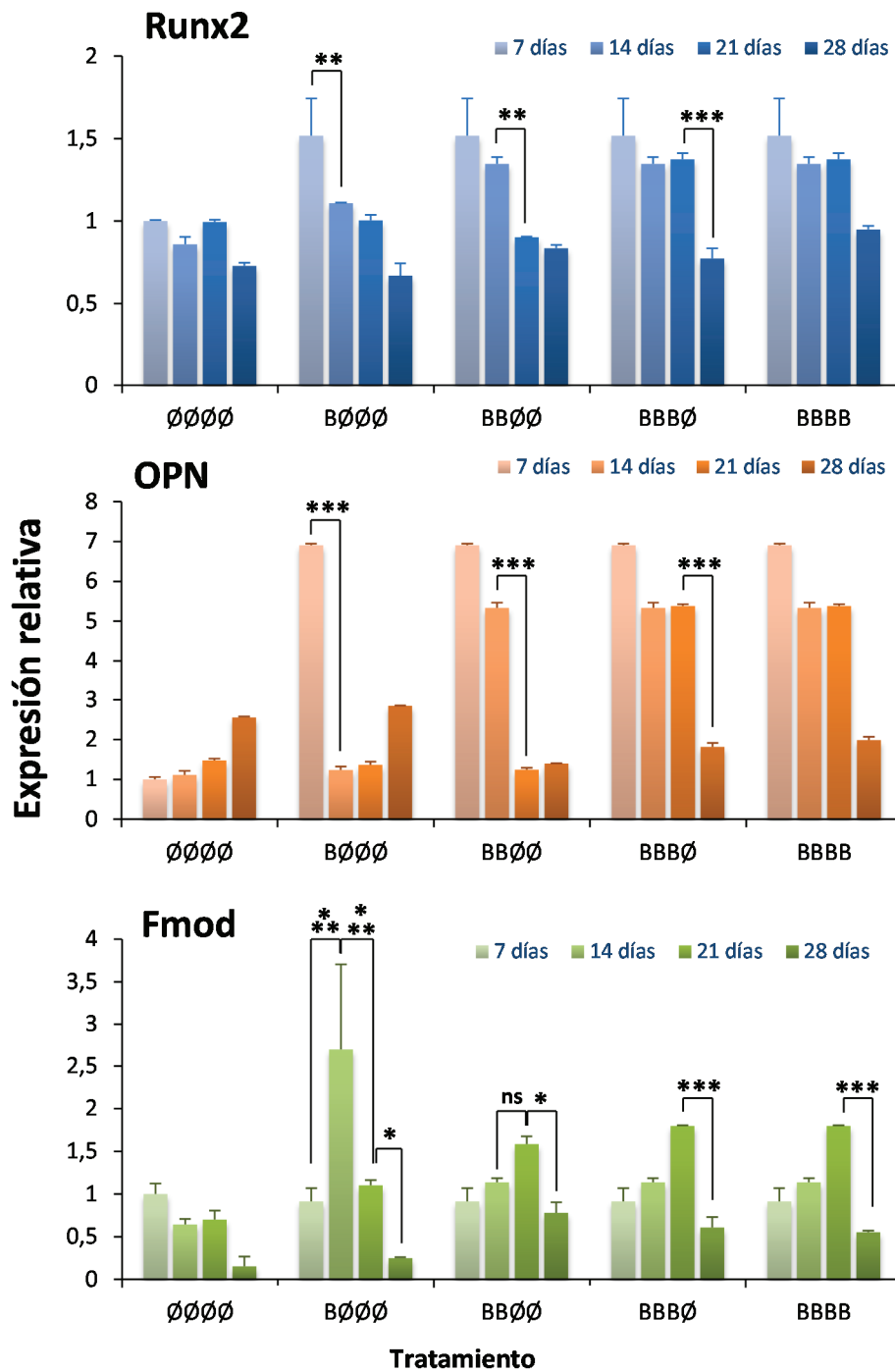


Figura 62. Expresión relativa de Runx2, Osteopontina y Fibromodulina a distintos días y distintos tratamientos de hMSC con rhBMP-2. Indicado con “B”: tratamiento con rhBMP-2; “ø”: sin tratamiento. Los datos fueron relativizados a la expresión del gen control RPLP0. A su vez los resultados se normalizaron respecto al valor obtenido para hMSC a día 7 sin tratamiento. Únicamente representada la estadística de los datos más relevantes para el estudio. \* P<0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001; ns: no significativo.

Por otro lado, los niveles de expresión de fibromodulina no fueron tan claros como para Runx2 y osteopontina. El tratamiento continuo de rhBMP-2 provocó un máximo de expresión a los 21 días. Sin embargo, en las células control los niveles de expresión de esta proteína fueron disminuyendo a lo largo del tiempo. Para aquellas células sometidas a tratamiento con rhBMP-2 y posteriormente privadas de él, se obtuvieron distintos perfiles de comportamiento. En el caso de un tratamiento corto durante 7 días, en la primera semana de privación de rhBMP-2 los niveles de expresión de este marcador osteoblástico aumentaron de manera muy significativa y a medida que se mantuvo el cultivo de dichas células la expresión volvió a disminuir. Esto también ocurrió con las células tratadas durante 14 días, aunque dicho aumento posterior no fue significativo. Sin embargo, si las células eran tratadas durante más tiempo, en este caso 21 días, y posteriormente se retiraba el aporte de rhBMP-2 el comportamiento fue diferente puesto que los niveles de fibromodulina disminuyeron considerablemente siguiendo el mismo patrón de expresión que las células sometidas a tratamiento durante los 28 días. Estos resultados se podrían explicar teniendo en cuenta que la fibromodulina es un marcador temprano de la diferenciación osteoblástica y por tanto, las células sometidas al tratamiento durante menos tiempo permanecen por un primer momento en esos primeros estadios de diferenciación cuando se retira el aporte de rhBMP-2. Por el contrario, las células tratadas durante más tiempo con dicha proteína avanzan en mayor medida en el proceso de diferenciación y en consecuencia, la expresión de fibromodulina disminuirá y aparecerá la expresión de marcadores osteoblásticos más tardíos. Además se puede apreciar cómo manteniendo el cultivo de aquellas células privadas de tratamiento los niveles de expresión vuelven a disminuir de forma pronunciada alcanzando valores similares a las células control.

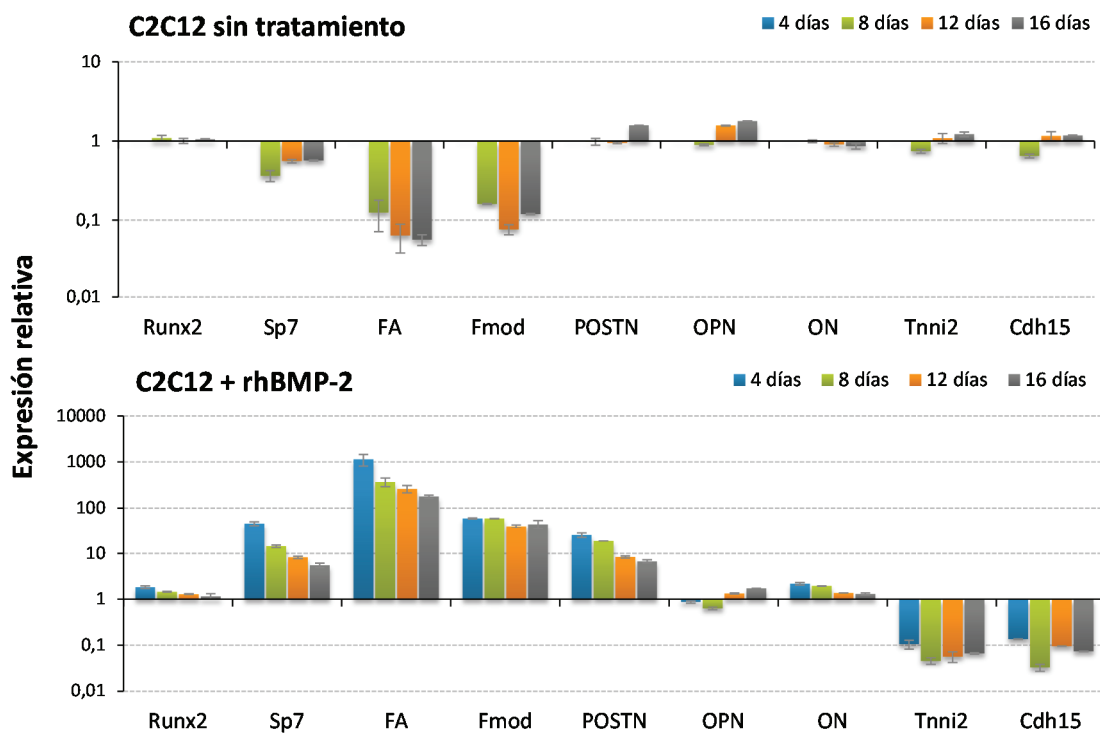
Con los resultados obtenidos en este estudio preliminar se puede concluir que el efecto de la rhBMP-2 sobre células madre mesenquimales no es permanente, es decir, es necesario un aporte continuado de dicha proteína para mantener la diferenciación de las células hacia el linaje osteoblástico.

### **3.2. Desdiferenciación en un modelo ectópico**

Una vez analizados dichos resultados, nos planteamos otra pregunta: si esto ocurre en células madre mesenquimales presentes en entornos de formación de hueso, ¿qué ocurrirá en lugares ectópicos? Si hemos demostrado *in vitro* que la rhBMP-2 es capaz de inducir la formación de hueso en lugares ectópicos, ¿este efecto es reversible? es decir, si se retira el aporte de dicha proteína ¿las células volverán a adquirir su fenotipo original?

Para comprobar estas cuestiones se realizaron ensayos similares a los anteriores pero esta vez con células mioblásticas C2C12. Además estas células ya han sido empleadas en nuestro laboratorio para estudios de expresión con rhBMP-2 (Abarrategi et al. 2009) y de este modo, se podrán completar dichos resultados.

La realización del ensayo se llevó a cabo del mismo modo que en el caso de células madre mesenquimales exceptuando los tiempos de estudio debido a la velocidad de crecimiento de dichas células y al modelo animal al que pertenecen (tal y como se ha indicado anteriormente). Para este estudio de administración continuada de rhBMP-2, se analizaron los niveles de expresión a los 4, 8, 12 y 16 días. Asimismo, los marcadores objeto de análisis fueron diferentes a los estudiados para hMSC, abarcando tanto marcadores osteoblásticos como mioblásticos debido a la naturaleza de las células C2C12 (figura 63).



**Figura 63. Expresión relativa de varios genes a distintos días en células C2C12 control y tratadas con rhBMP-2.** Los datos fueron relativizados a la expresión del gen control RPLP0. A su vez los resultados se normalizaron respecto al valor obtenido para C2C12 a día 4 sin tratamiento.

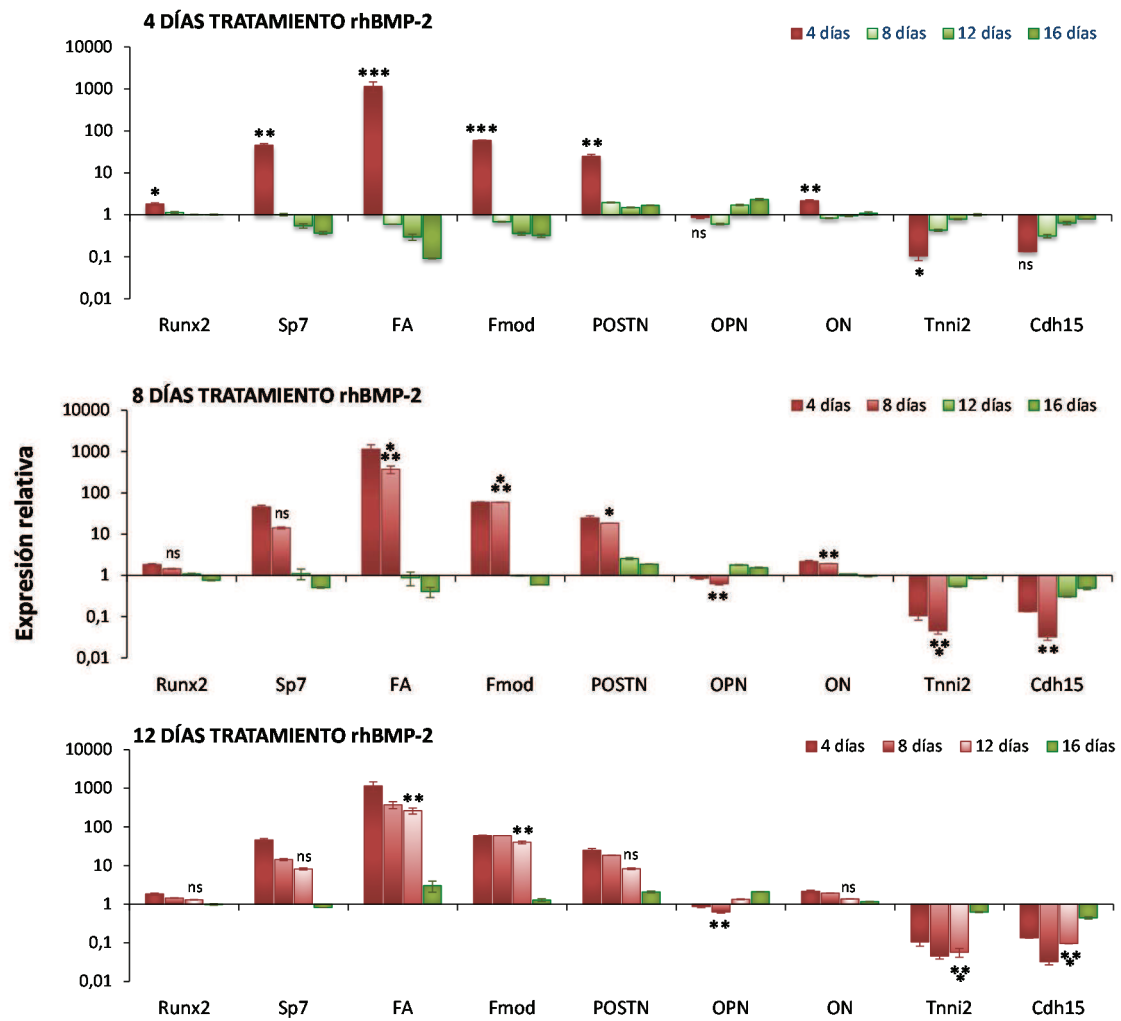
La variación en la expresión de los distintos genes analizados en C2C12 cultivadas sin aporte de rhBMP-2, fue bastante pequeña. Se pudo observar como durante los 16 días únicamente apareció una disminución acusada en la expresión de fosfatasa alcalina y

fibromodulina con respecto al primer día de estudio (día 4). También, el factor de transcripción Osterix (Sp7), presentó una disminución en sus niveles de expresión con respecto al día 4. El resto de marcadores analizados no mostraron variaciones importantes a lo largo de los días de cultivo.

Por otra parte, en el cultivo de células C2C12 tratadas con rhBMP-2 durante los 16 días de estudio se pudieron apreciar diferencias significativas con respecto al control (estadística no mostrada). Se analizaron dos factores de transcripción implicados en la diferenciación osteoblástica, Runx2 y Sp7. En el caso de Runx2 presentó niveles superiores de expresión con respecto al control y sufrió una ligera disminución progresiva desde el día 4 hasta el día 16. Mientras que para Sp7, los niveles de expresión a día 4 fueron superiores y posteriormente disminuyeron también de forma progresiva. Esto se puede explicar debido a que ambos factores de transcripción se expresan al inicio del proceso de diferenciación osteoblástica, en un primer momento Runx2 y posteriormente Sp7. Por este motivo los niveles de Runx2 no fueron tan elevados ya que un pico de expresión aparecerá en los primeros días de tratamiento con rhBMP-2, tiempos que no se abarcan en este estudio. Sin embargo, como la expresión de Sp7 es algo posterior que la de Runx2, en este caso sí podemos apreciar una variación más acusada en sus niveles con respecto al control.

También se analizaron tres marcadores osteoblásticos tempranos, la fosfatasa alcalina, la fibromodulina y la periostina. En los tres casos se apreció un aumento bastante significativo en sus niveles de expresión con respecto a las células control. Los valores más altos los presentó la fosfatasa alcalina a los 4 días de cultivo. Además se observó una disminución en sus niveles a medida que avanzaron los días de tratamiento debido a que al ser marcadores tempranos irán disminuyendo su expresión para empezar a expresar otros genes osteoblásticos de etapas más avanzadas. Otros marcadores analizados fueron la osteopontina y la osteonectina. Sin embargo, en dichos marcadores no se apreciaron las diferencias observadas para los genes anteriormente mencionados. Esto puede ser debido a que son células mioblásticas y aunque la rhBMP-2 induce su diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico, el tratamiento de éstas únicamente con rhBMP-2 no es suficiente para llegar a estadios finales de diferenciación.

Por otro lado, se analizaron dos genes relacionados con el fenotipo mioblástico para estudiar no sólo si la rhBMP-2 aumentaba la expresión de marcadores osteoblásticos, sino si también disminuía aquellos genes correspondientes al fenotipo original de las células. Como se pudo observar tanto la Troponina (Tnni 2) como la Cadherina (Cdh15) presentaban valores menores en todos los días de estudio con respecto a las células control. Esto indica la capacidad de la rhBMP-2 para invertir el fenotipo mioblástico de la línea celular C2C12.



**Figura 64. Expresión relativa de varios genes a distintos días y distintos tratamientos en células C2C12.** Los datos fueron relativizados a la expresión del gen control RPLP0. A su vez los resultados se normalizaron respecto al valor obtenido para C2C12 a día 4 sin tratamiento. Únicamente representada la estadística entre el último tiempo de tratamiento y el primero tiempo de privación de éste. \* P<0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001; ns: no significativo

Posteriormente a estudiar el comportamiento de las células C2C12 con y sin tratamiento de rhBMP-2, se analizaron los resultados para comprobar si el efecto de dicha proteína sobre este tipo celular era permanente o si por el contrario, se comportaban de la misma forma que las células madre mesenquimales (ver figura 62), produciéndose un efecto de desdiferenciación como consecuencia de la privación de tratamiento (figura 64).

Se pudo observar como el comportamiento de las células C2C12 fue claro. En el momento de retirada de tratamiento de rhBMP-2 las células perdían el fenotipo osteoblástico y volvían a recuperar la expresión de los genes del fenotipo mioblástico. Tanto en el tratamiento durante 4 días como en el tratamiento durante 8 días, la disminución en el momento de la retirada de dicho tratamiento, era muy pronunciada en los valores de expresión de los genes más afectados por el efecto de la rhBMP-2, como es el caso de la fosfatasa alcalina, la fibromodulina y la periostina alcanzando incluso valores negativos para los dos primeros. También ocurría esto para los dos factores de transcripción en el tratamiento durante 4 días apreciándose más, dicha variación, en el caso de Sp7. Por otro lado, para los genes relacionados con el fenotipo mioblástico se observó un aumento en sus niveles de expresión en el momento de retirada del tratamiento, indicando así la posible recuperación de dicho fenotipo en ausencia de rhBMP-2. Esta diferencia de expresión era más acusada a medida que aumentaban los días de exposición a rhBMP-2. Con las células tratadas durante 12 días y posteriormente privadas de tratamiento el comportamiento de expresión era similar. Sin embargo, la disminución de marcadores como fosfatasa alcalina, fibromodulina y periostina fue menos acusada que para las células tratadas durante 4 u 8 días. Estos datos podrían indicar, que a medida que aumentan los días de tratamiento con rhBMP-2 la desdiferenciación de las células es más lenta con respecto a los genes osteoblásticos.

Los resultados aquí presentados muestran la capacidad de rhBMP-2, no sólo de inducir la diferenciación de distintos tipos celulares hacia el fenotipo osteoblástico sino también de inhibir los marcadores relacionados con el fenotipo mioblástico. Además, se indica que es necesario un aporte continuado de rhBMP-2 para mantener dicha diferenciación.

Por este motivo, para la aplicación en clínica de dicha proteína se ha demostrado que es necesario encontrar un vehículo transportador que controle la liberación sostenida en el tiempo de rhBMP-2 en el sitio de implantación.

#### **IV. CONCLUSIONES**

En este capítulo se han realizado ensayos con el fin de comprender el papel de la rhBMP-2 en células primarias para aumentar la eficiencia de la utilización de BMP-2 en terapias osteoinductoras. Con los resultados obtenidos se presentan las siguientes conclusiones:

- La capacidad de proliferación y el potencial de diferenciación osteogénico de las hMSCs disminuye a medida que aumenta el tiempo de incubación *in vitro* de estas.
- El efecto producido por la rhBMP-2 sobre hMSC depende del tiempo en cultivo de éstas antes del tratamiento con rhBMP-2. Así, el efecto osteoinductivo es más acusado en pases cortos.
- La rhBMP-2 potencia la expresión de marcadores osteoblásticos tempranos en hMSCs sometidas a tratamiento con dicha proteína. Sin embargo, el tratamiento único de rhBMP-2 sobre hMSCs no es suficiente para inducir la mineralización de la matriz.
- El efecto de la rhBMP-2 sobre hMSC no es permanente, es decir, es necesario un aporte continuado de proteína para mantener la estimulación de la diferenciación hacia el linaje osteoblástico.
- El tratamiento de rhBMP-2 sobre células mioblásticas induce la diferenciación de éstas hacia el fenotipo osteoblástico a la vez que inhibe la expresión de marcadores propios de su linaje mioblástico. Además se comprueba que es necesario un aporte continuado de proteína para mantener dicha diferenciación puesto que tras el cese del tratamiento revierten a su fenotipo original.



✧ **CAPÍTULO 3:**  
*Aplicación clínica de rhBMP-2*

---



## **I. INTRODUCCIÓN**

Las enfermedades relacionadas con el sistema músculo-esquelético representan hoy día gran parte de los casos de incapacidad física. Las opciones para su tratamiento son limitadas, dependiendo en gran medida de la naturaleza y localización de la lesión a reparar. Una característica relevante del hueso, es su capacidad regenerativa. Sin embargo, en muchos casos debido a las dimensiones del daño es necesario el uso de materiales adecuados para reconstruir la parte afectada.

Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar biomateriales con propiedades adecuadas que proporcionen un entorno óptimo para la adhesión y crecimiento celular. Estos materiales deben cumplir dos principios básicos: osteoconducción y osteoinducción. La osteoconducción es un proceso atribuido a la matriz celular por el cual se produce el crecimiento de capilares y de células en el interior del biomaterial. Sin embargo, la osteoinducción es un proceso dependiente del material puesto que se refiere a la capacidad de inducir la proliferación y diferenciación de células mesenquimales indiferenciadas hacia células osteoprogenitoras responsables de la formación de hueso.

La función primordial de los andamiajes o “scaffolds” empleados como sustitutos óseos en la ingeniería de tejidos es proporcionar un soporte para que las células madre mesenquimales migren al sitio específico de interés y, de este modo, se produzca el crecimiento del tejido y, como consecuencia su regeneración. En el caso del tejido óseo, sería un material implantado de forma provisional que proporcione un armazón apto para guiar el fenómeno reparativo. Además debe ser estructuralmente resistente, para actuar como soporte biomecánico hasta su reemplazo por el tejido óseo neoformado. Cada vez es más importante la naturaleza y el diseño de la superficie del biomaterial, tanto más cuanto ha de permitir un comportamiento similar al de la matriz extracelular (Lanza, Langer & Vacanti 2000, Yang et al. 2001).

Las propiedades de estos materiales pueden mejorarse mediante la incorporación de moléculas bioactivas, como es el caso de los factores de crecimiento, provocando una estimulación del proceso regenerativo (Ashammakhi N. 2003, de Abram 2004). Por lo tanto, en la actualidad el objetivo es la búsqueda de un soporte adecuado biodegradable y que permita una liberación del factor de crecimiento en un tiempo determinado y en una localización espacial definida del organismo vivo. Entre estos factores destacan las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs).

Los andamiajes deben cumplir una serie de características (Bessa, Casal & Reis 2008a, Friess 2000, Geiger 2001):

- Estructura tridimensional con una adecuada porosidad para permitir la vascularización y la invasión celular.
- Capacidad de transferir nutrientes a las células y eliminar sus desechos sin efectos adversos para éstas.
- Ser biodegradable, es decir, el material debe degradarse de un modo controlado, originando productos no tóxicos que el cuerpo pueda metabolizar o excretar por mecanismos fisiológicos.
- Tener una relativa insolubilidad en condiciones fisiológicas.
- Ser biocompatible, es decir, no causar efectos adversos o tóxicos en contacto con el tejido vivo. No debe provocar respuestas del sistema inmunológico.
- Mantener la bioactividad del factor de crecimiento incorporado y protegerlo de posibles degradaciones proteolíticas.
- Posibilidad de esterilización.
- Ser de fácil fabricación.

Partiendo de todas estas características tiene que ser posible crear diferentes materiales con una amplia variedad de composiciones, testados convenientemente *in vitro*, y en base a estos resultados seleccionar el material más adecuado para estudios *in vivo*.

