

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**ESTUDIO DEL QUITOSANO COMO BIOMATERIAL
PORTADOR DE rhBMP-2:
DESARROLLO, CARACTERIZACIÓN Y
APLICABILIDAD EN REGENERACIÓN DE TEJIDO
ÓSEO.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Ander Abarrategui López

Bajo la dirección de los doctores
José Luís López Lacomba
Viviana Mónica Ramos

Madrid, 2008

- **ISBN: 978-84-692-1737-5**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

**Estudio del Quitosano como Biomaterial Portador de rhBMP-2:
Desarrollo, Caracterización y Aplicabilidad en Regeneración de Tejido Óseo.**

Ander Abarrategi López

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Dirigida por:
Dr. José Luis López Lacomba
Instituto de Estudios Biofuncionales
Universidad Complutense de Madrid

Dr. Viviana Mónica Ramos
Noricum S.L.

Madrid, 2008

INDICE DE TABLAS

INDICE DE FIGURAS

INDICE DE ABREVIATURAS

INDICE

<u>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</u>	1
1-INGENIERÍA DE TEJIDOS	3
2-TEJIDO ÓSEO	6
2.1- ESTRUCTURA DEL HUESO	7
2.2.- CONSTITUYENTES DEL TEJIDO ÓSEO	9
2.2.1.-LA MATRIZ ÓSEA	9
2.2.2- LAS CÉLULAS ÓSEAS	10
2.2.2.1 Osteoblastos:	10
2.2.2.2 Osteocitos	11
2.2.2.3 Osteoclastos	11
2.3 REPARACIÓN O CONSOLIDACIÓN ÓSEA	12
2.3.1.- FASE DE INFLAMACIÓN	13
2.3.2.- FASE DE REPARACIÓN	13
2.3.3.- FASE DE REMODELACIÓN	14
2.4-INJERTOS ÓSEOS	15
3-INGENIERÍA DE TEJIDOS ÓSEOS	17
3.1- MATERIALES.	19
3.1.1.-MATERIALES POLIMÉRICOS	19
3.1.2.-MATERIALES POLIMÉRICOS NATURALES	20
3.1.3.-MATERIALES POLIMÉRICOS SINTÉTICOS	20
3.1.4.-MATERIALES CERÁMICOS	21
3.2-FACTORES DE REPARACIÓN ÓSEA.	22
3.3- MODELOS Y CULTIVOS CELULARES.	23
3.4.- MODELOS ANIMALES DE REGENERACIÓN ÓSEA.	25
4- ANTECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN	27
5- OBJETIVOS GENERALES DEL TRABAJO	29
6- REFERENCIAS.	31

<u>CAPÍTULO 2: Evaluación de la respuesta celular a la rhBMP-2</u>	35
1-INTRODUCCIÓN	37
1.1.- BMP-2	39
2- OBJETIVOS DE ESTE CAPÍTULO	45
3-MATERIALES Y MÉTODOS	47
3.1.-OBTENCIÓN DE RHBMP-2.	49
3.2.-LÍNEA CELULAR C2C12.	50
3.3-ENSAYOS CELULARES.	51
3.3.1.-ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA.	51
3.3.2.-CONTENIDO TOTAL DE PROTEÍNAS.	51
3.3.3.-MEDICIÓN DE CALCEÍNA INTRACELULAR.	52
3.3.4.-ACTIVIDAD MITOCONDRIAL (MTT).	52
3.3.5.-CUANTIFICACIÓN DE DNA (HOESCHT).	53
3.3.6.-DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA MEDIANTE TINCIÓN CELULAR.	53
3.3.7.-ESTUDIO DE LA MIGRACIÓN CELULAR.	54
3.3.8.-ESTUDIO DE LA ADHESIÓN CELULAR.	54
3.3.9.- ESTUDIO DE APOPTOSIS Y CICLO CELULAR	54
3.3.10.- MIGRACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES	55
3.4-ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA	56
3.4.1.-EXTRACCIÓN DE RNA.	56
3.4.2.-PROCESAMIENTO DE LOS ARRAYS.	57
3.4.3.-ANÁLISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS.	57
3.4.4.-SÍNTESIS DE CDNA Y RT-PCR CUANTITATIVA.	58
3.5.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	59
4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN:	61
5-CONCLUSIONES	79
6- REFERENCIAS.	81

<u>CAPÍTULO 3: Formación de filmes de quitosano/rhBMP-2</u>	87
1.- INTRODUCCIÓN	89
<i>1.1.-MATERIALES PORTADORES DE BMP-2</i>	89
<i>1.2.-QUITOSANO COMO BIOMATERIAL</i>	89
2.-OBJETIVOS DE ESTE CAPÍTULO	95
3- MATERIALES Y MÉTODOS	97
3.1-PREPARACIÓN DE QUITINA Y QUITOSANO.	99
<i>CARACTERIZACIÓN DEL QUITOSANO.</i>	99
3.1.1-FORMACIÓN/CARACTERIZACIÓN DE FILMES DE QUITOSANO.	101
3.1.1.1-Preparación de filmes de quitosano.	101
3.1.1.2.-Caracterización de la superficie de los filmes.	101
3.1.1.3-Determinación de la rugosidad superficial.	101
3.1.1.4-Determinación del espesor de los filmes.	101
3.1.1.5-Determinación del volumen del quitosano.	102
3.1.1.6-Grado de hidratación de filmes.	102
3.1.1.7-Hidrofilicidad de la superficie de los filmes.	102
3.1.1.8-Ensayo de resuspensión de los filmes.	102
3.1.1.9-Ensayos de degradación enzimática in vitro.	103
3.1.2.-FILMES CON BMP-2	104
3.1.2.1.-Preparación de filmes quitosano/rh BMP-2.	104
3.1.2.2.-Liberación de rhBMP-2 por difusión.	104
3.1.2.3.-Difusión de rhBMP2 en medio de cultivo.	104
3.1.3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	104
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	105
<i>4.1.-EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS FILMES DE QUITOSANO.</i>	107
4.1.1.-CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	107
4.1.2.- CRECIMIENTO CELULAR.	114
4.1.3.-FILMES COMO PORTADORES DE RHBMP-2	118
5.-CONCLUSIONES	127
6- REFERENCIAS.	129

<u>CAPÍTULO 4: Evaluación del recubrimiento de implantes de titanio</u>	137
1.- INTRODUCCIÓN	139
1.1.- RECUBRIMIENTO DE IMPLANTES DENTALES DE TITANIO CON QUITOSANO/RHBMP-2.	140
2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	141
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	143
3.1-IMPLANTES DE TITANIO	145
3.1.1.-TRATAMIENTO SUPERFICIAL DE LOS IMPLANTES.	145
3.1.2.-RECUBRIMIENTO DE IMPLANTES CON QUITOSANO/RHBMP-2.	145
3.1.3.-CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LOS IMPLANTES.	145
3.1.4.-ENSAYOS CELULARES SOBRE IMPLANTES DE TITANIO.	146
3.1.5.-MODELO ECTÓPICO DE IMPLANTACIÓN DE MUESTRAS.	146
3.1.6.-ANÁLISIS DE MUESTRAS POR MICROTOMOGRFÍA COMPUTERIZADA.	146
3.1.7.-MODELO DE IMPLANTACIÓN ÓSEA DE LAS MUESTRAS.	146
3.1.8.-ESTUDIO DE LAS MUESTRAS POR RAYOS X.	147
3.1.9.-CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LOS IMPLANTES.	147
3.2.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	147
4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN	149
4.1.-RECUBRIMIENTO DE IMPLANTES DENTALES DE TITANIO CON FILMES DE QUITOSAN/RHBMP-2	151
4.1.1.-TRATAMIENTO SUPERFICIAL DE LOS IMPLANTES	
4.1.2.-ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	151
5.- CONCLUSIONES	155
6.- REFERENCIAS.	161

	163
<u>CAPÍTULO 5.: Evaluación del recubrimiento de cerámicas porosas de β-TCP</u>	169
1.- INTRODUCCIÓN	
2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	171
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	173
3.1.-CERÁMICA POROSA	175
3.1.1.-PREPARACIÓN DE LA CERÁMICA.	177
3.1.2.-RECUBRIMIENTO DE CERÁMICAS	177
3.1.3.-CARACTERIZACIÓN DE LA CERÁMICA:	177
3.1.3.1.-Análisis de la microestructura.	178
3.1.3.2.-Estudio de la estructura.	178
3.1.3.3.-Evaluación de la composición química.	178
3.1.3.4.-Estudio de la porosidad.	178
3.1.3.5.-Estudio de la microporosidad.	178
3.1.3.6.-Ensayo de compresión.	178
3.1.4.-ESTUDIOS DE BIOCMPATIBILIDAD IN VITRO.	178
3.1.5.-ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA SUPERFICIAL DE LAS CERÁMICAS Y ADHESIÓN CELULAR.	179
3.1.6.-COMPOSICIÓN SUPERFICIAL	179
3.1.7.-MODELO DE IMPLANTE EN CALOTA CRANEAL.	179
3.1.8.-ESTUDIOS HISTOLÓGICOS	179
3.2.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	180
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	180
4.1.-CARACTERIZACIÓN DE MATRICES POROSAS B-TCP RECUBIERTAS CON QUITOSANO/RHBMP-2	181
4.2.-ENSAYOS CELULARES E IMPLANTACIÓN DE LAS CERÁMICAS <i>IN VIVO</i> .	183
5.- CONCLUSIONES	188
6.- REFERENCIAS.	191
	193
<u>CONCLUSIONES FINALES</u>	
<u>ANEXO: PUBLICACIONES</u>	197
	205

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.1. Interrelación entre medicina, materiales y biología básica</i>	4
<i>Figura 1.2. Componentes de un implante bioactivo</i>	5
<i>Figura 1.3. Esquema morfológico de la estructura ósea</i>	8
<i>Figura 1.4. Fases en la reparación de una lesión ósea.</i>	14
<i>Figura 1.5: Materiales metálicos utilizados para tejido óseo</i>	16
<i>Figura 2.1. Familia TGF-β.</i>	38
<i>Figura 2.2. Número de publicaciones relacionadas con BMP-2 por año.</i>	39
<i>Figura 2.3. Estructura de la BMP-2.</i>	42
<i>Figura 2.4. Esquema de la ruta de señalización celular de BMP-2.</i>	43
<i>Figura 2.5. (A) Representación del mapa de restricción de la construcción pT7.7/BMP-2. (B) Secuencia nucleotídica codificante de la BMP-2 y la correspondiente secuencia aminoacídica.</i>	49
<i>Figura 2.6. Análisis de las diferentes fases del proceso de producción de rhBMP-2.</i>	50
<i>Figura 2.7. Recta patrón correspondiente al ensayo de proteínas totales</i>	52
<i>Figura 2.8. Chequeo de la integridad del RNA mediante electroforésis.</i>	56
<i>Figura 2.9. Ensayo de proliferación y diferenciación en presencia de rhBMP-2</i>	64
<i>Figura 2.10. Ensayo de respuesta celular a diferentes dosis de rhBMP-2.</i>	65
<i>Figura 2.11. Ensayos colorimétricos sobre células control y tratadas con rhBMP-2.</i>	66
<i>Figura 2.12. Ensayos de tinción celular.</i>	67
<i>Figura 2.13. Ejemplo ilustrativo de la obtención de términos ontológicos</i>	71
<i>Figura 2.14. Representación jerárquica de los términos ontológicos</i>	72
<i>Figura 2.15. Términos estadísticamente significativos obtenidos mediante el KEGG</i>	74
<i>Figura 2.16. Ensayos de migración celular</i>	76
<i>Figura 2.17. Ensayos de ciclo celular y apoptosis por citometría de flujo.</i>	77
<i>Figura 2.18. Ensayo de inducción de migración de células endoteliales.</i>	77

<i>Figura 3.1. Estructura química de quitina y quitosano</i>	90
<i>Figura 3.2. Modelo de degradación de las cadenas de quitosano y liberación de compuestos activos</i>	91
<i>Figura 3.3. Espectro ¹H RMN de quitosano.</i>	100
<i>Figura 3.4. Recta patrón de Absorbancia a 280nm de quitosano en tampón pH4</i>	103
<i>Figura 3.5. Estudio del espesor del filme formado</i>	108
<i>Figura 3.6. Grado de hidratación e hidrofiliicidad superficial de los filmes</i>	109
<i>Figura 3.7. Cinética de disolución de los filmes de quitosano.</i>	111
<i>Figura 3.8. Degradación enzimática de los filmes</i>	113
<i>Figura 3.9. Cinética de proliferación celular y diferentes parámetros celulares.</i>	115
<i>Figura 3.10. Ensayo de adhesión celular.</i>	116
<i>Figura 3.11. Estudio reexpresión génica</i>	117
<i>Figura 3.12. Ensayos de difusión de rhBMP-2.</i>	119
<i>Figura 3.13. Ensayos de actividad de rhBMP-2 de los ensayos de liberación realizados.</i>	120
<i>Figura 3.14. Ensayos de diferenciación celular</i>	121
<i>Figura 3.15. Ensayos de PCR cuantitativa</i>	126
<i>Figura 4.1. Imágenes SEM de la superficie de los implantes</i>	152
<i>Figura 4.2. Imágenes de los implantes utilizados y estructura superficial observada</i>	152
<i>Figura 4.3. Imágenes SEM de la superficie de implantes recubiertos con quitosano</i>	154
<i>Figura 4.4. Ensayos celulares in vitro sobre implantes de titanio.</i>	154
<i>Figura 4.5. Implante de muestras en tejido muscular de ratón.</i>	155
<i>Figura 4.6. Imágenes SEM de la superficie de tornillos recubiertos e implantados.</i>	156
<i>Figura 4.7. Adhesión in vivo de diferentes tipos de células</i>	157
<i>Figura 4.8. Células y estructuras tisulares observadas en implantes recubiertos</i>	158
<i>Figura 4.9. Evaluación del hueso neoformado por técnicas de rayos X.</i>	159
<i>Figura 5.1. espectros de difracción y espectroscopía infrarroja (FT-IR).</i>	184
<i>Figura 5.2. Medidas de porosidad de las cerámicas</i>	186
<i>Figura 5.3. Ensayos de dureza y estudio de la superficie de las cerámicas por SEM</i>	187
<i>Figura 5.4. Adhesión celular a cerámicas control y recubiertas con quitosano</i>	188
<i>Figura 5.5. Cuantificación de la proliferación y diferenciación celular.</i>	189
<i>Figura 5.6. Ensayos de implantación in vivo.</i>	190

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.1. Recopilación de los materiales, factores de crecimiento, cultivos celulares y modelos animales más utilizados en los estudios de regeneración de tejido óseo</i>	18
<i>Tabla 1.2. Materiales en regeneración ósea.</i>	19
<i>Tabla 1.3. Factores y procesos implicados en la regeneración ósea</i>	22
<i>Tabla 1.4. Líneas celulares mas utilizadas para el estudios óseos</i>	24
<i>Tabla 2.1. Hitos en el descubrimiento y uso clínico de las BMPs y BMP-2</i>	37
<i>Tabla 2.2. Términos con los que se relaciona la BMP-2.</i>	40
<i>Tabla 2.3. Listado de cebadores utilizados para los ensayos de PCR cuantitativa.</i>	59
<i>Tabla 2.4. Listado de sondas sobreexpresadas por el tratamiento con rhBMP-2</i>	69
<i>Tabla 2.5. Listado de sondas inhibidas por el tratamiento con rhBMP-2</i>	70
<i>Tabla 2.6. Términos relacionados con procesos celulares y de diferenciación.</i>	73
<i>Tabla 3.1. Características del quitosano de partida utilizado.</i>	107
<i>Tabla 3.2. Genes modificados en cada tratamiento y relación entre los genes de cada tratamiento</i>	122
<i>Tablas 3.3. Comparativas de los términos ontológicos obtenidos tras el estudio completo de los tratamientos</i>	123
<i>Tabla 4.1. Materiales implantables de uso clínico.</i>	139

CAPÍTULO 1:
Introducción

1-INGENIERÍA DE TEJIDOS

La Ingeniería de Tejidos es un campo de investigación emergente profundamente multidisciplinar. También conocida como “Medicina Regenerativa”, concentra y necesita los conocimientos de diferentes ramas de la Ciencia, como son la Biología, la Química, la Ingeniería y la Medicina¹⁻⁷.

El objetivo de esta disciplina es obtener tejidos vivos que puedan reemplazar estructuras o funciones perdidas. En esencia, consiste en fabricar nuevo tejido vivo funcional mediante un soporte (natural, sintético o mezclas de ambos). Para ello se construyen modelos equivalentes a órganos o tejidos, en los que es necesario que las células se organicen y comporten como si formaran parte del tejido original y conseguir así la reconstrucción final deseada.

De manera histórica, esta disciplina entronca con las raíces de la medicina, y en concreto de la cirugía. Con el avance quirúrgico y el desarrollo científico, las técnicas de restauración de la estructura y/o función han ido tomando fuerza. En este sentido, son dos las aproximaciones más utilizadas en la práctica médica para el tratamiento de la pérdida de función de los órganos: **los Transplantes y los Injertos**.

El transplante de un donador a un receptor ha llevado a éxitos espectaculares pero de duración limitada (hígado, corazón, riñón...). Por contra, los autoinjertos evitan problemas de rechazo, pero no son suficientes cuando la pérdida de masa del órgano es excesiva. En estos casos, el desarrollo de materiales (titanio, plástico, fibra de carbono, etc.) ha permitido el diseño de **implantes y prótesis** como soluciones paliativas de la pérdida de tejido.

El papel de la Ingeniería de Tejidos en este contexto supone un nuevo paso adelante en la evolución de los tratamientos sustitorios. 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. Por tanto, se puede considerar derivada de otras áreas del conocimiento.

Por una parte toma conocimientos de la Biología, Biología celular, molecular y bioquímica, para intentar aplicarlas en el diseño de tejidos. Estas áreas están experimentando avances muy considerables y facilitan las herramientas para la comprensión de los sistemas biológicos complejos.

Una segunda rama de conocimiento proviene de la Química, Ingeniería y Materiales, que aporta los conocimientos necesarios para diseñar y construir el soporte sobre el que han de interactuar y desarrollarse las células.

Finalmente, un tercer brazo de conocimiento proviene del área de la Terapia Humana tal como es aplicada por los cirujanos y los médicos, que proporciona el conocimiento práctico de los problemas y necesidades a la hora de la aplicación real de los sistemas desarrollados.

La confluencia de estas ciencias inicialmente tan dispares es lo que permite establecer no solo los objetivos a conseguir sino, más importante aún, cuales son las preguntas a contestar para poder resolver de una forma eficaz el problema existente planteado¹⁻⁷.

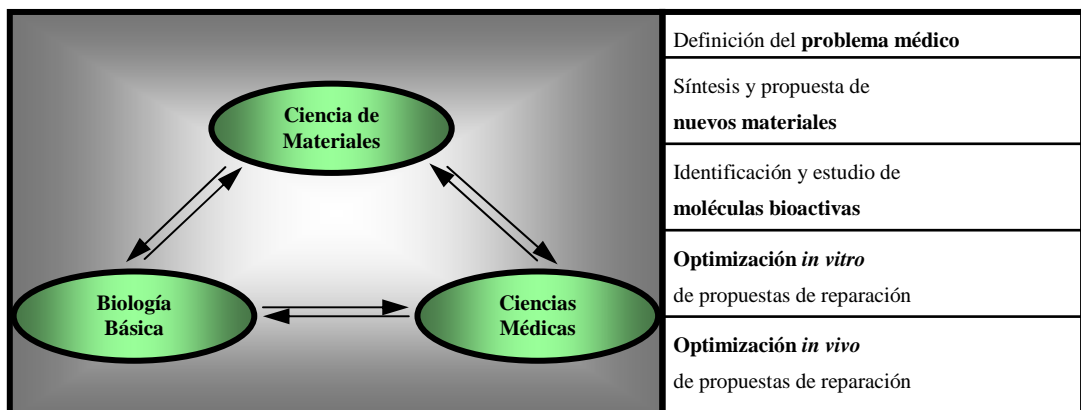


Figura 1.1. Interrelación entre medicina, materiales y biología básica.

La experiencia alcanzada hasta la fecha indica que para la fabricación de nuevos tejidos sustitutorios 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.**

Las **matrices** a utilizar deben poseer algunas características clave definidas por cada tipo de tejido a reparar, por lo que la elección del material a utilizar para una aplicación concreta es crítica^{1, 8, 9}. Su función principal es dirigir el crecimiento de las células que formarán el nuevo tejido. Esta matriz debe proporcionar por tanto un sustrato adecuado

que permita la adhesión celular, su proliferación, la realización de sus funciones diferenciadas y en ciertos casos, la migración celular^{10, 11}.

En este sentido, resulta fundamental estudiar y comprender el comportamiento celular en circunstancias normales de la vida, para simular después las condiciones de regeneración en el sistema a plantear. Las circunstancias biológicas que permiten a las células crear o recrear tejidos han de ser tenidas en cuenta para el diseño racional de modelos de regeneración.

La experiencia clínica indica que en todos los procesos regenerativos naturales es fundamental la presencia de señales biológicas que dirigen, organizan y estimulan este proceso. Esto motiva que se considere cada vez más importante incorporar **moléculas bioactivas** en la matriz a implantar.

El conseguir una liberación controlada y localizada de moléculas activas proporciona una poderosa herramienta para ayudar a la regeneración de tejidos. Esta incorporación provoca a su vez requerimientos especiales para el proceso de fabricación del material a implantar, puesto que estas moléculas pueden quedar inactivadas por exposición a altas temperaturas o a un entorno químico hostil.

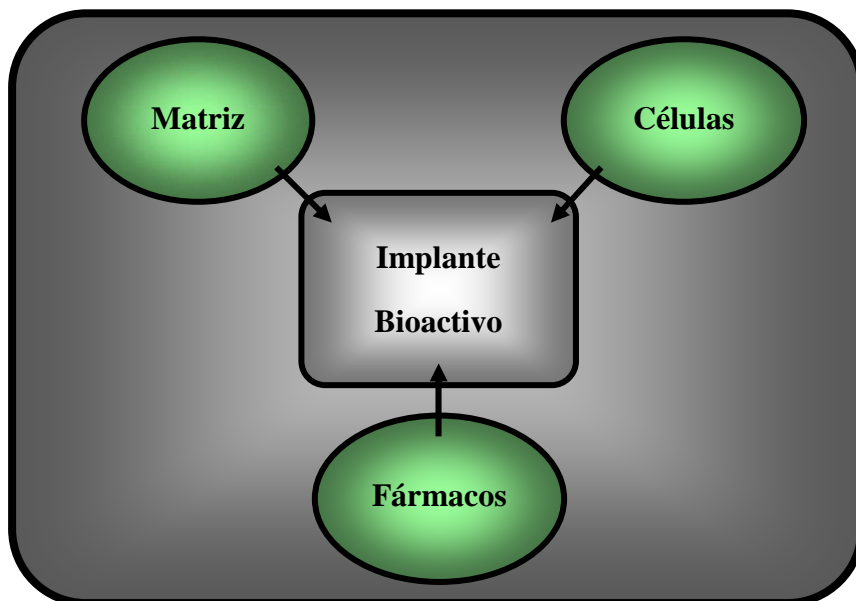


Figura 1.2. Componentes de un implante bioactivo.

Finalmente, los materiales sobresimplificados pueden ser un factor limitante del éxito, si no son capaces de alguna manera de suministrar las señales requeridas para la movilización de todo el mecanismo restaurador del organismo.

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.

2-TEJIDO ÓSEO

El hueso es un tejido conectivo especializado que juntamente con el cartílago forma el sistema esquelético. 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)¹².

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. Habitualmente, la dinámica del hueso es suficiente para reconstruir los defectos comunes, no obstante, para pérdidas masivas de masa tisular (accidentes, cirugías realizadas para la resección de cáncer óseo...) se hace necesario recurrir al aporte de sustitutivos óseos para obtener la reparación.

Se denominan **sustitutivos óseos** a todos los tejidos o materiales que pueden emplearse para rellenar defectos del hueso, con el objetivo de obtener la regeneración y reparación del tejido óseo. De acuerdo con esto, podemos reconocer dos tipos fundamentales de sustitutivos, los **injertos óseos**, que corresponden a fragmentos de hueso natural implantables, y los **biomateriales**, diseñados y manufacturados para mimetizar algunas de las propiedades intrínsecas el hueso natural.

El material preferido para el tratamiento de lesiones de hueso es el mismo tejido óseo, ya sea proveniente del propio paciente o bien de un individuo donante. El autoinjerto óseo esponjoso es probadamente el mejor procedimiento, pero presenta, sin embargo, importantes limitaciones como pueden ser la reducida cantidad de tejido óseo disponible y la potencial morbilidad de los sitios donantes.

Debido precisamente a las limitaciones descritas, numerosos grupos de investigadores han trabajado arduamente durante estas últimas décadas en el desarrollo, formulación y síntesis de diferentes biomateriales que puedan tener utilidad como sustitutivos óseos, evaluándolos mediante estudios *in vitro* e *in vivo* para definir sus aplicaciones clínicas potenciales.

2.1- ESTRUCTURA DEL HUESO

El hueso está compuesto por una **matriz ósea**, que representa alrededor de un 98.0 % del volumen, y **células específicas**, que representan el 2.0 % restante. Aproximadamente un 20.0 % de su volumen se encuentra constituido por agua y almacena casi el 99.0 % del calcio del organismo, lo que equivale aproximadamente a 1.200 g. El tejido óseo es un tejido en continua remodelación debido a las tensiones mecánicas que soporta. Las fuerzas que actúan sobre él modifican constantemente su forma, de tal manera que la presión condiciona su reabsorción y la tensión da lugar a la neoformación ósea¹³.

El conjunto de 206 huesos del organismo conforma el esqueleto, que presenta un peso medio de aproximadamente 9 kg. 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.).

El hueso largo está formado por tres partes diferenciadas (Figura 1): dos extremos anchos (epífisis), en el medio un tubo más o menos cilíndrico (diáfisis) y la zona intermedia entre estas dos partes (metáfisis) que es la que se encuentra en continuo desarrollo. La epífisis y la metáfisis se originan a partir de dos centros de osificación independientes y durante el crecimiento están separadas por una capa de cartílago llamada cartílago epifisiario o plataforma de crecimiento que realiza el proceso de calcificación.

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). El hueso cortical constituye la mayor parte de la diáfisis de los huesos largos así como de la parte externa de todos los huesos del cuerpo. Tiene una estructura de láminas o anillos concéntricos alrededor de canales centrales llamados canales de Havers que se extienden longitudinalmente. Los canales Haversianos están conectados entre sí por otros canales llamados canales de Volkmann, que perforan el periostio. Ambos canales son utilizados por los vasos sanguíneos, linfáticos

y nervios para extenderse por el hueso. Entre las láminas concéntricas de matriz mineralizada hay pequeños orificios o lagunas donde se encuentran los osteocitos. Estas células intercambian nutrientes con el líquido intersticial a través de una serie de canalículos por donde se extienden prolongaciones celulares citoplasmáticas. Los canalículos están conectados entre sí y, eventualmente, a los canales de Havers. El canal Harvesiano junto con las láminas concéntricas que lo rodean, las lagunas, los canalículos y los osteocitos recibe el nombre de osteona. Las restantes láminas entre osteonas se llaman láminas intersticiales.

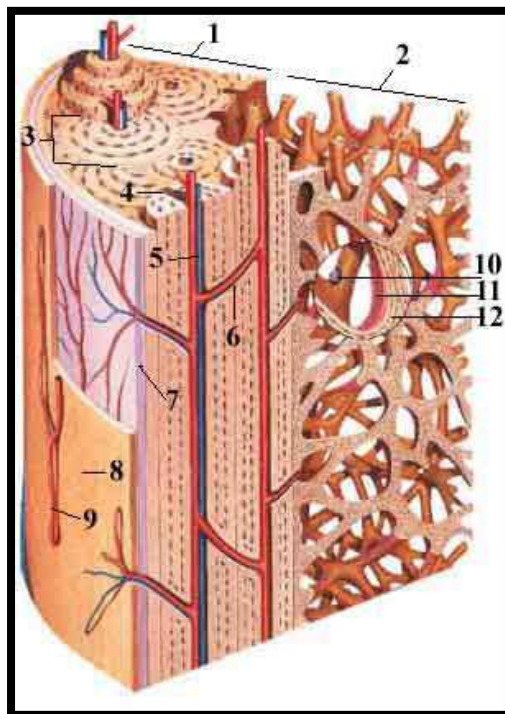


Figura 1.3. Esquema morfológico de la estructura ósea: hueso cortical y hueso trabecular. 1: Hueso cortical. 2: Hueso trabecular. 3: Sistema de Havers 4: Vaso sanguíneo. 5: Canal de Havers. 6: Canal de Volkmann. 7: Periostio. 8: Revestimiento óseo. 9: Vasos del periostio. 10: Osteoclastos. 11: Osteoblastos. 12: Osteocitos.

A diferencia del hueso compacto, el hueso trabecular no contiene osteonas, sino que las láminas intersticiales están dispuestas de forma irregular formando unos tabiques o placas llamadas trabéculas. Estos tabiques forman una estructura esponjosa dejando huecos que están llenos de médula ósea roja.

Dentro de las trabéculas están los osteocitos que yacen en sus lagunas con canalículos que irradian desde las mismas. En este caso, los vasos sanguíneos penetran directamente en el hueso esponjoso y permiten el intercambio de nutrientes con los osteocitos.

El hueso esponjoso es el principal constituyente de las epífisis de los huesos largos y del interior de la mayor parte de los huesos planos. En la superficie de las trabéculas se encuentran dos tipos celulares encargados del mantenimiento del tejido óseo. Por un lado tenemos los osteoblastos (precursores de los osteocitos) que son las células encargadas de la síntesis y deposición de la matriz ósea y su posterior mineralización y por otro lado los osteoclastos que son los encargados de la destrucción de las superficies óseas para la posterior reposición de matriz nueva.

Las distintas cargas que actúan sobre los huesos del esqueleto se encuentran relacionadas con las diversas actividades del individuo, tanto compresivas, como de tracción o de cizalladura. El hueso esponjoso soporta principalmente fuerzas de compresión, en cambio, el hueso cortical debe soportar fuerzas de compresión, tracción y cizalladura. En líneas generales, la fase mineral del hueso le confiere su resistencia a la compresión y cizalladura, mientras que el colágeno le proporciona su resistencia a la tracción¹³.

2.2.- CONSTITUYENTES DEL TEJIDO ÓSEO

2.2.1.-LA MATRIZ ÓSEA

La matriz ósea es la responsable de las propiedades biomecánicas del hueso y se encuentra mineralizada. Esta matriz está formada por una fase mineral y una fase orgánica (un 65% material cristalino inorgánico y un 35% matriz orgánica). La fase orgánica está formada por fibras de colágeno tipo I orientadas en una dirección preferencial (90% de la proteína total), por proteínas no estructurales de menor tamaño (osteocalcina, osteonectina, fosfoproteínas, sialoproteínas, factores de crecimiento, proteínas séricas, etc.), y por glicosaminoglicanos y lípidos. La fase mineral está formada por iones de fosfato cálcico depositados en forma de cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) entre las fibras de colágeno.

Las fibras de colágeno proporcionan flexibilidad y resistencia a la tensión mientras que las sales minerales confieren dureza, rigidez y resistencia a la compresión.

2.2.2- LAS CÉLULAS ÓSEAS

En el hueso existen principalmente dos tipos celulares; los osteoblastos y los osteoclastos. Existe un tercer tipo celular que deriva de la diferenciación terminal de los osteoblastos, llamados osteocitos. Las células óseas aunque constituyen menos del 2% del volumen total del hueso, protagonizan el desarrollo y remodelado del esqueleto a través de la actividad que llevan a cabo.

2.2.2.1 Osteoblastos:

Los osteoblastos son las células responsables de la formación ósea y del mantenimiento de la arquitectura esquelética. Su función principal es la síntesis y deposición de las proteínas de la matriz del hueso (osteóide). Son células cuboidales con núcleos redondos y citoplasma basófilo que normalmente se encuentran en la superficie ósea (periostio y endostio) formando una única monocapa adherente. Los osteoblastos activos presentan las características de una célula secretora con un prominente complejo de Golgi y una gran cantidad de cisternas de retículo endoplasmático rugoso. Son células polarizadas que presentan el núcleo celular en posición distal respecto a la superficie celular, poseen regiones especializadas de la membrana plasmática modificada para el tráfico y la secreción vesicular y para establecer uniones con los osteoblastos adyacentes¹⁴.

Estas células contienen grandes cantidades de fosfatasa alcalina, enzima que se encuentra en su membrana plasmática y que desempeña un importante papel en el control de la mineralización ósea. Están separadas de la matriz ósea mineralizada por una fina capa de matriz no mineralizada y regulan la diferenciación y actividad de los osteoclastos. De esta manera, los osteoblastos, juntamente con los osteoclastos, juegan un papel importante en el recambio óseo y en la homeostasis del calcio.

Los osteoblastos derivan de células progenitoras de origen mesenquimal (MSC: Mesenchymal Stem Cells) localizadas en la superficie del periostio y en el estroma de la médula ósea. Las células mesenquimales progenitoras o MSC presentan un amplio abanico de posibilidades para la diferenciación, transformándose en mioblastos, fibroblastos, adipocitos, condrocitos u osteoblastos en función de los factores de crecimiento o diferenciación que intervengan.

Los osteoblastos son células especializadas que **no están diferenciadas terminalmente**. Durante el proceso de formación ósea los osteoblastos pueden quedar embebidos en la

matriz ósea donde se diferencian hacia un estadio maduro dando lugar a los osteocitos. Otro posible destino de las células osteoblásticas es convertirse en células de revestimiento (células del endosito o “*living cells*”) las cuales a través de la secreción de factores locales parecen desarrollar un importante papel en el control del remodelado óseo. Por último, algunos osteoblastos activan su mecanismo apoptótico antes de quedarse embebidos en la matriz ósea¹⁴.

2.2.2.2 Osteocitos

Los osteoblastos totalmente diferenciados que quedan embebidos en la matriz ósea mineralizada se convierten en osteocitos (aproximadamente entre el 10-20% de los osteoblastos) que residen en el interior de las lagunas de hueso mineralizado. Tienen disminuida la secreción de proteínas de la matriz debido a la falta de difusión nutricional ya que su única fuente de nutrientes y de intercambio gaseoso es a través de los canalículos que se han ido formando durante la mineralización. Los osteocitos se comunican con los osteoblastos y células de revestimiento de la superficie ósea a través de “*gap junctions*” que hay entre los canalículos.

Los osteocitos tienen una morfología variable en función de su edad. Comparten gran parte de las características ultraestructurales con los osteoblastos pero tienen disminuido el volumen celular y la importancia de los organelos celulares implicados en la síntesis proteica. El destino final de los osteocitos es el de ser resorbidos por los osteoclastos, tras su apoptosis, juntamente con el resto de elementos que forman la matriz ósea. Hasta hace algunos años no se había considerado que los osteocitos pudieran ser una pieza clave del metabolismo óseo pero en estudios recientes se ha descrito la importante función que tienen como mecanosensores y en la activación local del remodelado¹⁵.

2.2.2.3 Osteoclastos

Son células móviles gigantes, ampliamente ramificadas, que presentan un citoplasma acidófilo, varios núcleos y numerosos lisosomas con enzimas proteolíticas. Pertenecen a la familia de los monocitos y macrófagos y derivan de la fusión de células mononucleadas que, a su vez, provienen de células madres hematopoyéticas.

Se disponen sobre las superficies óseas de manera aislada o en grupos poco numerosos y su función principal es el control de la homeostasis del calcio mediante la reabsorción del tejido óseo, luego que este proceso es iniciado por los osteoblastos. Para ello se desplazan con un movimiento de vaivén, parecido al del cepillo de un carpintero,

sobre un territorio varias veces superior a la superficie de la célula, que se denomina dominio osteoclástico.

Los osteoclastos degradan la fracción orgánica de la matriz ósea mediante la producción de dos tipos de enzimas lisosómicas; las cisteínproteinasas (como la fosfatasa ácida tartrato resistente) que funcionan con pH ácido y las colagenasas, que actúan a pH neutro. La reabsorción ósea se desarrolla en dos fases, primero se solubiliza el mineral y luego se digiere la matriz orgánica, hasta que finalmente los osteoclastos mueren por apoptosis. La comunicación entre los osteoclastos y las demás células óseas se realiza de forma indirecta, mediante intermediarios químicos, factores paracrinos y factores de unión de la matriz¹⁶.

2.3 REPARACIÓN O CONSOLIDACIÓN ÓSEA

Cuando un hueso es sometido a fuerzas que superan su resistencia mecánica se origina su fractura, desencadenándose tras ella el proceso de consolidación o reparación ósea, que tiene como objetivo restablecer la estructura tisular y las propiedades mecánicas originales.

La consolidación comienza con la estabilización otorgada por los callos periósticos y endósticos, proceso que restablece la continuidad de los extremos de fractura. Cuando la fractura se maneja en condiciones de estabilidad óptima por medio de la reducción anatómica y compresión interfragmentaria no se forma el callo perióstico, denominándose a este proceso consolidación primaria.

La siguiente fase corresponde al establecimiento de una unión ósea entre los fragmentos fracturados. Si durante este periodo la fractura carece de condiciones de estabilidad, se puede generar una pseudoartrosis hipertrófica, debido a la persistencia de tejido fibroso. Sin embargo, el proceso tolera un pequeño margen de movimiento, que incluso es capaz de estimular la consolidación ósea. En la fase final del proceso de reparación el tejido óseo neoformado experimenta fenómenos de remodelación que se mantienen hasta conseguir la resistencia inicial del hueso lesionado.

Por tanto, la consolidación ósea se desarrolla en tres etapas secuenciales que se superponen en el tiempo, que corresponden a las fases de inflamación, reparación y remodelación.

2.3.1.- FASE DE INFLAMACIÓN

Los traumatismos causantes de las fracturas lesionan las células, vasos sanguíneos y matriz del tejido óseo y también comprometen los tejidos adyacentes como periostio y músculos.

De esta forma, se establece un hematoma de fractura que es la base del proceso de consolidación. La lesión vascular interrumpe el aporte sanguíneo a los osteocitos y por ello en los extremos de fractura no se encuentran células vivas. Los mediadores de la inflamación liberados por las plaquetas y demás células lesionadas provocan vasodilatación y la aparición de un exudado plasmático que lleva al edema agudo.

Entre las células inflamatorias que migran al foco de fractura se encuentran leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y linfocitos. En la medida que disminuye la reacción inflamatoria, el tejido necrótico y el exudado plasmático son reabsorbidos y los osteoblastos se encargan de producir una nueva matriz ósea.

2.3.2.- FASE DE REPARACIÓN

El proceso de consolidación es estimulado por factores quimiotácticos liberados en la fase previa y las proteínas de la matriz expuestas por la desorganización tisular. La organización del hematoma de fractura proporciona un soporte de fibrina que facilita la migración celular, proliferación y síntesis de matriz ósea. En este estado el microambiente a nivel del foco de fractura es ácido por falta de irrigación, pero en la medida que el proceso avanza el pH se va alcalinizando progresivamente. Cuando los extremos de fractura se necrosan son reabsorbidos por los osteoclastos, lo que permite que los vasos periósticos aporten los brotes vasculares que inician la reparación. En este estadio la fosfatasa alcalina alcanza su nivel de actividad máximo, favoreciendo el inicio de la mineralización del callo óseo.

Las células mesenquimáticas pluripotenciales del foco de fractura y del torrente sanguíneo son las responsables de la neoformación ósea. La composición del callo óseo se modifica a medida que progresa la consolidación, de tal forma que las células sustituyen el coágulo de fibrina por una matriz fibrosa que contiene colágeno tipo I y III, proteoglicanos y glicosaminoglicanos. Posteriormente el tejido fibroso se transforma en fibrocartilago, con un importante contenido de colágeno tipo II, proteoglicanos específicos y proteínas de unión.

Finalmente, se produce la mineralización de la matriz ósea en paralelo a un aumento de la concentración de colágeno tipo I, fosfatasa alcalina y proteínas no colágenas, proceso que concluye con la osificación de la masa fusiforme del callo que

envuelve los extremos fracturarios y que contiene cantidades crecientes de hueso inmaduro.

2.3.3.- FASE DE REMODELACIÓN

Corresponde a la última fase del proceso de reparación o consolidación en la que se sustituye el hueso inmaduro del callo óseo por hueso laminar. Una vez que se ha reemplazado todo el hueso neoformado, el proceso de remodelación continúa con la reabsorción de las trabéculas mal orientadas por parte de los osteoclastos y su sustitución por otras nuevas adaptadas a las líneas de fuerza. Cuando la remodelación del callo óseo concluye completamente, se recuperan las propiedades mecánicas originales del hueso comprometido.

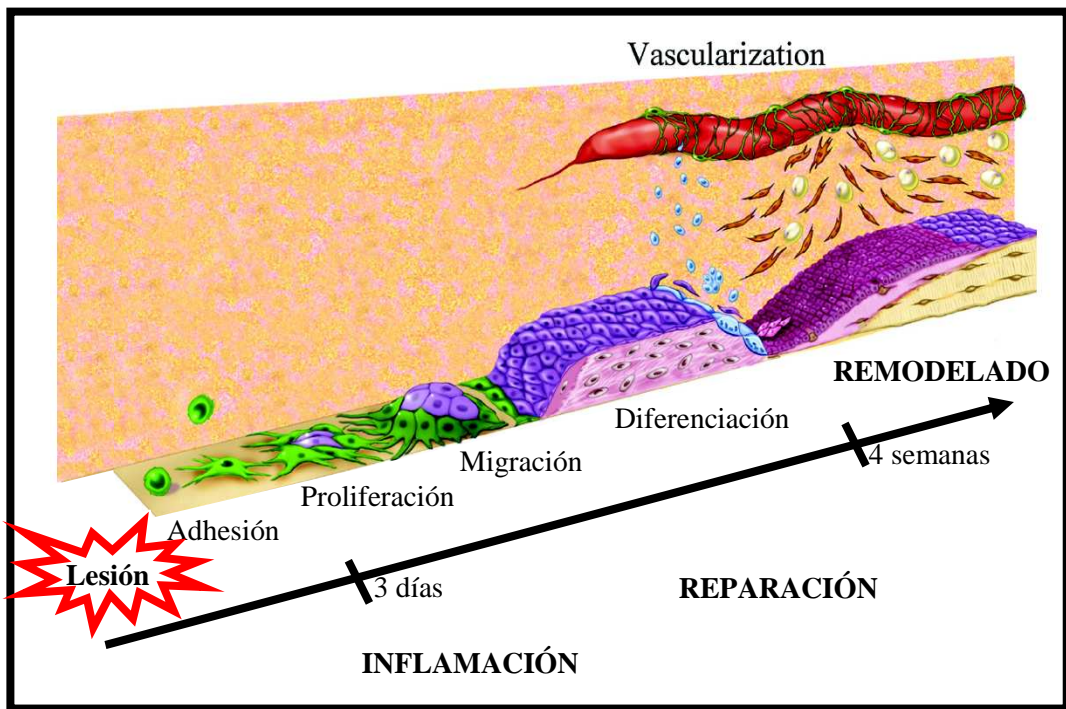


Figura 1.4. Fases en la reparación de una lesión ósea.

2.4-INJERTOS ÓSEOS

El proceso de reparación ósea es un proceso que generalmente se da de manera natural. Sin embargo, en los casos de fractura ósea grave, pérdida de hueso, o en aquellos casos en los que el hueso no se regenera adecuadamente, se hace necesaria la utilización de sustitutos óseos o injertos.

La incorporación de los injertos es un proceso dinámico simultáneo de reabsorción de hueso necrótico y neoformación ósea. La integración de los injertos óseos se puede definir como el proceso de interdigitación y englobamiento del hueso del donante por el nuevo tejido óseo que forma el receptor, y tiene muchas semejanzas con la reparación o consolidación de las fracturas.

Tradicionalmente los defectos óseos se han tratado implantando tejido óseo autólogo, heterólogo (allogénico o xenogénico), o mediante la implantación de materiales sustitutos en otros casos:

Autoinjertos. La estrategia más usada durante años para solucionar problemas óseos ha sido el implante de injertos autólogos. Este proceso involucra la toma de un fragmento de hueso del paciente de una zona no lesionada para su posterior trasplante en la zona de la lesión. Las principales características que lo convierten en el tratamiento quirúrgico actual de elección son sus propiedades osteoconductoras, osteoinductivas y osteogénicas:

Osteoconductoras, 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.

Aunque los autoinjertos presentan buenos porcentajes de éxito y evitan problemas inmunológicos, en muchos casos no es posible su uso debido, ante todo, a la cantidad limitada de tejido que puede ser tomada y a la morbilidad en el sitio de extracción.

Alloinjertos. Los alloinjertos implican la toma y procesamiento del hueso de un cadáver y luego su trasplante al paciente. 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; además, puede causar una

reacción inmune y existe la posibilidad de transmisión de agentes patógenos del donante al huésped.

Xenoinjertos. Los xenoinjertos consisten en la utilización de fragmentos de hueso obtenidos de animales de diferente especie. Su uso se encuentra prácticamente limitado al relleno de orificios óseos, como material inorgánico, mas que a la consecución de estructuras definidas.

Materiales implantables. Existen implantes de materiales que no tienen su origen en seres vivos, como metales, plásticos y cerámicos. Para considerar un material como sustitutivo óseo, este debe ser capaz de proporcionar ciertas funciones características que permitan la regeneración del tejido. Además de proporcionar un **soporte estructural**, el material a injertar ha de poseer al menos propiedades **osteconductivas**, aportando una estructura capaz de guiar la neoformación y aposición ósea. Para ello, el material a implantar ha de permitir una correcta adhesión, migración y proliferación celular. Las propiedades **osteinductoras**, que corresponden a la capacidad de promover la síntesis de matriz ósea mineralizada mediante el reclutamiento de células osteoformadoras, aunque deseables, son menos frecuentes. Finalmente, ha de permitir una correcta **osteogénesis**, generada con el aporte de tejido óseo que contenga células osteoformadoras vitales.

Los materiales utilizados actualmente presentan varias desventajas, ya que están sujetos a fenómenos de fatiga, fractura, toxicidad y desgaste. A diferencia del hueso natural, no se remodelan con el tiempo. Por ejemplo, un implante metálico no crece con el paciente y no puede cambiar su forma en respuesta a las cargas a las que es sometido. También es común que se presenten problemas de integración del implante con los tejidos adyacentes, puesto que no pueden adherirse a éste de forma correcta y creándose de esta manera deficiencias de tipo mecánico.

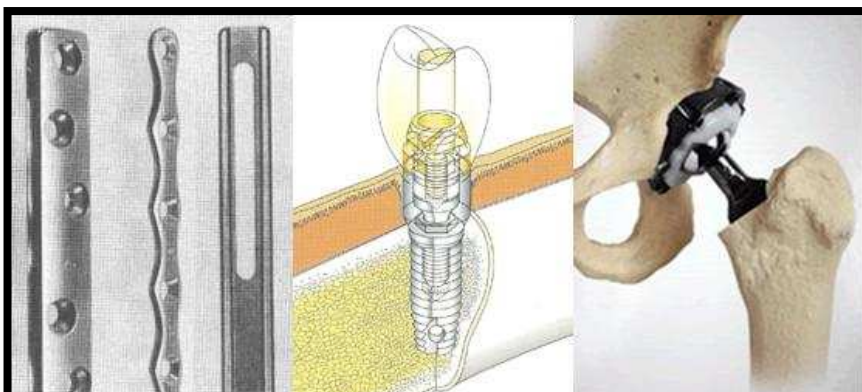


Figura 1.5: Materiales metálicos utilizados para tejido óseo.

3-INGENIERÍA DE TEJIDOS ÓSEOS

Como hemos visto hasta ahora, actualmente es el injerto óseo la herramienta fundamental para sustituir tejido óseo dañado. El injerto más adecuado corresponde al autólogo, aunque esto supone la extracción de hueso procedente de otra región quirúrgica para su implantación y restauración del capital óseo perdido. El área de Ingeniería de tejidos óseos surge precisamente con la búsqueda nuevas técnicas para la regeneración tisular que permitan sustituir las actuales por otras más eficientes^{17, 18}.

Existen multitud de aproximaciones para la regeneración del tejido óseo, que se sustentan, principalmente, en la implantación en el área de la lesión ósea de alguno de estos tres pilares: moléculas morfogenéticas, matrices portadoras y células formadoras del tejido¹⁹⁻²².

La evaluación de los compuestos que se proponen precisa de un modelo de regeneración *in vivo*. En este sentido se presentan multitud de variables a evaluar tales como tipo de animal a tratar, tamaño del daño a reparar, tiempo de reparación esperado, etc.

En general, se pretende obtener matrices capaces de mantener la estabilidad biomecánica del hueso y que faciliten la adhesión, proliferación y diferenciación celular, verdadero eje de la regeneración del tejido óseo. Por otro lado es fundamental la correcta integración del material empleado o su degradación gradual y predecible, de forma que permita la formación del nuevo tejido²³.

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 debe ser tenido en cuenta en el diseño inicial siempre que sea posible.

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^{24, 25}.

Para el estudio de todos estos componentes resulta fundamental el desarrollo de modelos *in vitro*. Estos modelos permiten entender mejor como funciona la construcción tisular diseñada para la reparación, así como saber cual es la distribución espacio-temporal

de los diferentes factores que actúan en él y mejorar, por tanto, el conocimiento básico del proceso de osteogénesis²⁶⁻²⁸. Estos estudios han de realizarse Tanto con los diferentes componentes por separado (Material, células y factores) como en conjunto.

Tabla 1.1. Recopilación de los materiales, factores de crecimiento, cultivos celulares y modelos animales más utilizados en los estudios de regeneración de tejido óseo.

Materiales	Factores	Cultivos celulares	Experimentación animal	Modelos <i>in vivo</i>
Metales	BMPs	Líneas óseas.	Rata	1)Injerto ectópico
Cerámicas	IGF	Líneas no óseas.	Ratón	2)Injerto óseo:
Polímeros	TGF-β	Cultivos primarios.	Conejo	Fractura tibial
	FGF		Perro	Osteotomía en
	VEGF		Cabra	calota
	PDGF		Cerdo	Osteotomía en
	KGF			radio

3.1- MATERIALES.