Estos materiales pueden ser de distinta naturaleza: polímeros naturales, polímeros sintéticos biodegradables y compuestos inorgánicos (tabla 10).

Los materiales poliméricos, ampliamente utilizados en clínica, deben su éxito a las enormes posibilidades que presentan, tanto por la variedad de compuestos, como por ofrecer la posibilidad de fabricarlos de muy distintas maneras, con características bien determinadas, y con la facilidad de conformarlos en fibras, tejidos, películas o bloques.

Tanto en el área de implantes quirúrgicos, como en la de membranas protectoras o en la de sistemas de dosificación de fármacos, existen aplicaciones de este tipo de materiales.

Estos compuestos pueden ser naturales o sintéticos, orgánicos o inorgánicos, biodegradables o no pero en todo caso han de ser compatibles con el tejido a regenerar.

**Tabla 10. Materiales empleados para la preparación de soportes en ingeniería de tejidos** ('Ashammakhi N. 2003, Ruhe et al. 2005, Takahashi, Yamamoto & Tabata 2005).

Naturaleza del material	
<b>Polímeros naturales</b>	Colágeno
	Ácido Hialurónico y derivados
	Quitosano
<b>Polímeros sintéticos</b>	Ácido poliglicólico (PGA)
	Ácido poliláctico (PLA)
	Ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA)
	Poli-ε-caprolactona (PCL)
	PEG y copolímeros
<b>Materiales inorgánicos</b>	Hidroxiapatita (HAP)
	Fosfato β-tricálcico (TCP)

## 1. POLÍMEROS NATURALES

Los materiales empleados en ingeniería de tejidos deben mimetizar las condiciones naturales de los tejidos. En este sentido, en la fabricación de matrices de polímeros naturales se trabaja con compuestos propios del hueso, el cartílago y la matriz extracelular. Por esta razón, estos materiales presentan a menudo excelentes propiedades para su empleo en aplicaciones de medicina regenerativa debido a que son biodegradables, reabsorbibles y tienen una gran versatilidad para presentarse en diferentes formulaciones (Malafaya et al. 2003, Gomes, Malafaya & Reis 2004). Sin embargo, los polímeros naturales pueden presentar riesgos de reacciones inmunológicas y la limitación de obtener cantidades necesarias para su aplicación.

Estos materiales pueden ser colágenos, alginatos, proteoglicanos, glicosaminoglicanos o hialuronanos. De entre ellos los colágenos son los más estudiados ya que el colágeno tipo I es el componente principal de la fase orgánica del hueso. Por este motivo las esponjas de colágeno tipo I son utilizadas ampliamente en el campo de la regeneración ósea.

El ácido hialurónico es un polisacárido que se encuentra en el líquido sinovial y en el cartílago. Se ha estudiado como inductor de condrogénesis y angiogénesis, así como en

conjunto con el colágeno. Finalmente, el condroitín sulfato es también un glicosaminoglicano de cartílago aplicable en reparación ósea.

En este grupo también entrarían los polímeros provenientes de organismos vivos pero que no se encuentran en la matriz extracelular ósea. Entre ellos está el quitosano, derivado de la quitina, que es el polisacárido principal en el exoesqueleto de los crustáceos. Este polímero se ha estudiado ampliamente en nuestro laboratorio obteniendo resultados que demuestran que es un material adecuado para la regeneración del tejido óseo (Abarrategi et al. 2008b, Guzmán et al. 2014, Abarrategi et al. 2009, Abarrategi et al. 2008a, Lopez-Lacomba et al. 2006, Ramos et al. 2006).

## **2. POLÍMEROS SINTÉTICOS**

Los **polímeros sintéticos** han sido ampliamente utilizados en aplicaciones de ingeniería de tejidos (Saito, Takaoka 2003). Los más estudiados son los poliésteres y los polianhídridos por su capacidad de **biodegradación** por el organismo. Precisamente esas características son hoy día su mayor desventaja, puesto que se producen ácidos y alcoholes que aumentan la respuesta inflamatoria e inhiben la formación del nuevo tejido. Los ácidos polilácticos (PLA) y los ácidos poliglicólicos (PLGA) se deshacen por hidrólisis dando como productos ácido láctico y ácido glicólico respectivamente. A pesar de estos inconvenientes se utilizan ampliamente como suturas y también se están evaluando para su uso en sustitutos óseos, piel e hígado.

La policaprolactona, los polianhídridos y los polifosfatos son también polímeros sintéticos biodegradables que se usan en diferentes aplicaciones para ingeniería de tejidos. El polietilenglicol (PEG) es otro de los polímeros sintéticos estudiados para la fabricación de hidrogeles por su alta hidrofilia (Patra et al. 2000, Rizzi et al. 2006, Pratt et al. 2004, Pratt et al. 2004).

Estos materiales han sido estudiados como transportadores de BMPs en una amplia variedad de modelos experimentales como en grandes defectos de hueso en conejos (Yoneda et al. 2005) y perros (Murakami et al. 2003) o en defectos en cráneo de ratas (Suzuki et al. 2006).

Por otro lado, también se han utilizado **polímeros sintéticos no degradables**. Entre ellos destaca el polimetilmetacrilato (PMMA) por su versatilidad, utilizándose para dentaduras, artroplastias, cranioplastias y como cemento en prótesis ortopédicas.

### **3. MATERIALES INORGÁNICOS**

Existen múltiples estudios relacionados con las cerámicas, tales como la hidroxiapatita y los fosfatos cálcicos, para su aplicación en el campo de la medicina que demuestran su capacidad para promover la formación de hueso cuando son implantadas. Cada vez más, los cementos de fosfatos de calcio son el objetivo de intensa investigación como sustitutos de hueso en cirugía ortopédica, estomatología y aplicaciones odontológicas debido a sus propiedades bioactivas y a las diferentes características de dureza, degradación y porosidad que se pueden obtener (Ehara et al. 2003). Estos biomateriales son muy versátiles pudiéndose aplicar como gránulos, polvo o bloques tridimensionales (LeGeros 2002, Apelt et al. 2004). Además de las ventajas clínicas que estos cementos presentan, como su maleabilidad y que pueden ser inyectados directamente en el defecto óseo, muestran una rápida deposición de hueso nuevo en su superficie (Apelt et al. 2004, Seeherman et al. 2006a, Seeherman et al. 2006b). También sus propiedades osteoconductoras y osteoinductivas hacen que puedan ser empleados como implantes permanentes o como soportes biodegradables (Müller et al. 2008).

Los cementos porosos se emplean en biotecnología y medicina como soportes para la migración y penetración de células y como materiales de relleno óseo. Además su porosidad permite la colonización ósea al interior de sus poros proporcionando una buena estabilidad mecánica. De este modo, el implante permite la osteoconducción actuando como puente estructural y modelo para la formación de tejido óseo. Sin embargo, esta porosidad debilita su estructura y puede limitar su utilización en áreas de carga (LeGeros 2002, Yuan et al. 1998).

Por otra parte, se han intentado mejorar las características de las cerámicas porosas incluyendo en éstas proteínas osteoinductivas, como las BMPs (Babensee, McIntire & Mikos 2000, Hoshino et al. 2006, Ohyama et al. 2004, Seeherman, Wozney 2005, Wikesjo et al. 2004). Para ello, se ha estudiado la incorporación de rhBMP-2 en cerámicas por adsorción superficial (Ruhe et al. 2006, Ruhe et al. 2004, Jingushi et al. 2002, Liang et al. 2005, Chen et al. 2004a, Kuboki, Jin & Takita 2001, Tsuruga et al. 1997, Yuan et al. 2001), durante el procesamiento de la muestra (Seeherman et al. 2006a, Seeherman et al. 2006b, Niedhart et al. 2003) o mediante la incorporación de otros materiales portadores (Ruhe et al. 2005, Takahashi, Yamamoto & Tabata 2005, Ruhe et al. 2003, Hoshino et al. 2007, Blumenthal et al. 2002, Namikawa et al. 2005), obteniéndose buenos resultados de formación ósea (Abarrategi et al. 2008a).

Por este motivo, en el campo de la biomedicina se han descrito compuestos híbridos polímeros/inorgánicos. Los sistemas compuestos incorporan propiedades favorables de los dos componentes. Los más interesantes son aquellos de polímeros naturales con fosfatos cálcicos como la HAP o el  $\beta$ -TCP. Es decir, por un lado, los fosfatos de calcio proporcionan refuerzo a la matriz y osteoconductividad y, por otro, el polímero modula ciertas propiedades como degradación o propiedades mecánicas.

La hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) ha sido estudiada como un posible material de sustitución de tejidos duros debido a su similitud química y cristalográfica con la apatita carbonatada presente en el hueso humano y en los dientes (LeGeros, LeGeros 1993, Suchanek, Yoshimura 1998). Además, tiene una alta biocompatibilidad y osteoconductividad. Sin embargo su uso en clínica como hueso artificial y para implantes dentales ha presentado problemas, como por ejemplo la dificultad para prevenir la dispersión de los gránulos, por lo que es difícil de adaptar a los defectos óseos (Yokoyama et al. 2002). También, se ha descrito que cuando se emplea hidroxiapatita en forma de bloque provoca necrosis y perforación de la mucosa cercana al material.

Para solucionar estos problemas se han estudiado otro tipo de compuestos de fosfato de calcio como es el caso del fosfato  $\beta$ - tricálcico ( $\beta$ -TCP:  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), fosfato  $\alpha$ - tricálcico ( $\alpha$ -TCP) (Ehara et al. 2003), fosfato tetracálcico (TTCP:  $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ ) que pueden ser moldeados y endurecidos in situ en forma de complejos en el sitio de implantación (Xu, Simon 2005). También este material es biocompatible y osteoconductor. Sin embargo, se distingue de forma considerable de la hidroxiapatita en el índice de resorción. La hidroxiapatita se reabsorbe muy lentamente en comparación con el  $\beta$ -TCP. La alta capacidad de remodelación del  $\beta$ -TCP debilita precozmente su resistencia mecánica, razón por la cual para su utilización en clínica se le debe asociar con otros materiales menos reabsorbibles o que posean potencial osteoinductivo.

La solubilidad, reabsorción y propiedades mecánicas de las cerámicas de fosfatos de calcio dependen de la relación calcio/fosfato y de su porosidad. Las variaciones en la porosidad tienen mayor influencia en la resistencia a la tracción que a la compresión, por lo que las cerámicas de fosfatos cálcicos son relativamente frágiles. Estos biomateriales no pueden emplearse como sustitutos óseos en áreas sometidas a carga, si no son asociados a otros biomateriales con características adecuadas que proporcionen un aumento en la resistencia a la fractura (Xu et al. 2002, Sous et al. 1998, Takagi et al. 2003).

Debido a la fragilidad de estos implantes compuestos por fosfatos cálcicos surgió la necesidad de mejorar su respuesta mecánica para poder proporcionar un soporte apto para la regeneración ósea. Además los métodos tradicionales de fabricación de dichos soportes presentaban sus limitaciones con respecto a la reproducibilidad de los mismos o la

personalización de su estructura. Por este motivo, se desarrollaron técnicas de fabricación que permitieron obtener cerámicas con estructuras tridimensionales altamente reproducibles con un tamaño de poro controlado. Estos métodos se denominaron fabricación de “Solid free form” (SFF) (Cesarano, Segalman & Calvert 1998, Smay, Cesarano & Lewis 2002, Miranda et al. 2006, Saiz et al. 2007).

El “robocasting” es una técnica de fabricación SFF que consiste en la deposición mediante un robot de una suspensión coloidal altamente concentrada (denominada “tinta”) del material cerámico, capaz de soportar su propio peso mediante el ensamblaje. La tinta se deposita en forma de barras, a través de un inyector, creando la estructura tridimensional deseada. Todo este proceso está controlado por ordenador donde previamente se ha programado el diseño de la estructura en capas. Esta técnica, al contrario que otras técnicas de SFF, permite utilizar tintas a base de agua con un mínimo contenido orgánico (< 1% en peso). Además no necesita el empleo de ningún molde por lo que todas estas características resultan atractivas para emplearla como técnica de fabricación de implantes cerámicos porosos.

#### **4. OBJETIVO PARCIAL: APLICACIÓN CLÍNICA DE rhBMP-2**

Estos implantes cerámicos tridimensionales se han caracterizado en relación a sus propiedades mecánicas (Miranda et al. 2008, Miranda, Pajares & Guiberteau 2008, Miranda et al. 2007, Perera et al. 2010). Sin embargo, aunque existen algunos estudios de implantes diseñados por SFF que evalúan sus propiedades biológicas *in vitro* y su posible actividad *in vivo* (Chu et al. 2002, Habibovic et al. 2008, Becker et al. 2009, Kim et al. 2010, Kang et al. 2011, Simon et al. 2007), no se dispone de suficiente información para confirmar su idoneidad en su aplicación en clínica.

Por este motivo, el objetivo de este apartado es determinar la biocompatibilidad y bioactividad de estos soportes cerámicos fabricados mediante robocasting y de este modo, poder acercarnos hacia su posible viabilidad en clínica. Para ello se muestran estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, además de una cirugía maxilofacial en cerdos como modelo para su aproximación a la posible aplicación clínica. También, se presentan ensayos incorporando a dicho material un factor osteoinductivo como es la BMP-2, y se evalúan los beneficios que dicha adición pueda proporcionar ya que se conoce que la combinación de cerámicas junto con este factor de crecimiento mejora la oseointegración (Abarrategi et al. 2008a, Hoshino et al. 2006, Jingushi et al. 2002, Liang et al. 2005).



## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. FABRICACIÓN “SCAFFOLDS”

Se empleó cerámica en polvo disponible comercialmente (Fluka, Buchs, Suiza) con un tamaño de partícula de  $1,8 \pm 0,8 \mu\text{m}$  para la preparación de la tinta del robocasting. Se realizó un scaffold con 44 capas empleando un Robocad 3.0 (3D Inks, Stillwater, OK, USA) con un diseño informático en el cual el espacio de las capas era de  $225 \mu\text{m}$  y el espacio en plano entre el centro de un cilindro y el centro del cilindro contiguo era de  $400 \mu\text{m}$ . Se fueron formando mediante inyección por una jeringa del sistema de robocasting los cilindros de  $250 \mu\text{m}$  de diámetro que formarán la estructura tridimensional. Estas barras se fueron depositando en un baño de aceite para evitar su secado durante el ensamblaje. Una vez formada la estructura, se secó al aire a temperatura ambiente durante 24 horas y posteriormente se sometieron a una temperatura de  $400^\circ\text{C}$  durante 1 hora para evaporar las sustancias orgánicas presentes en la muestra. Finalmente, las muestras se trataron a  $1.300^\circ\text{C}$  durante 2 horas para su sinterización y de este modo, formar una estructura compacta. Las estructuras se cortaron en piezas de un tamaño de  $0,3 \times 0,3 \times 0,3 \text{ cm}$  y piezas de  $1,5 \times 0,9 \times 0,9 \text{ cm}$  para cirugía en cerdos. Para su empleo en estudios *in vitro* e *in vivo* las piezas se esterilizaron a  $300^\circ\text{C}$ .

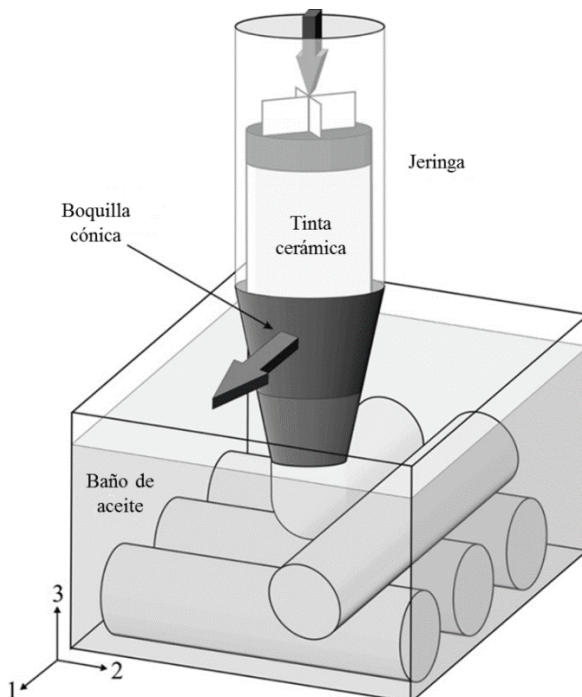


Figura 65. Esquema del proceso de fabricación de cerámicas por el método de robocasting.

Este procedimiento de fabricación de scaffolds se desarrolló gracias a la colaboración del grupo de Pedro Miranda en el Departamento de Ingeniería Mecánica, Energética y de los Materiales de la Universidad de Extremadura. Dicho procedimiento se encuentra descrito de forma más detallada en bibliografía (Miranda et al. 2006, Miranda et al. 2008).

## **2. INCORPORACIÓN DE rhBMP-2 A LAS CERÁMICAS**

La proteína rhBMP-2 se obtuvo según se indica en el capítulo 1 de este trabajo. Se incorporó a las cerámicas por adsorción sobre la superficie (500 µg/cerámica). Para ello se sumergió cada pieza en 400 µL de una solución de rhBMP-2 en ácido acético 50mM a una concentración de 1,25 mg/mL. Posteriormente las cerámicas se secaron en una cabina de flujo laminar vertical en condiciones estériles y a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 280 nm de la solución de proteína remanente para asegurarnos que toda la rhBMP-2 había quedado absorbida sobre la superficie de la muestra. Este procedimiento se describe en trabajos previos sobre otro tipo de cerámicas porosas (Abarrategi et al. 2008a).

Para el modelo de implantación en cerdos, la rhBMP-2 fue incorporada a las cerámicas utilizando el quitosano como transportador del mismo modo que se detalla en trabajos anteriores (Abarrategi et al. 2008b, Abarrategi et al. 2009, Lopez-Lacomba et al. 2006). De esta forma se creó un recubrimiento sobre dichas cerámicas de quitosano/rhBMP-2 (1 mg rhBMP-2 / cerámica).

## **3. CARACTERIZACIÓN DE LAS CERÁMICAS**

### **3.1. Tomografía microcomputarizada (µ-CT)**

Se utilizó un microtomógrafo computarizado (eXplore Vista, GE) para el estudio no destructivo de la estructura tridimensional de las cerámicas. Las imágenes de rayos X se obtuvieron con los siguientes parámetros: voltaje del tubo 50 kV y amperaje del tubo 200 µA. Se empleó una rotación angular de barrido de 180° con un incremento angular de 0,40° y una resolución de 50 µm. Los datos se transformaron en imágenes binarias (8-bit imágenes BMP) para el posterior procesamiento y reconstrucción en imágenes tridimensionales empleando el programa MicroView ABA 2.2 (GE Healthcare) (Molecular Imaging Core Unit, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid).

### 3.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las muestras se metalizaron con oro en un equipo Pelco 91000. Posteriormente se empleó un microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL JSM-6330F para visualizar la superficie de las cerámicas a distintos aumentos (ICTS, Centro Nacional de Microscopía Electrónica, UCM).

## 4. ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD DE LAS CERÁMICAS *IN VITRO*

Se realizaron los ensayos celulares con la línea C2C12, la cual fue propagada y cultivada en las mismas condiciones que se ha indicado en el capítulo 1.

Cada cerámica previamente esterilizada se introdujo en placas de cultivo con pocillos de 1 cm<sup>2</sup>. Se sembraron 50.000 células por muestra y se añadió a cada pocillo 400 µL de medio de cultivo. Se cultivaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Previamente a la realización de cada ensayo de medida, las cerámicas fueron transferidas a un pocillo de una nueva placa de cultivo para evitar resultados erróneos originados por las células adheridas a la superficie de la placa de cultivo y no a la cerámica. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado con sus controles correspondientes.

### 4.1. Estudio de la morfología celular

Tras cultivar las cerámicas con células, éstas se fijaron con formaldehído 3,7%.

Para la observación de las células por SEM (JEOL JSM-35 CF) se sometieron las muestras tras la fijación con formaldehído a una deshidratación mediante un gradiente de alcoholes y posteriormente se metalizaron con oro (Pelco 91000).

Para el estudio de las células por microscopía confocal se emplearon dos tinciones: Texas Red-Phalloidin (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) para la detección de la Actina-F y Hoechst (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) para la tinción de los núcleos celulares. Tras la fijación por formaldehído, las muestras se sometieron a dos lavados con PBS. Se incubaron con una solución de 0,1% de Tritón X-100 en PBS durante 5 minutos y se lavaron nuevamente con PBS. Por último las cerámicas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz, con la solución de tinte (25 µL de Texas Red-Phalloidin y 2,5 µL de Hoechst en 1 mL de PBS). Antes de la observación al microscopio las muestras se lavaron con PBS para eliminar el exceso de reactivo. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal Leica SP2 y se analizaron empleando el programa Leica LCS Lite (Citometría y Microscopía de Fluorescencia, UCM).





### **6.1. Experimentación en modelo de conejo**

Para el estudio *in vivo* se emplearon conejos machos de raza Neozelandesa de unos 3 kg de peso. Los conejos se anestesiaron por inyección intramuscular de Rompún al 2% (Xylazina, 1mL/10kg, Bayer) e Imalgene 1000 (Ketamina 20mg/kg, Merial). El área a operar se rasuró y se lavó con solución antiséptica (Betadine, 10% povidona yodada, Meda Manufacturing, Francia). Para la implantación muscular se realizó una incisión en el tejido muscular dorsal y se insertaron las cerámicas control (n=6) y las cerámicas con rhBMP-2 (n=6). Para la implantación en hueso, se realizó mediante una incisión en el periostio de la meseta tibial y posteriormente, se perforó un orificio empleando una trefina para la inserción de la muestra. Se colocó la cerámica control en el fémur izquierdo (n=6) y la cerámica con rhBMP-2 en el fémur derecho (n=6). En todos los casos, las heridas se cerraron mediante sutura. Todos los animales fueron sacrificados a las 3 semanas tras la operación y las muestras se extrajeron y se fijaron en una solución de formol para la realización de los estudios posteriores.

### **6.2. Experimentación en modelo de cerdo**

Para la realización de estos ensayos se emplearon ocho cerdos. Éstos fueron anestesiados con una mezcla de Medetomidina (0,03 mg/kg de Domtor®, Pfizer, Dublín, Irlanda), ketamina (10 mg/kg de Detolar®, Pfizer) y sulfato de atropina (0,02 mg/kg Atropina Braun®, Braun Surgical SA, Rubí, Barcelona) mediante inyección intramuscular. Durante la intervención quirúrgica los animales se monitorizaron y la anestesia se mantuvo con Propofol 1%. Se realizaron 2 defectos en cada sujeto (1,5 cm x 1 cm x 1 cm) en la zona de la encía por debajo de la raíz del diente del maxilar superior (figura 68). Se insertaron dos tipos de cerámicas: cerámicas de robocasting (1,5 cm x 0,9 cm x 0,9 cm) que se fijaron con la ayuda de 2 tornillos de titanio y cerámicas Bio-Oss® que se cortaron para adaptarlas al tamaño del defecto y se fijaron con pegamento quirúrgico (Histoacryl® surgical glue, Braun Surgical, Tuttlingen, Germany). Tras la operación los animales se trataron diariamente con amoxicilina (7 mg/10 kg) y ácido clavulánico (1,75 mg/19kg de Syinulox®, Pfizer) por inyección intramuscular durante 7 días. A los 3 meses de la intervención los animales se sacrificaron por inyección intravenosa de 100 mg/kg de pentobarbital sódico. Las muestras se extrajeron y se realizó una evaluación por  $\mu$ -CT e histológica de las mismas.



**Figura 68. Radiografía del maxilar del cerdo.** Marcado con el recuadro rojo la zona extraída para la realización del defecto.

**$\mu$ -CT de las muestras:** antes del estudio histológico se realizó tomografía computarizada ( $\mu$ -CT) de las muestras del mismo modo que se ha descrito anteriormente. Tanto las medidas como la reconstrucción tridimensional de las imágenes se realizaron con el programa MicroView ABA 2.2 (GE Healthcare) (Molecular Imaging Core Unit, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid). Se calculó la media y la desviación estándar de dos de los parámetros medidos: volumen de hueso y contenido mineral de hueso. Dichos estudios estadísticos se realizaron con el programa Graph Pad Prism versión 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, California, USA). Se realizó un análisis ANOVA con un test post-hoc Dunnet entre todos los tratamientos y las muestras control (sin implante). Las diferencias significativas se expresaron como: \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$ .

### 6.3. Evaluación histológica

Las muestras se fijaron en una solución de formol al 10% y posteriormente se decalcificaron con 10% de ácido nítrico durante 3 días. Tras la decalcificación, las muestras se deshidrataron y se embebieron en parafina. De cada muestra se cortaron láminas longitudinalmente y en varias series. Estas láminas se tiñeron con las tinciones convencionales de Hematoxilina & Eosina y Tricrómico de Masson. Las muestras se examinaron y observaron empleando un microscopio Olympus BX51 y se procesaron con el programa de Imagen Cell<sup>D</sup>. Todo el proceso histológico fue realizado por el servicio de histología de Dominion Pharmakine ([www.pharmakine.com](http://www.pharmakine.com)).