Los biomateriales que tienen utilidad como sustitutos óseos son aquellos que, al ser implantados, tienen la capacidad de promover la regeneración o reparación ósea. Se considera que los biomateriales ideales son aquellos que progresivamente son sustituidos por tejido óseo neoformado del hueso receptor²⁹⁻³¹. Si es posible se intenta activar estos materiales con biomoléculas, de forma que la liberación de estos factores dote al biomaterial de propiedades osteoinductivas, pudiendo provocar la neoformación ósea³²⁻³⁶. Los materiales más utilizados son las cerámicas de fosfatos de calcio, puesto que este es el compuesto mineral óseo mayoritario. Las matrices de colágeno también son muy frecuentes, así como los sulfatos cálcicos, el ácido poliláctico, el ácido poliglicólico y diversos otros biomateriales

En general, las matrices tridimensionales utilizables en Ingeniería de Tejido Óseo deben satisfacer ciertos criterios mecánicos, de biocompatibilidad, porosidad, osteoconductividad, osteoinductividad, biodegradabilidad, etc. específicos para la regeneración de este tejido.

Tabla 1.2. Materiales en regeneración ósea.

Material	Aplicación
Polímeros	Liberación controlada, Ingeniería de tejidos.
Metales	Placas de osteosíntesis, clavos, tornillos, implantes dentales.
Cerámicas y biovidrios	Protésis de cadera, rellenos óseos.

3.1.1.-MATERIALES POLIMÉRICOS

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.

3.1.2.-MATERIALES POLIMÉRICOS NATURALES

En la fabricación de matrices biomiméticas se trabaja con compuestos propios de la matriz extracelular tales como colágenos, proteoglicanos, glicosaminoglicanos o hialuronanos. Todos ellos son compuestos que se denominan **polímeros naturales** y de entre ellos los colágenos son los más estudiados. El colágeno tipo I es el componente principal de la fase orgánica del hueso, por lo que las esponjas de colágeno tipo I se utilizan ampliamente.

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 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 y que se ha utilizado ampliamente en el desarrollo de los trabajos presentados en esta Tesis Doctoral como un material adecuado para la regeneración del tejido óseo.

3.1.3.-MATERIALES POLIMÉRICOS SINTÉTICOS

Los **polímeros sintéticos** más estudiados son los poliésteres y los polianhídridos por sus 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 y los ácidos poliglicólicos 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 hidrofiliidad.

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

El politetrafluoroetileno (PTFE) se usa ampliamente en la regeneración ósea guiada, actuando como barrera para las poblaciones celulares indeseadas. El principio fundamental de esta técnica radica en que, cuando se produce un defecto tisular, este se coloniza por la población celular del entorno con la cinética de reproducción más elevada. Con esta técnica al mismo tiempo que se aporta un sustrato de migración celular que permita la regeneración ósea, se suministra una membrana que funciona como barrera protectora frente al tejido conectivo circundante.

3.1.4.-MATERIALES CERÁMICOS

Los estudios relacionados con las cerámicas para su aplicación en el campo de la medicina comenzaron hace unos 20 años. Hoy día la mayoría de los sustitutos óseos de uso clínico están basados en este tipo de materiales por las diferentes características de dureza, degradación y porosidad que se pueden obtener.

Las primeras cerámicas que fueron utilizadas en aplicaciones médicas, la alúmina y la zirconia, son dos prototipos de cerámicas conocidas como **inertes**, razón fundamental por lo que fueron elegidas para su utilización en implantes. Poseen una elevada estabilidad *in vivo*, gran resistencia mecánica, óptima biocompatibilidad y una influencia nula o muy pequeña en el tejido óseo aledaño.

Las cerámicas **porosas inertes** proporcionan una buena estabilidad mecánica debido a su fijación biológica, ya que permiten la colonización ósea en el interior de sus poros. Las mejores representantes de este grupo son las cerámicas de carbonato de calcio (CaCO_3) derivadas del coral.

Los fosfatos de calcio son por el contrario **cerámicas bioactivas**, puesto que reaccionan químicamente con los fluidos fisiológicos para producir hueso neoformado. El fosfato de calcio más utilizado en la fabricación de implantes es la hidroxiapatita, por ser el compuesto más parecido al componente mineral de los huesos y presentar buenas propiedades como biomaterial, tales como biocompatibilidad, bioactividad, osteoconductividad y unión directa al hueso. Sin embargo, sus propiedades mecánicas son inferiores a las de las cerámicas bioinertes y tiene una cinética de degradación muy lenta.

3.2-FACTORES DE REPARACIÓN ÓSEA

Durante el proceso de regeneración tisular actúan diferentes factores de crecimiento, cada una de ellos en diferentes fases de la reparación. El conocimiento de la función de los factores de crecimiento en este proceso ha llevado a intentar incorporar estas moléculas mediante técnicas variadas en los compuestos utilizados en la Ingeniería de tejidos óseos.

La matriz ósea extracelular constituye una importante reserva de factores de crecimiento, especialmente los sintetizados por las células óseas como IGF, TGF- β , FGF y PDGF. Los IGF (Insulin Growth Factors) regulan el crecimiento celular y determinan la calcificación de la matriz ósea. Las TGF- β (Transforming Growth Factor β) cumplen un importante rol en los procesos de formación y mineralización de la matriz ósea. El FGF (Fibroblast Growth Factor) estimula la proliferación de células indiferenciadas en proceso de reparación ósea y también es capaz de promover la neoangiogénesis. Finalmente, el PDGF (Platelet Derived Growth Factor) estimula la proliferación de fibroblastos y osteoblastos. Una mención especial en este apartado de factores implicados en la formación ósea merecen las BMPs (Bone Morphogenetic Proteins). De entre todos los factores que intervienen en este proceso, son sin duda las que más interés han despertado, puesto que inducen la diferenciación celular hacia fenotipos osteoblásticos.

El aislamiento de diversos factores bioactivos y la posibilidad de obtenerlos con técnicas ingeniería genética ha permitido un desarrollo promisorio de sustitutivos con propiedades osteoinductoras.

Tabla 1.3. Factores y procesos implicados en la regeneración ósea

Factores implicados	Factores Plaquetarios: KGF, TGF- β , FGF, VEGF, PDGF	Factores específicos de regeneración ósea: BMPs, IGF, TGF- β
Procesos de la regeneración ósea	Epitelización. Angiogénesis. Migración y proliferación Celular. Síntesis de Matriz Extracelular.	Formación de tejido óseo. Síntesis de Matriz extracelular. Apoptosis y remodelado óseo.

3.3- MODELOS Y CULTIVOS CELULARES

Hoy día los cultivos celulares son una herramienta valiosa y su uso está generalizado como un modelo obligado de estudio previamente a la experimentación *in vivo*. Su uso ha permitido grandes avances en el conocimiento de la biología celular básica y, entre otras aplicaciones, permite estudiar *in vitro* la respuesta del organismo a posibles tratamientos. Específicamente, permiten estudiar los mecanismos de respuesta a los fármacos administrados, así como caracterizar y optimizar diferentes materiales para su uso clínico.

Los cultivos celulares han servido para estudiar el proceso de diferenciación celular ósea. En este sentido, se han estudiado los mecanismos de regulación implicados en el proceso, moléculas que intervienen, etc. De esta manera se han identificado una serie de marcadores que caracterizan la diferenciación celular a osteoblastos, como pueden ser la producción de fosfatasa alcalina, de osteocalcina, síntesis de colágeno, y otros²⁶⁻²⁸.

La fuente de las células usadas en Ingeniería de Tejidos depende de muchos factores, entre los que hay que tener en cuenta los requerimientos funcionales existentes, la posibilidad de realización técnica y consideraciones económicas. La capacidad de separar, cultivar y manipular algunos tipos celulares a menudo limita su posibilidad de aplicación. En general, tanto para el estudio en laboratorio como para la implantación y regeneración de tejido óseo son dos los tipos de células más utilizadas: Osteoblastos y células osteoprogenitoras. En este último caso, se utilizan tanto células madre embrionarias como células madre mesenquimáticas, procedentes de tejido adulto.

Cuando se utilizan las células como un componente del material implantable, la masa de tejido a reemplazar es un factor crítico, puesto que determina el número de células que se necesitan. Se debe evaluar por tanto la capacidad técnica de aumentar la escala del cultivo celular *in vitro*. Algunas veces, el implante se basa en un crecimiento de células *in vivo* tras la implantación, de forma que la expansión de células *in vitro* es menos crítica. Un ejemplo de este tipo lo constituyen los trasplantes en médula ósea, ya que las células de la médula poseen el potencial de reconstituir rápidamente el tejido receptor sin necesidad de una expansión *in vitro* previa significativa. Sin embargo, en la mayor parte de los casos la expansión del número de células previamente a la implantación es algo necesario.

Para seleccionar los materiales adecuados en la regeneración de tejido óseo es necesario comprender la influencia del material a implantar en la viabilidad, el crecimiento y la función celular. Las interacciones de las células con los materiales se estudian mediante el uso de técnicas de cultivos celulares, sembrando los tipos celulares

seleccionados sobre la superficie del mismo. La adhesión celular a una superficie es crítica, ya que precede a cualquier otro fenómeno que tenga lugar, como la extensión de la célula sobre la superficie, la migración y la diferenciación celular. Aunque los experimentos *in vitro* no reproducen todo el amplio espectro de respuestas celulares observadas tras la implantación de biomateriales, el cultivo celular permite un nivel de control y de cuantificación que no se obtiene *in vivo*. Además, es necesario estudiar las características físico-químicas de la matriz generada, su degradación, peso molecular, volumen, tasa de absorción de agua y liberación de factores si los tuviera, a fin de entender la respuesta obtenida en los ensayos *in vivo*.

Tabla 1.4. Líneas celulares mas utilizadas para el estudios óseos.

Modelo Celular	Fuente	Fenotipo
C2C12	Músculo de ratón adulto	Mioblástico/ Osteoprogenitor
ST2	Médula ósea de ratón adulto	Osteoprogenitor
MC3T3-E1	Cráneo de feto de ratón	Osteoprogenitor
C3H10T1/2 2T9	Embrión de ratón Ratón transgénico	Multipotencial Osteoprogenitor
OCT-1	Ratón transgénico	Tipo osteoblasto
MLO-Y4	Ratón transgénico	Tipo osteocito
ROS 17/2.8	Osteosarcoma de rata	Tipo osteoblasto
FRC	Cráneo de feto de rata	Preosteoblástico
ROB-C26	Cráneo de rata neonata	Preosteoblástico
MG63	Osteosarcoma Humano	Tipo osteoblasto
NHOst	Hueso humano	Tipo osteoblasto
Cultivo Primario	Medula ósea de Ratón, rata, conejo, humano...	Multipotencial
Cultivo primario	Craneo de ratón, rata...	Tipo osteoblasto

3.4.- MODELOS ANIMALES DE REGENERACIÓN ÓSEA.

Los modelos animales que se usan en ingeniería de tejido óseo son tan diversos como los materiales y las estrategias de reparación. En general, y como en otras áreas de la ciencia, los estudios en animales se inician en modelos como el ratón o la rata, para pasar después a conejos, cerdos y ovejas^{33, 37}.

Por el tipo de tejido a reparar, la mayoría de los estudios se centran en animales de tamaño mediano y grande, puesto que el área de trabajo es mayor y esto facilita la cirugía a realizar. Además, los resultados que se obtienen en estos casos son más fácilmente extrapolables a un posible uso clínico.

En lo que se refiere a los modelos de lesión en tejido musculoesquelético, se utilizan tanto modelos de lesión críticos (lesiones que no se reparan espontáneamente) como modelos no críticos (lesiones de curación espontánea). Las localizaciones anatómicas de estos defectos dependen del objetivo del estudio. En este sentido, las más comunes suelen ser las lesiones y osteotomías en hueso largo (tibia y radio), en calota craneal, lesiones lumbares y lesiones en la región máxilofacial. Además, en el caso de materiales osteoinductivos, también se utilizan modelos de implantación ectópica en tejido muscular, para verificar esta propiedad del material.

Existe una cierta controversia a la hora de comparar resultados obtenidos en diferentes modelos animales. Esto se debe a que, en algunos casos, compuestos que parecen funcionar en animales pequeños no lo hacen en animales de mayor tamaño. Para explicar estos resultados se han esgrimido cuestiones tales como el tamaño absoluto del defecto o las diferencias fisiológicas y metabólicas entre especies, por lo que la mejor opción es trabajar con diferentes modelos animales.

En todo caso, se considera de gran importancia la elección correcta del material a estudio, el tipo de lesión a realizar y el modelo animal elegido.

4- ANTECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

El laboratorio de Ingeniería de Tejidos dirigido por el Profesor José Luíís López Lacomba se encuentra en el Instituto de Estudios Biofuncionales de la Universidad Complutense de Madrid. Los trabajos que se realizan se centran en el estudio de nuevos materiales para su aplicación en la regeneración de tejido óseo, así como en la obtención de factores de diferenciación óseos con el mismo fin.

El estudio de nuevos materiales se inicia con el diseño y producción de estructuras 2D y 3D. En este sentido, las vías de investigación se encaminan principalmente en tres grupos de materiales diferentes: El quitosano y sus derivados; Cerámicas de β -TCP e Hidroxiapatita y Matrices de nanotubos de carbón.

Los materiales desarrollados se ensayan tanto *in vitro* como *in vivo*. Para ello, el laboratorio cuenta con instrumental para la realización de ensayos cualitativos y cuantitativos de materiales, cultivos celulares y experimentación animal.

En lo que se refiere a estos últimos, actualmente se trabaja en diferentes localizaciones anatómicas para la aplicación de los materiales estudiados. Estos ensayos se realizan en los modelos animales más frecuentes tales como ratones, conejos, perros y minicerdos.

Puesto que los factores de diferenciación son una pieza clave para la regeneración de tejido, gran parte del esfuerzo científico del grupo se ha centrado en la obtención y caracterización de estos factores, fundamentalmente rhBMP-2, rhBMP-4 y rhBMP-7, que se utilizan para activar los materiales propuestos. Para ello, se ha dotado al laboratorio del instrumental necesario para la realización de ensayos de biología molecular y celular.

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.

5- OBJETIVOS GENERALES DEL TRABAJO

El objetivo fundamental de este trabajo es evaluar la aplicabilidad de los filmes de quitosano como transportadores de la rhBMP-2 y como recubrimiento osteoinductivo de materiales implantables.

Teniendo en cuenta la amplitud de tareas que abarca el objetivo general descrito, se plantearon objetivos parciales, en función de los factores de crecimiento y materiales a utilizar.

Objetivo 1: Evaluación de la respuesta celular a la rhBMP-2.

Objetivo 2: Formación de filmes de quitosano/rhBMP-2:

- 2.1. Evaluación de las características de los filmes.
- 2.2. Evaluación de la respuesta celular al material.

Objetivo 3: Aplicación del recubrimiento desarrollado sobre materiales implantables.

- 3.1. Evaluación del recubrimiento de implantes de titanio
- 3.2. Evaluación del recubrimiento de cerámicas porosas de β -TCP.

6- REFERENCIAS.

1. Lanza, R. P., Langer, R. S. & Vacanti, J. in *Principles of tissue engineering* (Academic Press San Diego, CA, 2000).
2. Caplan, A. I. Tissue engineering designs for the future: new logics, old molecules. *Tissue Eng.* **6**, 1-8 (2000).
3. Nerem, R. M. & Sambanis, A. Tissue Engineering: From Biology to Biological Substitutes. *Tissue Eng.* **1**, 3-13 (1995).
4. Minuth, W. W., Sittinger, M. & Kloth, S. Tissue engineering: generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications. *Cell Tissue Res.* **291**, 1-11 (1998).
5. Atala, A. Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application. *Rejuvenation Res.* **7**, 15-31 (2004).
6. Arosarena, O. Tissue engineering. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **13**, 233 (2005).
7. Falke, D. G. F. & Atala, A. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch. Argent. Pediatr.* **98**, 103 (2000).
8. Kim, B. S., Baez, C. E. & Atala, A. Biomaterials for tissue engineering. *World J. Urol.* **18**, 2-9 (2000).
9. Bell, E. Strategy for the Selection of Scaffolds for Tissue Engineering. *Tissue Eng.* **1**, 163-179 (1995).
10. Muschler, G. F., Nakamoto, C. & Griffith, L. G. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J. Bone Joint Surg. Am.* **86-A**, 1541-1558 (2004).
11. Bianco, P. & Robey, P. G. Stem cells in tissue engineering. *Nature* **414**, 118-121 (2001).

12. Baron, R. General principles of bone biology. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, Fifth ed.* Cadmus Professional Communications, Washington DC, 1–8 (2003).
13. Marks, S. C. & Odgren, P. R. Structure and development of the skeleton. *Principles of Bone Biology* **2**, 3–16 (2002).
14. Harada, S. & Rodan, G. A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* **423**, 349-355 (2003).
15. Bozal, C. B. Biología del osteocito. *Actualiz Osteología* **2**, 19-21 (2006).
16. Boyle, W. J., Simonet, W. S. & Lacey, D. L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**, 337-342 (2003).
17. Estrada, C., Paz, A. C. & López, L. E. Ingeniería de tejido óseo: Consideraciones básicas. *Revista de la EIA* **5**, 93-100 (2006).
18. Zárate-Kalfópulos, B. & Reyes-Sánchez, A. Injertos óseos en cirugía ortopédica. *Cir. Cir.* **74** (2006).
19. Salgado, A. J., Coutinho, O. P. & Reis, R. L. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol. Biosci.* **4**, 743-765 (2004).
20. Logeart-Avramoglou, D., Anagnostou, F., Bizios, R. & Petite, H. Engineering bone: challenges and obstacles. *J. Cell. Mol. Med.* **9**, 72-84 (2005).
21. Rose, F. R. & Oreffo, R. O. Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292**, 1-7 (2002).
22. Orban, J. M., Marra, K. G. & Hollinger, J. O. Composition options for tissue-engineered bone. *Tissue Eng.* **8**, 529-539 (2002).
23. Sikavitsas, V. I., Temenoff, J. S. & Mikos, A. G. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials* **22**, 2581-2593 (2001).

24. Goessler, U. R., Hormann, K. & Riedel, F. Tissue engineering with adult stem cells in reconstructive surgery (review). *Int. J. Mol. Med.* **15**, 899-905 (2005).
25. Mauney, J. R., Volloch, V. & Kaplan, D. L. Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects. *Tissue Eng.* **11**, 787-802 (2005).
26. Yamaguchi, A., Komori, T. & Suda, T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr. Rev.* **21**, 393-411 (2000).
27. Stein, G. S. & Lian, J. B. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr. Rev.* **14**, 424-442 (1993).
28. Heng, B. C., Cao, T., Stanton, L. W., Robson, P. & Olsen, B. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. *J. Bone Miner. Res.* **19**, 1379-1394 (2004).
29. Hutmacher, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* **21**, 2529-2543 (2000).
30. Chen, G., Ushida, T. & Tateishi, T. Scaffold Design for Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience* **2**, 67-77 (2002).
31. Burg, K. J., Porter, S. & Kellam, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* **21**, 2347-2359 (2000).
32. Ramoshebi, L. N. *et al.* Tissue engineering: TGF-beta superfamily members and delivery systems in bone regeneration. *Expert Rev. Mol. Med.* **2002**, 1-11 (2002).
33. Luginbuehl, V., Meinel, L., Merkle, H. P. & Gander, B. Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **58**, 197-208 (2004).
34. Tabata, Y. Tissue regeneration based on growth factor release. *Tissue Eng.* **9 Suppl 1**, S5-15 (2003).

35. Malafaya, P. B., Silva, G. A., Baran, E. T. & Reis, R. L. Drug delivery therapies I: General trends and its importance on bone tissue engineering applications. *Curr. Opin. Solid State Mat. Sci.* **6**, 283-295 (2002).

36. Malafaya, P. B., Silva, G. A., Baran, E. T. & Reis, R. L. Drug delivery therapies II: Strategies for delivering bone regenerating factors. *Curr. Opin. Solid State Mat. Sci.* **6**, 297-312 (2002).

37. Granjeiro, J. M., Oliveira, R. C., Bustos-Valenzuela, J. C., Sogayar, M. C. & Taga, R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **38**, 1463-1473 (2005).

CAPÍTULO 2:
Evaluación de la respuesta celular a rhBMP-2

1-INTRODUCCIÓN

La habilidad auto reparadora del hueso se atribuyó durante mucho tiempo a la matriz inorgánica de éste. Sin embargo, en 1965, Urist et al. ¹ describieron la formación ósea en tejido muscular a partir de extractos de hueso desmineralizado. Este descubrimiento se realizó por casualidad, ya que se esperaba ver la formación de hueso ectópico a partir de la fracción inorgánica del hueso y se decidió implantar la fracción orgánica como control negativo. De este modo, se demostró que la capacidad reparadora del hueso se debía a sustancias presentes en esta fracción, que por primera vez se denominaron factores morfogenéticos óseos, y posteriormente proteínas morfogenéticas óseas (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs). La siguiente tabla indica los hitos más relevantes en el descubrimiento y uso de estas proteínas, y especialmente BMP-2^{2 1, 3-14}.

Tabla 2.1. Hitos en el descubrimiento y uso clínico de las BMPs y BMP-2.

Autor	Año	Hito
Senn, <i>et al.</i>	1889	Uso de hueso decalcificado en defectos ostiomielíticos.
Levander, <i>et al.</i>	1934-38	Inducción de hueso desde extractos óseos (alcohol).
Sharrard, Collins, <i>et al.</i>	1961	Inducción de hueso desde hueso decalcificado (EDTA).
Urist, <i>et al.</i>	1965	Primera definición de BMP. Hueso ectópico desde hueso decalcificado (Ácido).
Reddi, <i>et al.</i>	1981	Ensayos de cuantificación reproducibles de BMP.
Rosen, Wozney, <i>et al.</i>	1989	Secuenciación y clonación de diferentes BMPs.
Israel, Wozney, <i>et al.</i>	1991	Expresión de rhBMP-2 en células CHO (Mamífero).
Johnson, <i>et al.</i>	1992	Uso clínico de BMP purificada de hueso.
Marouka, <i>et al.</i>	1995	Expresión de rhBMP-2 en células sf9 (Insecto).
Ruppert, <i>et al.</i>	1996	Expresión de rhBMP-2 en <i>E. coli</i> (Bacteria).
Gao, <i>et al.</i>	2006	Expresión de rhBMP-2 en plantas de tabaco.
Urist <i>et al</i> y otros.	1970-88	Patentes de purificación de la fracción protéica del hueso.
Genetic Institute	1990-99	Patentes de producción y uso de diferentes BMPs.
Stryker Corp./Medtronic	2002	Aprobación de uso clínico (FDA): BMP-7 en defectos de hueso largo. BMP-2 transportada por esponjas de colágeno en fusión espinal y fracturas de tibia (INFUSE, InductOs).
Sofanor Danek/Wyeth Europa		

A partir de los extractos proteicos de hueso se identificaron en una primera etapa 15 proteínas BMP. Con la excepción de la BMP-1, todas ellas son citoquinas multifuncionales que se engloban en la super familia de las TGF- β (figura 2.1). Algunas de ellas han demostrado capacidad osteoinductora (BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-8 y BMP-9) y prácticamente todas participan en diferentes procesos del desarrollo, crecimiento, diferenciación y apoptosis celular^{15, 16}. Dada la importancia de este grupo, existen multitud de artículos de revisión generales^{2, 17-22} y referidos a rutas de activación/actividad celular²³⁻³¹ y aplicaciones clínicas³²⁻⁴⁰.

La importancia de este grupo de citoquinas en el desarrollo se traduce en una alta conservación evolutiva. Estas moléculas se sintetizan como precursores de gran tamaño y la forma madura se libera mediante un proceso de proteolisis de la región propeptídica. La forma final activa de las BMPs es un homodímero que presenta tres puentes disulfuro en cada monómero (intracatenarios) y un cuarto puente disulfuro uniendo ambas cadenas peptídicas (intercatenario).

A finales de los años ochenta las BMPs se aislaron y se secuenciaron, con lo que se abrió la puerta a su expresión mediante técnicas de DNA recombinante en diversos organismos modelo^{1, 3-13}. De esta manera, no solo se han podido obtener estas proteínas de forma masiva, si no que se ha podido estudiar pormenorizadamente el mecanismo de acción y la respuesta celular de cada una de ellas.

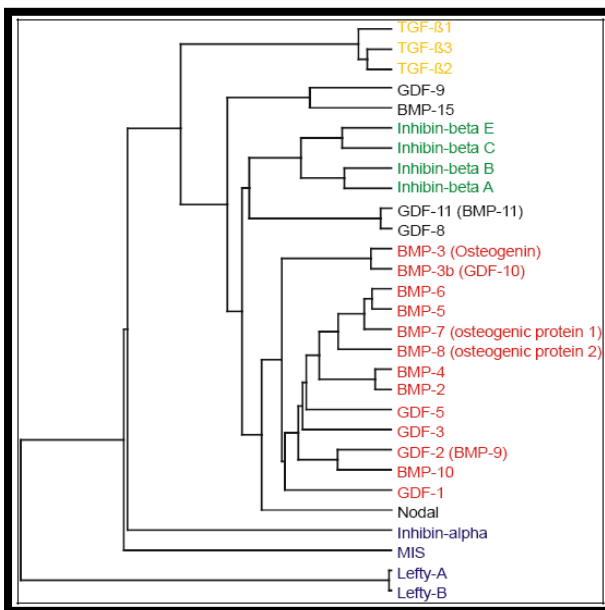


Figura 2.1. Familia TGF- β . Esta familia de proteínas engloba los factores denominados TGF- β , BMP, GDF e Inhibinas.

1.1.- BMP-2

La BMP-2 es la proteína que presenta mayor capacidad de inducir la regeneración ósea y de formar hueso ectópico en vertebrados adultos, aunque su vida media en el organismo es muy corta. Su uso se considera de gran interés en el campo de la ingeniería de tejidos, donde estudios clínicos recientes han demostrado que, cuando es liberada adecuadamente, resulta eficaz en la regeneración de tejido óseo³⁶. La importancia de esta molécula se ve reflejada en la gran cantidad de artículos científicos relacionados con la ella que se publican anualmente (Figura 2.2.).

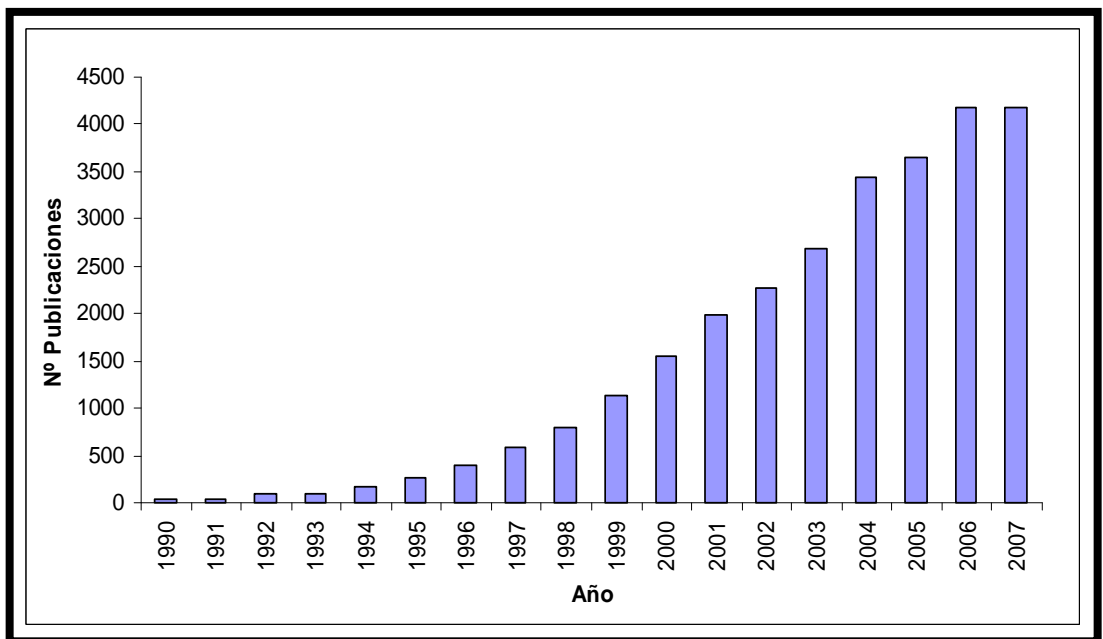


Figura 2.2. Número de publicaciones relacionadas con BMP-2 por año.

La BMP-2 desencadena una respuesta celular al unirse a receptores de superficie. De esta manera incide en múltiples procesos celulares y altera la expresión génica. Estos cambios están relacionados con procesos de desarrollo embrionario o de diferenciación a tejidos mesenquimales, mayoritariamente tejido óseo. En la tabla 2.2 se recopilan la función, procesos celulares, procesos de diferenciación y procesos de desarrollo con los que se relaciona la BMP-2 (GOTree).

En múltiples estudios *in vitro* se ha demostrado que la BMP-2 induce o aumenta los parámetros osteoblásticos de células multipotenciales, tanto en cultivos primarios como

en líneas celulares establecidas. Dentro de estos parámetros se incluye la actividad fosfatasa alcalina (FA), asociada al inicio de la calcificación y marcador temprano de diferenciación ósea. 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 FA, detectable tras su cultivo con BMP-2 activa ⁴¹⁻⁴³.

La BMP-2 humana, como otras proteínas de este grupo, ha sido clonada y actualmente se puede obtener de manera recombinante utilizando diferentes métodos de expresión (rhBMP-2). Precisamente, gran parte del trabajo realizado en el laboratorio durante los últimos años ha estado relacionado con la producción y purificación de rhBMP-2 biológicamente activa mediante su expresión en *Escherichia coli*.

Tabla 2.2. Términos con los que se relaciona la BMP-2.

BMP-2	Términos ontológicos
Función	cytokine activity growth factor activity
Procesos celulares	cell-cell signalling regulation of transcription organ morphogenesis growth negative regulation of cell proliferation negative regulation of progression through cell cycle inflammatory response
Tejido Óseo	bone mineralization osteoblast differentiation positive regulation of ossification positive regulation of osteoblast differentiation cartilage development odontogenesis (sensu Vertebrata)
Otros tejidos mesenquimáticos	cardiac cell differentiation positive regulation of astrocyte differentiation
Desarrollo embrionario	embryonic development cell fate commitment epithelial to mesenchymal transition

La estructura de la BMP-2 humana corresponde a una proteína homodimérica formada por dos subunidades (monómeros). Esta proteína tiene un lugar de glicosilación en cada monómero^{8, 44}. No obstante, para que la proteína presente su actividad no precisa de esta glicosilación, como indican los estudios realizados con la proteína recombinante (rhBMP-2) clonada y expresada en *Escherichia coli*¹¹.

Cada una de las subunidades de la forma madura de la BMP-2 está formada por 114 aminoácidos que presentan un peso molecular de 13 KDa y un punto isoeléctrico de 7,9^{8, 44}. La estructura terciaria, descrita por Scheufler y col.⁴⁵ mediante estudios cristalográficos, está formada por un nudo cistina, dos lámina- β antiparalelas separadas, la segunda de las cuales adopta una conformación “crossover-twisted”, y una α -hélice “four-turn” ($\alpha 3$) prácticamente perpendicular a las hojas⁴⁵. Esta topografía de plegamiento se asemeja a una mano donde la α -hélice mimetiza la muñeca, el centro del nudo de cistina simula la palma y las láminas- β de doble hebra los dedos⁴⁶ (Figura 2.3).

El nudo cistina está constituido por seis residuos de cisteína, que se unen para formar tres puentes disulfuro intracatenarios. Como consecuencia de las uniones entre Cys43/Cys111 y Cys47/Cys113 se forma un anillo y a través de éste pasa el tercer puente disulfuro (Cys14/Cys79)⁴⁵. Esta estructura es similar a la encontrada en miembros de la superfamilia del TGF- β , lo que ha hecho que algunos autores la denominen la “estructura básica de TGF/BMP”⁴⁷.

La unión de los monómeros de la BMP-2 se realiza covalentemente mediante la formación de un puente disulfuro 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 26 KDa altamente estable^{6, 48}.

Scheufler y col.⁴⁵ han descrito la presencia de dos cavidades en la estructura cristalina del dímero de la BMP-2 que se corresponden con dos centros hidrofóbicos no presentes en los monómeros, y en cuya composición están involucrados residuos de ambas subunidades⁴⁵ (Figura 2.3). La cavidad I, situada en el lado convexo, 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. Precisamente, este extremo se ha descrito como lugar de unión a heparina, presente en la matriz extracelular¹¹. Por otro lado la cavidad II, es decir, el lado cóncavo, tiene un predominio de cargas negativas debido a las cadenas ácidas de Glu83 y Asp105 y el extremo carboxilo, que se ha descrito como la posible área de interacción con los receptores transmembrana de tipo serina-treonina-quinasa.

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. Éstas tienen un potencial negativo exterior y en el fondo albergan residuos aminoácidos hidrofóbicos (Trp28, Trp31, Ile62, Leu66, Tyr103, Met106). Esta región se podría corresponder a un epítipo de interacción con los receptores.

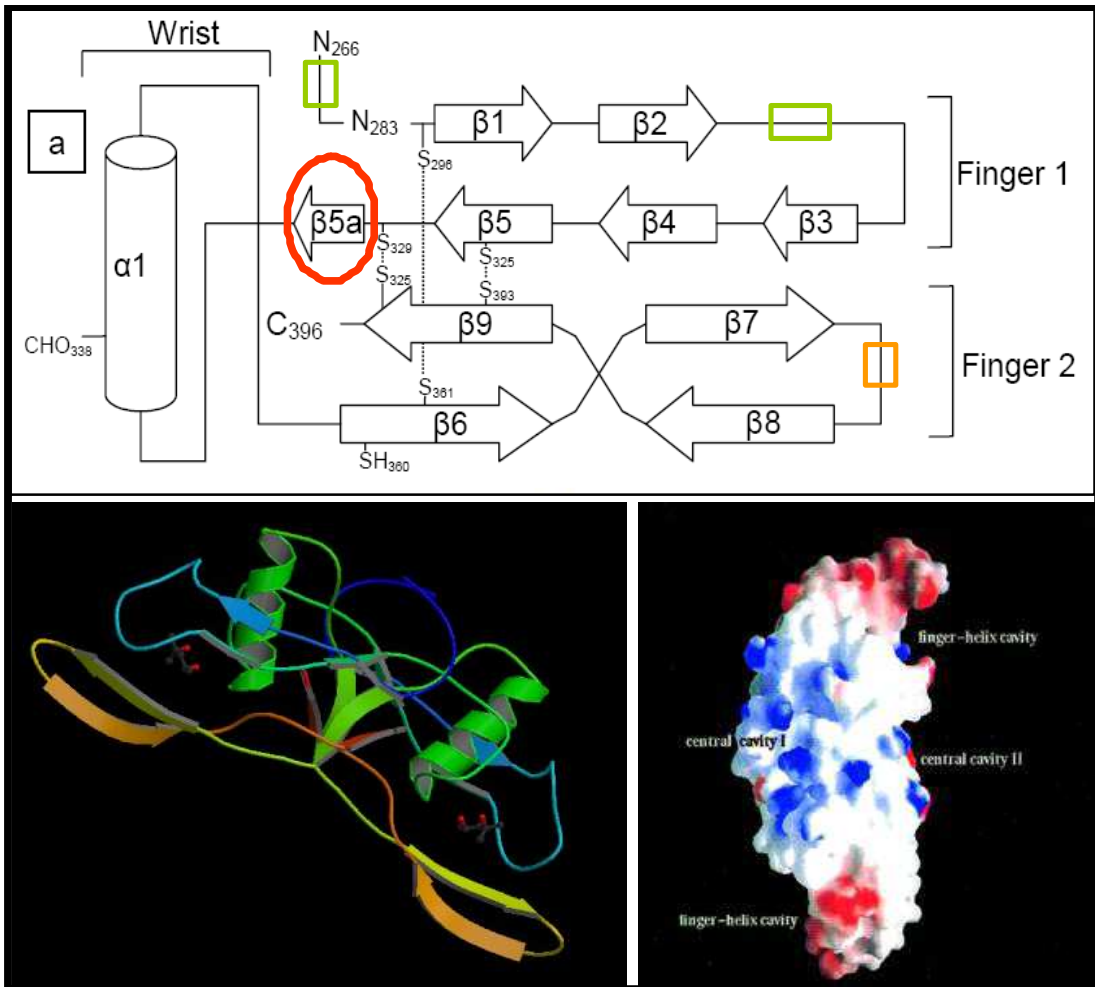


Figura 2.3. Estructura de la BMP-2. La figura superior muestra la estructura secundaria del monómero. El círculo rojo resalta la estructura lámina- β específica de la BMP-2. Los cuadrados verdes indican la posición de láminas- β ausentes en la BMP-2 y específicas de las TGF- β . El cuadrado naranja indica la posición de la lámina- β específica de BMP-7. Las figuras inferiores muestran la estructura terciaria del dímero de BMP-2 y las cavidades de la proteína dimérica.

En lo referente a la ruta de señalización celular, las BMPs desarrollan su actividad biológica mediante su unión a receptores de la superficie celular (receptores serin-treonin-quinasas). Existen dos receptores conocidos, BMPR-I y BMPR-II. La unión de la BMP-2 se da inicialmente al BMPR-II y después al BMPR-I. Aunque la unión a cada uno de los receptores no es muy fuerte, al unirse a los dos se forma un complejo heteromérico estable. De esta manera, el receptor tipo II fosforila al receptor tipo I, que a su vez desencadena la fosforilación de las proteínas Smad.

La ruta de señalización intracelular Smad se considera la “vía canónica” de respuesta celular que regula la expresión transcripcional en respuesta a BMP-2 (Figura 2.4)¹⁷. Las Smad se dividen en reguladas por receptor (R-Smads, Ej. Smad1, Smad5, Smad8), mediadoras (Co-Smads, Ej. Smad4) e inhibitoras (I-Smads, Ej. Smad6, Smad7). Una vez que el BMPR-I fosforila las R-Smad, éstas dimerizan en el citoplasma con una Co-Smad. El complejo se transloca al núcleo y funciona como factor transcripcional, iniciando la expresión de genes de respuesta temprana a la BMP-2. Las I-Smad son reguladores negativos de todo este proceso, inhibiendo tanto la fosforilación inicial de las R-Smad como su posterior dimerización.

Por otro lado, se ha descrito la activación de otras rutas de señalización intracelular como las MAPK en respuesta a BMP-2. Es por ello que el conocimiento del funcionamiento global en respuesta a BMP-2 se considera todavía limitado, con posibles interacciones entre diferentes rutas de señalización intracelular aún no descritas.

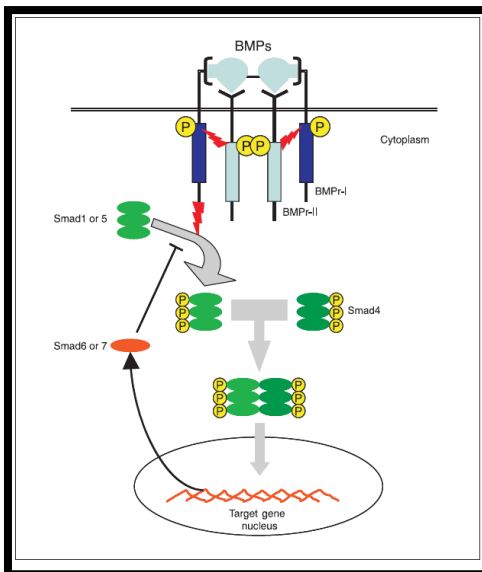


Figura 2.4. Esquema de la ruta de señalización celular de la BMP-2.

2- OBJETIVOS DE ESTE CAPÍTULO

Este apartado agrupa los experimentos realizados para la consecución del primer objetivo parcial indicado en los objetivos generales del trabajo:

Objetivo 1: Evaluación de la respuesta celular a la rhBMP-2

Para la realización del objetivo global planteado se procedió a acometer los siguientes objetivos parciales:

- 1- Respuesta de las células C2C12 a la rhBMP-2:
 - 1.1 Determinación de la dosis de rhBMP-2 para obtener respuesta celular.
 - 1.2 Evaluación de la respuesta celular a la rhBMP-2.
 - 1.3 Determinación de los cambios de expresión génica en respuesta a rhBMP-2.

- 2- Respuesta de células de diferentes cultivos primarios a la rhBMP-2:
 - 2.1 Evaluación de la respuesta de células de médula ósea de conejo a la rhBMP-2.
 - 2.2 Evaluación de la respuesta de células de médula ósea humana a la rhBMP-2.
 - 2.3 Evaluación de la respuesta de células madre homogéneas a la rhBMP-2.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

PURIFICACIÓN Y PLEGAMIENTO CORRECTO DE rhBMP-2

Para la purificación y plegamiento de la proteína se llevaron a cabo diferentes procesos y cromatografías. Inicialmente se purificaron los cuerpos de inclusión de la rhBMP-2, procedentes de su expresión en *E. coli*, mediante cromatografía de baja presión de intercambio catiónico (Sulfopropil-Sefarosa (SP-Sefarosa)). Para ello, los cuerpos de inclusión se solubilizaron (Urea 6 M, EDTA 2 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0), se centrifugaron (15000 r.p.m., 20 minutos) y se cargaron en la columna. La elución de la fracción dimérica de la rhBMP-2 se realizó mediante una fase móvil igual a la de solubilización pero con NaCl (0,4 M). Posteriormente, para la obtención de la rhBMP-2 activa, ésta se desnaturalizó y se realizó su plegamiento correcto *in vitro*, siguiendo protocolos previamente descritos. Tras un proceso de diafiltración (Urea 6 M, EDTA 2 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0) y concentración, se procedió a purificar la rhBMP-2 activa mediante cromatografía de baja presión de afinidad por heparina (Heparina inmovilizada en cerámica Hydrogel M HyperD, SIGMA) (Heparin Sepharose, AMERSHAM BIOSCIENCES). Para ello, se cargó la muestra y se eluyó la fracción correspondiente al dímero activo de rhBMP-2, mediante la adición de NaCl en la fase móvil. Durante todo el proceso, se analizó el grado de pureza de las muestras protéicas mediante geles de SDS-PAGE al 15%.

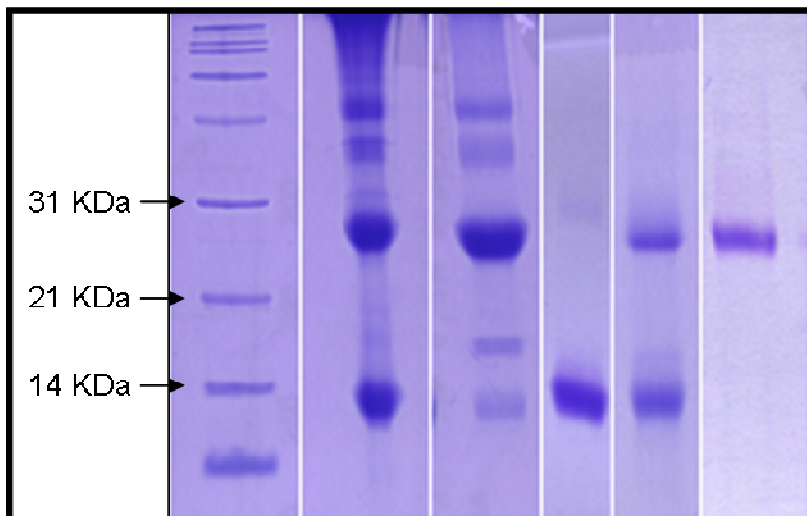


Figura 2.6. Análisis de las diferentes fases del proceso de producción de rhBMP-2 mediante geles SDS-PAGE. De izquierda a derecha: Patrón de pesos moleculares, Cuerpos de inclusión extraídos de *E. coli*, Fracción dimérica purificada por columna de intercambio catiónico, desnaturalización, Plegamiento *in Vitro* y proteína activa purificada por columna de afinidad a heparina.

3.2.-LÍNEA CELULAR C2C12.

La línea celular mioblástica C2C12 (ATCC, Manassas, Virginia) se mantuvo en cultivo en frascos de 25cm² de superficie, con medio DMEM enriquecido (10% de suero fetal bovino, 100U/mL de penicilina y 100µg/mL de sulfato de estreptomina).

Propagación celular. Este proceso se realizó en condiciones estériles cada 3-4 días, cuando las células cubrían un 80-90% de la superficie (80-90% de confluencia). Para ello, se eliminó el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS, se utilizó tripsina para desprender las células de la superficie de cultivo. Para inactivar la tripsina, se añadió medio DMEM enriquecido y se midió el número de células obtenidas mediante una cámara de Neubauer mejorada. En cada propagación, la concentración inicial de células fue de 2500 células por cm² de superficie de cultivo.

3.3-ENSAYOS CELULARES

Los ensayos celulares se llevaron a cabo por triplicado, en células con menos de 10 pases y en placas de cultivo celular de 48 pocillos (Corning Costar).

Para realizar los ensayos celulares sobre filmes de quitosano, estos filmes se formaron directamente sobre la superficie de las placas de cultivo celular de 48 pocillos. En cada ensayo celular se realizaron los siguientes controles: pocillos vacíos, pocillos con filmes y sin células y células sembradas sobre pocillos sin filme.

Las células se cultivaron durante 4 días antes de los ensayos, a una densidad inicial de 10000 cel/cm².

3.3.1.-ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA.

La enzima fosfatasa alcalina es un indicador temprano de la diferenciación ósea. La actividad de esta enzima se determinó y cuantificó de manera colorimétrica, empleando un sustrato que, tras la acción de la enzima, da lugar a un producto de intenso color amarillo. Para la realización del ensayo, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron los pocillos con PBS, para eliminar los posibles restos de proteínas del suero fetal bovino. Se añadieron 100µL de buffer de lisis a cada pocillo (Tris pH 6,8 50mM, Tritón X-1000 1%, MgCl₂ 2mM) y se realizaron 3 ciclos de congelación-descongelación. Se separaron 10µL del lisado celular y se le añadieron 100µL de buffer sustrato (50µL de p-nitrofenilfosfato y 50µL de buffer 2-amino-2-metil-1-propanol). Después de una incubación de 15 minutos a

37°C la reacción se paró con 100µL de NaOH 0,5M y se midió la A₄₅₀ en el lector de placas (Biotek FL-600).

3.3.2.-CONTENIDO TOTAL DE PROTEÍNAS

El contenido total de proteínas en cada ensayo se determinó por el método MicroBradford (BioRad). Este ensayo se basa en la afinidad del colorante azul de Coomassie G250 por las proteínas, y se utiliza para cuantificar la proliferación celular. Para la realización de los ensayos, se obtuvieron lisados celulares de la misma manera que en el ensayo de actividad de fosfatasa alcalina. Se emplearon 10µL de lisado celular, 60µL de reactivo Bradford y 230µL de H₂O destilada. Se incubó durante 15 minutos y se determinó la A₅₉₀ en el lector de placas (Biotek FL-600). Para cuantificar la cantidad de proteína de las muestras se realizaron blancos sin muestra y rectas patrón con cantidades de proteína conocidas (Figura 2.7).

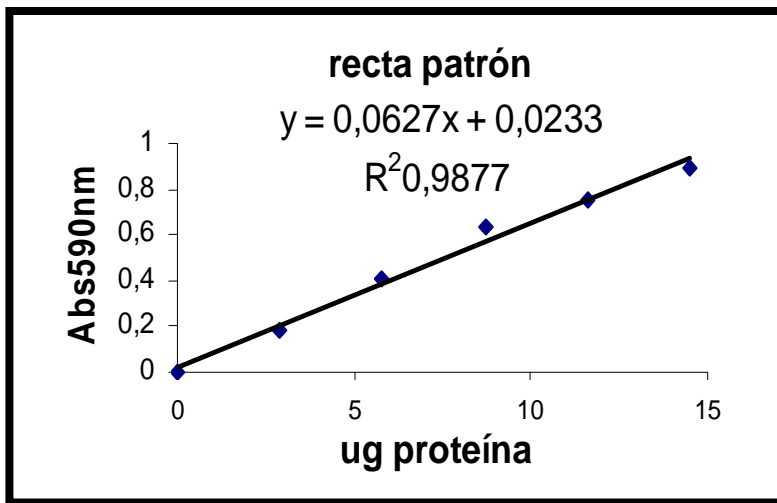


Figura 2.7. Recta patrón correspondiente al ensayo de proteínas totales (MicroBradford) empleando la proteína IgG como patrón.

3.3.3.-MEDICIÓN DE CALCEÍNA INTRACELULAR

La calceína AM es un compuesto fluorógeno hidrofóbico que atraviesa la membrana plasmática de las células de forma pasiva. Una vez en el citoplasma, las esterasas intracelulares hidrolizan la calceína AM, dando lugar a un derivado fluorescente (calceína libre). Al ser hidrofílico, el derivado no puede atravesar libremente la membrana

plasmática y queda atrapado en el interior de las células. Para realizar los ensayos, se retiró el medio de cultivo de las placas de 48 pocillos y se añadió 100 µL de reactivo (2µM de calceína AM en PBS). Las placas se incubaron en oscuridad durante una hora y posteriormente se realizaron las medidas de fluorescencia (Excitación a 490 nm y emisión a 530nm).

3.3.4.-ACTIVIDAD MITOCONDRIAL (MTT).

En el ensayo de MTT se emplea el reactivo Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol -2- il) -2,5 -difentiltetrazolio (MTT) (3- (4,5- Dimethylthiazol -2- yl) -2,5- diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) que es reducido a cristales de formazán en la mitocondria de las células vivas, por lo que es un ensayo que evalúa la actividad mitocondrial y, por lo tanto, está directamente relacionado con el número de células viables. Para realizar estos ensayos, se añadió el reactivo a cada pocillo (1/10 del volumen de medio de cultivo) y se incubó durante 2h y 30 minutos en una cámara de cultivo a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, se añadió igual volumen de solución de solubilización (compuesta por un 89.12% de isopropanol, 0.88% de ácido clorhídrico al 35% y un 10% de Tritón X-100) para disolver los cristales de formazán. Finalmente, se midió la absorbancia a 590nm y 630nm en el lector de placas (Biotek FL-600).