## **7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  desviación estándar. Los análisis de ajustes de datos se llevaron a cabo empleando el programa GraphPad Prism versión 4. La comparación entre dos grupos fue realizada por test de Student y para analizar dos grupos de variables se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) y el test post-hoc de Bonferroni. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con un  $P < 0,05$ .

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 1. MORFOLOGÍA DE LOS SOPORTES CERÁMICOS

Como hemos indicado en el apartado de Materiales y Métodos de este mismo capítulo el proceso de fabricación de estos materiales cerámicos de SFF junto con sus propiedades físicas han sido descritos previamente en varias publicaciones (Miranda et al. 2006, Miranda et al. 2008, Miranda, Pajares & Guiberteau 2008, Miranda et al. 2007).

Para el estudio de sus propiedades de biocompatibilidad es necesario estudiar la morfología de dichas estructuras. Se conoce que la geometría de la cerámica, concretamente su porosidad, es muy importantes para la adhesión celular y los procesos de proliferación (Perera et al. 2010, LeGeros, Daculsi & LeGeros 2008, Daculsi et al. 2008).

Por este motivo, se emplearon dos técnicas para analizar tanto la morfología de la cerámica como las medidas de su estructura (SEM y  $\mu$ -CT).

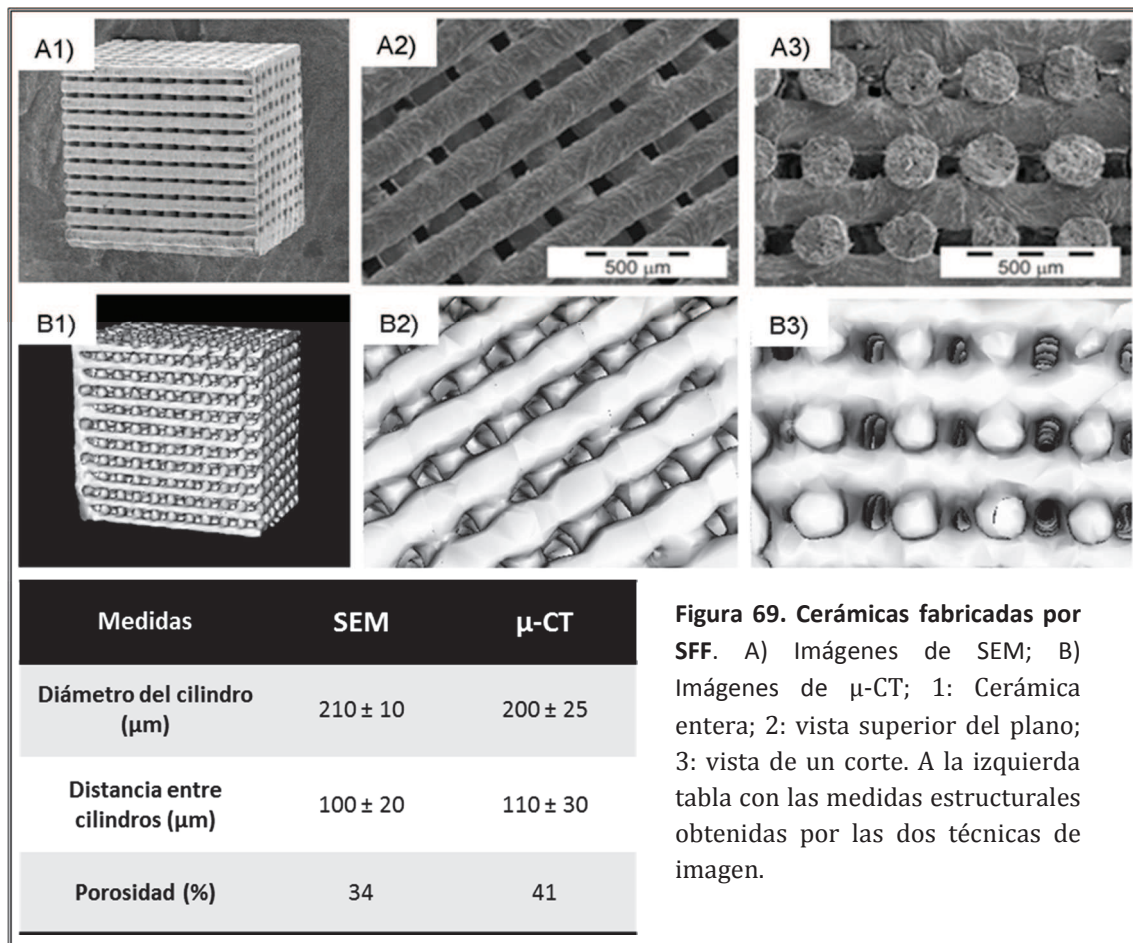


Figura 69. Cerámicas fabricadas por SFF. A) Imágenes de SEM; B) Imágenes de  $\mu$ -CT; 1: Cerámica entera; 2: vista superior del plano; 3: vista de un corte. A la izquierda tabla con las medidas estructurales obtenidas por las dos técnicas de imagen.

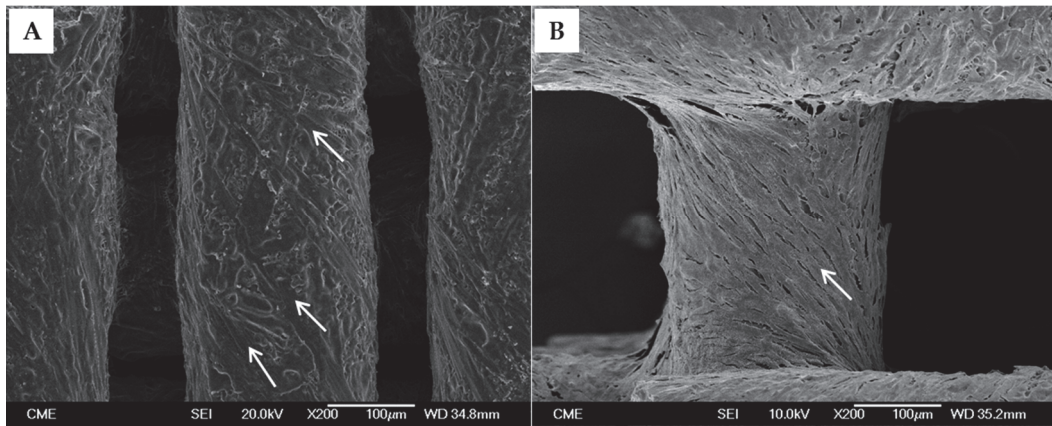
En la figura 69 se observan distintas imágenes de las muestras empleadas. Las imágenes A1 y B1 muestran una visión macroscópica de la estructura completa de la cerámica mientras que las imágenes A2 y B2 se refieren con más detalle a la parte superior de la superficie. A su vez, en las figuras A3 y C3 se puede apreciar la estructura interna de las cerámicas ya que se corresponden con una vista de un corte transversal de las muestras. De este modo, en dichas imágenes se puede apreciar la disposición de los cilindros en las distintas capas y se pueden obtener medidas de la estructura (figura 69).

## **2. ENSAYOS *IN VITRO* DE BIOCMPATIBILIDAD**

Los estudios *in vitro* empleando técnicas de cultivo celular, tienen la ventaja de proporcionar un ambiente definido donde se pueden estudiar las interacciones entre el material y las células. Estos estudios permiten tanto la visualización a nivel microscópico de la disposición de las células sobre la estructura de la cerámica, como la evaluación de la adhesión celular, viabilidad, proliferación y migración de las células en dicho material.

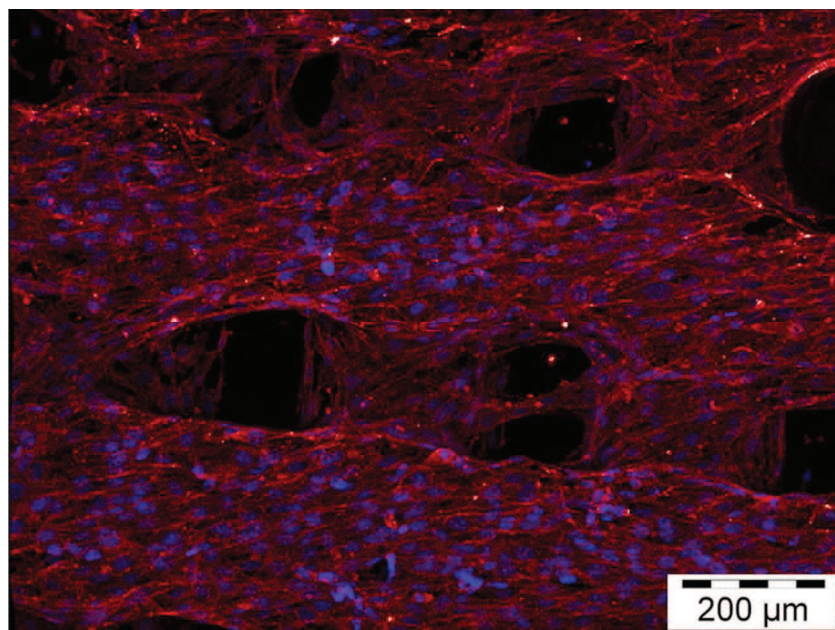
Para estudiar la adhesión y colonización celular en las cerámicas, se empleó la línea celular pre-mioblástica C2C12. Además dicha línea celular posee la capacidad de diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico bajo la acción de la BMP-2 tal y como hemos indicado en los capítulos anteriores de este trabajo.

En unos primeros ensayos se evaluó la capacidad de adhesión de las células. Se emplearon diferentes métodos para detectar las células sobre la superficie de las cerámicas. Un primer análisis se realizó por SEM para observar la estructura de las cerámicas control (sin células sembradas en su superficie) y de aquellas en las que se habían sembrado y cultivado células durante 7 días. Se pudo apreciar que las cerámicas control presentan en su superficie un patrón de marcas transversales (figura 70A). Cabe destacar como en las cerámicas cubiertas con células (figura 70B), éstas se disponían siguiendo el mismo patrón irregular de la superficie de los cilindros.



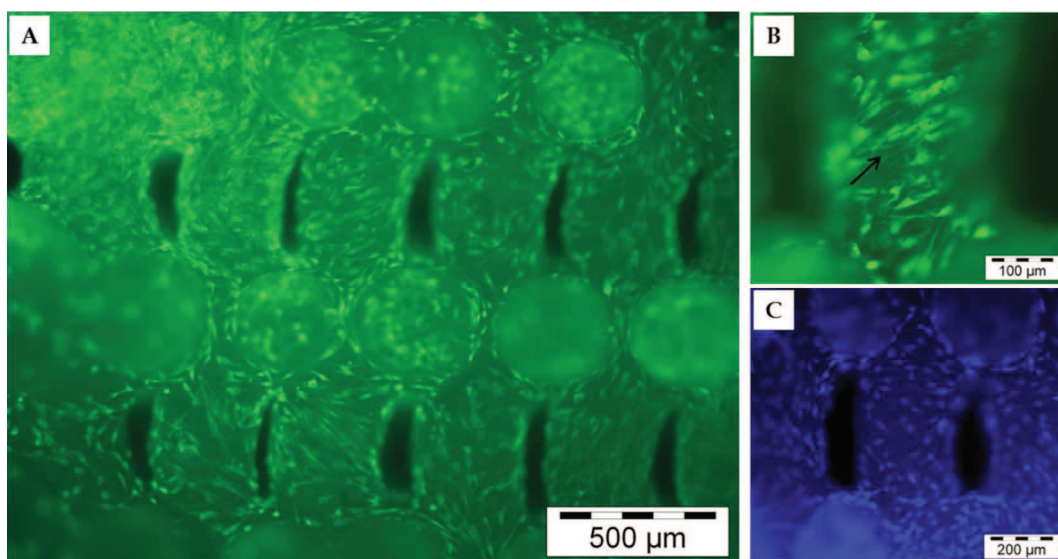
**Figura 70. Imágenes de SEM.** A) Cerámica control. B) Cerámica sembrada con células. Las flechas señalan el patrón de extrusión de la superficie de la cerámica y la morfología que adoptan las células en su crecimiento que coincide con dicho patrón.

Por otro lado, para visualizar la morfología de las células y la adhesión de éstas en una imagen más definida de los distintos planos de la muestra se realizó microscopía confocal. Para la observación de las células, se llevó a cabo una tinción tanto del núcleo como de la F-actina presente en el citoesqueleto celular. De este modo, se pudo apreciar nuevamente como las células tras 7 días de cultivo cubrían completamente la superficie del material observándose, incluso, el anclaje de éstas entre los cilindros de la estructura (figura 71).



**Figura 71. Imagen de microscopio confocal de la cerámica sembrada con células.** En rojo el citoesqueleto celular y en azul el núcleo.

Esta misma disposición de las células se observó mediante microscopio de fluorescencia con la tinción de calceína. Dicha tinción revela la viabilidad celular ya que utiliza un sustrato que por la acción de enzimas presentes en las células (esterasas) da lugar a un producto fluorescente detectable al microscopio. Por tanto, sólo se apreciarán aquellas células vivas adheridas a la superficie de la cerámica. En la imagen 72A se observa como la fluorescencia está presente en la totalidad de la cerámica, lo que indica que las células cubrían toda la superficie de los cilindros que componen la cerámica. Además apreciamos en una visión más detallada (figura 72B) que dichas células seguían la disposición anteriormente mencionada en las imágenes de SEM. La misma muestra fue teñida a su vez, con el reactivo de Hoechst para distinguir la presencia de los núcleos celulares (figura 72C).

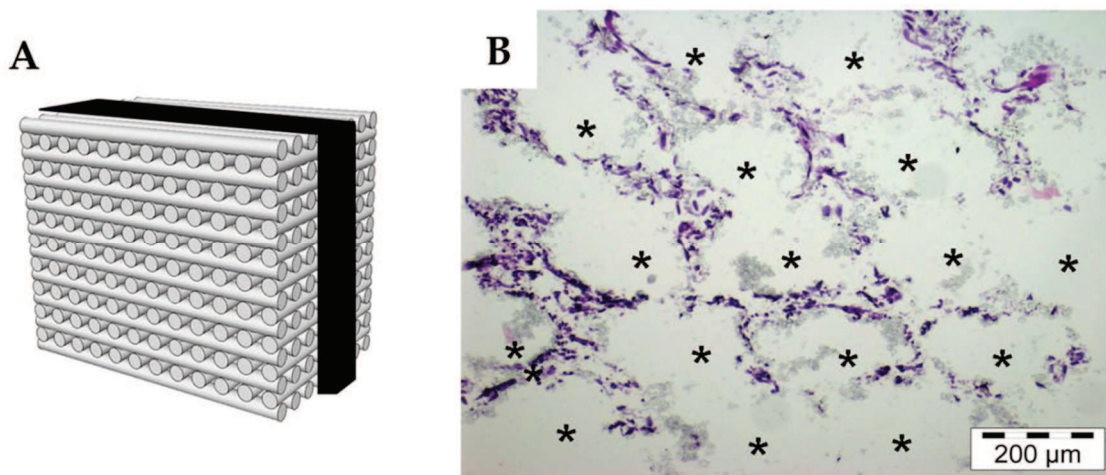


**Figura 72. Ensayos de viabilidad celular.** Imágenes del microscopio de fluorescencia. A) Ensayo de calceína de la cerámica sembrada con células. Las células viables presentan fluorescencia de color verde. B) Imagen a mayor aumento de la misma cerámica sembrada. La flecha indica la disposición de las células sobre la cerámica. C) Ensayo de Hoechst para la misma cerámica. En color azul los núcleos celulares.

Estos ensayos demuestran la idoneidad de este tipo de cerámicas ya que permiten no sólo la adhesión celular sino el crecimiento y viabilidad de éstas.

Sin embargo, uno de los factores limitantes del empleo de materiales porosos es la posibilidad de migración de las células hacia el interior de la estructura. En estos primeros ensayos se ha podido apreciar como las células se anclaban entre los cilindros. Sin embargo, estas imágenes no dan información suficiente para poder comprobar si las células

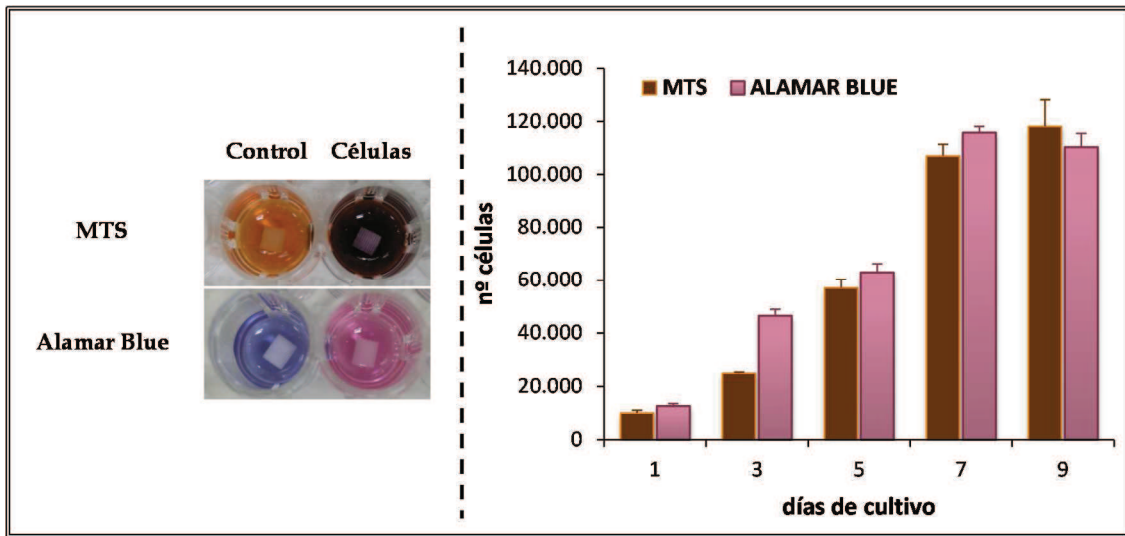
penetraban en el interior de la cerámica. Para ello, se realizó un examen histológico de un corte transversal por el centro del material previamente sembrado y cultivado con células. En la figura 73A se observa en negro el área de estudio histológico mientras que la figura 73B muestra la tinción de Hematoxilina/Eosina realizada en dicho corte. En ella se aprecian las células teñidas de color morado confirmando la presencia de éstas en el interior de la cerámica. Así podemos afirmar que las células no sólo se adhieren a la superficie del material sino que también penetran en su interior colonizando la totalidad de la estructura (Abarrategi et al. 2012).



**Figura 73. A) Representación esquemática de la cerámica de SFF.** Señalado en negro el área objeto de examen histológico. **B) Histología del corte de la cerámica.** Señalado con asteriscos (\*) los cilindros de la cerámica. En color morado las células presentes en el interior de la estructura.

Sin embargo, a pesar de haber comprobado la adherencia de las células al material, para poder demostrar su biocompatibilidad es necesario evaluar la proliferación celular sobre dicha estructura. Para ello se cuantificó mediante ensayos colorimétricos el número de células adheridas a la cerámica a distintos días de cultivo. Se utilizaron dos métodos indirectos de proliferación celular, el ensayo de MTS y en el ensayo Alamar Blue. Ambos determinan el poder reductor de las células por lo que siempre se refieren al número de células viables. En los resultados obtenidos (figura 74) se observó cómo al inicio del ensayo se encontraban adheridas alrededor de 10.000 células mientras que a medida que aumentaban los días de cultivo dicho valor aumentaba. Además cabe destacar cómo los valores obtenidos en ambos ensayos eran similares, exceptuando el dato de 3 días en el que obteníamos un valor mayor para el ensayo de Alamar Blue. Este dato puede ser debido

simplemente a la mayor sensibilidad de dicho ensayo en comparación con MTS (Hamid et al. 2004).



**Figura 74. Ensayos colorimétricos de cuantificación celular.** A la izquierda se muestran los pocillos de cerámicas control y con células tras la realización de los ensayos de MTS y Alamar Blue. Se observa la diferencia de color entre éstos. A la derecha la representación de los datos obtenidos en los distintos ensayos.

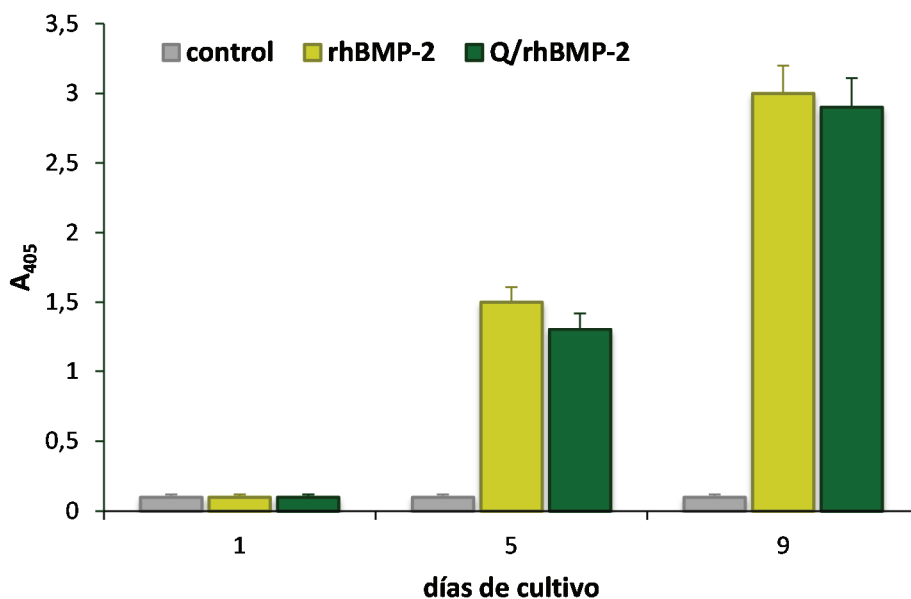
Por tanto, los resultados indican que además de adherirse al material, las células tienen la capacidad de proliferar sobre éste por lo que se confirma la biocompatibilidad de dichas cerámicas de SFF.

### 3. ESTUDIO *IN VITRO* DE ACTIVIDAD TRAS LA INCORPORACIÓN DE rhBMP-2

En el campo de la ingeniería de tejido óseo se pretende mejorar las propiedades de estos materiales cerámicos incorporándoles factores de crecimiento capaces de proporcionarle un mayor efecto osteoinductivo (Bose, Tarafder 2012). Uno de los factores más estudiados es la BMP-2 (Abarrategi et al. 2009, Jingushi et al. 2002, Liang et al. 2005, Yamamoto, Tabata & Ikada 1998, Nakamura et al. 2003, Hall et al. 2007). Estos factores pueden ser incorporados al material por medio de adsorción directa o mediante un transportador (Kuboki, Jin & Takita 2001, Lan Levengood et al. 2010, Lópiz-Morales et al. 2010, Mouriño, Boccaccini 2010). Han sido descritos diversos estudios referentes a la liberación de BMP-2 adsorbida desde otros materiales cerámicos (Abarrategi et al. 2008a, Yuan et al. 2001) y a su vez también se han publicado artículos sobre la liberación de dicho

factor desde un transportador como el quitosano (Abarrategi et al. 2008b, Abarrategi et al. 2009, Lopez-Lacomba et al. 2006). Por este motivo, en el presente trabajo se han seleccionado ambos métodos de incorporación de la rhBMP-2 a las cerámicas de SFF.

Para el estudio *in vitro* del efecto de la rhBMP-2 en las cerámicas se empleó el ensayo de fosfatasa alcalina. De este modo, se midieron los niveles de dicho marcador en las células adheridas a los materiales tras varios días de cultivo (1, 5 y 9 días). En la gráfica de la figura 75, se aprecia cómo los niveles de fosfatasa alcalina se detectaron al quinto día de cultivo y aumentaban al noveno día. Además dichos niveles estaban presentes en ambas formas de incorporación de la rhBMP-2 a la cerámica: por adsorción y por inclusión en el quitosano como material de recubrimiento de la cerámica. Sin embargo, no existía actividad fosfatasa alcalina en las células adheridas sobre las cerámicas control, es decir, aquella a la que no se le ha añadido rhBMP-2. Estos resultados indican que la rhBMP-2 presente en dichos materiales conserva su actividad y, por tanto, induce la diferenciación ósea en ensayos *in vitro*.



**Figura 75. Ensayo de actividad fosfatasa alcalina.** Representación de los datos obtenidos a distintos tiempos de cerámicas control, cerámicas con rhBMP-2 y cerámicas con rhBMP-2 incorporada mediante recubrimiento de quitosano.