3.3.5.-CUANTIFICACIÓN DE DNA (HOESCHT).

Este ensayo se basa en la afinidad de un reactivo fluorescente al DNA. Para el ensayo, se eliminó el medio de cultivo, se lavaron los pocillos con PBS, se añadió 100 µL de agua destilada por pocillo y se procedió a la lisis celular, mediante 3 ciclos de congelación/descongelación. Se preparó el reactivo (25 µL de reactivo en 10mL de tampón TNE, CASA COMERCIAL) y se añadió 100 µL de esta solución a cada pocillo. Finalmente, se realizaron las medidas de fluorescencia (Excitación a 346 nm y emisión a 460 nm).

3.3.6.-DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA MEDIANTE TINCIÓN CELULAR.

Se retiró el medio de cultivo celular y se fijaron las células con formalina. Se preparó la solución con el sustrato de la enzima (48mL de agua destilada, 2 mL de naftol AS_MX fosfato alcalina y una capsula de “Fast Blue RR” (Sigma)), y se añadió sobre las células (1mL/cm²). La reacción se incubó durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, los

pocillos se lavaron con agua y los núcleos celulares se tiñeron con hematoxilina de Mayer (2 minutos). Finalmente, las muestras se aclararon con agua destilada y se procedió a su estudio por microscopía óptica. La actividad enzimática se observa como una coloración citoplasmática azul intensa.

3.3.7.-ESTUDIO DE LA MIGRACIÓN CELULAR

Para estudiar este proceso celular, se dejaron crecer los cultivos hasta confluencia. Mediante una punta, se realizaron hendiduras de 1 mm de grosor en la monocapa celular y se midió la velocidad de colonización celular del espacio libre formado. Para ello, se tomaron fotografías a diferentes lapsos de tiempo.

3.3.8.-ESTUDIO DE LA ADHESIÓN CELULAR

Para realizar este estudio, se siguió el protocolo de propagación celular anteriormente descrito. La adhesión celular a los diferentes sustratos de crecimiento se cuantificó midiendo el tiempo de actuación necesario para que la tripsina desprenda las células del sustrato. Para ello, se añadió tripsina sobre las células en cultivo y se tomaron fotografías a diferentes lapsos de tiempo.

3.3.9. ESTUDIO DE APOPTOSIS Y CICLO CELULAR

Inicialmente se sembraron células en placas de 10 cm² y se siguió el protocolo de propagación celular anteriormente descrito. A los 4 días de cultivo, las células se tripsinizaron, se recolectaron y se centrifugaron 10 minutos a 1000 rpm. El sobrenadante se descartó, el pellet celular se resuspendió en 1 mL de medio PBS-etanol 70% (medio de fijación celular) y las muestras se guardaron a 4°C.

Para el marcaje y conteo celular, se añadió 9 mL de medio PBS, se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm y se descartó el sobrenadante. El pellet celular se resuspendió en 1 mL de PBS y se añadió 50 µg de RNAasa. 30 minutos después, se cogieron 450 µL de muestra y se añadió 50 µL de una disolución de yoduro de propidio a 1 mg/mL. El tamaño, la complejidad y el DNA de las muestras se midió en un citómetro de flujo (BD, FACScalibur) y los datos se trataron con el programa WinMDI 2.9.

3.3.10.- ESTUDIO DE MIGRACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES

Para este estudio también se siguió el protocolo de propagación celular anteriormente descrito. Tras cuatro días de cultivo celular, el medio de cultivo se recolectó, se filtro por 0,22 μm y se guardó a 4°C (medio de cultivo condicionado).

Para el cultivo de explantes de aorta se prepararon geles de colágeno tipo I de cola de ratón (BD, collagen type I, 8,3 mg/mL). Para ello, se preparó a 4°C una mezcla de colágeno tipo I a 1,5 mg/mL. Se mezclaron el medio condicionado o medio DMEM completo (7,2 mL) con NaHCO_3 (1 mL de un stock a 35mg/mL) y colágeno tipo I (15 mg). Se añadió 80 μL de esta mezcla en pocillos de 1 cm^2 y se incubaron en cabinas de cultivo celular a 37°C.

Para la obtención de explantes de aorta, se sacrificaron ratones Balc, se extrajo la aorta y se cortaron trozos de 1 mm x 1mm de tamaño aproximado. Estos explantes se colocaron sobre los geles de colágeno y se añadió encima otros 80 μL de la mezcla de colágeno. 10 minutos después, se añadió 300 μL de medio de cultivo en cada pocillo (completo o condicionado) y se cultivo a 37°C y 5% de CO_2 .

3.4-ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

3.4.1.-EXTRACCIÓN DE RNA

La extracción de RNA se realizó con un kit comercial y siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante (RNeasy Kit, Qiagen). Tanto la concentración del RNA como la ausencia de contaminación proteínica se determinaron de manera espectrofotométrica (Concentración, Abs_{260} ; Pureza, Abs_{260}/Abs_{280} entre 1.8 y 2) (NanoDrp, ND-1000 Spectrophotometer) y la integridad del RNA se testó mediante electroforesis (RNA 6000 NanoChips, Agilent 2100 Bioanalyzer).

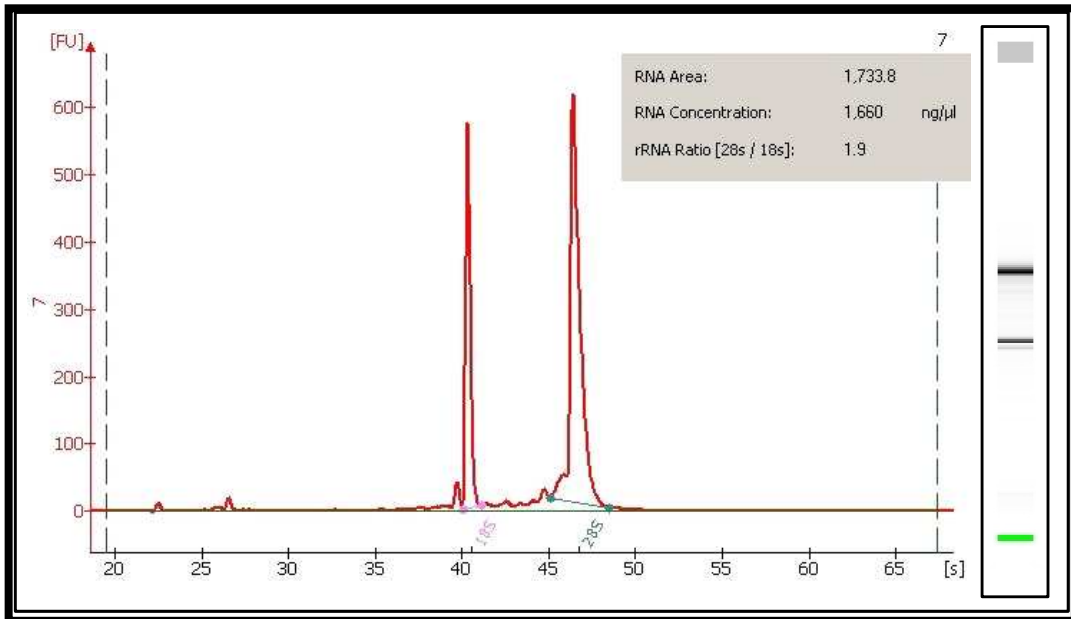


Figura 2.8. Chequeo de la integridad del RNA mediante electroforesis (RNA 6000 NanoChips, Agilent 2100 Bioanalyzer). En la imagen de la derecha se observan claramente las bandas ribosomales 28S y 18S. La gráfica representa la intensidad de estas bandas y la pureza de la muestra.

3.4.2.-PROCESAMIENTO DE LOS ARRAYS

Los estudios de transcripción global se realizaron utilizando la plataforma "GeneChip® Affymetrix" y los arrays "Mouse Genome 430 2.0". Este array contiene 45.000 "probeset" de ratón que representan a más de 39.000 transcritos y variantes. Las secuencias para estos "probeset" han sido seleccionadas de las bases de datos GenBank®, dbEST and RefSeq.

En el procesamiento de cada muestra biológica se usaron 5 microgramos de RNA total para la síntesis de cDNA de doble cadena, usando el kit "One-cycle cDNA Synthesis Kit" (Affymetrix, Santa Clara, CA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA de doble cadena se usó como molde para su transcripción *in vitro* con el "GeneChip IVT Labelling Kit" (Affymetrix), obteniéndose cRNA biotilado. La distribución de tamaños del cRNA se analizó con el equipo "Agilent Bioanalyzer 2100", y este cRNA se cuantificó y se fragmentó mediante hidrólisis inducida por metales. Se usaron 15 µg de cRNA biotilado y fragmentado para su hibridación en arrays de ratón GeneChip® MOE 430 2.0 durante 16h y 45 °C, siguiendo el manual "Gene Chip Expression Analysis Technical Manual" (Affymetrix). Tras la hibridación, los arrays se lavaron y se tñeron con estreptavidina-ficoeritrina, incluyendo un paso de amplificación de señal mediante anticuerpos anti-estreptavidina biotilados. La intensidad de fluorescencia de cada array se obtuvo con un escáner "GeneChip® Scanner 3000" y los datos crudos fueron extraídos como archivos .CEL con el software "GeneChip Operative Software (GCOS 1.2, Affymetrix)".

La calidad de los experimentos se verificó mediante la inspección visual de los arrays hibridados y la revisión de parámetros como el ruido y fondo del experimento, el porcentaje de señales "present", y las señales para controles de genes "spike" y "housekeeping".

3.4.3.-ANÁLISIS DE LOS DATOS DE MICROARRAYS OBTENIDOS

Los datos de archivos .CEL fueron normalizados y resumidos para cada "probeset" mediante el software "Robust Multiarray Average (RMA)"⁴⁹. Los ratios de expresión génica entre distintas condiciones se calcularon como el cociente entre las medias de datos para "probesets" individuales de las condiciones en estudio. Los genes con expresión diferencial estadísticamente significativa se determinaron mediante una estimación Bayesiana de la varianza entre señales, usando el programa estadístico "Cyber-T"⁵⁰ en el sitio web <http://visitor.ics.uci.edu/genex/cybert/>.

En comparaciones entre experimentos siempre se tomó como referencia el tratamiento control. Se seleccionaron para análisis posteriores aquellos genes con cambios de expresión ≥ 2 ó ≤ -2 y valores de $p < 0.01$. Posteriormente se hizo una corrección para hipótesis múltiples usando el método "false discovery rate" (FDR) de Benjamini y Hochberg en cada grupo, seleccionándose como significativos aquellos genes con $FDR \leq 0.01$.

Los genes seleccionados se clasificaron en distintos grupos funcionales usando la herramienta "WebGestalt toolkit" (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt>)⁵¹.

3.4.4.-SÍNTESIS DE CDNA Y RT-PCR CUANTITATIVA

Mediante PCR cuantitativa se analizaron cambios de expresión en algunos genes seleccionados, partiendo de los mismos RNAs usados en experimentos de microarrays. La primera cadena de cDNA se sintetizó desde 1 μg de RNA total, usando el kit "High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems)" y cebadores al azar, y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los análisis de PCR cuantitativa se realizaron en un volumen de reacción final de 20 microlitros, en placas "MicroAmp Optical 96-well reaction plate". Para estas reacciones se usó el kit "TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix" (Applied Biosystems) y sondas LNA de la colección "Universal ProbeLibrary" (Roche Applied Science), o el kit "Power SYBR Green PCR Master Mix" (Applied Biosystems). Los cebadores y las sondas fueron diseñados en el "UniversalProbeLibrary Assay Design Center" (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/adc.jsp>). Los cebadores directo y reverso fueron suministrados por Isogen Life Science y las concentraciones finales de cebadores y sondas en el ensayo fueron 200 nM y 100 nM, respectivamente. La PCR cuantitativa fué realizada en un equipo "7900HT Fast Real Time PCR System" (Applied Biosystems) con un paso de desnaturalización a 95°C durante 20 s seguido de 40 ciclos PCR con desnaturalización a 95°C durante 1 s y apareamiento/extensión a 60°C durante 20 s. Todos los ensayos PCR para un gen concreto se hicieron al mismo tiempo y por duplicado. Los niveles de expresión de los genes en estudio fueron normalizados respecto a los niveles de beta-Actina. Todos los cebadores y sondas usados se describen en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Listado de cebadores utilizados para los ensayos de PCR cuantitativa.

Gen/Símbolo	Cebador directo	Cebador reverso	Sonda UPL
Fibromodulin (Fmod)	agtctgacgacactagacc	agtcctgccgacactagacc	6
Trans-acting transcription factor 7 (Sp7)	cgactgcagatcaggttcc	ggggataacctggtaggtc	35
BMP and activin membrane-bound inhibitor (Bambi)	cacttccagggtctttg	gctacagagagcacaggtttt	24
MAD homolog 6 (Smad 6)	ctcaacaaccacagatagcaatg	cctggggtgggtctctg	59
Cadherin 15 (Cdh15)	ggacatgtatggacatcagtgag	gcgtatccacacagcacatc	81
Procollagen typeI alpha2 (Col1a2)	gccacaggttctcttca	aaccatgggcaagaaggaa	90
Inhibitor of DNA binding 3 (Ide3)	ggcctgaagagctagcacac	gtcagggtggggacagagt	61
Myogenin (MyogD)	tatcgggtccaagcctct	caatacacaagcactggaaggt	86
Periostin, osteoblast specific factor (Postn)	catgcagggtttatctcaatg	ggaccagtcacaatgatgt	80
Troponin I, skeletal, fast 2 (Tnni)	cggagggtgcgtatgct	tcaggctcatgcacaacct	3
β -actin (Bact)	atctggcctcactgtcac	ctcatgtaactcctgctgct	120 <i>SYBR G assay</i>
Interleukin 6 (Il6)	ttccaatgctctctaacagat	tctggctcttagccactcc	<i>SYBR G assay</i>
Chemokine (C-C motif) ligand 2 (Ccl2)	accagcaagatgatccaat	cctgctgctgggtgatcct	<i>SYBR G assay</i>
Chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (Cxcl12)	ccaatcagaaatggagacaaga	aatgcctgtaaatagttacaaaaaac	<i>SYBR G assay</i>
L1 cell adhesion molecule (L1cam)	tctctacaggcactggcta	gctaaggggttctgggggat	<i>SYBR G assay</i>
Glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)	gaagaagcaaggaaggtttca	aglatctgggctccatcaa	<i>SYBR G assay</i>

3.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Cada experimento se realizó por triplicado. Los resultados se expresaron como promedio \pm la desviación estandar. Los análisis de ajustes de datos lineales y no lineales se llevaron a cabo empleando el programa Graph Pad PrismTM

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de este apartado corresponden a ensayos realizados en la línea celular C2C12, inicialmente aislada de tejido muscular en ratón adulto. La implantación de rhBMP-2 en el tejido muscular induce la formación ósea, por lo que este modelo celular es uno de los más utilizados en estudios con esta proteína. 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. Este proceso de diferenciación implica un amplio cambio en la expresión génica usándose diferentes marcadores para su seguimiento. En este sentido la actividad enzimática fosfatasa alcalina (FA) es uno de los más utilizados. La FA es un marcador temprano de diferenciación, puesto que se empieza a expresar en las primeras fases del proceso. Esta enzima está relacionada con el inicio de la calcificación y, sin el estímulo producido mediante la adición de rhBMP-2, su expresión basal en las células C2C12 es nula.

Se seleccionó por tanto este marcador para la evaluación inicial de la respuesta celular a la rhBMP-2. La cuantificación de esta enzima se realizó empleando un método colorimétrico, basado en la detección de la actividad de la FA mediante la adición de un sustrato que, tras la acción enzimática, se convierte en un producto de color amarillo.

En un primer ensayo se optimizó el periodo de cultivo celular necesario para obtener la máxima respuesta celular a la rhBMP-2. Para ello, se sembraron 10.000 células en pocillos de 1cm², se añadió rhBMP-2 en el medio (500nM) y se inició el cultivo. Cada 24 horas se retiraron triplicados y se midió tanto la actividad fosfatasa alcalina como la proliferación celular (μ g de proteínas celulares totales medidas por el método Bradford).

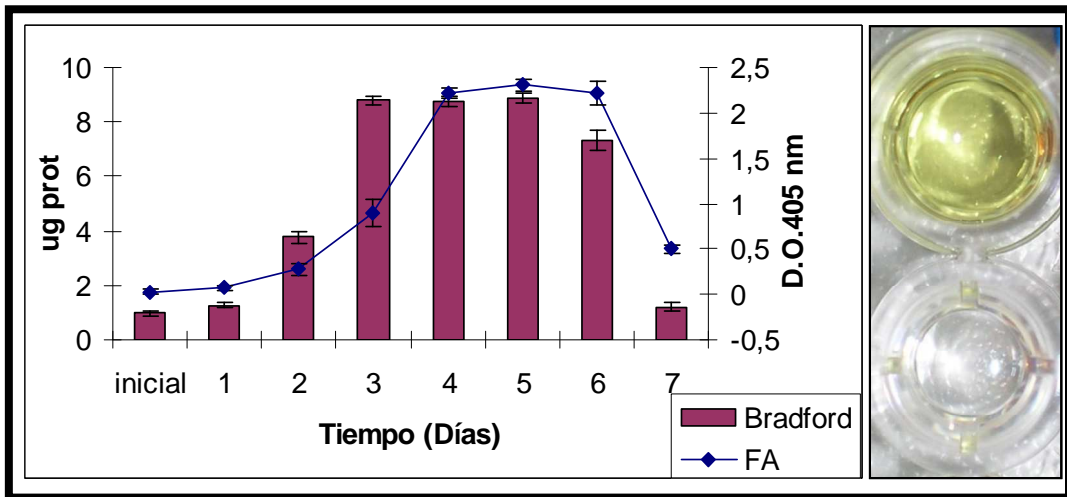


Figura 2.9. Ensayo de proliferación y diferenciación de las células C2C12 en presencia de rhBMP-2. Los datos se obtuvieron cada 24 horas de cultivo celular. Los µg de proteínas celulares totales (eje Y, izquierda) se representan en barras (Bradford) mientras que la actividad FA (eje Y, derecha) se representa mediante puntos unidos (FA). La Imagen ilustra la coloración amarilla obtenida como consecuencia de la actividad de la enzima FA, frente al control transparente.

La figura 2.9 muestra los datos obtenidos durante los primeros 7 días de ensayo. Los resultados de proliferación celular indican que las células C2C12 proliferan durante los primeros 3 días, hasta llegar a saturar el área de crecimiento (confluencia). A partir del quinto día, las células pierden capacidad de adherencia al sustrato. Por otro lado, los datos de actividad de FA indican que la expresión máxima de esta enzima se alcanza al cuarto día de cultivo, y que durante la fase de crecimiento celular su expresión es menor. Por tanto, teniendo en cuenta estos datos, se optó por realizar los siguientes ensayos con las células C2C12 al cuarto día de cultivo.

El siguiente punto a estudiar fue la respuesta celular en función de la dosis de rhBMP-2. En este caso, se sembraron 10.000 células en pocillos de 1cm² y se añadieron diferentes cantidades de rhBMP-2 en el medio. Al cuarto día se midió tanto la actividad fosfatasa alcalina como la proliferación celular (μg de proteínas celulares totales medidas por el método Bradford) en todos los casos.

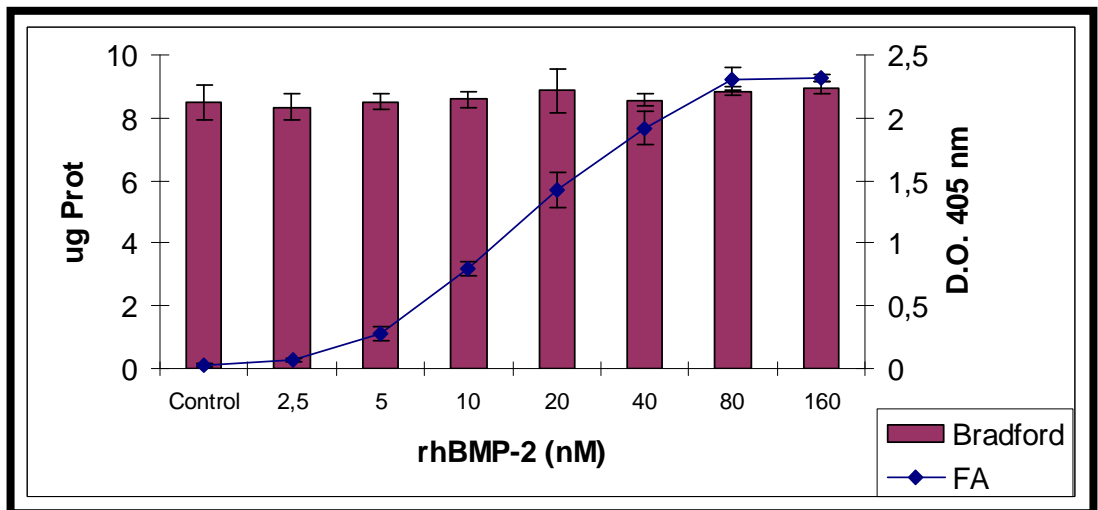


Figura 2.10. Ensayo de respuesta celular a diferentes dosis de rhBMP-2. Los datos se obtuvieron a los 4 días de cultivo. Los μg de proteínas celulares totales (eje Y, izquierda) se representan mediante barras (Bradford) y la actividad fosfatasa alcalina (eje Y, derecha) se mediante puntos unidos (FA).

La figura 2.10 muestra que, en todos los casos, las células están en confluencia a los 4 días de cultivo. También se puede ver claramente que la actividad FA aumenta con la dosis de rhBMP-2, alcanzándose la máxima respuesta celular con una concentración de 100 nM de rhBMP-2. Este valor obtenido es similar a los publicados anteriormente por diferentes autores en ensayos realizados con otros cultivos celulares^{11,41}.

Puesto que se observó que la línea celular C2C12 expresaba marcadores tempranos de diferenciación ósea en respuesta a rhBMP-2, se decidió estudiar el efecto de este proceso en otros parámetros celulares, también a 4 días. En concreto, se utilizaron métodos colorimétricos para evaluar el efecto de rhBMP-2 en la proliferación y viabilidad celular.

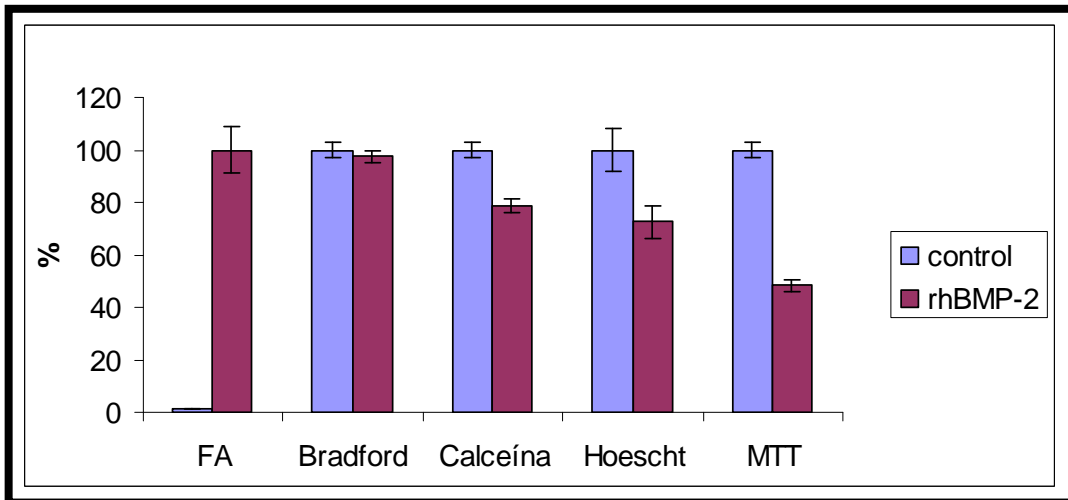


Figura 2.11. Ensayos sobre células control y tratadas con rhBMP-2. Cada ensayo mide diferentes parámetros celulares. Los datos se presentan normalizados y en porcentaje.

La figura 2.11 muestra los datos obtenidos para los diferentes parámetros celulares estudiados. Como en la figura anterior, se puede observar que el tratamiento induce la aparición de la enzima FA, ausente en las células C2C12 sin el estímulo diferenciador proporcionado por la rhBMP-2. Se puede observar, por otra parte, que el tratamiento con rhBMP-2 no altera los valores de proteína celular total (ensayo de Bradford), mientras que sí se detecta una reducción en la cantidad de DNA total (ensayo de Hoescht), al mismo tiempo que una disminución en la actividad esterasa, como indica el ensayo de viabilidad da la calceína AM. Además, se observó una clara reducción de la actividad mitocondrial (ensayo de MTT) debido al cambio del fenotipo celular.

Estos resultados, tomados en conjunto, indican que la diferenciación celular inducida por la rhBMP-2 implica un cambio global de los parámetros celulares, incluida una disminución de la proliferación (reducción de cantidad de DNA) y un aumento en el tamaño celular (mantenimiento de la cantidad total de proteínas celulares).

Junto a estos datos del metabolismo celular, se decidió estudiar también el efecto que la rhBMP-2 produce en la morfología de las células C2C12. Para ello, se realizaron tinciones de células cultivadas durante 4 días, tanto de FA como del núcleo (Hematoxilina).

La figura 2.12 muestra un cambio en la morfología celular relacionado con la exposición a la rhBMP-2. Las células control presentan un aspecto fusiforme, típico del fenotipo mioblástico. Estas células, en confluencia, prosiguen el proceso de diferenciación mioblástica y se fusionan para formar miotubos. Por otro lado, las células tratadas con rhBMP-2 presentan un aspecto estrellado, totalmente diferente al de las células control. Además, se observa claramente que sólo las células tratadas expresan FA, que en este caso se detecta como una intensa coloración azulada.

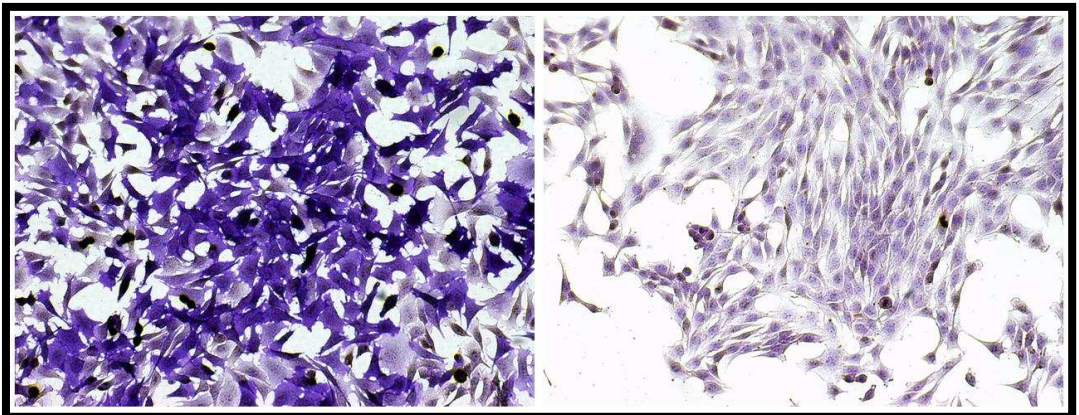


Figura 2.12. Las imágenes superiores corresponden a los ensayos de tinción celular para detectar expresión de FA y núcleo (tinción Hematoxilina)

Puesto que ligado al cambio de fenotipo inducido por rhBMP-2, los datos indican un cambio drástico en múltiples parámetros celulares, se decidió estudiar este fenómeno a nivel de expresión génica. Para ello se utilizaron técnicas de microarrays, que permiten seguir la expresión de todos los genes y compararla con el estado control. Esta técnica ya ha sido utilizada por otros grupos para conocer la respuesta celular a BMP-2 en diferentes cultivos celulares, lo que nos permite comparar los datos obtenidos⁵²⁻⁵⁶.

Se realizaron inicialmente extracciones de RNA a los 4 días de cultivo, tanto de células control como de células tratadas con rhBMP-2. Estas muestras se procesaron y se estudiaron mediante la tecnología de microarrays. De esta manera se obtuvieron los datos de expresión de 34000 genes en cada muestra y se compararon las muestras control con las muestras tratadas con rhBMP-2.

Los resultados de estos ensayos indicaron que el tratamiento con rhBMP-2 induce el cambio de expresión de 567 sondas, correspondientes a 344 genes. De ellos, 186 genes estaban sobreexpresados (cambio de expresión ≥ 2 , $p < 0,01$) y 158 genes estaban inhibidos (cambio de expresión ≤ -2 , $p < 0,01$). Las tablas 2.4 (A-B) muestran el listado de todas las sondas con cambio de expresión, junto con el símbolo del gen al que corresponden y el grado de activación o represión correspondiente.

Teniendo en cuenta el gran número de genes a evaluar generados por esta técnica, se decidió realizar un estudio ontológico mediante herramientas informáticas (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt>). Estos estudios están basados en el conocimiento científico que se tiene de la función de cada gen, relacionando estos genes con “términos ontológicos” concretos. De esta manera, se obtiene el número de genes relacionados con cada “término” en el grupo a estudiar y se compara con el número de genes esperados en cada caso. Los “términos ontológicos” estadísticamente significativos son aquellos cuyo número de genes encontrados varía significativamente del número de genes esperados ($p < 0,01$).

La figura 2.13 es un ejemplo de este estudio, correspondiente al término “Desarrollo”. En el genoma completo, un porcentaje de genes está relacionado con “Desarrollo”, por lo que, en el grupo de genes alterados por la rhBMP-2 (344 genes), se espera encontrar el mismo porcentaje. En este caso, la diferencia entre el número de genes esperados (45) y el número de genes encontrados (100) es estadísticamente significativa ($p < 2,45E-14$)

Respuesta celular a la rhBMP-2

fold_BvsC	Gene Symbol	fold_BvsC	Gene Symbol	fold_BvsC	Gene Symbol	fold_BvsC	Gene Symbol
183,409438	Fmod	5,316291	Creb3l1	3,420573	Tgfb1	2,653342	Ret
175,546035	Prg4	5,250137	Lgr6	3,413958	D0H4S114	2,646682	Whrm
105,13142	Fmod	5,237602	Crtf1	3,391677	Col5a1	2,638694	Pparg
80,300455	Fmod	5,227568	Bglap-rs1 /// Bglap	3,388059	Hip1	2,632491	Tnfrsf13c
76,103298	Fmod	5,182059	Hoxc13	3,379846	Unc5b	2,612539	Srxp2
70,635957	Fmod	5,148605	Dpysl3	3,376893	Nr4a2	2,606379	Pank1
67,18841	Prep1	5,124693	---	3,352827	Cgref1	2,600579	Sash1
46,37108	Fmod	4,977362	A730041O15Rik	3,351683	Cd24a	2,59912	Dlx1
37,430386	Postn	4,940708	Optn	3,341002	Nr4a2	2,595467	MGI:2149712
36,522232	Gpr115	4,936345	Id3	3,265161	Enah	2,588732	2610001E17Rik
32,433573	Fabp4	4,924844	Optn	3,244952	6330416G13Rik	2,587262	Cib2
29,500973	Krt1-16	4,844607	Lgr4	3,239199	Tagln	2,585082	Garnl4
27,298121	Ptgs2	4,823614	Dpysl3	3,172591	Nuak1	2,578608	Ppap2b
23,311949	Fabp4	4,613498	U90926	3,137415	Dact1	2,572438	---
22,242773	Prep1	4,604353	Acpl2	3,127453	BC023829	2,568077	Mapre2
21,715245	Akp2	4,547928	Tgfb1	3,092221	Car8	2,556406	Hoxa1
19,186031	Ptgs2	4,537163	Tmem2	3,084197	Col5a1	2,540974	Rrm2
17,926447	Krt1-14	4,498947	Calcb	3,080739	Plekhh4	2,525835	Wnt4
17,050568	Krt1-14	4,440399	Cnn1	3,001513	Nfatc1	2,521848	4930533K18Rik
15,735701	Smoc2	4,413676	Atf1b1	2,978961	D030063E12	2,514294	Slc7a1
15,536908	Smoc2	4,40396	Thbs1	2,978728	AW049604	2,510754	Fkbp10
14,197212	A630038E17Rik	4,378911	Plxna4	2,969035	Col1a2	2,500135	1700112C13Rik
13,486568	Rgs4	4,345258	Rgs4	2,961008	Gja3	2,48941	Ids
13,411808	Serpinb2	4,307662	Cd24a	2,959612	Snag1	2,488983	Rrm2
12,814515	A030004J04Rik	4,208309	Tmeff1	2,943384	---	2,48892	Pank1
11,78187	Lgr6	4,207415	Cxcr6	2,940332	Gpr56	2,480782	Fst
11,567597	Inhba	4,179004	Pla2g4a	2,939475	Rgs3	2,473563	Snai2
11,101675	Smad6	4,175602	Ehd3	2,925758	1500005K14Rik	2,47294	Efnb1
10,68438	A730041O15Rik	4,13328	Slc25a32	2,91383	Bmp2k	2,472105	Vegfc
10,598021	Fabp7	4,098504	Smoc1	2,911693	Enah	2,465186	Enah
10,289495	Tnfrsf21	4,069684	Cd24a	2,885484	4921533L14Rik	2,457064	Id4
10,236722	Gpr97	4,036671	Col1a2	2,880672	Ids	2,444121	Chn2
9,774882	Cpm	3,963112	A630038E17Rik	2,874247	Tc7f	2,437565	Tmeff1
9,470069	Ctgf	3,914483	Arf4	2,856327	Gcnt2	2,436002	Enc1
9,42811	Bambi	3,886634	Cutl1	2,855883	Bicc1	2,409775	Serpinb8
9,331083	Sp7	3,876601	Rasl11a	2,8461	Aspn	2,404478	Aldh1a3
9,123645	Tcra /// A430107F	3,869728	Fst	2,843945	Aebp1	2,380438	Panx1
8,479236	Il1f10	3,856768	Nfatc1	2,840668	Mapre2	2,379403	Ccnf
8,142978	Cpm	3,856741	1810008K03Rik	2,839687	Lrp4	2,354055	6330512M04Rik
8,061873	Hey1	3,842104	G0s2	2,832561	Cd28	2,34638	Aspn
7,895166	Kazald1	3,822374	Col5a2	2,830652	2310015A05Rik	2,344748	Bmp2k
7,889176	Hao1	3,791497	Klk4	2,822285	Il1rn	2,337187	Grlh1
7,821824	Sdc3	3,754915	Nr4a2	2,82114	Col5a2	2,331071	---
7,331241	Lamb3	3,7513	BC023892	2,817094	Thbs1	2,32498	Dok4
7,313771	Selp	3,72905	Sp8	2,792945	Il7	2,319434	4921533L14Rik
7,180519	BC033606	3,687661	Myo1d	2,792566	Cgref1	2,318646	Slc6a6
6,834203	Nfatc1	3,670837	Al413331	2,785236	Myliip	2,306663	Sbk1
6,808817	Tcra /// A430107F	3,63927	Irx3	2,781331	Bicc1	2,30516	Serpinf1
6,765441	Npnt	3,626187	Foxq1	2,778309	Grem2	2,275771	Igfbp7
6,700595	Sdc3	3,60688	Mylc2pl	2,771483	Snag1	2,259308	Tmepai
6,430115	Dlx2	3,593383	Rgs3	2,766129	Golph4	2,246625	Mal
6,131289	Lman1l	3,574421	Hs3st3a1	2,752694	Aebp1	2,213657	Dock4
6,128243	6330416G13Rik	3,535828	9430041P20Rik	2,750487	Pard6g	2,203647	Sytl2
6,07838	Wnt4	3,532778	Adam12	2,733401	---	2,191227	Fabp5
5,881298	Cxcr6	3,525504	Slc25a32	2,725593	---	2,190613	1110032E23Rik
5,874741	LOC230628	3,51434	2310002L13Rik	2,724612	Al662791	2,188888	Csrp2
5,847013	Adam12	3,511362	Diras2 /// LOC544	2,696025	Ces1	2,170893	Lrrc15
5,681944	Npnt	3,501078	Unc5b	2,693466	Tm4sf1	2,170225	Gadd45g
5,674514	Adams12	3,475454	D0H4S114	2,689475	Vdr	2,129918	Il7
5,605225	Tmeff2	3,475274	Acpl2	2,675379	Foxf2	2,114723	Tgfb2
5,539725	Al646023	3,471211	Pycr1	2,672355	Slc39a14	2,110694	Rgs4
5,511912	Tmem2	3,468696	Cpc6	2,662373	Pgam2	2,093272	Fstl1
5,444232	Tcra /// A430107F	3,45385	Smad7	2,661686	Atoh8	2,089058	2310015A05Rik
5,393186	Id4	3,445891	---	2,657832	Snai2	2,085577	Gpr23
5,325299	Omd	---	---	---	---	2,013801	Tmeff2

Tabla 2.4.A. Listado de sondas sobreexpresadas por el tratamiento con rhBMP-2 (cambio de expresión ≥ 2 , $p < 0,01$).

fold_Bvsc	Gene Symbol	fold_Bvsc	Gene Symbol	fold_Bvsc	Gene Symbol
-59.900078	Igfbp5	-4.756365	Hmga1	-3.016574	Plscr1
-47.690222	Nefl	-4.737852	Tm7sf1	-3.001333	2210010L05Rik
-34.295114	---	-4.553316	Cxcl12	-2.992552	Sema3a
-21.093405	Eps8	-4.531613	2310016A09Rik	-2.948135	2810003C17Rik
-20.187399	Eps8	-4.338519	AU041783	-2.93463	Cntn1
-19.74974	Sema5a	-4.31221	Cntn1	-2.898717	1200015N20Rik
-14.836743	Mgp	-4.282391	H19	-2.886402	Igsf4a
-12.664352	9230117N10Rik	-4.181019	Plscr2	-2.852565	Bnc2
-10.914863	Blnk	-4.108679	Tm7sf1	-2.836612	Slc30a4
-10.786273	4631423F02Rik	-4.080327	Mgam	-2.832494	Ifitm1
-10.212856	Sema5a	-4.054114	Tm7sf1	-2.74842	Pdgfd
-10.06045	---	-4.027849	Gsta4	-2.741689	2810004A10Rik
-9.937114	Eps8	-3.984334	Tm7sf1	-2.727296	Bnc1
-8.671416	Aldh3a1	-3.916286	Sema6a	-2.714669	Arhgap18
-8.128834	Lrig1	-3.81305	Tspan11	-2.709581	1110059G02Rik
-7.911159	Hba-a1	-3.789747	Gch1	-2.706577	Btbd11
-7.737927	Hba-a1	-3.779626	Tm7sf1	-2.680864	Dock9
-7.729928	Cst6	-3.74702	Sdpr	-2.678057	Fcgr3a
-7.493747	Phex	-3.744675	1600029D21Rik	-2.671596	Rerg
-7.36883	Msln	-3.712728	Kif5c	-2.669774	Ap1s3
-7.125114	Gap43	-3.632874	Tm7sf1	-2.60398	Fmo1
-6.946547	Cp	-3.628053	Ugcg	-2.590417	Synpo2l
-6.61109	Cp	-3.618945	Tgfb3	-2.565775	---
-6.518997	Popdc3	-3.578063	Nptx1	-2.555344	E2f2
-6.414988	Cd34	-3.562859	Angpt1	-2.554349	BC042782
-6.197204	Ccl2	-3.527054	Dtx4	-2.549442	Mtap2
-6.105395	C3	-3.514804	Olfm1	-2.546343	Sh3bgr
-6.061254	Lrig1	-3.472547	Gpr149	-2.544294	---
-6.048173	Cp	-3.466006	Sema3a	-2.531779	Gpr149
-6.031261	Chrb1	-3.46209	Ttc9	-2.455918	Myog
-5.840238	Cp	-3.455014	---	-2.370024	1110059G02Rik
-5.679621	Enpp2	-3.445474	Syt13	-2.369961	Cf2
-5.627439	Sprr1a	-3.438844	L1cam	-2.357218	Apccd1
-5.437613	Cp	-3.369955	Antxr2	-2.342667	MGI:1916782
-5.28785	Vgll2	-3.369091	Dock9	-2.309799	Mamdc2
-5.213656	Cp	-3.36651	Olfm1	-2.27821	Igsf4a
-5.207672	Csnk	-3.363754	Tnni2	-2.248383	Tmcc3
-5.158633	Inhbb	-3.347448	Adora2b	-2.165908	Slc24a3
-5.123005	Pdlim3	-3.307194	Gsto2	-2.143679	Dkk2
-5.115555	Gsta2	-3.281057	Peg3	-2.068542	Strbp
-4.966217	Plf /// P1f2	-3.226238	Gas2	-2.065912	Pmaip1
-4.94682	Erb3	-3.157753	Gm489	-2.04867	Pde10a
-4.904674	Vcam1	-3.020541	---	-2.030144	Ppp2r2b
				-2.015522	Tnnc2

Tabla 2.4.B. Listado de sondas inhibidas por el tratamiento con rhBMP-2 (cambio de expresión ≥ -2 , $p < 0,01$).

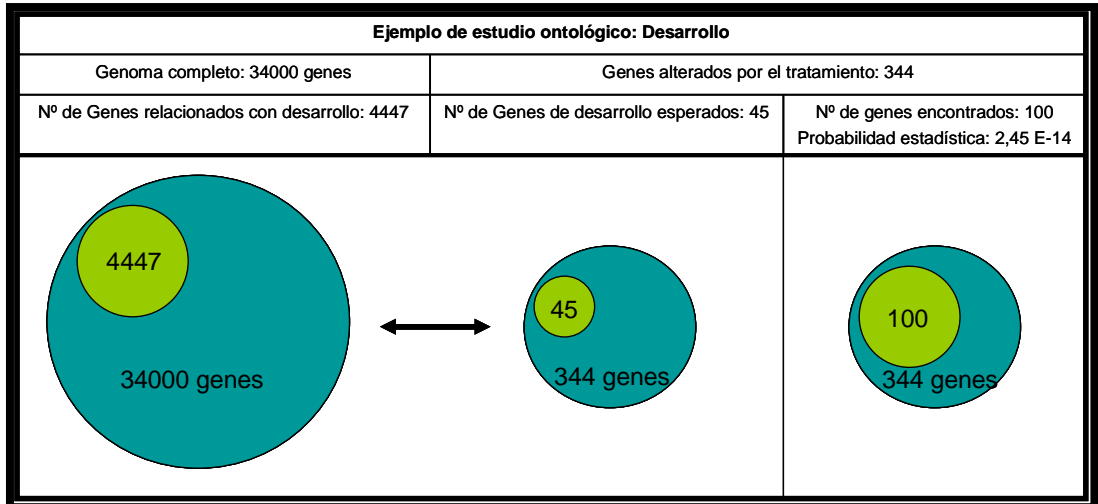


Figura 2.13. Ejemplo ilustrativo de la obtención de términos ontológicos estadísticamente significativos ($p < 0,01$).

Dado el alto número de genes a estudio (344) se realizó un primer estudio reducido con los 50 genes más activados y los 50 genes más inhibidos por el tratamiento, con el fin de obtener una visión simplificada de los procesos más importantes relacionados con la acción de la rhBMP-2.

Como se puede observar en la figura 2.14.A, los 50 genes más activados están estadísticamente relacionados (en rojo, $p < 0,01$) con términos conocidos del proceso de diferenciación ósea. También se incluyen en la figura una serie de términos que, aun no teniendo una significación estadística, son importantes para establecer una relación jerárquica entre éstos. Por otra parte, en la figura 2.14.B se puede ver la relación entre los términos obtenidos con los 50 genes más inhibidos (en verde, $p < 0,01$). Además, en este estudio se observa que ciertos procesos biológicos de importancia como son desarrollo o crecimiento aparecen en ambos grupos, puesto que engloban a otros grupos menores presentes en cada caso.

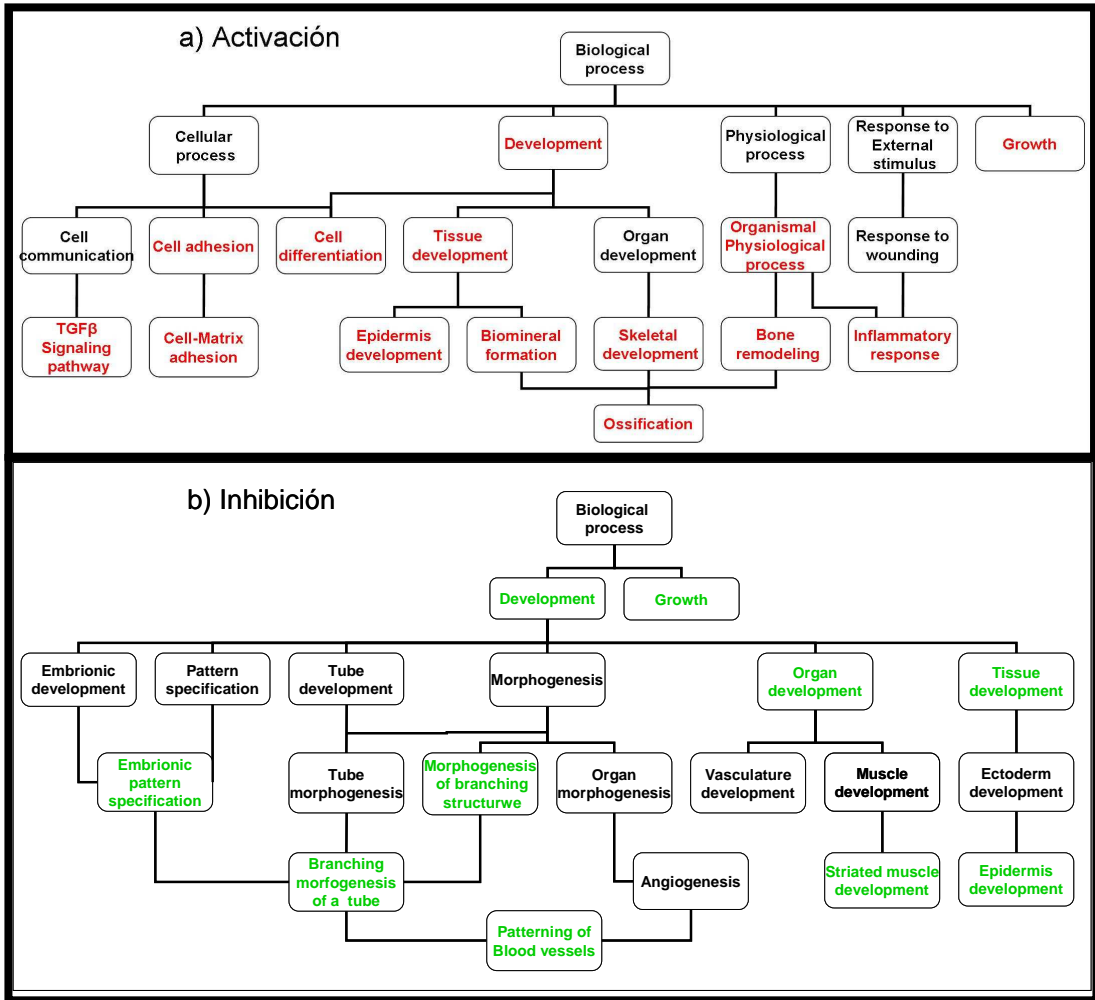


Figura 2.14. Representación jerárquica de los términos ontológicos. La figura A recopila los términos estadísticamente significativos (Rojo) relacionados con los 50 genes más activados por el tratamiento con rhBMP-2. La figura B recopila los términos estadísticamente significativos (verde) relacionados con los 50 genes más inhibidos.

GO term	BMP-2 treatment			BMP-2 treatment	
	Nº Genes	P-Value		Nº Genes	P-Value
Well known regulated genes	344				
regulation of biological process	↑↓ 97	7,0E-03	development	↑↓ 100	2,7E-16
regulation of cellular process	↑↓ 90	4,2E-05	Anatomical structure development	↑↓ 81	8,60E-14
reg. cel. Physiol. process	↑↓ 79	1,8E-03	Bone dif. Pathway		
Signal Transduction	↑ 64	8,7E-03	Bone remodeling	↑ 8	5,5E-04
morphogenesis	↑↓ 50	3,9E-10	skeletal development	↑ 10	8,0E-04
cell differentiation	↑↓ 49	3,5E-10	ossification	↑ 7	1,5E-03
transcription regulator activ.	↑ 37	9,5E-03	biomineral formation	↑ 7	1,5E-03
cell adhesion	↑ 24	4,8E-04	TGFB signaling pathway	↑ 5	2,7E-03
cellular morphogenesis	↑↓ 22	1,9E-05	Angiogenesis		
apoptosis	↑↓ 20	3,5E-03	blood vessel development	↑ 13	1,5E-05
cell development	↑↓ 19	1,6E-05	vasculature development	↑ 13	1,9E-05
cell proliferation	↑ 17	2,4E-03	blood vessel morphogenesis	↑ 11	7,2E-05
cell migration	13	1,3E-03	angiogenesis	↑ 8	2,2E-03
regulation of cell cycle	11	9,1E-02	Miogenesis		
growth factor activity	↑ 9	7,0E-03	heart development	↓ 10	6,2E-05
regulation of cell size	7	3,1E-03	troponin complex	↓ 3	6,9E-04
Homeostasis	6	1,8E-01	striated muscle thin filament	↓ 3	5,0E-03
			sarcomere	↓ 5	1,3E-02
			Structural constituent of cytoskeleton	↓ 6	1,5E-02
			myofibril	↓ 5	1,8E-02
			contractile fiber	↓ 5	2,1E-02
			Neurogenesis		
			nervous system development	↓ 29	3,4E-07
			neurogenesis	↓ 18	1,1E-05
			axonogenesis	↓ 11	6,6E-05
			glial cell differentiation	↓ 3	3,1E-03
			Epidermogenesis		
			epidermis development	↑↓ 9	7,2E-06
			Ectoderm development	↑↓ 9	1,3E-05
			hair follicle development	↑ 4	3,5E-04
			Embriogenesis		
			Embryonic development	17	1,4E-03
			Embryonic morphogenesis	10	2,0E-03

Tabla 2.6. Términos relacionados con procesos celulares (Izq) y procesos de diferenciación (Derecha).