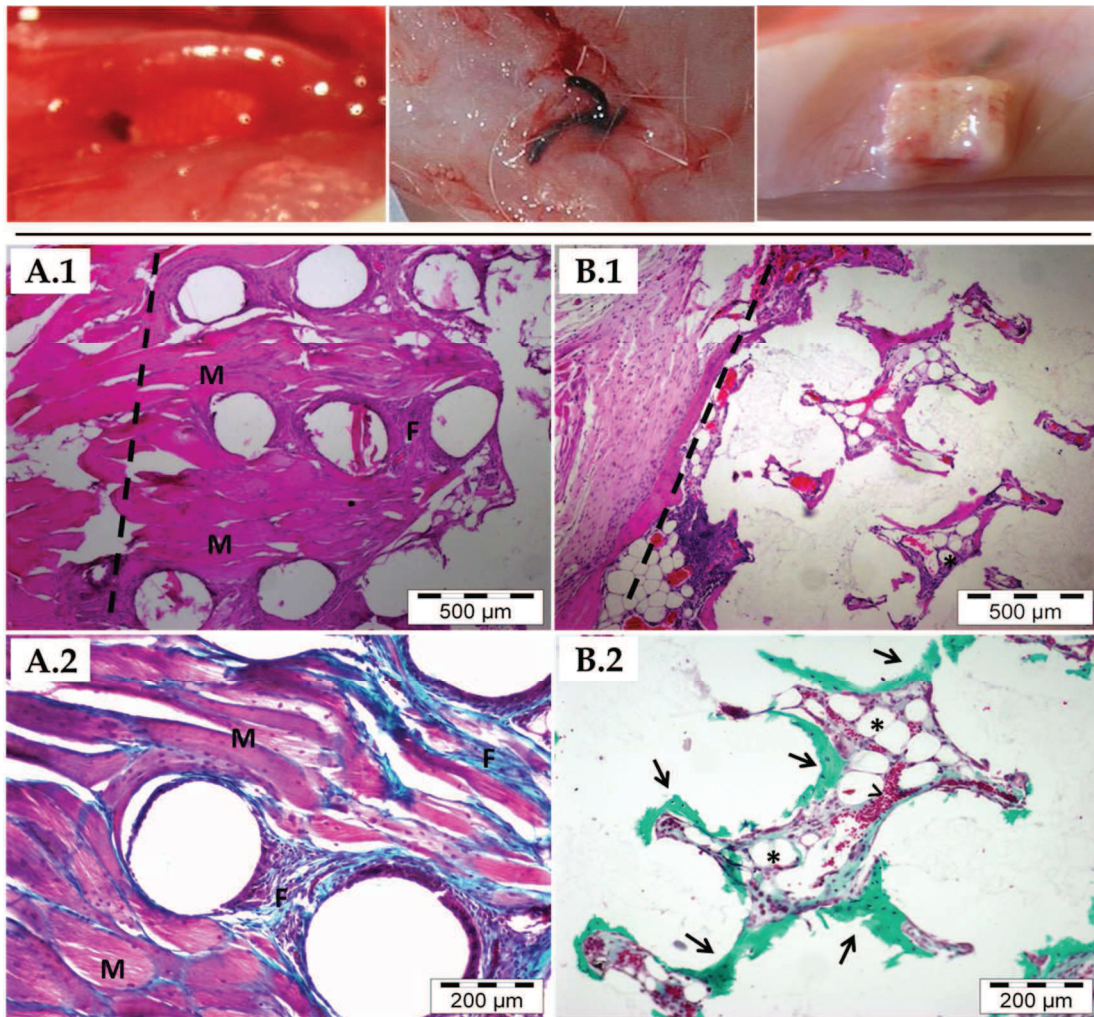
Por tanto, todos los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* confirman que los materiales cerámicos de SFF poseen propiedades adecuadas para permitir la adhesión, proliferación e incluso diferenciación celular.

#### **4. ENSAYOS *IN VIVO***

La principal aplicación de las estructuras cerámicas es la regeneración ósea. Sin embargo, es necesario un estudio exhaustivo de dichos materiales para poder dirigirlos a una aplicación en clínica. Por esta razón, se han abordado distintos modelos animales para evaluar las propiedades y comportamiento de dicho material y se ha estudiado el efecto osteoinductivo de las cerámicas con rhBMP-2. En el caso del modelo de conejo se emplearon cerámicas con la rhBMP-2 adsorbida, mientras que para el modelo de cerdo la proteína se incorporó a la cerámica con el quitosano como transportador.

##### **4.1. Modelo de implantación en músculo de conejo**

Un primer estudio se realizó en una localización ectópica ya que es un buen modelo para evaluar el comportamiento de las cerámicas implantadas en ausencia de los factores de crecimientos innatos presentes en condiciones *in vivo*. Con este ensayo se pretendía evaluar tanto el efecto conductivo proporcionado por la estructura del material así como el efecto osteoinductivo en aquellas cerámicas a las que se le había incorporado la rhBMP-2. Para ello se implantaron distintas muestras en el tejido muscular dorsal de conejo. Las muestras estuvieron implantadas durante 3 semanas y pasado dicho tiempo se realizó un estudio histológico de la zona operada. En la figura 76 se puede apreciar las imágenes obtenidas de las muestras control y con rhBMP-2 teñidas con dos tinciones diferentes: Hematoxilina/Eosina y Tricrómico de Masson. Las cerámicas control mostraron una matriz de tejido muscular en el interior del material (figura 76A) junto con la presencia de tejido fibroso. Por el contrario, el aspecto de las muestras de cerámica con rhBMP-2 era muy diferente. No se apreció esa invasión de tejido muscular, sin embargo, apareció una coloración verde correspondiente a la presencia de colágeno. Además se observó tejido graso y vasos sanguíneos con acúmulos de células rojas (figura 76B). Tanto el colágeno como la presencia de nuevos vasos sanguíneos y tejido graso indicaron la formación de hueso ectópico en el lugar de implantación de la cerámica.



**Figura 76. Implantación de cerámicas en músculo de conejo.** En la parte superior imágenes del procedimiento quirúrgico realizado. A) Cerámicas control. B) Cerámica con rhBMP-2. 1) tinción Hematoxilina & Eosina. 2) Tinción Tricrómico de Masson. Señalado con línea discontinua el límite de la estructura implantada. M: tejido muscular. F: tejido fibroso. Los espacios circulares vacíos corresponden a los cilindros del material. Las flechas (→) indican el tejido óseo de nueva formación teñido de color verde. Los asteriscos (\*) muestran los vasos sanguíneos en tejido medular. El símbolo “>” señala las células rojas sanguíneas.

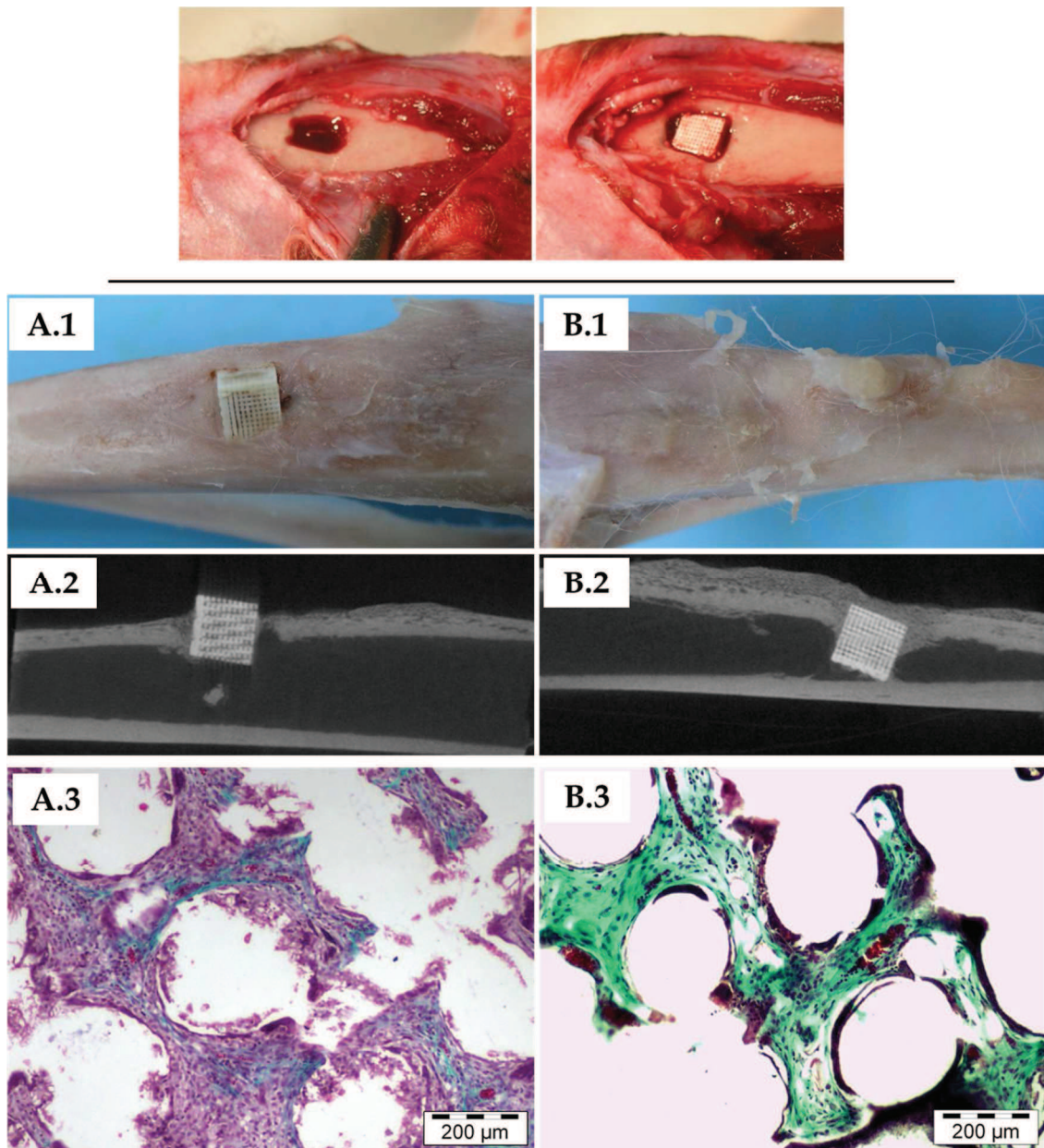
#### 4.2. Modelo de implantación en hueso de conejo

En un segundo modelo *in vivo* se escogió la tibia de conejos para poder estudiar el comportamiento del material en una localización ortotópica. Para ello, se creó un defecto del tamaño de la cerámica en la tibia y se implantaron las muestras. La figura 77 muestra las imágenes del modelo quirúrgico realizado. A las 3 semanas de la cirugía se extrajeron las muestras y se analizaron. La cerámica control presentó una buena integración de ésta en el

hueso (77A.1). Sin embargo, en la cerámica tratada con rhBMP-2 se observó además, una alta formación de hueso tanto alrededor como en la parte superior de la cerámica que dificulta su visualización (77B.1). Posteriormente se analizaron las muestras por  $\mu$ -CT y se confirmó lo que se advertía en una primera observación. En la figura 77A.2 se puede apreciar como la cerámica control se integró en el defecto creado en la tibia pero no se formó hueso alrededor de la cerámica. Esto no ocurre en el caso de la cerámica con rhBMP-2 ya que se observó cómo dicha estructura estaba rodeada de hueso nuevo (77B.2).

Por otro lado, se estudiaron las muestras desde el punto de vista histológico y se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en el modelo de implantación en músculo (figura 77A.3 y 77B.3). En las cerámicas control aparecía tejido fibroso en el interior de la estructura mientras que en el caso de la cerámica con rhBMP-2 predominaba el tejido óseo (color verde) formado entre los cilindros que componen el material. También en este último caso, se pudo apreciar la presencia de tejido medular graso y vasos sanguíneos pero de forma minoritaria ya que existía una abundante formación de hueso.

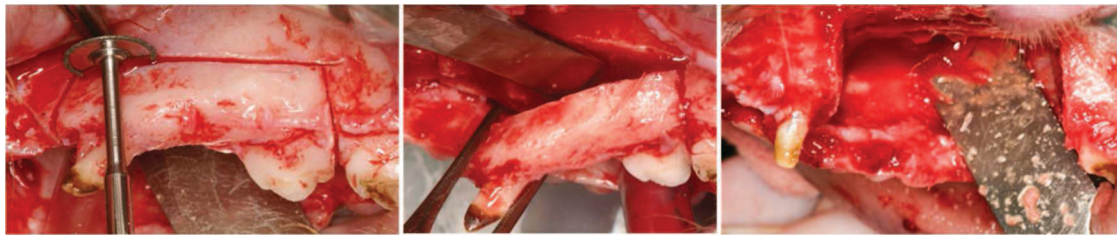
Todos los resultados obtenidos en los estudios *in vivo* en conejo indican que la estructura porosa del material permite la colonización del tejido circundante al interior de la estructura. Esto ocurre en las cerámicas control ya que se aprecia una invasión del tejido muscular incluyendo la aparición de tejido fibroso. Además, a la vista de los resultados se comprueba la influencia significativa de la rhBMP-2 en dichos materiales ya que permitieron la formación de tejido óseo nuevo en el interior de la cerámica. Este hecho y la aparición de tejido medular graso con vasos sanguíneos entre el hueso de nueva formación sugiere que las cerámicas activadas con rhBMP-2 poseen una importante capacidad osteoinductora *in vivo* (Kuboki, Jin & Takita 2001, Lan Levensgood et al. 2010).



**Figura 77. Implantación de cerámicas en hueso de conejo.** En la parte superior imágenes del procedimiento quirúrgico realizado. A) Cerámicas control. B) Cerámica con rhBMP-2. 1) apariencia de las muestras en el momento de su extracción. 2) Imágenes obtenidas por  $\mu$ -CT. 3) Imágenes histológicas de la tinción Tricrómico de Masson. En las figuras A.3 y B.3 se observa el tejido formado en el interior de la estructura en ambos casos. Los espacios circulares vacíos corresponden a los cilindros del material. Aparece de color violeta el tejido fibroso y de color verde el tejido óseo.

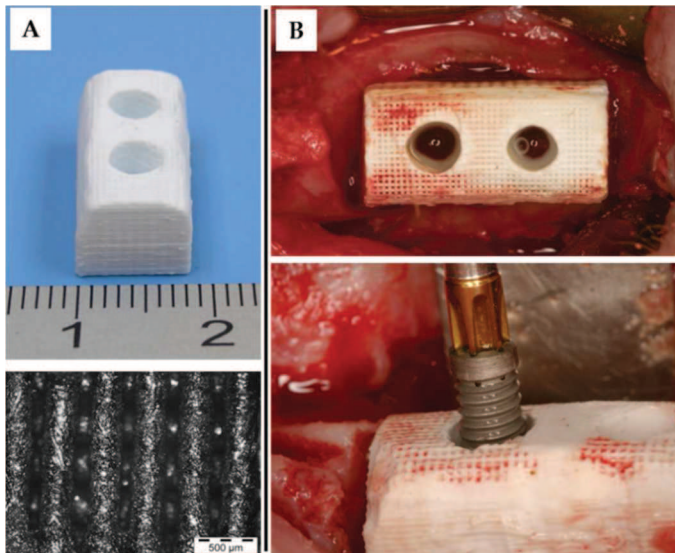
### 4.3. Modelo de implantación en maxilar de cerdo

Puesto que en odontología uno de los principales problemas es la falta de volumen de hueso en la zona de trabajo, se utilizó como modelo de cirugía de defectos de mayor tamaño que en el caso del modelo en conejo y esta vez en el maxilar superior (figura 78). Para ello se emplearon cerdos como sujeto animal debido a su similitud fisiológica con la especie humana. De este modo, se estudió la posible aplicación clínica de las cerámicas de robocasting.



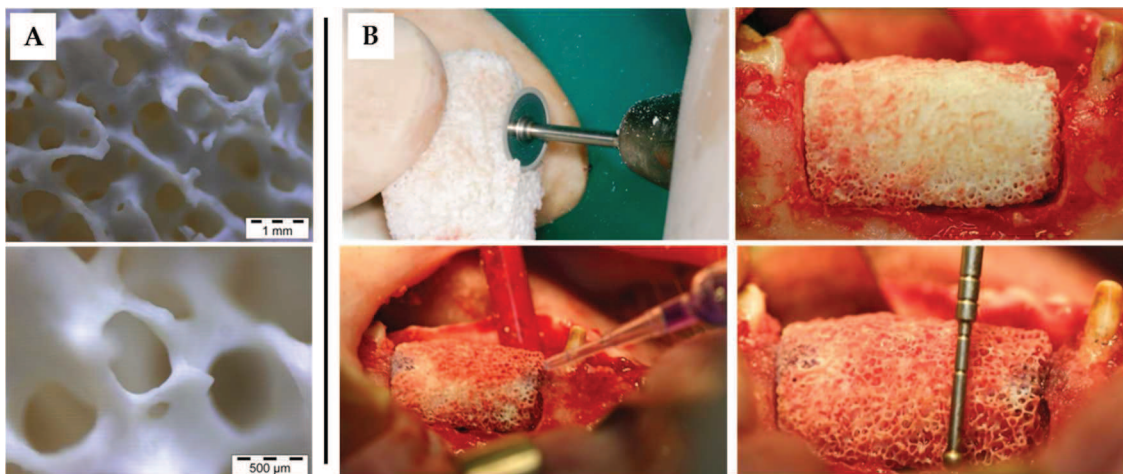
**Figura 78. Imágenes del procedimiento quirúrgico realizado en cerdo.** Extracción del defecto en el maxilar superior.

Para el estudio se utilizaron tanto cerámicas control como cerámicas con la rhBMP-2 incorporada utilizando como transportador el quitosano. Se fabricaron y diseñaron con la forma adecuada para poder ser implantadas como relleno óseo en el maxilar. Así en el maxilar superior de los sujetos se creó un defecto del tamaño de la cerámica y se fijó ésta por medio de dos implantes de titanio. En la figura 79 se muestran imágenes de la estructura implantada y de la intervención realizada.



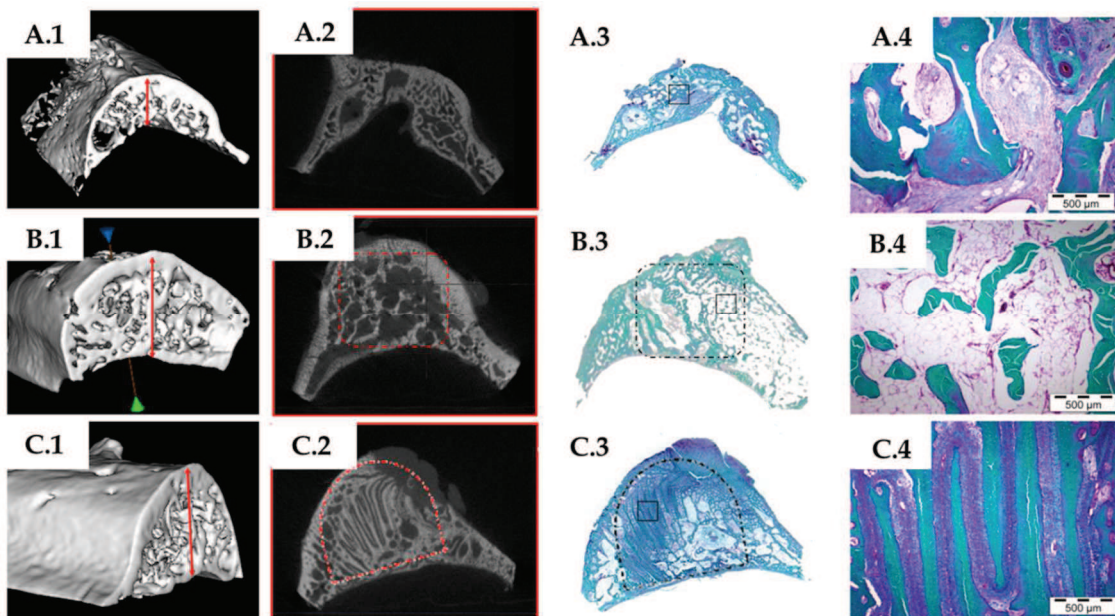
**Figura 79. Implantación de cerámicas fabricadas por robocasting en el maxilar superior de cerdo.** A) Cerámica implantada e imagen microscópica de dicha estructura. B) Imágenes del procedimiento quirúrgico de implantación y fijación mediante tornillos de titanio.

También se implantaron con objeto comparativo bloques de cerámica disponibles actualmente en clínica (Bio-Oss®). Se emplearon bloques control y bloques con rhBMP-2 incorporada del mismo modo que las cerámicas objeto de estudio. Dicho material posee una estructura de poros interna irregular y se adaptó al tamaño del defecto creado en el maxilar mediante pulido mecánico. Además se inmovilizaron en la zona de forma diferente a las cerámicas de robocasting ya que se empleó pegamento quirúrgico. En la figura 80 se observa la estructura interna del Bio-Oss® y el procedimiento de implantación realizado.



**Figura 80. Implantación de cerámicas Bio-Oss® en el maxilar superior de cerdo.** A) Imagen microscópica de la cerámica implantada. B) Imágenes del procedimiento quirúrgico de implantación y fijación mediante pegamento.

Todas las muestras fueron extraídas a los 3 meses tras la cirugía. Se analizaron mediante  $\mu$ -CT y por métodos histológicos. En la figura 81 se muestra un resumen de los resultados obtenidos. En las imágenes de  $\mu$ -CT se observó la diferencia del volumen de hueso formado en los sujetos con cerámicas implantadas con rhBMP-2 con respecto a las muestras en las que el defecto permaneció vacío, es decir, no se insertó ningún material. Además en las tinciones histológicas (Tricrómico de Masson) se pudo diferenciar la disposición del hueso nuevo formado. Éste siguió la estructura interior del material implantado por lo que se observa en la imagen correspondiente a la cerámica de robocasting como la nueva formación de hueso presenta una distribución regular (figura 81C.4).



**Figura 81. Resultados de la implantación de cerámicas en defectos en el maxilar superior de cerdo.** A) Muestra control: defecto vacío. B) muestra de Bio-Oss® con rhBMP-2. C) muestra de cerámica de robocasting con rhBMP-2. 1) Reconstrucción tridimensional de imágenes de  $\mu$ -CT. La línea roja indica la altura del hueso formado. 2) Imagen de  $\mu$ -CT de un plano de la muestra. Las líneas rojas discontinuas indican la localización de la estructura implantada. 3) Imagen macroscópica de las muestras histológicas. Las líneas discontinuas indican la localización de la cerámica. En un recuadro señalada la zona objeto de examen microscópico (4).

Además el análisis de  $\mu$ -CT permitió obtener distintas medidas para evaluar los resultados de los materiales implantados. Se analizaron 13 de las 16 muestras. En la figura 82 se exponen todos los datos obtenidos de dicho análisis observando diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Estas diferencias aparecen entre las muestras en las que el defecto permaneció vacío y las muestras con cerámicas control ( $p \leq 0,05$ ). A su vez, dichas diferencias se acentúan entre los mencionados defectos vacíos y aquellas en las que se ha implantado las cerámicas con rhBMP-2, tanto cerámicas de robocasting como el Bio-Oss® ( $p \leq 0,001$ ). Por otro lado, no existen diferencias significativas entre las distintas cerámicas (robocasting y Bio-Oss®). Esto ocurre también con aquellas a las que se ha incorporado la rhBMP-2. Sin embargo, entre las cerámicas control y las cerámicas con rhBMP-2 sí encontramos diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ ).

	Volumen de hueso (mm <sup>3</sup> )	Contenido mineral del hueso (mg)	Volumen cortical (mm <sup>3</sup> )	Volumen medular (mm <sup>3</sup> )	Volumen trabecular (mm <sup>3</sup> )
Control vacío	474,38187	2793,23507	45,8433	72,14137	356,39718
Control vacío	526,88685	2717,63145	55,04625	102,45375	369,38685
SFF	807,4547	3893,3653	115,422	36,7875	655,2452
SFF	798,3354	3623,852	83,493	9,027	705,8154
SFF	771,7312	3973,2698	87,4395	36,5295	647,7622
SFF/BMP-2	1071,4957	6071,6906	175,7265	0,2475	895,5217
SFF/BMP-2	1100,4825	5841,9714	294,15375	1,539	804,78975
SFF/BMP-2	1069,1383	5298,2002	90,3375	104,1825	874,6183
SFF/BMP-2	1234,8813	5169,9093	51,4485	25,638	1157,7948
Bio-Oss®	708,9029	3620,5808	48,117	2,733	658,0529
Bio-Oss®	760,41225	3474,27575	94,0995	18,351	647,96175
Bio-Oss®/BMP-2	1213,9638	6011,7482	39,3075	6,018	1218,6383
Bio-Oss®/BMP-2	996,89755	4942,32605	135,52875	42,18975	789,17905

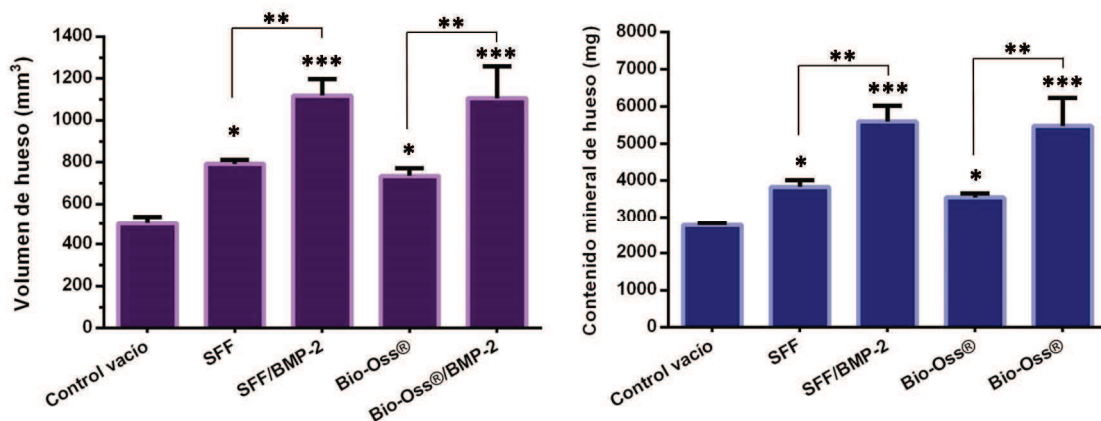


Figura 82. Datos del modelo de implantación de cerámicas en maxilar en cerdos.