Una vez conocidos los procesos relacionados con los genes más representativos, se procedió al estudio completo con los 344 genes. Este estudio se realizó de 3 maneras diferentes: solo con los genes activados (186 genes), solo con los genes inhibidos (158 genes) y finalmente con la respuesta completa (los 344 genes)

La tabla 2.6 corresponde a la agrupación realizada de los términos obtenidos en este estudio relacionados con procesos celulares (izquierda) y procesos de diferenciación (derecha). Como se puede observar, el cambio de fenotipo inducido por la rhBMP-2 se refleja en un cambio de expresión génica relacionado con multitud de aspectos celulares. Además, ciertos procesos están relacionados tanto con los genes activados (↑) como con los inhibidos (↓) ($p < 0,01$).

En lo que se refiere a los procesos de diferenciación, se observan varios puntos importantes. Lo primero a destacar sería la activación de los procesos de diferenciación ósea y angiogénesis, este último indispensable para la formación viable de tejido óseo. Por otro lado, se observa la inactivación de los procesos relacionados con otros tejidos mesenquimáticos, como son el tejido muscular y el sistema nervioso. Además, también se obtuvieron ciertos términos relacionados con el proceso de embriogénesis que podrían deberse a que todos estos procesos de diferenciación celular se dan principalmente en este estadio. Finalmente, el estudio también refleja la relación de las BMPs con el tejido epidérmico descrito por otros autores.

Los genes obtenidos en el ensayo de expresión génica también se estudiaron con otro programa, similar al anterior, pero que agrupa los genes en función de diferentes procesos y vías celulares (KEGG pathway, database of 47,434 pathway). La figura 2.15 agrupa los procesos y vías estadísticamente significativos obtenidos. En este caso, se observa que el cambio de fenotipo afecta a la composición de la matriz extracelular y a la relación de la célula con esta (términos en marrón). Las relaciones célula-célula también se ven alteradas (verde), así como los tipos de receptores para citoquinas (azul) y sus rutas de señalización intracelular.

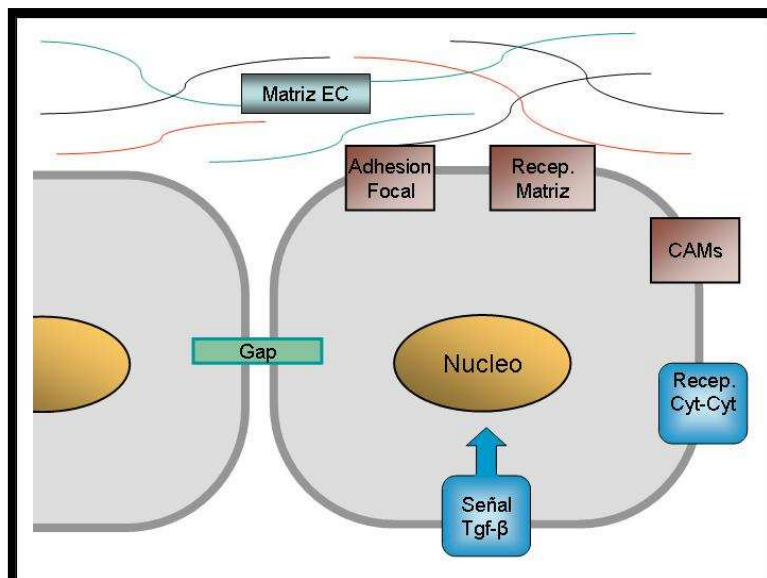


Figura 2.15. Términos estadísticamente significativos obtenidos mediante el estudio KEGG.

Los datos obtenidos en el ensayo de microarrays se validaron mediante PCR cuantitativa. Para ello se seleccionaron genes relacionados con la diferenciación ósea, genes relacionados con biogénesis y genes con expresión alterada por el tratamiento de quitosano. Todos los resultados fueron similares a los obtenidos por el ensayo de microarray, por lo que se consideró validado el ensayo (ver figura 3.15 del capítulo 3 de este trabajo).

Puesto que el análisis de resultados desveló la alteración de un gran número de procesos celulares en respuesta a rhBMP-2, se estimó conveniente estudiar algunos de ellos de forma más concreta. En este sentido, se seleccionaron los procesos de migración celular, apoptosis/ciclo celular y angiogénesis para la realización de nuevos ensayos, manteniendo las condiciones de cultivo del ensayo de array.

Para el estudio de la migración celular se optó por utilizar el método denominado “Scratch Wound Healing Assay”. Este ensayo consiste en cultivar las células hasta llegar a confluencia y realizar entonces una “herida” en la monocapa celular. Posteriormente, se obtienen imágenes de la región cada hora, durante un período de tiempo determinado, y se analizan estas imágenes para determinar la velocidad de migración celular en el área determinada^{57, 58}.

La figura 2.16 muestra el ensayo de migración realizado en células control y en células tratadas con rhBMP-2. Las imágenes superiores muestran la herida inicial realizada y las inferiores la migración celular observada 8 horas después. Como se puede observar, las células tratadas con rhBMP-2 migraron más rápidamente, llegando a contactar los dos extremos de la herida a las 8 horas de ensayo. Por su parte, las células control migraron más lentamente, y no contactaron hasta las 12 horas de ensayo. En ambos casos, se observó la desaparición total de la herida a las 12 y 16 horas de ensayo respectivamente. La velocidad de migración se calculó mediante el estudio de las imágenes obtenidas, y se obtuvo un valor de 41 $\mu\text{m}/\text{hora}$ para las células tratadas con rhBMP-2 y 27 $\mu\text{m}/\text{hora}$ para las células control.

Por otra parte, los parámetros de apoptosis y ciclo celular se estudiaron mediante citometría de flujo, analizando histogramas que representan el área de DNA y el número de células (figura 2.17). Mediante estos ensayos se obtienen diferentes regiones correspondientes a las fases celulares: mitosis (M4), G2-S (M3) y G1 (M2). El área de DNA inferior a G1 se relaciona con apoptosis celular y se marcó como M1. A fecha de finalización de este trabajo estos estudios no han concluido, pero los ensayos preliminares

muestran que, con el tratamiento de rhBMP-2, disminuye el número de células en mitosis y aumenta la apoptosis.

Finalmente, para el estudio de inducción de angiogénesis, se optó por cultivar explantes de aorta en geles de colágeno. Estos explantes se cultivan con medios “condicionados” (en este caso, medios previamente utilizados para el crecimiento celular, con y sin rhBMP-2) y posteriormente se estudia la migración inducida de células endoteliales en cada caso⁵⁹. De esta manera se estudia si las células C2C12 han producido factores angiogénicos durante el tratamiento realizado y si esos factores producidos son suficientes para inducir la migración de células endoteliales.

Como en el caso anterior, a fecha de finalización de este trabajo estos estudios no han concluido, pero los ensayos preliminares muestran una mayor migración de células endoteliales cuando los explantes se cultivan con medios con rhBMP-2 y previamente utilizados para cultivar células C2C12 (figura 2.18).

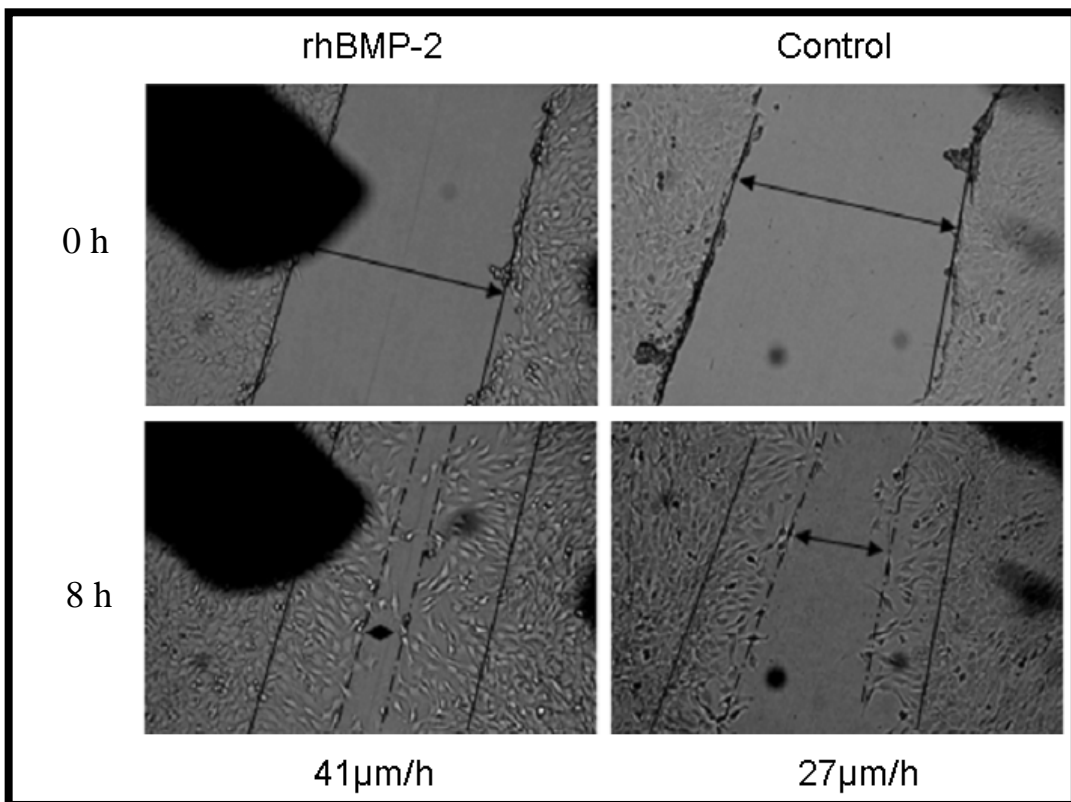


Figura 2.16. Ensayos de migración celular.

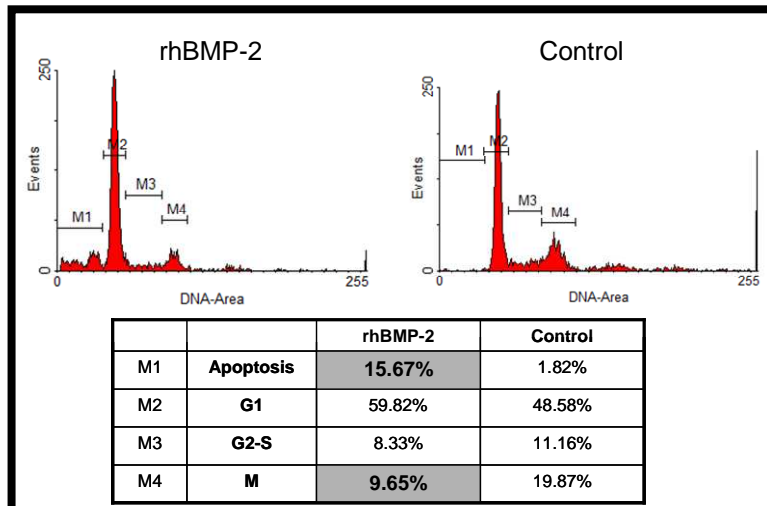


Figura 2.17. Ensayos de ciclo celular y apoptosis por citometría de flujo.

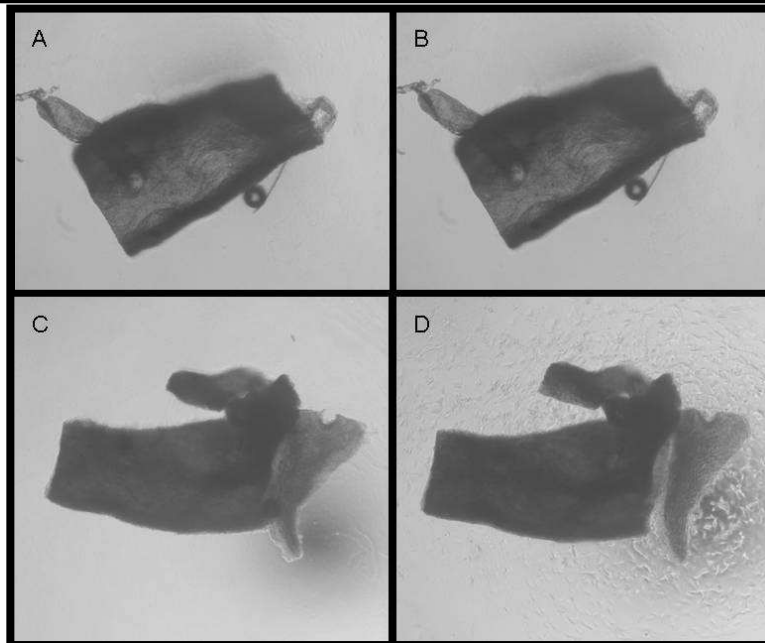


Figura 2.18. Ensayo de inducción de migración de células endoteliales. Las imágenes A-C corresponden al estado inicial y las imágenes B-D a los 10 días de ensayo. Las imágenes A-B corresponden al tratamiento control y las imágenes C-D al tratamiento de explantes con medios condicionados rhBMP-2.

5.-CONCLUSIONES

En este apartado se han agrupado los resultados obtenidos en relación a la respuesta de las células C2C12 a la rhBMP-2 obtenida en el laboratorio.

Los estudios efectuados indican que la respuesta de las células C2C12 a rhBMP-2 sigue un comportamiento dosis-dependiente. Tras cuatro días de tratamiento, se observan cambios en parámetros celulares tales como cantidad de DNA, viabilidad celular y, en especial, la aparición de marcadores óseos (FA). Otros parámetros celulares asociables a la aparición del fenotipo osteoblástico, como son la morfología o la capacidad de migración celular, también se ven afectados en este periodo de tiempo. Tomados en conjunto, estos resultados indican la existencia de cambios drásticos en las células estudiadas como consecuencia del efecto morfodiferenciador de la rhBMP-2.

Los estudios de expresión génica indican un cambio de expresión a nivel global, corroborando los resultados de los ensayos concretos mencionados en el apartado anterior. El tratamiento con rhBMP-2 induce la sobreexpresión de genes relacionados con la diferenciación ósea y la angiogénesis, mientras que genes relacionados con la diferenciación mioblástica y neural están inhibidos. Además, los estudios realizados indican que, en este proceso de transdiferenciación, están implicados múltiples procesos celulares. Estos resultados se han confirmado cuantitativamente para los distintos genes seleccionados.

6.- REFERENCIAS:

1. Urist, M. R. Bone: formation by autoinduction. *Science* **150**, 893-899 (1965).
2. Dimitriou, R. & Giannoudis, P. V. Discovery and development of BMPs. *Injury* **36 Suppl 3**, S28-33 (2005).
3. Senn, N. On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. *Am. J. Med. Sci.* **98**, 219 (1889).
4. Levander, G. A study of bone regeneration. *Surg. Gynecol. Obstet.* **67**, 705-714 (1938).
5. Sharrard, W. J. & Collins, D. H. The fate of human decalcified bone grafts. *Proc. R. Soc. Med.* **54**, 1101-1102 (1961).
6. Sampath, T. K. & Reddi, A. H. Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 7599-7603 (1981).
7. Rosen, V. *et al.* Purification and molecular cloning of a novel group of BMPs and localization of BMP mRNA in developing bone. *Connect. Tissue Res.* **20**, 313-319 (1989).
8. Israel, D. I., Nove, J., Kerns, K. M., Moutsatsos, I. K. & Kaufman, R. J. Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. *Growth Factors* **7**, 139-150 (1992).
9. Johnson, E. E., Urist, M. R. & Finerman, G. A. 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. *Clin. Orthop. Relat. Res.* (**277**), 229-237 (1992).
10. Maruoka, Y. *et al.* Production of functional human bone morphogenetic protein-2 using a baculovirus/Sf-9 insect cell system. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **35**, 957-963 (1995).

11. Ruppert, R., Hoffmann, E. & Sebald, W. Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *FEBS Journal* **237**, 295-302 (1996).
12. Gao, Y. *et al.* Expression of human BMP-2 gene in different tissues of tobacco plants. *Yi Chuan Xue Bao* **33**, 56-62 (2006).
13. BMP 2--Genetics Institute/ Medtronic-Sofamor Danek/Integra. Bone morphogenetic protein 2--Genetics Institute/ Medtronic-Sofamor Danek/Integra, INFUSE Bone Graft, recombinant human bone morphogenetic protein 2--Genetics Institute/Medtronic-Sofamor Danek/Integra, RhBMP 2--Genetics Institute/Medtronic-Sofamor Danek/Integra. *BioDrugs* **16**, 376-377 (2002).
14. Yamaguchi, A. *et al.* Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J. Cell Biol.* **113**, 681-687 (1991).
15. Hogan, B. L. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**, 432-438 (1996).
16. Hogan, B. L. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* **10**, 1580-1594 (1996).
17. Rengachary, S. S. Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurg. Focus.* **13**, e2 (2002).
18. Szpalski, M. & Gunzburg, R. Recombinant human bone morphogenetic protein-2: a novel osteoinductive alternative to autogenous bone graft? *Acta Orthop. Belg.* **71**, 133-148 (2005).
19. Chen, D., Zhao, M. & Mundy, G. R. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* **22**, 233-241 (2004).
20. Groeneveld, E. H. & Burger, E. H. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur. J. Endocrinol.* **142**, 9-21 (2000).

21. Cao, X. & Chen, D. The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene* **357**, 1-8 (2005).
22. Xiao, Y. T., Xiang, L. X. & Shao, J. Z. Bone morphogenetic protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 550-553 (2007).
23. Schmierer, B. & Hill, C. S. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 970-982 (2007).
24. Wan, M. & Cao, X. BMP signaling in skeletal development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**, 651-657 (2005).
25. Kawabata, M., Imamura, T. & Miyazono, K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* **9**, 49-61 (1998).
26. von Bubnoff, A. & Cho, K. W. Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev. Biol.* **239**, 1-14 (2001).
27. Balemans, W. & Van Hul, W. Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev. Biol.* **250**, 231-250 (2002).
28. Herpin, A. & Cunningham, C. Cross-talk between the bone morphogenetic protein pathway and other major signaling pathways results in tightly regulated cell-specific outcomes. *FEBS J.* **274**, 2977-2985 (2007).
29. Nohe, A., Keating, E., Knaus, P. & Petersen, N. O. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell. Signal.* **16**, 291-299 (2004).
30. Wagner, T. U. Bone morphogenetic protein signaling in stem cells--one signal, many consequences. *FEBS J.* **274**, 2968-2976 (2007).
31. Canalis, E., Economides, A. N. & Gaggero, E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr. Rev.* **24**, 218-235 (2003).

32. Solofomalala, G. D. *et al.* Bone morphogenetic proteins: from their discoveries till their clinical applications. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology* **17**, 609-615 (2007).
33. Granjeiro, J. M., Oliveira, R. C., Bustos-Valenzuela, J. C., Sogayar, M. C. & Taga, R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **38**, 1463-1473 (2005).
34. Kirker-Head, C. A. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **43**, 65-92 (2000).
35. Reddi, A. H. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J. Bone Joint Surg. Am.* **83-A Suppl 1**, S1-6 (2001).
36. Sykaras, N. & Opperman, L. A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? *J. Oral Sci.* **45**, 57-73 (2003).
37. Termaat, M. F., Den Boer, F. C., Bakker, F. C., Patka, P. & Haarman, H. J. Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. *J. Bone Joint Surg. Am.* **87**, 1367-1378 (2005).
38. Harwood, P. J. & Giannoudis, P. V. Application of bone morphogenetic proteins in orthopaedic practice: their efficacy and side effects. *Expert Opin. Drug Saf.* **4**, 75-89 (2005).
39. Simic, P. & Vukicevic, S. Bone Morphogenetic Proteins: from developmental signals to tissue regeneration. *Conference on bone morphogenetic proteins.EMBO Rep* **8**, 327-331 (2007).
40. Vaibhav, B., Nilesh, P., Vikram, S. & Anshul, C. Bone morphogenic protein and its application in trauma cases: A current concept update. *Injury* (2007).
41. Katagiri, T. *et al.* Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J. Cell Biol.* **127**, 1755-1766 (1994).

42. Katagiri, T. *et al.* Bone morphogenetic protein-2 inhibits terminal differentiation of myogenic cells by suppressing the transcriptional activity of MyoD and myogenin. *Exp. Cell Res.* **230**, 342-351 (1997).
43. Rauch, C., Brunet, A. C., Deleule, J. & Farge, E. C2C12 myoblast/osteoblast transdifferentiation steps enhanced by epigenetic inhibition of BMP2 endocytosis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **283**, C235-43 (2002).
44. Celeste, A. J. *et al.* Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 9843-9847 (1990).
45. Scheufler, C., Sebald, W. & Hulsmeyer, M. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **287**, 103-115 (1999).
46. Daopin, S., Li, M. & Davies, D. R. Crystal structure of TGF-beta 2 refined at 1.8 Å resolution. *Proteins* **17**, 176-192 (1993).
47. Griffith, D. L., Keck, P. C., Sampath, T. K., Rueger, D. C. & Carlson, W. D. Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci US A* **93**, 878-883 (1996).
48. Wozney, J. M. *et al.* Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* **242**, 1528-1534 (1988).
49. Irizarry, R. A. *et al.* Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**, 249-264 (2003).
50. Baldi, P. & Long, A. D. A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: regularized t -test and statistical inferences of gene changes. *Bioinformatics* **17**, 509-519 (2001).
51. Zhang, B., Kirov, S. & Snoddy, J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res.* **33**, W741-8 (2005).

52. Balint, E. *et al.* Phenotype discovery by gene expression profiling: mapping of biological processes linked to BMP-2-mediated osteoblast differentiation. *J. Cell. Biochem.* **89**, 401-426 (2003).
53. Theilhaber, J. *et al.* Finding genes in the C2C12 osteogenic pathway by k-nearest-neighbor classification of expression data. *Genome Res.* **12**, 165-176 (2002).
54. Vaes, B. L. *et al.* Comprehensive microarray analysis of bone morphogenetic protein 2-induced osteoblast differentiation resulting in the identification of novel markers for bone development. *J. Bone Miner. Res.* **17**, 2106-2118 (2002).
55. de Jong, D. S. *et al.* Identification of novel regulators associated with early-phase osteoblast differentiation. *J. Bone Miner. Res.* **19**, 947-958 (2004).
56. Peng, Y. *et al.* Transcriptional characterization of bone morphogenetic proteins (BMPs)-mediated osteogenic signaling. *J. Cell. Biochem.* **90**, 1149-1165 (2003).
57. Rodriguez, L. G., Wu, X. & Guan, J. L. Wound-healing assay. *Methods Mol. Biol.* **294**, 23-29 (2005).
58. Yarrow, J. C., Perlman, Z. E., Westwood, N. J. & Mitchison, T. J. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC Biotechnol.* **4**, 21 (2004).
59. Masson, V. *et al.* Mouse aortic ring assay: a new approach of the molecular genetics of angiogenesis. *Biol Proced Online* **4**, 24-31 (2002).

CAPÍTULO 3:
Formación de filmes de quitosano/rhBMP-2

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.-MATERIALES PORTADORES DE BMP-2

La incorporación de los factores de crecimiento en la matriz que sirve como soporte para el crecimiento celular durante la regeneración de tejidos tiene varias ventajas. Por un lado, cuando el factor se inmoviliza en el biomaterial, este previene una degradación prematura del mismo que impida la acción esperada. Por otra parte, la implantación de materiales portadores facilita la aplicación en la localización deseada y evita su transporte por parte del organismo. Además, la liberación del factor desde el material es más o menos prolongada en el tiempo, permitiendo así una mayor y mejor respuesta localizada. Finalmente, la estructura del material también es útil a la hora de definir el volumen y la forma del hueso a formar, pudiendo optimizarse en función de la aplicación terapéutica.

En lo que se refiere a la BMP-2, existe una extensa bibliografía en relación a los diferentes materiales portadores utilizados para distintas aplicaciones y localizaciones anatómicas.¹⁻⁵ En general, los materiales utilizados se pueden agrupar en polímeros naturales, polímeros sintéticos, fosfatos de calcio y composites. Como ejemplo concreto, ya existen en el mercado matrices de colágeno portadoras de rhBMP-2 para su uso en regeneración de hueso en fracturas de tibia y fusión de vértebras de la espina dorsal (InfuseTM).

1.2.-QUITOSANO COMO BIOMATERIAL

El quitosano es un polisacárido presente como tal solo en algunos hongos. Normalmente, este compuesto se obtiene mediante desacetilación alcalina de la quitina, homopolímero presente en los exoesqueletos de crustáceos, moluscos, en la cutícula de insectos y en las paredes celulares de muchos hongos⁶. Cuando la estructura no está desacetilada, el nitrógeno forma parte de un grupo amida. A partir de un 50% de desacetilación, se considera que polímero es quitosano en vez de quitina. Éste es el único polielectrolito catiónico natural y en su estructura, poli [β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranos], el nitrógeno se encuentra como amina alifática primaria (Figura 3.1). Esto permite que se den las reacciones típicas de este grupo funcional, como la formación de base de Schiff⁷.