La tabla superior resume los datos obtenidos en el estudio por  $\mu$ -CT. Las gráficas representan las medias y la desviación del volumen de hueso y del contenido mineral del hueso formado. Diferencias significativas indicadas con respecto al control vacío y entre algunas muestras: \* ( $p \leq 0,05$ ), \*\* ( $p \leq 0,01$ ), \*\*\* ( $p \leq 0,001$ ).

Los resultados presentados en este capítulo indican que las cerámicas fabricadas por el método de robocasting tienen un comportamiento similar a las cerámicas disponibles actualmente en clínica (Bio-Oss®). De este modo, se demuestran sus propiedades osteoconductoras y osteoinductivas en el caso de aquellas estructuras que llevan incorporada la rhBMP-2. Sin embargo, en contraposición al material actualmente comercializado, estas cerámicas de robocasting presentan la ventaja de poder estar diseñadas con la forma adecuada a las necesidades facilitando, de este modo, el procedimiento quirúrgico.

#### **IV. CONCLUSIONES**

Los ensayos de este capítulo han ido orientados a estudiar la posible aplicación clínica de la BMP-2 en soportes cerámicos. Para ello se han estudiado las propiedades biológicas de las cerámicas utilizadas y su actividad tras su recubrimiento con rhBMP-2. Las conclusiones obtenidas son:

- El método de fabricación de cerámicas tridimensionales por robocasting ofrece la ventaja de poder diseñar una estructura con tamaño y porosidad adecuados a las necesidades requeridas.
- Se ha demostrado la biocompatibilidad de las matrices cerámicas tanto *in vitro* como *in vivo*. La estructura tridimensional estudiada permite la colonización del tejido circundante hacia el interior de la cerámica, lo que implica una capacidad osteoconductiva si se implanta en tejido óseo.
- La incorporación de rhBMP-2 a las cerámicas, tanto en la superficie de la estructura como mediante un recubrimiento de quitosano, induce la diferenciación ósea de las células sembradas en ensayos *in vitro*. *In vivo*, estas cerámicas activadas inducen la formación de tejido óseo tanto en una localización ectópica como en el propio hueso.
- Se ha diseñado una cerámica específica con rhBMP-2 para un problema clínico concreto, como es la regeneración de tejido óseo en mandíbula, y se han utilizado cerdos como modelo de estudio. Este trabajo ha corroborado la potencial aplicabilidad clínica del compuesto desarrollado.

Los resultados obtenidos sugieren que las cerámicas de robocasting con BMP-2 pueden ser de utilidad en el campo de la odontología, traumatología e incluso para aplicaciones concretas en cirugía de cáncer de hueso.



✧ *Bibliografía*

---



Abarrategi, A., Moreno-Vicente, C., Ramos, V., Aranaz, I., Sanz Casado, J. & López-Lacomba, J. 2008a, "Improvement of Porous b-TCP Scaffolds with rhBMP-2 Chitosan Carrier Film for Bone Tissue Application", vol. 14, no 8, pp. 1305-1319.

Abarrategi, A., Civantos, A., Ramos, V., Sanz Casado, J.V. & López-Lacomba, J.L. 2008b, "Chitosan Film as rhBMP2 Carrier: Delivery Properties for Bone Tissue Application", vol. 9, no 2, pp. 711-718.

Abarrategi, A., Perez-Tavarez, R., Rodriguez-Milla, M.A., Cubillo, I., Mulero, F., Alfranca, A., Lopez-Lacomba, J.L. & García-Castro, J. 2013, "In vivo ectopic implantation model to assess human mesenchymal progenitor cell potential", *Stem Cell Reviews and Reports*, vol. 9, no. 6, pp. 833-846.

Abarrategi, A., Fernandez-Valle, M.E., Desmet, T., Castejón, D., Civantos, A., Moreno-Vicente, C., Ramos, V., Sanz-Casado, J.V., Martínez-Vázquez, F.J., Dubruel, P., Miranda, P. & López-Lacomba, J.L. 2012, "Label-free magnetic resonance imaging to locate live cells in three-dimensional porous scaffolds", *Journal of The Royal Society Interface*, vol. 9, no. 74, pp. 2321-2331.

Abarrategi, A., García-Cantalejo, J., Moreno-Vicente, C., Civantos, A., Ramos, V., Casado, J.V.S., Pérez-Rial, S., Martínez-Corriá, R. & López-Lacomba, J.L. 2009, "Gene expression profile on chitosan/rhBMP-2 films: A novel osteoinductive coating for implantable materials", *Acta Biomaterialia*, vol. 5, no. 7, pp. 2633-2646.

Abbatiello, S. & Porter, T. 1997, "Anion-mediated precipitation of recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2) is dependent upon the heparin binding N-terminal region", *Protein Sci*, vol. 6, pp. 99.

Allori, A.C., Sillon, A.M. & Warren, S.M. 2008, "Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part I: biochemical signaling molecules", *Tissue Engineering Part B: Reviews*, vol. 14, no. 3, pp. 259-273.

Altamirano, M.M., Garcia, C., Possani, L.D. & Fersht, A.R. 1999, "Oxidative refolding chromatography: folding of the scorpion toxin Cn5", vol. 17, no 2, pp. 187-191.

Andrades, J.A., Narváez-Ledesma, L., Cerón-Torres, L., Cruz-Amaya, A.P., López-Guillén, D., Mesa-Almagro, M.L. & Moreno-Moreno, J.A. 2013, "Bone Engineering: A Matter of Cells, Growth Factors and Biomaterials", pp 615-641

Apelt, D., Theiss, F., El-Warrak, A.O., Zlinszky, K., Bettschart-Wolfisberger, R., Bohner, M., Matter, S., Auer, J.A. & von Rechenberg, B. 2004, "In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements", *Biomaterials*, vol. 25, no. 7-8, pp. 1439-1451.

Asari, T., Furukawa, K., Tanaka, S., Kudo, H., Mizukami, H., Ono, A., Numasawa, T., Kumagai, G., Motomura, S. & Yagihashi, S. 2012, "Mesenchymal stem cell isolation and characterization from human spinal ligaments", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 417, no. 4, pp. 1193-1199.

'Ashammakhi N., F.P.'. 2003, *Topics in Tissue Engineering*

Babensee, J.E., McIntire, L.V. & Mikos, A.G. 2000, "Growth factor delivery for tissue engineering", *Pharmaceutical research*, vol. 17, no. 5, pp. 497-504.

Balint, E., Lapointe, D., Drissi, H., van der Meijden, C., Young, D.W., Van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein, G.S. & Lian, J.B. 2003, "Phenotype discovery by gene expression profiling: Mapping of biological processes linked to BMP-2-mediated osteoblast differentiation", *Journal of cellular biochemistry*, vol. 89, no. 2, pp. 401-426.

Baron, R. 2003, "General principles of bone biology", *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, vol. 5, pp. 1-8.

Baron, R. & Kneissel, M. 2013, "WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments", *Nature medicine*, vol. 19, no. 2, pp. 179-192.

Barradas, A., Fernandes, H.A., Groen, N., Chai, Y.C., Schrooten, J., van de Peppel, J., van Leeuwen, J.P., van Blitterswijk, C.A. & de Boer, J. 2012, "A calcium-induced signaling cascade leading to osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells", *Biomaterials*, vol. 33, no. 11, pp. 3205-3215.

Barry, F., Boynton, R.E., Liu, B. & Murphy, J.M. 2001, "Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow: Differentiation-Dependent Gene Expression of Matrix Components", *Experimental cell research*, vol. 268, no. 2, pp. 189-200.

Batas, B. & Chaudhuri, J.B. 1996, "Protein refolding at high concentration using size-exclusion chromatography", *Biotechnol Bioeng*, vol. 50, pp. 16-23.

Becker, S.T., Bolte, H., Krapf, O., Seitz, H., Douglas, T., Sivananthan, S., Wiltfang, J., Sherry, E. & Warnke, P.H. 2009, "Endocultivation: 3D printed customized porous scaffolds for heterotopic bone induction", *Oral oncology*, vol. 45, no. 11, pp. e181-e188.

Bessa, P.C., Pedro, A.J., Klösch, B., Nobre, A., van Griensven, M., Reis, R.L. & Casal, M. 2007, "Osteoinduction in human fat-derived stem cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2 produced in *Escherichia coli*", vol. 30, no 1, pp. 15.

Bessa, P.C., Casal, M. & Reis, R. 2008a, "Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery)", *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, vol. 2, no. 2-3, pp. 81-96.

Bessa, P.C., Casal, M. & Reis, R. 2008b, "Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts)", *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, vol. 2, no. 1, pp. 1-13.

Bessette, P.H., Åslund, F., Beckwith, J. & Georgiou, G. 1999, "Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 96, no. 24, pp. 13703-13708.

Bessho, K., Kusumoto, K., Fujimura, K., Konishi, Y., Ogawa, Y., Tani, Y. & Iizuka, T. 1999, "Comparison of recombinant and purified human bone morphogenetic protein", *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 37, no. 1, pp. 2-5.

Bessho, K., Konishi, Y., Kaihara, S., Fujimura, K., Okubo, Y. & Iizuka, T. 2000, "Bone induction by *Escherichia coli* -derived recombinant human bone morphogenetic protein-2 compared with Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2", *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 38, no. 6, pp. 645-649.

Biron, R.J. 1999, Oxidative renaturation of recombinant human bone morphogenetic protein-2, *Tesis Doctoral. Tufts University*.

Blumenthal, N.M., Koh-Kunst, G., Alves, M.E., Miranda, D., Sorensen, R.G., Wozney, J.M. & Wikesjö, U.M. 2002, "Effect of surgical implantation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a bioabsorbable collagen sponge or calcium phosphate putty carrier in intrabony periodontal defects in the baboon", *Journal of periodontology*, vol. 73, no. 12, pp. 1494-1506.

Bose, S. & Tarafder, S. 2012, "Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review", *Acta biomaterialia*, vol. 8, no. 4, pp. 1401-1421.

Bostrom, M.P. 1998, "Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing", *Clinical orthopaedics and related research*, vol. 355, pp. S116-S123.

Bowden, G.A. & Georgiou, G. 1990, "Folding and aggregation of beta-lactamase in the periplasmic space of *Escherichia coli*.", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, no. 28, pp. 16760-16766.

Bozal, C.B. 2006, "Biología del osteocito", *Actualizaciones en Osteología.Cap.2: 19*, vol. 21.

Bragdon, B., Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J. & Nohe, A. 2011, "Bone morphogenetic proteins: a critical review", *Cellular signalling*, vol. 23, no. 4, pp. 609-620.

Burkus, J.K., Heim, S.E., Gornet, M.F. & Zdeblick, T.A. 2003, "Is INFUSE bone graft superior to autograft bone? An integrated analysis of clinical trials using the LT-CAGE lumbar tapered fusion device", *Journal of spinal disorders & techniques*, vol. 16, no. 2, pp. 113-122.

Bustos-Valenzuela, J., Fujita, A., Halcsik, E., Granjeiro, J. & Sogayar, M. 2011, "Unveiling novel genes upregulated by both rhBMP2 and rhBMP7 during early osteoblastic transdifferentiation of C2C12 cells", *BMC Research Notes*, vol. 4, no. 1, pp. 370.

Cahill, K.S., Chi, J.H., Day, A. & Claus, E.B. 2009, "Prevalence, complications, and hospital charges associated with use of bone-morphogenetic proteins in spinal fusion procedures", *Jama*, vol. 302, no. 1, pp. 58-66.

Canalis, E. & Delany, A.M. 2002, "Mechanisms of glucocorticoid action in bone", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 966, no. 1, pp. 73-81.

Canalis, E., Pereira, R.C. & Delany, A.M. 2002, "Effects of glucocorticoids on the skeleton", *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM*, vol. 15 Suppl 5, pp. 1341-1345.

Cardamone, M., Puri, N.K. & Brandon, M.R. 1995, "Comparing the Refolding and Reoxidation of Recombinant Porcine Growth Hormone from a Urea Denatured State and from *Escherichia coli* Inclusion Bodies", vol. 34(17), pp. 5773-5794.

Celeste, A.J., Iannazzi, J.A., Taylor, R.C., Hewick, R.M., Rosen, V., Wang, E.A. & Wozney, J.M. 1990, "Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 87, no. 24, pp. 9843-9847.

Celeste, A.J. & Murray, B.L. 2000, "Bone morphogenetic protein (BMP)-17 and BMP-18 compositions", *Bone morphogenetic protein (BMP)-17 and BMP-18 compositions, U.S. Patent No 6, 027, 917*.

Cesarano, J., Segalman, R. & Calvert, P. 1998, "Robocasting provides moldless fabrication from slurry deposition", *Ceramic Industry*, vol. 148, no. 4.

Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B. & Middleton, J. 2007, "Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing", *Stem cells*, vol. 25, no. 11, pp. 2739-2749.

Chen, D., Zhao, M. & Mundy, G.R. 2004, "Bone morphogenetic proteins", *Growth factors*, vol. 22, no. 4, pp. 233-241.

Chen, J., Singh, K., Mukherjee, B.B. & Sodek, J. 1993, "Developmental expression of osteopontin (OPN) mRNA in rat tissues: evidence for a role for OPN in bone formation and resorption", *Matrix*, vol. 13, no. 2, pp. 113-123.

Chen, W., Jingushi, S., Hirata, G., Matsumoto, Y. & Iwamoto, Y. 2004a, "Intramuscular bone induction by the simultaneous administration of recombinant human bone morphogenetic protein 2 and bisphosphonate for autobone graft", *Tissue engineering*, vol. 10, no. 11-12, pp. 1652-1661.

Chen, H., Shi, S., Acosta, L., Li, W., Lu, J., Bao, S., Chen, Z., Yang, Z., Schneider, M.D., Chien, K.R., Conway, S.J., Yoder, M.C., Haneline, L.S., Franco, D. & Shou, W. 2004b, "BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis", *Development (Cambridge, England)*, vol. 131, no. 9, pp. 2219-2231.

Choi, J.H., Keum, K.C. & Lee, S.Y. 2006, "Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*", *Chemical Engineering Science*, vol. 61, no. 3, pp. 876-885.

Chu, T.G., Orton, D.G., Hollister, S.J., Feinberg, S.E. & Halloran, J.W. 2002, "Mechanical and in vivo performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures", *Biomaterials*, vol. 23, no. 5, pp. 1283-1293.

Coelho, M., Trigo Cabral, A. & Fernandes, M. 2000, "Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in  $\alpha$ -MEM and in DMEM", *Biomaterials*, vol. 21, no. 11, pp. 1087-1094.

Conget, P.A. & Minguell, J.J. 1999, "Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells", *Journal of cellular physiology*, vol. 181, no. 1, pp. 67-73.

Daculsi, G., Aguado, E., Goyenvalle, E., LeGeros, R.Z., LeGeros, J.P., Grimandi, G. & Soueidan, A. 2008, "Effect of sintering process of HA/TCP bioceramics on microstructure, dissolution, cell proliferation and bone ingrowth", *Key Engineering Materials*, vol. 361, pp. 1139-1142.

Daopin, S., Li, M. & Davies, D.R. 1993, "Crystal structure of TGF- $\beta$ 2 refined at 1.8 Å resolution", *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 17, no. 2, pp. 176-192.

David, L., Mallet, C., Keramidas, M., Lamande, N., Gasc, J.M., Dupuis-Girod, S., Plauchu, H., Feige, J.J. & Bailly, S. 2008, "Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor", *Circulation research*, vol. 102, no. 8, pp. 914-922.

de Abram, A.P. 2004, "Quitina y quitosano obtencion, caracterizacion y aplicaciones", *Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD). Resultados del proyecto CYTED IV, vol. 14 Universidad Católica Pontificia del Perú.*

De Bernardez Clark, E., Hevehan, D., Szela, S. & Maachupalli-Reddy, J. 1998, "Oxidative Renaturation of Hen Egg-White Lysozyme. Folding vs Aggregation", *Biotechnology progress*, vol. 14, no. 1, pp. 47-54.

De Bernardez Clark, E., Schwarz, E. & Rudolph, R. 1999 "Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding" in *Methods in Enzymology* Academic Press, vol. 309, pp. 217-236.

De, B.C. 2001, "Protein refolding for industrial processes", *Curr Opin Biotechnol*, vol. 12, no. 2, pp. 202-207.

De, B.C. 1998, "Refolding of recombinant proteins", *Curr Opin Biotechnol*, vol. 9, pp. 157-163.

Deal, C. 2009, "Potential new drug targets for osteoporosis", *Nature Clinical Practice Rheumatology*, vol. 5, no. 1, pp. 20-27.

Denhardt, D.T. & Guo, X. 1993, "Osteopontin: a protein with diverse functions.", *The FASEB Journal*, vol. 7, no. 15, pp. 1475-1482.

Derman, A.I., Prinz, W.A., Belin, D. & Beckwith, J. 1993, "Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*.", *Science (New York, NY)*, vol. 262, no. 5140, pp. 1744.

Deschaseaux, F., Sensébé, L. & Heymann, D. 2009, "Mechanisms of bone repair and regeneration", *Trends in molecular medicine*, vol. 15, no. 9, pp. 417-429.

Diefenderfer, D.L., Osyczka, A.M., Garino, J.P. & Leboy, P.S. 2003a, "Regulation of BMP-induced transcription in cultured human bone marrow stromal cells", *The Journal of Bone & Joint Surgery*, vol. 85, no. suppl\_3, pp. 19-28.

Diefenderfer, D.L., Osyczka, A.M., Reilly, G.C. & Leboy, P.S. 2003b, "BMP responsiveness in human mesenchymal stem cells", *Connective tissue research*, vol. 44, no. 1, pp. 305-311.

DiGirolamo, C.M., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D.G., Class, R. & Prockop, D.J. 1999, "Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate", *British journal of haematology*, vol. 107, no. 2, pp. 275-281.

Dragoo, J.L., Choi, J.Y., Lieberman, J.R., Huang, J., Zuk, P.A., Zhang, J., Hedrick, M.H. & Benhaim, P. 2003, "Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat", *Journal of orthopaedic research*, vol. 21, no. 4, pp. 622-629.

Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L. & Karsenty, G. 1997, "Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation", *Cell*, vol. 89, no. 5, pp. 747-754.

Ehara, A., Ogata, K., Imazato, S., Ebisu, S., Nakano, T. & Umakoshi, Y. 2003, "Effects of alpha-TCP and TetCP on MC3T3-E1 proliferation, differentiation and mineralization", *Biomaterials*, vol. 24, no. 5, pp. 831-836.

Einhorn, T.A. 1995, "Enhancement of fracture-healing", *The Journal of bone and joint surgery.American volume*, vol. 77, no. 6, pp. 940-956.

Estape, D. & Rinas, U. 1996, "Optimized procedures for purification and solubilization of basic fibroblast growth factor inclusion bodies", *Biotechnol Tech*, vol. 10, pp. 481-484.

FALKE, D.G.F. & Atala, A. 2000, "RECONSTRUCCION DE TEJIDOS Y ORGANOS UTILIZANDO INGENIERIA TISULAR 2000; 98 (2) 103", *Reconstrucción*, vol. 98, no. 2, pp. 103.

Feiner, N., Begemann, G., Renz, A.J., Meyer, A. & Kuraku, S. 2009, "The origin of bmp16, a novel Bmp2/4 relative, retained in teleost fish genomes", *BMC evolutionary biology*, vol. 9, pp. 277-2148-9-277.

Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, I., Gracia, A., del Canto Pingarrón, M. & Blanco Jerez, L. 2006, "Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo".

Fiedler, J., Röderer, G., Günther, K. & Brenner, R.E. 2002, "BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells", *Journal of cellular biochemistry*, vol. 87, no. 3, pp. 305-312.

Fink, A.L. 1998, "Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid", *Folding and Design*, vol. 3, no. 1, pp. R9-R23.

Firth, A.L. & Yuan, J.X. 2012, "Identification of functional progenitor cells in the pulmonary vasculature", *Pulmonary circulation*, vol. 2, no. 1, pp. 84-100.

Franceschi, R.T., Iyer, B.S. & Cui, Y. 1994, "Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells", *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 9, no. 6, pp. 843-854.

Friess, W. 2000 "Drug Delivery Systems Based on Collagen", *Arzneistoffträger Auf Basis Von Kollagen. Shaker* .

GAO, Y., SUO, G., HAN, J., HE, Z., YAO, W. & DAI, J. 2006, "Expression of human BMP-2 gene in different tissues of tobacco plants", *Acta Genetica Sinica*, vol. 33, no. 1, pp. 56-62.

Geiger, M.H.P. 2001, Porous Collagen/Ceramic Composite Carriers for Bone Regeneration Using Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2), *Tesis Doctoral. Naturwissenschaftliche Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg*.

Geng, X. & Quan, B. 2002, "Mechanism of simultaneously refolding and purification of proteins by hydrophobic interaction chromatographic unit and applications", *Sci China B*, vol. 45, pp. 655-669.

Gerber, H. & Ferrara, N. 2000, "Angiogenesis and bone growth", *Trends in cardiovascular medicine*, vol. 10, no. 5, pp. 223-228.

Gergioui, G. & Valax, P. 1999, "Isolating inclusion bodies from bacteria", *Methods Enzymol*, vol. 309, pp. 48-58.

Gilbert, H.F. 1997, "Protein disulfide isomerase and assisted protein folding", *J Biol Chem*, vol. 272, pp. 29399-29402.

Gill, S.C. & von Hippel, P.H. 1989, "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data", *Analytical Biochemistry*, vol. 182, no. 2, pp. 319-326.

Goessler, U.R., Hormann, K. & Riedel, F. 2005, "Tissue engineering with adult stem cells in reconstructive surgery", *Int J Mol Med*, vol. 15, no. 6, pp. 899-905.

Gomes, M.E., Malafaya, P.B. & Reis, R.L. 2004, "Methodologies for processing biodegradable and natural origin scaffolds for bone and cartilage tissue-engineering applications" *In Biopolymer Methods in Tissue Engineering* Springer, , pp. 65-75.

González Muñoz, D.M. 2004, Plegamiento "*in vitro*" de la rhBMP-2. Caracterización inicial del dímero activo mediante fluorescencia., *Tesis Doctoral, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID*.

Goosen, M.F., Daugulis, A.J. & Faulkner, P. 1993, Insect cell culture engineering. *Marcel Dekker, Inc.*

Götz, R., Köster, R., Winkler, C., Raulf, F., Lottspeich, F., Scharl, M. & Thoenen, H. 1994, "Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family", vol. 372, pp. 266-269.

Govender, S., Csimma, C., Genant, H.K., Valentin-Opran, A., Amit, Y., Arbel, R., Aro, H., Atar, D., Bishay, M. & Börner, M.G. 2002, "Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients", *The Journal of Bone & Joint Surgery*, vol. 84, no. 12, pp. 2123-2134.

Greenwald, J., Groppe, J., Gray, P., Wiater, E., Kwiatkowski, W., Vale, W. & Choe, S. 2003, "The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly", *Molecular cell*, vol. 11, no. 3, pp. 605-617.

Gribskov, M. & Burgess, R.R. 1983, "Overexpression and purification of the sigma subunit of Escherichia coli RNA polymerase", *Gene*, vol. 26, no. 2-3, pp. 109-118.

Groeneveld, E.H. & Burger, E.H. 2000, "Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration", *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, vol. 142, no. 1, pp. 9-21.

Groppe, J., Rumpel, K., Economides, A.N., Stahl, N., Sebald, W. & Affolter, M. 1998, "Biochemical and Biophysical Characterization of Refolded Drosophila DPP, a Homolog of Bone Morphogenetic Proteins 2 and 4", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 44, pp. 29052-29065.

Gueorguieva, L., Vallejo, L.F., Rinas, U. & Seidel-Morgenstern, A. 2006, "Discontinuous and continuous separation of the monomeric and dimeric forms of human bone morphogenetic protein-2 from renaturation batches", *Journal of Chromatography A*, vol. 1135, no. 2, pp. 142-150.

Guzmán, R., Nardecchia, S., Gutiérrez, M.C., Ferrer, M.L., Ramos, V., del Monte, F., Abarrategi, A. & López-Lacomba, J.L. 2014, "Chitosan Scaffolds Containing Calcium Phosphate Salts and rhBMP-2: In Vitro and In Vivo Testing for Bone Tissue Regeneration", *PloS one*, vol. 9, no. 2, pp. e87149.

Habal, M. 1992, "Different forms of bone grafts", *Bone Grafts and Bone Substitutes*. Philadelphia: WB Saunders, pp. 6-8.

Habibovic, P., Gbureck, U., Doillon, C.J., Bassett, D.C., van Blitterswijk, C.A. & Barralet, J.E. 2008, "Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants", *Biomaterials*, vol. 29, no. 7, pp. 944-953.

Hahn, G.V., Cohen, R.B., Wozney, J.M., Levitz, C.L., Shore, E.M., Zasloff, M.A. & Kaplan, F.S. 1992, "A bone morphogenetic protein subfamily: chromosomal localization of human genes for BMP5, BMP6, and BMP7", *Genomics*, vol. 14, no. 3, pp. 759-762.

Hall, J., Sorensen, R.G., Wozney, J.M. & Wikesjö, U.M. 2007, "Bone formation at rhBMP-2-coated titanium implants in the rat ectopic model", *Journal of clinical periodontology*, vol. 34, no. 5, pp. 444-451.

Hallahan, A.R., Pritchard, J.I., Chandraratna, R.A., Ellenbogen, R.G., Geyer, J.R., Overland, R.P., Strand, A.D., Tapscott, S.J. & Olson, J.M. 2003, "BMP-2 mediates retinoid-induced apoptosis in medulloblastoma cells through a paracrine effect", *Nature medicine*, vol. 9, no. 8, pp. 1033-1038.

Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R. & Bullock, P. 2004, "Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening", *Toxicology in vitro*, vol. 18, no. 5, pp. 703-710.

Harada, S. & Rodan, G.A. 2003, "Control of osteoblast function and regulation of bone mass", *Nature*, vol. 423, no. 6937, pp. 349-355.

Harmon, E.B., Apelqvist, A.A., Smart, N.G., Gu, X., Osborne, D.H. & Kim, S.K. 2004, "GDF11 modulates NGN3+ islet progenitor cell number and promotes beta-cell differentiation in pancreas development", *Development (Cambridge, England)*, vol. 131, no. 24, pp. 6163-6174.

Hawkins, H.C. & Freedman, R.B. 1995, "The effect of denaturants on PDI conformation and activity", *Biochem Soc Trans*, vol. 23, pp. 65S.

Hazama, M., Aono, A., Ueno, N. & Fujisawa, Y. 1995, "Efficient expression of a heterodimer of bone morphogenetic protein subunits using a baculovirus expression system", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 209, no. 3, pp. 859-866.

Hillger, F., Herr, G., Rudolph, R. & Schwarz, E. 2005, "Biophysical Comparison of BMP-2, ProBMP-2, and the Free Pro-peptide Reveals Stabilization of the Pro-peptide by the Mature Growth Factor", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 15, pp. 14974-14980.

Hillier, L.W., Graves, T.A., Fulton, R.S., Fulton, L.A., Pepin, K.H., Minx, P., Wagner-McPherson, C., Layman, D., Wylie, K. & Sekhon, M. 2005, "Generation and annotation of the DNA sequences of human chromosomes 2 and 4", *Nature*, vol. 434, no. 7034, pp. 724-731.

Hino, J., Kangawa, K., Matsuo, H., Nohno, T. & Nishimatsu, S. 2004, "Bone morphogenetic protein-3 family members and their biological functions", *Front Biosci*, vol. 9, no. 1, pp. 1520-1529.

Hoemann, C., El-Gabalawy, H. & McKee, M. 2009, "In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization", *Pathologie Biologie*, vol. 57, no. 4, pp. 318-323.

Hoffmann, A., Weich, H., Gross, G. & Hillmann, G. 2001, "Perspectives in the biological function, the technical and therapeutic application of bone morphogenetic proteins", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 57, no. 3, pp. 294-308.

Hogan, B.L. 1996, "Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development", *Genes & development*, vol. 10, no. 13, pp. 1580-1594.

Horiuchi, K., Amizuka, N., Takeshita, S., Takamatsu, H., Katsuura, M., Ozawa, H., Toyama, Y., Bonewald, L.F. & Kudo, A. 1999, "Identification and Characterization of a Novel Protein, Periostin, with Restricted Expression to Periosteum and Periodontal Ligament and Increased Expression by Transforming Growth Factor ?", *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 14, no. 7, pp. 1239-1249.

Hoshino, M., Namikawa, T., Kato, M., Terai, H., Taguchi, S. & Takaoka, K. 2007, "Repair of bone defects in revision hip arthroplasty by implantation of a new bone-inducing material comprised of recombinant human BMP-2, Beta-TCP powder, and a biodegradable polymer: An experimental study in dogs", *Journal of orthopaedic research*, vol. 25, no. 8, pp. 1042-1051.

Hoshino, M., Egi, T., Terai, H., Namikawa, T. & Takaoka, K. 2006, "Repair of long intercalated rib defects using porous beta-tricalcium phosphate cylinders containing recombinant human bone morphogenetic protein-2 in dogs", *Biomaterials*, vol. 27, no. 28, pp. 4934-4940.

Hu, Y. 2005, "Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells", *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 26, no. 4, pp. 405-416.

HU, Z., PEEL, S.A.F., HO, S.K.C., SANDOR, G.K.B. & CLOKIE, C.M.L. 2009, "Induction of Bone Matrix Protein Expression by Native Bone Matrix Proteins in C2C12 Culture", *Biomedical and Environmental Sciences*, vol. 22, no. 2, pp. 164-169.

Israel, D.I., Nove, J., Kerns, K.M., Kaufman, R.J., Rosen, V., Cox, K.A. & Wozney, J.M. 1996, "Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo", *Growth Factors*, vol. 13, no. 3-4, pp. 291-300.

Israel, D.I., Nove, J., Kerns, K.M., Moutsatsos, I.K. & Kaufman, R.J. 1992, "Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells", *Growth Factors*, vol. 7, no. 2, pp. 139-150.

Iwakura, M., Obara, K., Kokubu, T., Ohashi, S. & Izutsu, H. 1992, "Expression and purification of growth hormone-releasing factor with the aid of dihydrofolate reductase handle", *J Biochem (Tokyo)*, vol. 112, pp. 57-62.

Jäger, M., Fischer, J., Dohrn, W., Li, X., Ayers, D.C., Czibere, A., Prall, W.C., Lensing-Höhn, S. & Krauspe, R. 2008, "Dexamethasone modulates BMP-2 effects on mesenchymal stem cells in vitro", *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 26, no. 11, pp. 1440-1448.

Jaiswal, R.K., Jaiswal, N., Bruder, S.P., Mbalaviele, G., Marshak, D.R. & Pittenger, M.F. 2000, "Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase", *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 13, pp. 9645-9652.

Ji, X., Chen, D., Xu, C., Harris, S.E., Mundy, G.R. & Yoneda, T. 2000, "Patterns of gene expression associated with BMP-2-induced osteoblast and adipocyte differentiation of mesenchymal progenitor cell 3T3-F442A", *Journal of bone and mineral metabolism*, vol. 18, no. 3, pp. 132-139.

Jingushi, S., Urabe, K., Okazaki, K., Hirata, G., Sakai, A., Ikenoue, T. & Iwamoto, Y. 2002, "Intramuscular bone induction by human recombinant bone morphogenetic protein-2 with beta-tricalcium phosphate as a carrier: in vivo bone banking for muscle-pedicle autograft", *Journal of orthopaedic science*, vol. 7, no. 4, pp. 490-494.

Johnson, E.E., Urist, M.R. & AM Finerman, G. 1992, "Resistant nonunions and partial or complete segmental defects of long bones: treatment with implants of a composite of human bone morphogenetic protein (BMP) and autolyzed, antigen-extracted, allogeneic (AAA) bone", *Clinical orthopaedics and related research*, vol. 277, pp. 229-237.

Jørgensen, N., Henriksen, Z., Sørensen, O. & Civitelli, R. 2004, "Dexamethasone, BMP-2, and 1, 25-dihydroxyvitamin D enhance a more differentiated osteoblast phenotype: validation of an in vitro model for human bone marrow-derived primary osteoblasts", *Steroids*, vol. 69, no. 4, pp. 219-226.

Juhásová, J., Juhás, S., Klíma, J., Strnádel, J., Holubová, M. & Motlík, J. 2011, "Osteogenic differentiation of miniature pig mesenchymal stem cells in 2D and 3D environment", *Physiol Res*, vol. 60, no. 559, pp. 71.

Kalamajski, S. & Oldberg, Å. 2007, "Fibromodulin Binds Collagen Type I via Glu-353 and Lys-355 in Leucine-rich Repeat 11", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 37, pp. 26740-26745.

Kang, Q., Sun, M.H., Cheng, H., Peng, Y., Montag, A., Deyrup, A., Jiang, W., Luu, H., Luo, J. & Szatkowski, J. 2004, "Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery", *Gene therapy*, vol. 11, no. 17, pp. 1312-1320.

Kang, S., Kim, J., Park, K., Cha, B., Shim, J., Kim, J.Y., Cho, D., Rhie, J. & Lee, S. 2011, "Surface modification with fibrin/hyaluronic acid hydrogel on solid-free form-based scaffolds followed by BMP-2 loading to enhance bone regeneration", *Bone*, vol. 48, no. 2, pp. 298-306.

Kang, S., La, W., Kang, J.M., Park, J. & Kim, B. 2008, "Bone morphogenetic protein-2 enhances bone regeneration mediated by transplantation of osteogenically undifferentiated bone marrow-derived mesenchymal stem cells", *Biotechnology Letters*, vol. 30, no. 7, pp. 1163-1168.

Kapinas, K., Lowther, K.M., Kessler, C.B., Tilbury, K., Lieberman, J.R., Tirnauer, J.S., Campagnola, P. & Delany, A.M. 2012, "Bone matrix osteonectin limits prostate cancer cell growth and survival", *Matrix Biology*, vol. 31, no. 5, pp. 299-307.

Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J.M., Fujisawa-Sehara, A. & Suda, T. 1994, "Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage.", *The Journal of cell biology*, vol. 127, no. 6, pp. 1755-1766.

Kessler, E., Takahara, K., Biniaminov, L., Brusel, M. & Greenspan, D.S. 1996, "Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 271, no. 5247, pp. 360-362.

Kim, I.S., Song, Y.M., Cho, T.H., Park, Y.D., Lee, K.B., Noh, I., Weber, F. & Hwang, S.J. 2008, "In vitro response of primary human bone marrow stromal cells to recombinant human bone

morphogenic protein-2 in the early and late stages of osteoblast differentiation", *Development, growth & differentiation*, vol. 50, no. 7, pp. 553-564.

Kim, J.Y., Jin, G., Park, I.S., Kim, J., Chun, S.Y., Park, E.K., Kim, S., Yoo, J., Kim, S. & Rhie, J. 2010, "Evaluation of solid free-form fabrication-based scaffolds seeded with osteoblasts and human umbilical vein endothelial cells for use in vivo osteogenesis", *Tissue Engineering Part A*, vol. 16, no. 7, pp. 2229-2236.

Kim, C.S. & Lee, E.K. 2000, "Effects of operating parameters in in vitro renaturation of a fusion protein of human growth hormone and glutathione S transferase from inclusion body", *Process Biochemistry*, vol. 36, no. 1-2, pp. 111-117.

King, J. 1997, "Refolding with a piece of the ring", vol. 15, pp. 514-515.

King, J.A., Marker, P.C., Seung, K.J. & Kingsley, D.M. 1994, "BMP5 and the Molecular, Skeletal, and Soft-Tissue Alterations in *short ear* Mice", *Developmental biology*, vol. 166, no. 1, pp. 112-122.

Kirker-Head, C.A. 2000, "Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins", *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 43, no. 1, pp. 65-92.

Knight, P.G. & Glister, C. 2006, "TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development", *Reproduction (Cambridge, England)*, vol. 132, no. 2, pp. 191-206.

Koch, H., Jadowiec, J.A. & Campbell, P.G. 2005, "Insulin-like growth factor-I induces early osteoblast gene expression in human mesenchymal stem cells", *Stem cells and development*, vol. 14, no. 6, pp. 621-631.

Koenig, B.B., Cook, J.S., Wolsing, D.H., Ting, J., Tiesman, J.P., Correa, P.E., Olson, C.A., Pecquet, A.L., Ventura, F., Grant, R.A., Chen, G., Wrana, J.L., Massagué, J. & Rosenbaum, J.S. 1994, "Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells.", *Molecular and cellular biology*, vol. 14, no. 9, pp. 5961-5974.

Korz, D., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, E. & Deckwer, W. 1995, "Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*", *Journal of Biotechnology*, vol. 39, no. 1, pp. 59-65.

Kos, K., Wong, S., Tan, B., Gummesson, A., Jernas, M., Franck, N., Kerrigan, D., Nystrom, F.H., Carlsson, L.M., Randeva, H.S., Pinkney, J.H. & Wilding, J.P. 2009, "Regulation of the fibrosis

and angiogenesis promoter SPARC/osteonectin in human adipose tissue by weight change, leptin, insulin, and glucose", *Diabetes*, vol. 58, no. 8, pp. 1780-1788.

Kost, T.A., Condreay, J.P. & Jarvis, D.L. 2005, "Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells", *Nature biotechnology*, vol. 23, no. 5, pp. 567-575.

Kuboki, Y., Jin, Q. & Takita, H. 2001, "Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis", *The Journal of Bone & Joint Surgery*, vol. 83, no. 90012, pp. S105-S115.

Kurata, H., Guillot, P.V., Chan, J. & Fisk, N.M. 2007, "Osterix induces osteogenic gene expression but not differentiation in primary human fetal mesenchymal stem cells", *Tissue engineering*, vol. 13, no. 7, pp. 1513-1523.

Lan Levensgood, S.K., Polak, S.J., Poellmann, M.J., Hoelzle, D.J., Maki, A.J., Clark, S.G., Wheeler, M.B. & Wagoner Johnson, A.J. 2010, "The effect of BMP-2 on micro-and macroscale osteointegration of biphasic calcium phosphate scaffolds with multiscale porosity", *Acta Biomaterialia*, vol. 6, no. 8, pp. 3283-3291.

Lancaster, M.V. & Fields, R.D. 1996, Antibiotic and cytotoxic drug susceptibility assays using resazurin and poisoning agents, *U.S. Patent No 5,501,959*.

Lanza, R.P., Langer, R.S. & Vacanti, J. 2000, Principles of tissue engineering, *Academic Press*.

Lee, K., Kim, H., Li, Q., Chi, X., Ueta, C., Komori, T., Wozney, J.M., Kim, E., Choi, J., Ryoo, H. & Bae, S. 2000, "Runx2 Is a Common Target of Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 and Bone Morphogenetic Protein 2, and Cooperation between Runx2 and Smad5 Induces Osteoblast-Specific Gene Expression in the Pluripotent Mesenchymal Precursor Cell Line C2C12", *Molecular and cellular biology*, vol. 20, no. 23, pp. 8783-8792.

Lee, M., Kim, Y., Kim, H., Park, H., Kang, A., Kyung, H., Sung, J., Wozney, J.M., Kim, H. & Ryoo, H. 2003a, "BMP-2-induced Runx2 Expression Is Mediated by Dlx5, and TGF- $\beta$ 1 Opposes the BMP-2-induced Osteoblast Differentiation by Suppression of Dlx5 Expression", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 36, pp. 34387-34394.

Lee, M., Kwon, T., Park, H., Wozney, J.M. & Ryoo, H. 2003b, "BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 309, no. 3, pp. 689-694.

LeGeros, R.Z. & LeGeros, J.P. 1993, "Dense hydroxyapatite", *Adv.Ser.Ceram.*, vol. 1, pp. 139-180.

LeGeros, R.Z., Daculsi, G. & LeGeros, J.P. 2008, "Bioactive bioceramics" in *Musculoskeletal Tissue Regeneration* Springer, pp. 153-181.

LeGeros, R.Z. 2002, "Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates", *Clinical orthopaedics and related research*, vol. (395), no. 395, pp. 81-98.

Li, Z., Hassan, M.Q., Volinia, S., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Croce, C.M., Lian, J.B. & Stein, G.S. 2008, "A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, no. 37, pp. 13906-13911.

Liang, G., Yang, Y., Oh, S., L Ong, J., Zheng, C., Ran, J., Yin, G. & Zhou, D. 2005, "Ectopic osteoinduction and early degradation of recombinant human bone morphogenetic protein-2-loaded porous  $\beta$ -tricalcium phosphate in mice", *Biomaterials*, vol. 26, no. 20, pp. 4265-4271.

Lilie, H., Schwarz, E. & Rudolph, R. 1998, "Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*", *Current opinion in biotechnology*, vol. 9, no. 5, pp. 497-501.

Lissenberg-Thunnissen, S.N., de Gorter, D.J., Sier, C.F. & Schipper, I.B. 2011, "Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing", *International orthopaedics*, vol. 35, no. 9, pp. 1271-1280.

Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. 2001, "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method", *methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402-408.

Lo, K.W., Ulery, B.D., Ashe, K.M. & Laurencin, C.T. 2012, "Studies of bone morphogenetic protein-based surgical repair", *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, no. 12, pp. 1277-1291.

Lo, T., Tsai, C., Shih, Y.V., Wang, Y., Lu, S., Sung, T., Hsu, W., Chen, Y. & Lee, O.K. 2011, "Phosphoproteomic analysis of human mesenchymal stromal cells during osteogenic differentiation", *Journal of proteome research*, vol. 11, no. 2, pp. 586-598.

Long, S., Truong, L., Bennett, K., Phillips, A., Wong-Staal, F. & Ma, H. 2006, "Expression, purification, and renaturation of bone morphogenetic protein-2 from *Escherichia coli*", *Protein expression and purification*, vol. 46, no. 2, pp. 374-378.

Lopez-Lacomba, J.L., Garcia-Cantalejo, J.M., Sanz Casado, J.V., Abarategi, A., Correas Magana, V. & Ramos, V. 2006, "Use of rhBMP-2 activated chitosan films to improve osseointegration", *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 3, pp. 792-798.

López-Morales, Y., Abarategi, A., Ramos, V., Moreno-Vicente, C., López-Durán, L., López-Lacomba, J. & Marco, F. 2010, "In vivo comparison of the effects of rhBMP-2 and rhBMP-4 in osteochondral tissue regeneration", vol. 20, pp. 367.

Luo, G., Hofmann, C., Bronckers, A.L., Sohocki, M., Bradley, A. & Karsenty, G. 1995, "BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning", *Genes & development*, vol. 9, no. 22, pp. 2808-2820.

Luo, Q., Kang, Q., Si, W., Jiang, W., Park, J.K., Peng, Y., Li, X., Luu, H.H., Luo, J., Montag, A.G., Haydon, R.C. & He, T. 2004, "Connective Tissue Growth Factor (CTGF) Is Regulated by Wnt and Bone Morphogenetic Proteins Signaling in Osteoblast Differentiation of Mesenchymal Stem Cells", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 53, pp. 55958-55968.

Luu, H.H., Song, W., Luo, X., Manning, D., Luo, J., Deng, Z., Sharff, K.A., Montag, A.G., Haydon, R.C. & He, T. 2007, "Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells", *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 25, no. 5, pp. 665-677.

Luyten, F., Chen, P. & Paralkar, V. 1994, "Recombinant bone morphogenetic protein-4, transforming growth factor-beta 1, and activin A enhance the cartilage phenotype of articular chondrocytes in vitro", *Exp Cell Res*, vol. 210, pp. 224-229.

Mabie, P.C., Mehler, M.F. & Kessler, J.A. 1999, "Multiple roles of bone morphogenetic protein signaling in the regulation of cortical cell number and phenotype", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 19, no. 16, pp. 7077-7088.

Malafaya, P.B., Gomes, M.E., Salgado, A.J. & Reis, R.L. 2003, "Polymer based scaffolds and carriers for bioactive agents from different natural origin materials" in *Tissue Engineering, Stem Cells, and Gene Therapies* Springer, pp. 201-233.

Malanchi, I., Santamaria-Martínez, A., Susanto, E., Peng, H., Lehr, H., Delaloye, J. & Huelsken, J. 2012, "Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization", *Nature*, vol. 481, no 7379, pp. 85-89.

Marieb, E.N. & Hoehn, K. 2007, *Human anatomy & physiology*, Pearson Education.

Marks, S. & Hermey, D. 1996, "The structure and development of bone", *Principles of bone biology*, vol. 1, pp. 3-14.

Martin, R.B., Burr, D.B. & Sharkey, N.A. 1998, *Skeletal tissue mechanics*, Springer.

Maruoka, Y., Oida, S., Iimura, T., Takeda, K., Asahina, I., Enomoto, S. & Sasaki, S. 1995, "Production of functional human bone morphogenetic protein-2 using a baculovirus/Sf-9 insect cell system", *Biochemistry and molecular biology international*, vol. 35, no. 5, pp. 957-963.

Massague, J., Seoane, J. & Wotton, D. 2005, "Smad transcription factors", *Genes & development*, vol. 19, no. 23, pp. 2783-2810.

Matsubara, T., Tsutsumi, S., Pan, H., Hiraoka, H., Oda, R., Nishimura, M., Kawaguchi, H., Nakamura, K. & Kato, Y. 2004, "A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 313, no. 3, pp. 503-508.

Matsubara, T., Kida, K., Yamaguchi, A., Hata, K., Ichida, F., Meguro, H., Aburatani, H., Nishimura, R. & Yoneda, T. 2008, "BMP2 Regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during Osteoblast Differentiation", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 43, pp. 29119-29125.

Mauney, J.R., Volloch, V. & Kaplan, D.L. 2005, "Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects", *Tissue engineering*, vol. 11, no. 5-6, pp. 787-802.

Milona, M., Gough, J. & Edgar, A. 2003, "Expression of alternatively spliced isoforms of human Sp7 in osteoblast-like cells", *BMC Genomics*, vol. 4, no. 1, pp. 43.

Miranda, P., Pajares, A. & Guiberteau, F. 2008, "Finite element modeling as a tool for predicting the fracture behavior of robocast scaffolds", *Acta Biomaterialia*, vol. 4, no. 6, pp. 1715-1724.

Miranda, P., Pajares, A., Saiz, E., Tomsia, A.P. & Guiberteau, F. 2008, "Mechanical properties of calcium phosphate scaffolds fabricated by robocasting", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 85, no. 1, pp. 218-227.

Miranda, P., Pajares, A., Saiz, E., Tomsia, A.P. & Guiberteau, F. 2007, "Fracture modes under uniaxial compression in hydroxyapatite scaffolds fabricated by robocasting", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 83, no. 3, pp. 646-655.

Miranda, P., Saiz, E., Gryn, K. & Tomsia, A.P. 2006, "Sintering and robocasting of  $\beta$ -tricalcium phosphate scaffolds for orthopaedic applications", *Acta Biomaterialia*, vol. 2, no. 4, pp. 457-466.

Moran, J.L., Li, Y., Hill, A.A., Mounts, W.M. & Miller, C.P. 2002, "Gene expression changes during mouse skeletal myoblast differentiation revealed by transcriptional profiling", *Physiological Genomics*, vol. 10, no. 2, pp. 103-111.

Mosmann, T. 1983, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *Journal of immunological methods*, vol. 65, no. 1, pp. 55-63.

Mouriño, V. & Boccaccini, A.R. 2010, "Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds", *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 7, no. 43, pp. 209-227.

Müller, P., Bulnheim, U., Diener, A., Lüthen, F., Teller, M., Klinkenberg, E., Neumann, H., Nebe, B., Liebold, A. & Steinhoff, G. 2008, "Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells", *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 12, no. 1, pp. 281-291.

Muller, C. & Rinas, U. 1999, "Renaturation of heterodimeric platelet-derived growth factor from inclusion bodies of recombinant *Escherichia coli* using size-exclusion chromatography", *J Chromatogr A*, vol. 855, pp. 203-213.

Mundy, G.R. 1993, "Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling", *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 8, no. S2, pp. S505-S510.

Murakami, N., Saito, N., Takahashi, J., Ota, H., Horiuchi, H., Nawata, M., Okada, T., Nozaki, K. & Takaoka, K. 2003, "Repair of a proximal femoral bone defect in dogs using a porous

surfaced prosthesis in combination with recombinant BMP-2 and a synthetic polymer carrier", *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2153-2159.

Nakamura, Y., Wakitani, S., Nakayama, J., Wakabayashi, S., Horiuchi, H. & Takaoka, K. 2003, "Temporal and Spatial Expression Profiles of BMP Receptors and Noggin During BMP-2-Induced Ectopic Bone Formation", *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 18, no. 10, pp. 1854-1862.

Nakase, T. & Yoshikawa, H. 2006, "Potential roles of bone morphogenetic proteins (BMPs) in skeletal repair and regeneration", *Journal of bone and mineral metabolism*, vol. 24, no. 6, pp. 425-433.

Nakashima, M., Tachibana, K., Iohara, K., Ito, M., Ishikawa, M. & Akamine, A. 2003, "Induction of reparative dentin formation by ultrasound-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11", *Human Gene Therapy*, vol. 14, no. 6, pp. 591-597.

Namikawa, T., Terai, H., Suzuki, E., Hoshino, M., Toyoda, H., Nakamura, H., Miyamoto, S., Takahashi, N., Ninomiya, T. & Takaoka, K. 2005, "Experimental spinal fusion with recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered by a synthetic polymer and  $\beta$ -tricalcium phosphate in a rabbit model", *Spine*, vol. 30, no. 15, pp. 1717-1722.

Niedhart, C., Maus, U., Redmann, E., Schmidt-Rohlfing, B., Niethard, F.U. & Siebert, C.H. 2003, "Stimulation of bone formation with an in situ setting tricalcium phosphate/rhBMP-2 composite in rats", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 65, no. 1, pp. 17-23.

Nohe, A., Keating, E., Knaus, P. & Petersen, N.O. 2004, "Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors", *Cellular signalling*, vol. 16, no. 3, pp. 291-299.

Oberg, K., Chrnyk, B.A., Wetzel, R. & Fink, A.L. 1994, "Native-like Secondary Structure in Interleukin-1 $\beta$ . Inclusion Bodies by Attenuated Total Reflectance FTIR", vol. 33, pp. 2628-2634.

Ohyama, T., Kubo, Y., Iwata, H. & Taki, W. 2004, "Beta-tricalcium phosphate combined with recombinant human bone morphogenetic protein-2: a substitute for autograft, used for packing interbody fusion cages in the canine lumbar spine", *Neurologia medico-chirurgica*, vol. 44, no. 5, pp. 234-40; discussion 241.

Onishi, T., Ishidou, Y., Nagamine, T., Yone, K., Imamura, T., Kato, M., Sampath, T., Ten Dijke, P. & Sakou, T. 1998, "Distinct and overlapping patterns of localization of bone

morphogenetic protein (BMP) family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats", *Bone*, vol. 22, no. 6, pp. 605-612.

Ortuño, M.J., Ruiz-Gaspà, S., Rodríguez-Carballo, E., Susperregui, A.R.G., Bartrons, R., Rosa, J.L. & Ventura, F. 2010, "p38 Regulates Expression of Osteoblast-specific Genes by Phosphorylation of Osterix", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 42, pp. 31985-31994.

Owen, T.A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L.M., Wilming, L., Tassinari, M.S., Kennedy, M.B., Pockwinse, S., Lian, J.B. & Stein, G.S. 1990, "Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix", *Journal of cellular physiology*, vol. 143, no. 3, pp. 420-430.

Oxburgh, L., Dudley, A.T., Godin, R.E., Koonce, C.H., Islam, A., Anderson, D.C., Bikoff, E.K. & Robertson, E.J. 2005, "BMP4 substitutes for loss of BMP7 during kidney development", *Developmental biology*, vol. 286, no. 2, pp. 637-646.

Ozkaynak, E., Schnegelsberg, P.N., Jin, D.F., Clifford, G.M., Warren, F.D., Drier, E.A. & Oppermann, H. 1992, "Osteogenic protein-2. A new member of the transforming growth factor-beta superfamily expressed early in embryogenesis", *The Journal of biological chemistry*, vol. 267, no. 35, pp. 25220-25227.

Park, J., Kim, J., Kim, B., Cho, K., Im, G., Kim, B. & Kim, C. 2012, "Dose-and time-dependent effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the osteogenic and adipogenic potentials of alveolar bone-derived stromal cells", *Journal of periodontal research*, vol. 47, no. 5, pp. 645-654.

Park, J. 2012, "The effects of dexamethasone, ascorbic acid, and  $\beta$ -glycerophosphate on osteoblastic differentiation by regulating estrogen receptor and osteopontin expression", *Journal of Surgical Research*, vol. 173, no. 1, pp. 99-104.

Parra-Torres, A.Y., Valdés-Flores, M., Orozco, L. & Velázquez-Cruz, R. 2013, "Molecular Aspects of Bone Remodeling".

Patra, A.K., Mukhopadhyay, R., Mukhija, R., Krishnan, A., Garg, L.C. & Panda, A.K. 2000, "Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*", *Protein Expr Purif*, vol. 18, pp. 182-192.

Peng, Y., Kang, Q., Luo, Q., Jiang, W., Si, W., Liu, B.A., Luu, H.H., Park, J.K., Li, X., Luo, J., Montag, A.G., Haydon, R.C. & He, T.C. 2004, "Inhibitor of DNA binding/differentiation helix-loop-helix proteins mediate bone morphogenetic protein-induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells", *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, no. 31, pp. 32941-32949.

Perera, F.H., Martínez-Vázquez, F.J., Miranda, P., Ortiz, A.L. & Pajares, A. 2010, "Clarifying the effect of sintering conditions on the microstructure and mechanical properties of  $\beta$ -tricalcium phosphate", *Ceramics International*, vol. 36, no. 6, pp. 1929-1935.

Pratt, A.B., Weber, F.E., Schmoekel, H.G., Müller, R. & Hubbell, J.A. 2004, "Synthetic extracellular matrices for in situ tissue engineering", *Biotechnology and bioengineering*, vol. 86, no. 1, pp. 27-36.

Proba, K., Ge, L. & Plückthun, A. 1995, "Functional antibody single-chain fragments from the cytoplasm of *Escherichia coli*: influence of thioredoxin reductase (TrxB)", *Gene*, vol. 159, no. 2, pp. 203-207.

Ramos, V., Rodríguez, N., Henning, I., Díaz, M., Monachesi, M., Rodríguez, M., Abarrategi, A., Correas-Magaña, V., López-Lacomba, J. & Agulló, E. 2006, "Poly (ethylene glycol)-crosslinked N-methylene phosphonic chitosan. Preparation and characterization", *Carbohydrate Polymers*, vol. 64, no. 2, pp. 328-336.

Rawadi, G., Vayssière, B., Dunn, F., Baron, R. & Roman-Roman, S. 2003, "BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop", *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 18, no. 10, pp. 1842-1853.

Reddi, A.H. 1998, "Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration", *Nature biotechnology*, vol. 16, no. 3, pp. 247-252.

Reddi, A.H. 1981, "Cell biology and biochemistry of endochondral bone development", *Collagen and related research*, vol. 1, no. 2, pp. 209-226.

Reddi, A. 1998, "Cartilage-derived morphogenetic proteins and cartilage morphogenesis", *Microscopy research and technique*, vol. 43, no. 2, pp. 131-136.

Reddi, A.H. 2003, "Cartilage morphogenetic proteins: role in joint development, homeostasis, and regeneration", *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 62 Suppl 2, pp. ii73-8.

Reddi, A.H. & Huggins, C. 1972, "Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 69, no. 6, pp. 1601-1605.

Reinholt, F.P., Hultenby, K., Oldberg, A. & Heinegård, D. 1990, "Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 87, no. 12, pp. 4473-4475.

Rizzi, S.C., Ehrbar, M., Halstenberg, S., Raeber, G.P., Schmoekel, H.G., Hagenmüller, H., Müller, R., Weber, F.E. & Hubbell, J.A. 2006, "Recombinant protein-co-PEG networks as cell-adhesive and proteolytically degradable hydrogel matrixes. Part II: biofunctional characteristics", *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 11, pp. 3019-3029.

Robling, A.G., Castillo, A.B. & Turner, C.H. 2006, "Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling", *Annu.Rev.Biomed.Eng.*, vol. 8, pp. 455-498.

Roghani, M., Mansukhani, A., Dell'Era, P., Bellosta, P., Basilico, C., Rifkin, D.B. & Moscatelli, D. 1994, "Heparin increases the affinity of basic fibroblast growth factor for its receptor but is not required for binding.", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 6, pp. 3976-3984.

Romano, D., Molla, G., Pollegioni, L. & Marinelli, F. 2009, "Optimization of human d-amino acid oxidase expression in *Escherichia coli*", *Protein expression and purification*, vol. 68, no. 1, pp. 72-78.

Rose, F.R. & Oreffo, R.O. 2002, "Bone tissue engineering: hope vs hype", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 292, no. 1, pp. 1-7.

Rosen, V. 2009, "BMP2 signaling in bone development and repair", *Cytokine & growth factor reviews*, vol. 20, no. 5, pp. 475-480.

Rosen, V., Wozney, J.M., Wang, E.A., Cordes, P., Celeste, A., McQuaid, D. & Kurtzberg, L. 1989, "Purification and molecular cloning of a novel group of BMPs and localization of BMP mRNA in developing bone", *Connective tissue research*, vol. 20, no. 1-4, pp. 313-319.

Rudarakanchana, N. & Morrell, N.W. 2004, "Bone morphogenetic protein receptor type II (BMPRII)-mediated signalling pathways", *Expert Reviews in Molecular Medicine*, vol. 6.

Ruhe, P.Q., Hedberg, E.L., Padron, N.T., Spauwen, P.H., Jansen, J.A. & Mikos, A.G. 2003, "rhBMP-2 release from injectable poly (DL-lactic-co-glycolic acid)/calcium-phosphate cement composites", *The Journal of Bone & Joint Surgery*, vol. 85, no. suppl\_3, pp. 75-81.

Ruhe, P.Q., Kroese-Deutman, H.C., Wolke, J.G., Spauwen, P.H. & Jansen, J.A. 2004, "Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants in cranial defects in rabbits", *Biomaterials*, vol. 25, no. 11, pp. 2123-2132.

Ruhe, P., Boerman, O., Russel, F., Mikos, A., Spauwen, P. & Jansen, J. 2006, "In vivo release of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement pretreated with albumin", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 17, no. 10, pp. 919-927.

Ruhe, P.Q., Boerman, O.C., Russel, F.G., Spauwen, P.H., Mikos, A.G. & Jansen, J.A. 2005, "Controlled release of rhBMP-2 loaded poly(dl-lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement composites in vivo", *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, vol. 106, no. 1-2, pp. 162-171.

Ruppert, R., Hoffmann, E. & Sebald, W. 1996, "Human Bone Morphogenetic Protein 2 Contains a Heparin-Binding Site which Modifies Its Biological Activity", *European Journal of Biochemistry*, vol. 237, no. 1, pp. 295-302.

Saito, N. & Takaoka, K. 2003, "New synthetic biodegradable polymers as BMP carriers for bone tissue engineering", *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2287-2293.

Saiz, E., Gremillard, L., Menendez, G., Miranda, P., Gryn, K. & Tomsia, A. 2007, "Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds", *Materials Science and Engineering: C*, vol. 27, no. 3, pp. 546-550.

Sambrook, J. 1989, "Fritsch. EF and Maniatis. T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual", *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY*, vol. 267, pp. 9289-9293.

Sampath, T.K. & Reddi, A.H. 1981, "Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 78, no. 12, pp. 7599-7603.

Scheufler, C., Sebald, W. & Hülsmeier, M. 1999, "Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution", *J. Mol. Biol.*, vol. 287, pp. 103-115.

Schlegl, R., Iberer, G., Machold, C., Necina, R. & Jungbauer, A. 2003, "Continuous matrix-assisted refolding of proteins", *J Chromatogr A*, vol. 1009, pp. 119-132.

Sciadini, M.F., Dawson, J.M., Banit, D., Juliao, S.F., Johnson, K.D., Lennington, W.J. & Schwartz, H.S. 2000, "Growth factor modulation of distraction osteogenesis in a segmental defect model", *Clinical orthopaedics and related research*, vol. 381, pp. 266-277.

Seeherman, H., Li, R., Bouxsein, M., Kim, H., Li, X.J., Smith-Adaline, E.A., Aiolova, M. & Wozney, J.M. 2006a, "rhBMP-2/calcium phosphate matrix accelerates osteotomy-site healing in a nonhuman primate model at multiple treatment times and concentrations", *The Journal of bone and joint surgery.American volume*, vol. 88, no. 1, pp. 144-160.

Seeherman, H. & Wozney, J.M. 2005, "Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration", *Cytokine & growth factor reviews*, vol. 16, no. 3, pp. 329-345.

Seeherman, H.J., Azari, K., Bidic, S., Rogers, L., Li, X.J., Hollinger, J.O. & Wozney, J.M. 2006b, "rhBMP-2 delivered in a calcium phosphate cement accelerates bridging of critical-sized defects in rabbit radii", *The Journal of bone and joint surgery.American volume*, vol. 88, no. 7, pp. 1553-1565.

Seshadri, S., Khurana, R. & Fink, A.L. 1999 "[36] Fourier transform infrared spectroscopy in analysis of protein deposits" in *Methods in Enzymology* Academic Press, vol. 309, pp. 559-576.

Shafiee, A., Seyedjafari, E., Soleimani, M., Ahmadbeigi, N., Dinarvand, P. & Ghaemi, N. 2011, "A comparison between osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue.", vol. 33, pp. 1257.

Shim, J., Greenblatt, M.B., Xie, M., Schneider, M.D., Zou, W., Zhai, B., Gygi, S. & Glimcher, L.H. 2009, "TAK1 is an essential regulator of BMP signalling in cartilage", *The EMBO journal*, vol. 28, no. 14, pp. 2028-2041.

Shimasaki, S., Moore, R.K., Otsuka, F. & Erickson, G.F. 2004, "The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction", *Endocrine reviews*, vol. 25, no. 1, pp. 72-101.

Shirk, R.A., Elisen, M., Meijers, J. & Church, F.C. 1994, "Role of the H helix in heparin binding to protein C inhibitor.", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 46, pp. 28690-28695.

Shirley, D., Marsh, D., Jordan, G., McQuaid, S. & Li, G. 2005, "Systemic recruitment of osteoblastic cells in fracture healing", *Journal of orthopaedic research*, vol. 23, no. 5, pp. 1013-1021.

Shore, E.M., Xu, M., Calvert, G., Moriatis, J. & Kaplan, F.S. "Human Bone Morphogenetic Protein-2 Genomic DNA Sequence", *PubMed protein sequence search, unpublished data*, .

Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C. & Knaus, P. 2009, "Recent advances in BMP receptor signaling", *Cytokine & growth factor reviews*, vol. 20, no. 5, pp. 343-355.

Sikavitsas, V.I., Temenoff, J.S. & Mikos, A.G. 2001, "Biomaterials and bone mechanotransduction", *Biomaterials*, vol. 22, no. 19, pp. 2581-2593.

Šimić, P. & Vukičević, S. 2007, "Bone morphogenetic proteins: from developmental signals to tissue regeneration. Conference on bone morphogenetic proteins", *EMBO reports*, vol. 8, no. 4, pp. 327-331.

Simon, J.L., Michna, S., Lewis, J.A., Rekow, E.D., Thompson, V.P., Smay, J.E., Yampolsky, A., Parsons, J.R. & Ricci, J.L. 2007, "In vivo bone response to 3D periodic hydroxyapatite scaffolds assembled by direct ink writing", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 83, no. 3, pp. 747-758.

Simonet, W., Lacey, D., Dunstan, C., Kelley, M., Chang, M., Lüthy, R., Nguyen, H., Wooden, S., Bennett, L. & Boone, T. 1997, "Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density", *Cell*, vol. 89, no. 2, pp. 309-319.

Smay, J.E., Cesarano, J. & Lewis, J.A. 2002, "Colloidal inks for directed assembly of 3-D periodic structures", *Langmuir*, vol. 18, no. 14, pp. 5429-5437.

Sous, M., Bareille, R., Rouais, F., Clement, D., Amedee, J., Dupuy, B. & Baquey, C. 1998, "Cellular biocompatibility and resistance to compression of macroporous beta-tricalcium phosphate ceramics", *Biomaterials*, vol. 19, no. 23, pp. 2147-2153.

Steck, E., Bertram, H., Abel, R., Chen, B., Winter, A. & Richter, W. 2005, "Induction of Intervertebral Disc-Like Cells From Adult Mesenchymal Stem Cells", *Stem cells*, vol. 23, no. 3, pp. 403-411.

Stein, G.S. & Lian, J.B. 1993, "Molecular Mechanisms Mediating Proliferation/Differentiation Interrelationships During Progressive Development of the Osteoblast Phenotype", *Endocrine reviews*, vol. 14, no. 4, pp. 424-442.

Stempfer, G., Holl-Neugebauer, B. & Rudolph, R. 1996, "Improved refolding of an immobilized fusion protein", *Nature Biotechnol*, vol. 14, pp. 329-334.

Stone, S.R., Brown-Luedi, M.L., Rovelli, G., Guidolin, A., McGlynn, E. & Monard, D. 1994, "Localization of the heparin-binding site of glia-derived nexin/protease nexin-1 by site-directed mutagenesis", *Biochemistry*, vol. 33, no. 24, pp. 7731-7735.

Studier, F.W. 2005, "Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures", *Protein expression and purification*, vol. 41, no. 1, pp. 207-234.

Suchanek, W. & Yoshimura, M. 1998, "Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants", *Journal of Materials Research*, vol. 13, no. 1, pp. 94-117.

Sugiura, F., Kitoh, H. & Ishiguro, N. 2004, "Osteogenic potential of rat mesenchymal stem cells after several passages", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 316, no. 1, pp. 233-239.

Sun, H.J., Bahk, Y.Y., Choi, Y.R., Shim, J.H., Han, S.H. & Lee, J.W. 2006, "A proteomic analysis during serial subculture and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cell", *Journal of orthopaedic research*, vol. 24, no. 11, pp. 2059-2071.

Suzuki, A., Terai, H., Toyoda, H., Namikawa, T., Yokota, Y., Tsunoda, T. & Takaoka, K. 2006, "A biodegradable delivery system for antibiotics and recombinant human bone morphogenetic protein-2: A potential treatment for infected bone defects", *Journal of orthopaedic research*, vol. 24, no. 3, pp. 327-332.

Suzuki, N., Labosky, P.A., Furuta, Y., Hargett, L., Dunn, R., Fogo, A.B., Takahara, K., Peters, D.M., Greenspan, D.S. & Hogan, B.L. 1996, "Failure of ventral body wall closure in mouse embryos lacking a procollagen C-proteinase encoded by Bmp1, a mammalian gene related to *Drosophila* tolloid", *Development (Cambridge, England)*, vol. 122, no. 11, pp. 3587-3595.

Sykaras, N. & Opperman, L.A. 2003, "Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician?", *Journal of oral science*, vol. 45, no. 2, pp. 57-74.

Takagi, S., Chow, L.C., Hirayama, S. & Eichmiller, F.C. 2003, "Properties of elastomeric calcium phosphate cement-chitosan composites", *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*, vol. 19, no. 8, pp. 797-804.

Takahashi, Y., Yamamoto, M. & Tabata, Y. 2005, "Enhanced osteoinduction by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from biodegradable sponge composed of gelatin and beta-tricalcium phosphate", *Biomaterials*, vol. 26, no. 23, pp. 4856-4865.

Ter Brugge, P. & Jansen, J. 2002, "In vitro osteogenic differentiation of rat bone marrow cells subcultured with and without dexamethasone", *Tissue engineering*, vol. 8, no. 2, pp. 321-331.

Thatcher, D.R. & Hitchcock, A. 1994, "Protein folding in biotechnology", *In Mechanisms of protein refolding*, pp. 229-254.

Tomé, M., López-Romero, P., Albo, C., Sepúlveda, J.C., Fernández-Gutiérrez, B., Dopazo, A., Bernad, A. & González, M.A. 2010, "miR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells", *Cell Death & Differentiation*, vol. 18, no. 6, pp. 985-995.

Tomé, M., Sepúlveda, J.C., Delgado, M., Andrades, J.A., Campisi, J., González, M.A. & Bernad, A. 2014, "MiR-335 correlates with senescence/aging in human mesenchymal stem cells and inhibits their therapeutic actions through inhibition of AP-1 activity", *STEM CELLS*.

Tortora, G.J. & Derrickson, B. 2013, *Principios de anatomía y fisiología*, Médica Panamericana.

Tsuruga, E., Takita, H., Itoh, H., Wakisaka, Y. & Kuboki, Y. 1997, "Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis", *Journal of Biochemistry*, vol. 121, no. 2, pp. 317-324.

Tuan, R.S., Boland, G. & Tuli, R. 2003, "Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering", *Arthritis Research and Therapy*, vol. 5, no. 1, pp. 32-45.

Uaesoontrachoon, K., Yoo, H., Tudor, E.M., Pike, R.N., Mackie, E.J. & Pagel, C.N. 2008, "Osteopontin and skeletal muscle myoblasts: Association with muscle regeneration and regulation of myoblast function in vitro", *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 40, no. 10, pp. 2303-2314.

Urist, M.R., Chang, J., Lietze, A., Huo, Y., Brownell, A. & DeLange, R. 1987, "[28] Preparation and bioassay of bone morphogenetic protein and polypeptide Fragments", *Methods in enzymology*, vol. 146, pp. 294-312.

Urist, M.R. 1965, "Bone: formation by autoinduction", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 150, no. 3698, pp. 893-899.

Urist, M.R. & Strates, B.S. 1971, "Bone morphogenetic protein", *Journal of dental research*, vol. 50, no. 6, pp. 1392-1406.

Vallejo, L.F., Brokelmann, M., Marten, S., Trappe, S., Cabrera-Crespo, J., Hoffmann, A., Gross, G., Weich, H.A. & Rinas, U. 2002, "Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*", *Journal of Biotechnology*, vol. 94, no. 2, pp. 185-194.

Vallejo, L.F. & Rinas, U. 2004a, "Optimized procedure for renaturation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at high protein concentration", *Biotechnology and bioengineering*, vol. 85, no. 6, pp. 601-609.

Vallejo, L. & Rinas, U. 2004b, "Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins", *Microbial Cell Factories*, vol. 3, no. 1, pp. 11.

Von Einem, S., Schwarz, E. & Rudolph, R. 2010, "A novel TWO-STEP renaturation procedure for efficient production of recombinant BMP-2", *Protein expression and purification*, vol. 73, no. 1, pp. 65-69.

Wall, J.G. & Plückthun, A. 1995, "Effects of overexpressing folding modulators on the in vivo folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*", *Current opinion in biotechnology*, vol. 6, no. 5, pp. 507-516.

Walsh, G. 2010, "Biopharmaceutical benchmarks 2010", *Nature biotechnology*, vol. 28, no. 9, pp. 917.

Wan, M. & Cao, X. 2005, "BMP signaling in skeletal development", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 328, no. 3, pp. 651-657.

Wang, E.A., Rosen, V., Cordes, P., Hewick, R.M., Kriz, M.J., Luxenberg, D.P., Sibley, B.S. & Wozney, J.M. 1988, "Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 85, no. 24, pp. 9484-9488.

Wang, E.A., Rosen, V., D'Alessandro, J.S., Bauduy, M., Cordes, P., Harada, T., Israel, D.I., Hewick, R.M., Kerns, K.M. & LaPan, P. 1990, "Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 87, no. 6, pp. 2220-2224.

Wang, Y., Yu, X., Cohen, D.M., Wozniak, M.A., Yang, M.T., Gao, L., Eyckmans, J. & Chen, C.S. 2011, "Bone morphogenetic protein-2-induced signaling and osteogenesis is regulated by cell shape, RhoA/ROCK, and cytoskeletal tension", *Stem cells and development*, vol. 21, no. 7, pp. 1176-1186.

Wennberg, C., Hessle, L., Lundberg, P., Mauro, S., Narisawa, S., Lerner, U.H. & Millán, J.L. 2000, "Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice", *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 15, no. 10, pp. 1879-1888.

West, S.M., Chaudhuri, J.B. & Howell, J.A. 1998, "Improved protein refolding using hollow-fibre membrane dialysis", *Biotechnol Bioeng*, vol. 57, pp. 590-599.

White, A.P., Vaccaro, A.R., Hall, J.A., Whang, P.G., Friel, B.C. & McKee, M.D. 2007, "Clinical applications of BMP-7/OP-1 in fractures, nonunions and spinal fusion", *International orthopaedics*, vol. 31, no. 6, pp. 735-741.

Wikesjo, U.M., Qahash, M., Thomson, R.C., Cook, A.D., Rohrer, M.D., Wozney, J.M. & Hardwick, W.R. 2004, "rhBMP-2 significantly enhances guided bone regeneration", *Clinical oral implants research*, vol. 15, no. 2, pp. 194-204.

Wozney, J., Rosen, V., Byrne, M., Celeste, A., Moutsatsos, I. & Wang, E. 1990, "Growth factors influencing bone development", *Journal of cell science*, vol. 1990, no. Supplement 13, pp. 149-156.

Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M. & Wang, E.A. 1988, "Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities", *Science*, vol. 242, no. 4885, pp. 1528-1534.

Wrana, J.L. 2000, "Regulation of Smad activity", *Cell*, vol. 100, no. 2, pp. 189-192.

Xu, H.H., Quinn, J.B., Takagi, S. & Chow, L.C. 2002, "Processing and properties of strong and non-rigid calcium phosphate cement", *Journal of dental research*, vol. 81, no. 3, pp. 219-224.

Xu, H.H. & Simon, C.G., Jr 2005, "Fast setting calcium phosphate-chitosan scaffold: mechanical properties and biocompatibility", *Biomaterials*, vol. 26, no. 12, pp. 1337-1348.

Yamaguchi, K., Nagai, S., Ninomiya-Tsuji, J., Nishita, M., Tamai, K., Irie, K., Ueno, N., Nishida, E., Shibuya, H. & Matsumoto, K. 1999, "XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway", *The EMBO journal*, vol. 18, no. 1, pp. 179-187.

Yamamoto, M., Tabata, Y. & Ikada, Y. 1998, "Ectopic bone formation induced by biodegradable hydrogels incorporating bone morphogenetic protein", *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 9, no. 5, pp. 439-458.

Yamashita, H., Shimizu, A., Kato, M., Nishitoh, H., Ichijo, H., Hanyu, A., Morita, I., Kimura, M., Makishima, F. & Miyazono, K. 1997, "Growth/Differentiation Factor-5 Induces Angiogenesis *in Vivo*", *Experimental cell research*, vol. 235, no. 1, pp. 218-226.

Yang, S., Leong, K., Du, Z. & Chua, C. 2001, "The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors", *Tissue engineering*, vol. 7, no. 6, pp. 679-689.

Yano, K., Hoshino, M., Ohta, Y., Manaka, T., Naka, Y., Imai, Y., Sebald, W. & Takaoka, K. 2009, "Osteoinductive capacity and heat stability of recombinant human bone morphogenetic protein-2 produced by *Escherichia coli* and dimerized by biochemical processing", vol. 27, pp. 355.

Yokoyama, A., Yamamoto, S., Kawasaki, T., Kohgo, T. & Nakasu, M. 2002, "Development of calcium phosphate cement using chitosan and citric acid for bone substitute materials", *Biomaterials*, vol. 23, no. 4, pp. 1091-1101.

Yoneda, M., Terai, H., Imai, Y., Okada, T., Nozaki, K., Inoue, H., Miyamoto, S. & Takaoka, K. 2005, "Repair of an intercalated long bone defect with a synthetic biodegradable bone-inducing implant", *Biomaterials*, vol. 26, no. 25, pp. 5145-5152.

Yuan, H., Yang, Z., Li, Y., Zhang, X., De Bruijn, J. & De Groot, K. 1998, "Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 9, no. 12, pp. 723-726.

Yuan, H., De Bruijn, J., Zhang, X., Van Blitterswijk, C. & De Groot, K. 2001, "Use of an osteoinductive biomaterial as a bone morphogenetic protein carrier", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 12, no. 9, pp. 761-766.

Yun, Y., Yang, D.H., Kim, S., Park, K., Ohe, J., Lee, B., Choi, B. & Kim, S.E. 2014, "Local delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) from rhBMP-2/heparin complex fixed to a chitosan scaffold enhances osteoblast behavior", *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 11, no. 2, pp. 163-170.

Zara, J.N., Siu, R.K., Zhang, X., Shen, J., Ngo, R., Lee, M., Li, W., Chiang, M., Chung, J. & Kwak, J. 2011, "High doses of bone morphogenetic protein 2 induce structurally abnormal bone and inflammation in vivo", *Tissue Engineering Part A*, vol. 17, no. 9-10, pp. 1389-1399.

Zernik, J., Twarog, K. & Upholt, W.B. 1990, "Regulation of alkaline phosphatase and alpha2 (I) procollagen synthesis during early intramembranous bone formation in the rat mandible", *Differentiation*, vol. 44, no. 3, pp. 207-215.

Zhang, P., Wu, Y., Dai, Q., Fang, B. & Jiang, L. 2013, "p38-MAPK signaling pathway is not involved in osteogenic differentiation during early response of mesenchymal stem cells to continuous mechanical strain", *Molecular and cellular biochemistry*, vol. 378, no. 1-2, pp. 19-28.

Zhao, G.Q., Deng, K., Labosky, P.A., Liaw, L. & Hogan, B.L. 1996, "The gene encoding bone morphogenetic protein 8B is required for the initiation and maintenance of spermatogenesis in the mouse", *Genes & development*, vol. 10, no. 13, pp. 1657-1669.

Zhivkova-Galunska, M., Adwan, H., Eyol, E., Kleeff, J., Kolb, A., Bergmann, F. & Berger, M.R. 2010, "Osteopontin but not osteonectin favors the metastatic growth of pancreatic cancer cell lines", *Cancer biology & therapy*, vol. 10, no. 1, pp. 54-64.

zur Nieden, N.I., Kempka, G., Rancourt, D.E. & Ahr, H. 2005, "Induction of chondro-, osteo- and adipogenesis in embryonic stem cells by bone morphogenetic protein-2: effect of cofactors on differentiating lineages", *BMC developmental biology*, vol. 5, no. 1, pp. 1.



✧ *Anexo I*





➤ **SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE rhBMP-2 CLONADAS EN LOS VECTORES DE EXPRESIÓN**

• **Secuencia en vector B.S.:**

GATATCATGGTGGCCGGGACCCGCTGTCTTCTAGCGTTGCTGCTTCCCCAGGT  
CCTCCTGGGCGGCGCGGCTGGCCTCGTTCGGAGCTGGGCCGCAGGAAGTTC  
GCGGCGGCGTCGTCGGGCCGCCCTCATCCCAGCCCTCTGACGAGGTCCTGA  
GCGAGTTCGAGTTGCTGCTGCTCAGCATGTTTCGGCCTGAAACAGAGACCCACC  
CCCAGCAGGGACGCCGTGGTGCCCCCTACATGCTAGACCTGTATCGCAGGCA  
CTCAGGTCAGCCGGGCTCACCCGCCCCAGACCACCGTTGGAGAGGGCAGCC  
AGCCGAGCCAACACTGTGCGCAGCTTCCACCATGAAGAATCTTTGGAAGAACTA  
CCAGAAACGAGTGGGAAAACAACCCGGAGATTCTTCTTTAATTTAAGTTCTATCC  
CCACGGAGGAGTTTATCACCTCAGCAGAGCTTCAGGTTTTCCGAGAACAGATGC  
AAGATGCTTTAGGAAACAATAGCAGTTTCCATCACCGAATTAATATTTATGAAATC  
ATAAAACCTGCAACAGCCAACCTCGAAATTCGCCGTGACCAGTCTTTTGGACACC  
AGGTTGGTGAATCAGAATGCAAGCAGGTGGGAAAGTTTTGATGTCACCCCCGCT  
GTGATGCGGTGGACTGCACAGGGACACGCCAACCATGGATTTCGTGGTGGAAGT  
GGCCCACTTGAGAGGAGAAACAAGGTGTCTCCAAGAGACATGTTAGGATAAGCA  
GGTCTTTGCACCAAGATGAACACAGCTGGTTCACAGATAAGGCCATTGCTAGTAA  
CTTTTGGCCATGATGGAAAAGGGCATCCTCTCCACAAAAGAGAAAAACGTCAAG  
CCAAACACAAACAGCGGAAACGCCTTAAGTCCAGCTGTAAGAGACACCCTTTGT  
ACGTGGACTTCAGTGACGTGGGGTGGAAATGACTGGATTGTGGCTCCCCCGGGG  
TATCACGCCTTTTACTGCCACGGAGAATGCCCTTTTCCTCTGGCTGATCATCTGA  
ACTCCACTAATCATGCCATTGTTTCAGACGTTGGTCAACTCTGTAACTCTAAGAT  
TCCTAAGGCATGCTGTGTCCCAGACAAGTCAAGTCTATCTCGATGCTGTACCT  
TGACGAGAATGAAAAGGTTGTATTAAGAAGTATCAGGACATGGTTGTGGAGGG  
TTGTGGGTGTCGCTAGGATATC

• **Secuencia en vector pT7.7:**

CATATGCAAGCCAAACACAAACAGCGGAAACGCCTTAAGTCCAGCTGTAAGAGA  
CACCCTTTGTACGTGGACTTCAGTGACGTGGGGTGGAAATGACTGGATTGTGGCT  
CCCCCGGGTATCACGCCTTTTACTGCCACGGAGAATGCCCTTTTCCTCTGGCT  
GATCATCTGAACTCCACTAATCATGCCATTGTTTCAGACGTTGGTCAACTCTGTTA  
ACTCTAAGATTCCTAAGGCATGCTGTGTCCCAGACAAGTCAAGTCTATCTCGA  
TGCTGTACCTTGACGAGAATGAAAAGGTTGTATTAAGAAGTATCAGGACATGGT  
TGTGGAGGGTTGTGGGTGTCGCTAGGATATC

*(Subrayado en la secuencia los sitios de restricción de enzimas)*



➤ **ECUACIONES DE LOS AJUSTES ESTADÍSTICOS CORRESPONDIENTES A LAS CURVAS DOSIS RESPUESTA**

Ecuación Dosis-Respuesta Sigmoide (pendiente variable)

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{HillSlope})})$$

donde: X es el logaritmo de la concentración o dosis

Y es la respuesta

- **Actividad FA/Bradford de C2C12 con distintas dosis de rhBMP-2 almacenada en diferentes condiciones durante 6 meses:**

	<b>CONTROL-4°C-LIOF</b>	<b>-20°C</b>
<b>BOTTOM</b>	0,00384	0,001824
<b>TOP</b>	0,1753	1,554
<b>LOGEC<sub>50</sub></b>	0,2216	1,716
<b>HILLSLOPE</b>	1,418	1,31
<b>EC<sub>50</sub></b>	1,666	51,97
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9603	0,949

- **Actividad FA/Bradford de C2C12 con distintas dosis de rhBMP-2 almacenada en diferentes condiciones durante 1 año:**

	<b>4°C</b>	<b>LIOFILIZADO</b>	<b>-20°C</b>	
			<b>6 meses</b>	<b>1 año</b>
<b>BOTTOM</b>	0,004531	0,0006958	0,001824	-0,0002114
<b>TOP</b>	0,1521	0,2225	1,554	0,04807
<b>LOGEC<sub>50</sub></b>	0,1918	0,4185	1,716	0,356
<b>HILLSLOPE</b>	1,803	1,241	1,31	1,666
<b>EC<sub>50</sub></b>	1,555	2,621	51,97	2,27
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9624	0,9705	0,949	0,8376

- Actividad FA/Bradford inducida bajo el tratamiento de rhBMP-2 de dos líneas celulares:

	MIOBLÁSTICAS	OSTEOBLÁSTICAS
<b>BOTTOM</b>	0,008333	0,1018
<b>TOP</b>	0,2029	2,11
<b>LOGEC<sub>50</sub></b>	0,01596	-0,4538
<b>HILLSLOPE</b>	1,976	1,311
<b>EC<sub>50</sub></b>	1,037	0,3517
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9659	0,8857

- Actividad FA/Bradford inducida en C2C12 bajo el tratamiento de rhBMP-2 control y rhBMP-2 lisada

	rhBMP-2 CONTROL	rhBMP-2 LISADA
<b>BOTTOM</b>	0,005907	0,1605
<b>TOP</b>	0,2126	0,5645
<b>LOGEC<sub>50</sub></b>	-0,07477	-0,112
<b>HILLSLOPE</b>	1,227	0,3455
<b>EC<sub>50</sub></b>	0,8418	0,7726
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9828	0,9839

✦ *Productividad*





Fruto de este trabajo de investigación y de los trabajos realizados en el laboratorio durante los años empleados en la realización de la Tesis Doctoral, se han publicado los siguientes artículos científicos y capítulos de libro:

1. A Abarrategi, **C Moreno-Vicente**, FJ Martínez-Vázquez, A Civantos, V Ramos, JV Sanz-Casado, R Martínez-Corriá, FH Perera, F Mulero, P Miranda\*, JL López-Lacomba\*, 2012 “Biological Properties of Solid Free Form Designed Ceramic Scaffolds with BMP-2: *in vitro* and *in vivo* Evaluation”, *PloS ONE*, vol 7, no 3, pp. e34117.
2. A Abarrategi, ME Fernandez-Valle, T Desmet, D Castejón, A Civantos, **C Moreno-Vicente**, V Ramos, J V Sanz-Casado, FJ Martínez-Vázquez, P Dubruel, P Miranda and JL López-Lacomba, 2012, “Label-free magnetic resonance imaging to locate live cells in three-dimensional porous scaffolds”, *Journal of the Royal Society. Interface*, vol. 9, no 74, pp. 2321-2331
3. R Martinez-Corriá, A Abarrategi, JV Sanz-Casado, JM Navarro, V Méndez-Blanco, R Lorenzo-Vignau, P Miranda, **C Moreno-Vicente**, A Civantos, A Cuenca-Moya, V Ramos and JL López-Lacomba\*, 2009, “The use of a chitosan/BMP-2 complex in bone substitutes and implant surfaces in Proceedings of the First P-I Brånemark Scientific Symposium, Gothenburg, 29-31 Oct 2009, Gothenburg, Sweden”, *Robert Gottlander & Daniel van Steenberghe*, vol I, pp.105-116, 2010 Quintessence Publishing Company, Berlin ISBN 978-1-85097-207-9.
4. Y Lópiz-Morales, A Abarrategi, V Ramos, **C Moreno-Vicente**, L López-Durán, JL López-Lacomba\* and F Marco, 2010, “*In vivo* comparison of the effects of BMP-2 and BMP-4 in osteochondral tissue regeneration”, *European Cells and Materials*, vol 20, pp 367-378.
5. A Abarrategi, J García-Cantalejo, **C Moreno-Vicente**, A Civantos, V Ramos, JV Sanz Casado, S Pérez-Rial, R Martínez-Corriá and JL López-Lacomba, 2009, “Gene expression profile on chitosan/rhBMP-2 films, a novel osteoinductive coating for implantable materials”, *Acta Biomaterialia*, vol 5, pp 2633-2646.

6. MJ Hortigüela, MC Gutiérrez, I Aranaz, M Jobbágy, A Abarrategi, **C Moreno-Vicente**, A Civantos, V Ramos, JL López-Lacomba, ML Ferrer and F del Monte, 2008, "Urea assisted hydroxyapatite mineralization on MWCNT/CHI scaffolds", *Journal of Materials Chemistry*, vol 18, pp.5933-5940.
7. A Abarrategi, **C Moreno-Vicente**, V Ramos, I Aranaz, JV Sanz Casado and JL López-Lacomba, 2008, "Improvement of porous  $\beta$ -TCP scaffolds with rhBMP-2 chitosan carrier film for bone tissue application", *Tissue Engineering*, vol 14, no 8, pp 1305-1319.
8. A Abarrategi, MC Gutiérrez, **C Moreno-Vicente**, MJ. Hortigüela, V Ramos, JL. López-Lacomba, ML. Ferrer, F del Monte, 2008, "Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes", *Biomaterials*, vol. 29, pp 94-102.
9. A Abarrategi, **C. Moreno-Vicente**, V. Ramos, S. Perez-Rial, J.M.G. García-Cantalejo, A. Sisniega, A. Civantos, J.J. Vaquero, J.V. Sanz-Casado and J.L. López-Lacomba, 2007, "rhBMP-2/chitosan film as titanium implant coating: *in vitro* characterization and *in vivo* bone formation", *Regenerative Medicine*, vol. 2, no 5, pp 587.
10. A Abarrategi, **C Moreno-Vicente**, V Ramos, JV Sanz-Casado, R Martínez-Corriá, V Méndez and JL López-Lacomba, 2006, "Bone growth induction on rhBMP-2 coated implants", *Cytotherapy*, vol. 8 (Supplement 2), pp 61.

Se han realizado las siguientes asistencias a congresos con poster y comunicaciones orales, tanto nacionales como internacionales:

1. A Civantos, F Couso-Ferrer, R Guzmán, A. Abarrategi, T Desmet, **C Moreno-Vicente**, V Ramos and JL Lopez-Lacomba. "Evaluation Polycaprolactone-Chitosan Scaffolds Activated with rh-BMP-2", *Biofuture 2011: Young European Biomaterial Scientists Designing a View for the Future*, Comunicación oral, Ghent, Bélgica, 16-18 Noviembre 2011.

2. R Guzmán, R Martínez-Corriá, A Abarrategi, A Civantos, **C Moreno-Vicente**, F Couso-Ferrer, JV Sanz-Casado, V. Ramos and J. L. Lopez-Lacomba. "Bone regeneration induced by chitosan rhBMP-2 activated: a preliminary study on maxillary defects on pigs", *Termis EU 2011 Annual Meeting*, Póster, Granada, España, 7-10 Junio 2011.
3. A Abarrategi, R Martínez-Corriá, A Civantos, **C Moreno-Vicente**, R Guzmán, F Couso, JV Sanz-Casado, V Ramos and JL Lopez-Lacomba. "Chitosan/rhBMP-2 Coating in Ceramics: Bone Induction in Pig Mandible Defects", *10th International Conference of the European Chitin Society (EUCHIS' 11)*, Póster, San Petersburgo, Rusia, 20-24 Mayo 2011.
4. A Civantos, A Abarrategi, **C Moreno-Vicente**, R Guzman, F Couso, V Ramos, and J L Lopez-Lacomba. "Chitosan films properties: cell biocompatibility", *10th International Conference of the European Chitin Society (EUCHIS' 11)*, Póster, San Petersburgo, Rusia, 20-24 Mayo 2011.
5. **C Moreno-Vicente**, A Abarrategi, FJ Martínez-Vázquez, A Civantos, V Ramos, R Martinez-Corriá, JV Sanz-Casado, P Miranda and JL López-Lacomba. "In vitro and in vivo studies of rhBMP-2 activated robocasting  $\beta$ -tcp scaffold", *8th International Conference on Bone Morphogenetic Proteins*, Póster, Leuven, Bélgica, 15-18 Septiembre 2010.
6. ML Romero-Romero, A Civantos, **C Moreno-Vicente**, JL López-Lacomba and JM Sánchez-Ruiz. "Modulation of the activity of different variants of bone morphogenetic protein-2", *8th International Conference on Bone Morphogenetic Proteins*, Póster, Leuven, Bélgica, 15-18 Septiembre 2010.
7. A Abarrategi, D Castejón, ME Fernandez-Valle, A Civantos, **C Moreno-Vicente**, V Ramos, JV Sanz-Casado, FJ Martínez-Vázquez \*, P Miranda\* and JL López-Lacomba. "High Resolution MRI to Localize Non-Labeled Cells on 3D Scaffolds", *23<sup>rd</sup> European Conference on Biomaterials*, Póster, Tampere, Finlandia, 11-15 Septiembre 2.010.
8. ML Romero-Romero, **C Moreno-Vicente**, A Civantos, JL López-Lacomba and JM Sánchez-Ruiz. "Modulation of the activity of different variants of bone morphogenetic protein-2", *IV Spanish-Portuguese Biophysical Congress*, Póster, Zaragoza, España, 7-10 Julio 2010.

9. A Civantos, A Abarrategi, S Perez-Rial, **C Moreno-Vicente**, V Ramos, A Heras-Caballero and JL Lopez-Lacomba. "In vitro and in vivo study of chitosan film biodegradation using FITC labelling", *11<sup>th</sup> International Conference on Chitin & Chitosan*, Póster, Taipei, Taiwan, 6-9 Septiembre 2009.
10. A Abarrategi, Y López, **C Moreno-Vicente**, A Civantos, VM Ramos, JV Sanz-Casado, F Marco, L López-Durán and JL López-Lacomba. "In vivo study of chitosan scaffolds for osteochondral tissue regeneration", *9<sup>th</sup> International Conference of the European Chitin Society*, Póster, Venecia, Italia, 23-26 Mayo 2009.
11. A Abarrategi, **C Moreno-Vicente**, A Civantos, V Ramos, JV Sanz-Casado and JL López-Lacomba. "Chitosan films: rhBMP-2 carriers for bone tissue applications", *8<sup>th</sup> World Biomaterials Congress*, Póster, Amsterdam, Holanda, 28 Mayo-1 Junio 2008.
12. **C Moreno-Vicente**, A Abarrategi, MC Gutiérrez, A Civantos, MJ Hortigüela, V Ramos, I Aranaz, JL López-Lacomba, ML Ferrer and F del Monte. "Multiwall carbon nanotube scaffolds: a tissue engineering application", *8<sup>th</sup> World Biomaterials Congress*, Póster, Amsterdam, Holanda, 28 Mayo-1 Junio 2008.
13. A Abarrategi, **C Moreno-Vicente**, V Ramos, S Pérez-Rial, J García-Cantalejo, A Sisniega, A Civantos, JJ Vaquero, JV Sanz-Casado, and JL López-Lacomba. "rhBMP-2/chitosan film as titanium implant coating: in vitro characterization and in vivo bone formation", *3<sup>rd</sup> World Congress on Regenerative Medicine*, Póster, Leipzig, Alemania, 18-20 Octubre 2007.
14. **C Moreno-Vicente**, A Civantos, A Abarrategi, V Ramos, JV Sanz-Casado, and JL López-Lacomba. "Porous  $\beta$ -TCP activation with a chitosan/rh-BMP-2 coating", *ECM VIII: Bone Tissue Engineering*, Póster, Davos, Suiza, 25-28 Junio 2007.
15. A Abarrategi, **C Moreno-Vicente**, JM García-Cantalejo, V Ramos, JV Sanz-Casado, FM Marco and JL López-Lacomba. "Transcriptional expression analysis of C2C12 cells grown on chitosan/rhBMP2 films", *5<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Tissue Engineering Society*, Póster, Róterdam, Holanda, 8-11 Octubre 2006.

16. JL Lopez-Lacomba, A Abarrategi, V Ramos, **C Moreno-Vicente** and JV Sanz-Casado. "Chitosan films: *in vitro* characterization for its use in bone tissue engineering", *20<sup>th</sup> European Conference on Biomaterials*, Póster, Nantes, Francia, 27 Septiembre-1 Octubre 2006.
17. M Jiménez, **C Moreno-Vicente**, VJ Cid, C Nombela, M Molina "The Slr-2 MAP kinase from the *S.cerevisiae* cell integrity pathway retrophosphorylates its upstream activating kinases", *2<sup>nd</sup> Congress of European Microbiologists*, Póster, Madrid, España, 4-8 Julio, 2006.
18. JL López-Lacomba, V Ramos, A Abarrategi, V Correas-Magaña, **C Moreno-Vicente** and JV Sanz-Casado. "In vitro and in vivo testing of micro porous cement", *CIMTEC2006, 11<sup>th</sup> Internacional Ceramics Congreso*, Póster, Acireale, Sicily, Italia, 4-9 Junio, 2006.
19. A Abarrategi, **C Moreno-Vicente**, V Ramos, JV Sanz-Casado, R Martínez-Corriá, V Méndez and JL López-Lacomba. "Bone growth induction on rhBMP-2 coated implants", *2<sup>nd</sup> International Conference "Strategies in Tissue Engineering"*, Póster, Würzburg, Alemania, 31 Mayo-2 Junio 2006.

Se ha realizado Docencia de clases prácticas en el laboratorio del Departamento de Fisicoquímica de la Facultad de Farmacia de la UCM durante el curso lectivo de 2009-2010.

Se ha disfrutado de las siguientes estancias:

- Department of Clinical Engineering (UK BioTec), University of Liverpool, Reino Unido. Duración: 10/09/2008–10/12/2008 (12 semanas). TEMA: "Evaluación de la respuesta celular *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* a biomateriales".

Cursos realizados durante la Tesis Doctoral:

1. "ACREDITACIÓN PARA LA UTILIZACIÓN DE ANIMALES EN EXPERIMENTACIÓN: CATEGORIA B".  
Organización: Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España, 11-15 Febrero 2008.
2. "2nd INTERNATIONAL CONFERENCE ON CELL THERAPY AND REGENERATIVE MEDICINE".  
Organización: Instituto de Salud Carlos III. Granada, España, 23 y 24 Abril 2007.
3. "BIOPOLYMER COURSE 2006".  
Organización: Prof. Martin G. Peter, Institute of Chemistry and Interdisciplinary Research Center for Mass Spectrometry of Biopolymers, University of Potsdam, Alemania, 11-30 Septiembre 2006 (120 horas).
4. "INGENIERÍA TISULAR: LAS CÉLULAS QUE CURAN".  
Organización: Fundación de la Universidad Rey Juan Carlos. Aranjuez, Madrid, España, 10-14 Julio 2006.
5. "XII SYMPOSIUM SOBRE ONCOGENES Y MALIGNIZACIÓN CELULAR. MARCADORES TUMORALES".  
Organización: Cátedra de Oncología Médica. Facultad de Medicina (UCM). Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Farmacia (UCM). SEOM. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España, 10-11 Mayo 2006.
6. "NUEVAS TERAPIAS BASADAS EN EL TRASPLANTE Y MANIPULACION GENETICA DE CELULAS MADRE".  
Organización: Dr. Antonio Bernad Miana (Consejo Superior de Investigaciones Científicas). Centro Nacional de Biotecnología (CNB), Madrid, España, 4-7 Abril 2006.