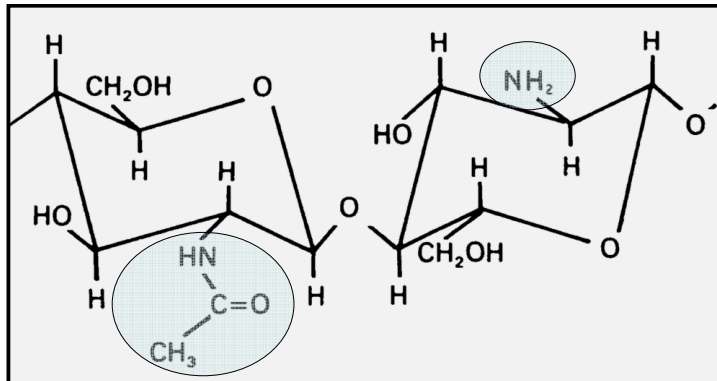


Figura 3.1. Estructura química de quitina y quitosano.

Este polímero resulta muy interesante en el campo de los biomateriales debido principalmente a su carácter biocompatible y su baja o nula toxicidad. Además, es biodegradable, lo que constituye un requisito necesario en numerosas aplicaciones biomédicas. Destaca su uso para la preparación de apósitos y vendajes, que se usan para el tratamiento de heridas y para la regeneración y reparación tisular. Actualmente se está estudiando su uso en diferentes aplicaciones biomédicas⁸⁻¹³.

Posee una gran versatilidad debido a sus características químicas y físicas que le permite ser transformado en membranas, fibras, filmes, sistemas de andamiaje porosos, micro o nanopartículas e hidrogeles. Por este motivo se le considera “atractivo” en el campo de los biomateriales. La solubilización del polímero en medios acuosos débilmente ácidos facilita su manipulación en condiciones suaves, permitiendo así la interacción electrostática y unión a la estructura de proteínas y diferentes polianiones, como polímeros sintéticos, componentes de la matriz extracelular y ADN.

Aunque el quitosano es una molécula totalmente ausente en mamíferos, sus unidades estructurales sacarídicas, la glucosamina y la N-acetil-glucosamina, están presentes en diferentes glicosaminoglicanos (GAG). Estos GAG se encuentran en la matriz extracelular y juegan un papel muy importante en su organización y funcionamiento. El quitosano es, por tanto, un compuesto análogo a los GAG, y eso le confiere alguna de sus actividades biológicas. Además, a diferencia de los GAG, el quitosano presenta carácter básico y carga positiva a pH ácido, por lo que puede interactuar con la superficie celular y proteínas plasmáticas de manera singular, combinando interacciones específicas tipo GAG con otras inespecíficas asociadas a su carga¹⁴.

La degradación *in vivo* del quitosano se debe principalmente a la susceptibilidad de ser hidrolizado enzimáticamente. La lisozima, una enzima proteolítica no específica presente en todos los tejidos del cuerpo humano, se considera la enzima principal en la degradación del polímero, cuyo grado de desacetilación y peso molecular son importantes para este proceso. El mecanismo de degradación no está completamente elucidado aunque parece que la estructura del polímero influye apreciablemente en la accesibilidad de la enzima al mismo, siendo este hecho importante para su degradación. La acción de las enzimas produce oligosacáridos no tóxicos que pueden ser posteriormente degradados por otras enzimas, siendo estos productos eliminados o reabsorbidos fácilmente por el organismo¹⁵. El estudio y análisis de los factores que afectan a la biodegradación son importantes no sólo a la hora de determinar si ésta tiene o no lugar, sino también porque la velocidad de biodegradación definirá su funcionalidad en una aplicación concreta. Además, cuando el compuesto posee moléculas activas en la estructura, como proteínas o DNA, la velocidad de degradación influirá en la liberación de éstas al medio (Figura 3.2⁸).

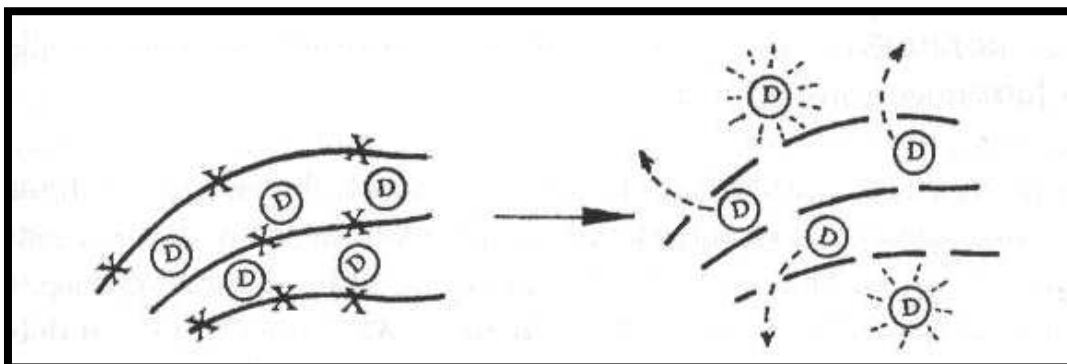


Figura 3.2. Modelo de degradación de las cadenas de quitosano y liberación de compuestos activos.

QUITOSANO COMO MATERIAL IMPLANTABLE

En diferentes ensayos realizados *in vitro* se ha demostrado una buena histocompatibilidad de este material, ya que el quitosano permite el crecimiento y proliferación de células vasculares, neuronales, epiteliales, fibroblastos, osteoblastos y condrocitos. Esta es una característica fuertemente dependiente de la forma física empleada y de las características físico-químicas del quitosano. Por ello se ha considerado un componente temporal muy prometedor en ingeniería de tejidos^{7, 16-25}. En general, los materiales derivados de quitosano provocan una reacción de cuerpo extraño mínima. La respuesta habitual es la formación de tejido granular con una angiogénesis acelerada⁸. En experimentos *in vivo* realizados durante la ejecución de esta Tesis Doctoral, los implantes de quitosano se integran en el tejido receptor y los resultados obtenidos indican un alto grado de biocompatibilidad y aceptación tisular para los diferentes modelos de aplicación.

Las características del quitosano permiten no solo la implantación de diferentes estructuras de quitosano, sino también la formación de copolímeros y complejos polielectrolitos. En este sentido, se han estudiado tanto estructuras tridimensionales formadas por quitosano con otros materiales como recubrimientos de quitosano sobre materiales implantables. Estas aproximaciones se realizan con el objetivo de complementar las características favorables de cada uno de los componentes.

QUITOSANO COMO MATERIAL PARA LA INMOVILIZACIÓN DE FÁRMACOS, CÉLULAS Y GENES

Las propiedades del quitosano permiten la inmovilización de diferentes compuestos tanto por acción química como por atrapamiento físico. En este sentido, las estructuras más estudiadas son las cápsulas de quitosano o de copolímeros y complejos polielectrolitos con quitosano. Estas “esferas” se han utilizado principalmente para la liberación controlada de fármacos por vía oral, aunque también existen otras aplicaciones como la inmovilización de células (hepatocitos) o el uso de quitosano como vector de DNA para la transformación celular²⁶⁻²⁹.

En lo que se refiere a la inmovilización y liberación controlada de proteínas y factores de crecimiento, se han estudiado cápsulas de quitosano portadoras de diferentes factores (TGF- β , PDGF-BB, FGF, HGH, IL-2, etc) para su uso en regeneración tisular^{18, 30-34}. Además, también se han estudiado otras estructuras como son los filmes de quitosano para la administración transdermal de fármacos.

USOS DEL QUITOSANO EN REPARACIÓN DE HERIDAS, QUEMADURAS Y PIEL

El quitosano activa los sistemas de coagulación debido a la masiva adsorción de proteínas sobre su superficie. Por lo tanto, el contacto con la sangre induce una respuesta trombogénica con una rápida formación de coágulo. Estas propiedades hemostáticas y su efecto acelerador de la cicatrización y la curación se han evaluado ampliamente en el tratamiento de heridas, úlceras y quemaduras, existiendo actualmente en el mercado productos basados en quitosano para estos fines (Ej. HemConTM). Además, también se han estudiado las propiedades del quitosano en relación a la formación de “piel artificial”, compuesta de diferentes materiales en combinación con cultivos celulares que en su conjunto se asemejan a la estructura de este tejido¹⁵.

USOS DEL QUITOSANO EN REPARACIÓN ÓSEA Y DE CARTÍLAGO.

Algunos trabajos confieren al quitosano propiedades ostoinductivas³⁵⁻³⁹. Sin embargo, en la regeneración de tejido óseo, el quitosano se ha utilizado principalmente para la formación de materiales con fosfatos cálcicos e hidroxiapatita. Estos sistemas incorporan propiedades de los dos componentes. Por un lado, los fosfatos cálcicos proporcionan refuerzo a la matriz y osteoconductividad y por otro, el quitosano modula la degradación y las propiedades mecánicas. Estos compuestos se integran rápidamente en la estructura ósea y son transformados finalmente en hueso⁴⁰⁻⁴⁷.

También se ha utilizado el quitosano como recubrimiento de otras matrices de poliésteres biodegradables. En general, las superficies hidrofóbicas de estos compuestos no promueven la adhesión y proliferación celular, por lo que se introduce una capa superficial de un material citocompatible como el quitosano⁴⁸⁻⁵⁴. Se han utilizado compuestos PLLA-quitosano para la liberación controlada de factores de crecimiento como PDGF^{30, 31}, y diferentes compuestos y estructuras de quitosano para la liberación de rhBMP-2⁵⁵⁻⁵⁷.

2.-OBJETIVOS DE ESTE CAPÍTULO

El objetivo planteado en la introducción y referente a este capítulo es el de la evaluación de los filmes de quitosano activados mediante rhBMP-2 para su uso en la regeneración del tejido óseo:

Objetivo 2: Formación de filmes de quitosano/rhBMP-2:

- 2.1. Evaluación de las características de los filmes.
- 2.2. Evaluación de la respuesta celular al material.

Para la consecución de dicho objetivo se formularon además los siguientes objetivos parciales:

- 2.2.1. Evaluación de las formas de liberación de rhBMP-2.
- 2.2.2. Evaluación de la biocompatibilidad de los filmes.
- 2.2.3. Evaluación de la respuesta celular en respuesta al crecimiento sobre filmes de quitosano/rhBMP-2.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.- MATERIALES Y MÉTODOS:

Los materiales y metodos referentes a la producción de la rhBMP-2, a los cultivos celulares y a los ensayos celulares se especifican en el apartado “Materiales y Métodos” del capítulo 2 de este trabajo.

3.1.--PREPARACIÓN DE QUITINA Y QUITOSANO.

La quitina se obtuvo a partir de los desechos de crustáceos, en este caso de langostinos de la variedad *Pleoticus mülleri*. El material se redujo de tamaño mediante una molienda y se lavó para eliminar la materia orgánica. Luego se trató con una solución de hidróxido de sodio al 9% (p/p) a una temperatura de 65°C durante 90 minutos para eliminar las proteínas. Posteriormente se desmineralizó con ácido clorhídrico al 10% (v/v) a 20°C durante 15 minutos. Se realizaron lavados para eliminar los reactivos y la quitina así preparada se secó bajo corriente de aire frío. El quitosano se obtuvo directamente por hidrólisis alcalina a 136°C con hidróxido de sodio al 50% (p/p) durante una hora.

CARACTERIZACIÓN DEL QUITOSANO.

El quitosano fue caracterizado siguiendo las normas ASTM: F2103 (Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Entended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Product Applications)⁵⁸.

Determinación del contenido de humedad. Se determinó por secado de la muestra en estufa de vacío a 105 °C (P/Selecta Vaciotem) durante 1 hora. Las medidas se realizaron por triplicado.

Determinación del contenido de cenizas. Se determinó por calcinación de muestras a 580 °C (NEY, Vulcan A-130) hasta obtener cenizas blancas o ligeramente grises y peso constante.

Determinación del grado de desacetilación. Se determinó mediante espectroscopia ¹H RMN (Figura 3.3). Se evaluó el grado de desacetilación teniendo en cuenta la intensidad de la integral de los protones del grupo CH₃ (I_{CH₃}) y la suma de las intensidades de las integrales de los protones H₂-H₆ (I_{H₂-H₆}) empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Grado de desacetilación (\%)} = [1 - (1/3 I_{\text{CH}_3} / 1/6 I_{\text{H}_2\text{-H}_6})] \times 100$$

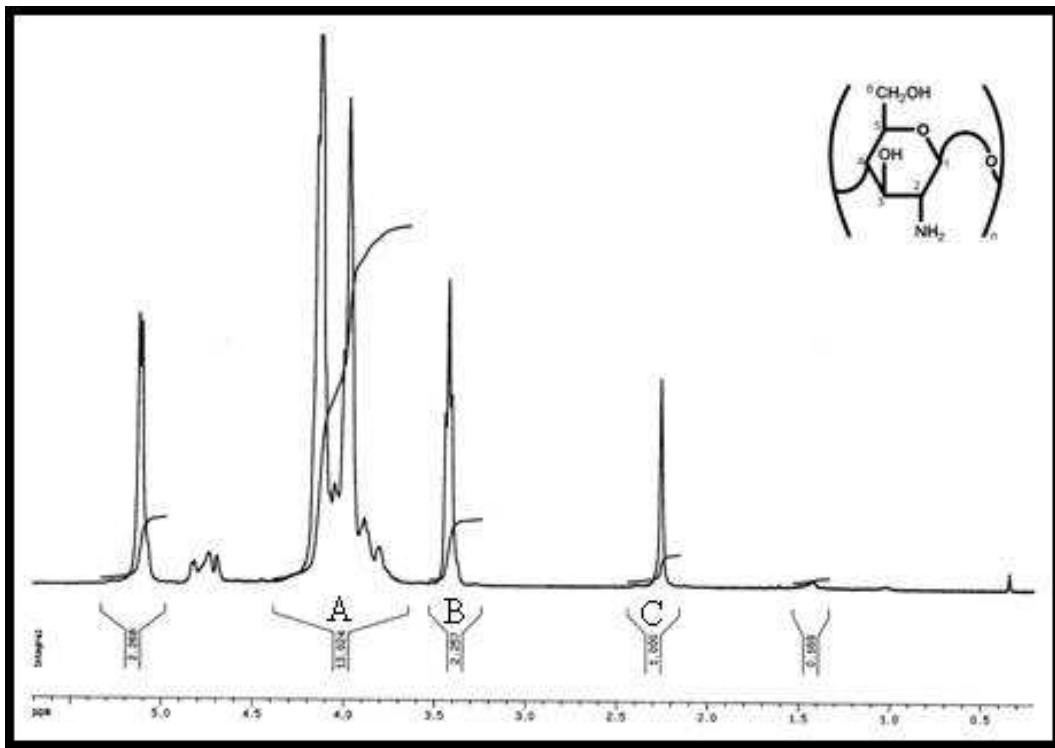


Figura 3.3. Espectro ¹H RMN de quitosano. La I H2-H6 y la I CH3 corresponden a las integrales A+B y C respectivamente.

Las medidas se llevaron a cabo en un equipo AMX500 Bruker RMN, con un campo magnético estático de 500,13 MHz y 70°C. Se emplearon para la determinación 10 mg de muestra en 0,5 mL de una solución DCl/D₂O al 2% (w/w)⁵⁹.

Determinación del peso molecular. Este parámetro se determinó mediante el análisis de la viscosidad de una solución de quitosano en el solvente 0,1 M HOAc- 0,2 M NaCl. Las medidas de viscosidad se realizaron en un viscosímetro Ubbelohde (Schott Geräte TYP 52520/II). Las constantes K y a para la ecuación de Mark-Houwink fueron $1,81 \times 10^{-3}$ y 0,93 respectivamente⁶.

3.1.1-FORMACIÓN/CARACTERIZACIÓN DE FILMES DE QUITOSANO.

3.1.1.1-Preparación de filmes de quitosano.

Se preparó una solución de quitosano al 1% (p/v) en ácido acético al 1% (v/v) y se filtró por 0,22 μm . Se depositaron alícuotas de 200 μL en superficies de 1 cm^2 y se dejó evaporar el solvente en cámara de flujo laminar, a temperatura ambiente y durante toda la noche. Para la estabilización de los filmes se añadió sobre estos 400 μL del buffer fosfato 0,25 M pH7 y posteriormente se realizaron lavados con PBS⁶⁰. En el caso de filmes con rhBMP-2, la proteína se incorporó a los mismos a partir de disoluciones de concentración conocida y se prepararon como se describe previamente.

3.1.1.2.-Caracterización de la superficie de los filmes.

Para caracterizar la superficie de los filmes de quitosano las muestras se metalizaron con oro en un equipo Pelco 91000. Posteriormente, se utilizó un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-35 CF para visualizar la superficie de los filmes a diferentes aumentos.

3.1.1.3-Determinación de la rugosidad superficial de los filmes.

Para determinar la rugosidad superficial de los filmes se utilizó un microscopio interferométrico (MicroXAMTM Optical Profiler). La adquisición, análisis y visualización de la datos metrológicos de la superficie se realizó usando el programa SPIPTM (Scanning Probe Image Processor) Los datos de rugosidad (S_a) se obtuvieron siguiendo el estándar para rugosidad superficial DIN 4768.

3.1.1.4-Determinación del espesor de los filmes.

Con la ayuda de un bisturí se desprendió parte del filme formado sobre una superficie cristalina de 1 cm^2 . Posteriormente, se determinó el espesor de los filmes midiendo el perfil de corte mediante un microscopio interferométrico (MicroXAMTM Optical Profiler). Los datos se obtuvieron mediante un análisis de las imágenes con el programa SPIPTM.

3.1.1.5-Determinación del volumen específico del quitosano.

Partiendo de la determinación del espesor de los filmes, se evaluó la relación entre el espesor del filme y la cantidad de quitosano utilizado. Este valor se estudió para diferentes filmes, formados a partir de soluciones con diferentes concentraciones de quitosano.

3.1.1.6-Determinación del grado de hidratación de los filmes.

Los ensayos de hidratación de los diferentes filmes se realizaron tomando el peso inicial y sumergiendo los filmes en PBS a 37 °C. Los filmes se secaron con papel de filtro para eliminar el exceso de PBS y se pesaron. Se calculó el porcentaje de hinchamiento con la siguiente formula:

$$S\%=(W_w - W_d)/ W_d \times 100$$

W_w = Peso húmedo de la muestra

W_d = Peso seco de la muestra

3.1.1.7-Determinación de la hidrofiliidad de la superficie de los filmes.

Para medir la hidrofiliidad de los filmes se midió el ángulo de contacto formado por una gota de agua depositada sobre su superficie. Se utilizó una jeringa (Hamilton) para depositar una gota de 5 μ L sobre la superficie, y se adquirieron imágenes del ángulo formado por la gota y la superficie (goniómetro NRL, Rame Hart, USA). Los ensayos se realizaron a temperatura y humedad ambientales.

3.1.1.8-Ensayo de resuspensión de los filmes.

Se añadieron 800 μ L de diferentes tampones (tampón ácido acético-acetato de sodio pH3, pH4 y pH5; tampón Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 pH5, pH6, pH7, pH8 y PBS a pH7,4) sobre los filmes y se recogió todo el volumen en distintos puntos temporales. Posteriormente se midió la A_{280} de cada muestra en el espectrofotómetro (GBC UV/VIS 920), utilizando como blanco la correspondiente solución tampón. Para calcular el porcentaje de filme disuelto se realizaron rectas patrón de cada tampón con diferentes concentraciones de quitosano en disolución (Figura 3.4). Este experimento se realizó a tres temperaturas diferentes (4, 25 y 37 °C)

Cada medida fue independiente del resto, realizándose triplicados para cada punto experimental.

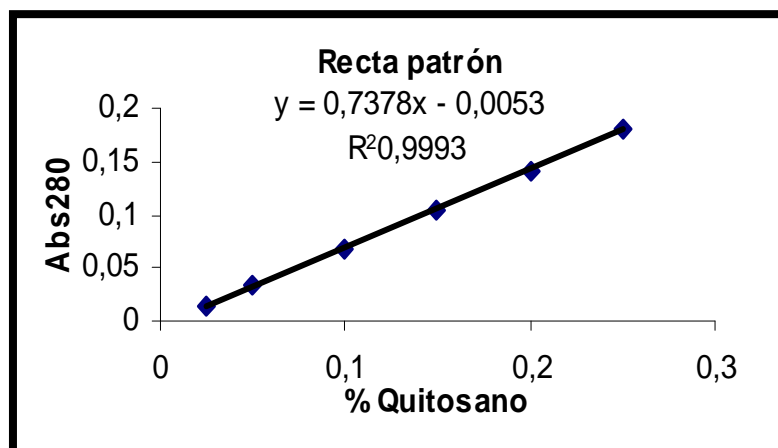


Figura 3.4. Recta patrón de Absorbancia a 280nm de quitosano en tampón pH4 a diferentes concentraciones conocidas.

3.1.1.9-Ensayos de degradación enzimática in Vitro

Ensayo a pH5.

Se añadieron 500 μ g de lisozima (hen egg-white, Sigma, Spain) disuelta en tampón fosfato pH 5 sobre los filmes. Las muestras se mantuvieron en agitación y a 37°C durante el tiempo de ensayo estipulado (7h, 24h, y 7, 14 y 21 días). Como control, se añadió solo tampón fosfato pH 5 sobre filmes. Alcanzado el tiempo determinado para cada muestra se retiró el medio, se añadió 1 ml de Ácido Acético 50mM, y se incubaron hasta su disolución, agitándolos en las mismas condiciones 24 horas más. Finalmente se determinó la viscosidad de estas muestras empleando un microviscosímetro capilar (Anton Paar), acoplado a un Densímetro (DMA4500, Anton Paar) y a un cargador de muestras (Changer SP-1m, Anton Paar). La viscosidad de las muestras se midió en un capilar de 1 mm de diámetro (número de serie 14099557).

Ensayo a pH 7.4.

Se añadieron 500 μ g de lisozima disuelta en PBS (pH 7.4) sobre los filmes. Las muestras se mantuvieron en agitación y a 37°C durante el tiempo de ensayo estipulado (7h, 24h y 7, 14 y 21 días). Como control, se añadió solo PBS pH 7.4 sobre filmes. La obtención y tratamiento de muestras se realizó de idéntica manera a la descrita previamente.

3.1.2.-FILMES CON BMP-2

3.1.2.1.-Preparación de filmes de quitosano con BMP-2.

La proteína se incorporó a la solución de quitosano 1% a partir de disoluciones de concentración conocida. Posteriormente, los filmes se prepararon como se describe previamente⁶⁰.

3.1.2.2.-Liberación de rhBMP-2 de los filmes por difusión.

Se prepararon filmes con 800 µg de rhBMP-2. La liberación de rhBMP-2 de diferentes filmes de quitosano se realizó sumergiendo los filmes en 800µL de PBS, a temperatura ambiente y con agitación. Se tomaron 10µL de muestra a diferentes puntos temporales, desde 1 hora a 7 días. La cantidad de proteína por muestra se determinó por el método de MicroBradford (BioRad), añadiendo 60µL de reactivo Bradford y 230µL de H₂O destilada. Se incubó durante 15 minutos y se leyó la A₅₉₀ en el lector de placas (Biotek FL-600). Para cuantificar la cantidad de proteína de las muestras se realizaron blancos sin muestra y rectas patrón con cantidades de proteína conocidas.

Para cuantificar la cantidad de proteína retenida tras el ensayo, se resuspendieron los filmes tratados en ácido acético 50mM y se procedió a la realización del ensayo colorimétrico como se ha descrito previamente.

3.1.2.3.-Difusión de rhBMP2 en medio de cultivo celular.

Se prepararon filmes con diferentes cantidades de rhBMP-2 (1, 6 y 60 µg), se añadió sobre estos 400 µL de medio de cultivo celular (DMEM suplementado) y se incubaron las muestras a 37 °C. El medio de cultivo se renovó diariamente y se recolectó para su uso posterior como medio de cultivo de células C2C12. En ellas, tras cuatro días de cultivo con el medio retirado de los filmes, se realizó el ensayo de cuantificación de la actividad fosfatasa alcalina siguiendo los protocolos previamente descritos.

3.1.3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Cada experimento se realizó por triplicado. Los resultados se expresaron como promedio ± la desviación estandar. Los análisis de ajustes de datos lineales y no lineales se llevaron a cabo empleando el programa Graph Pad PrismTM

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

4.1.-EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS FILMES DE QUITOSANO.

4.1.1.-CARACTERÍSTICAS FISICO-QUÍMICAS

Las características físico-químicas del quitosano dependen del origen del material y del método de obtención del mismo. Estas características influyen en los filmes a formar, modificando parámetros tales como las cinéticas de degradación o la adhesión celular. Por esta razón, aunque la forma física elegida para el estudio sea el filme, se debe caracterizar el material de partida, teniendo en cuenta aquellos parámetros del polímero que puedan influir en la aplicación elegida.

En este sentido, y como paso previo del estudio a realizar, se determinó el peso molecular, el grado de desacetilación, el porcentaje de cenizas y el porcentaje de agua del material de partida (estándar ASTM F2103-01 para quitosanos). Los valores obtenidos se recogen en la siguiente tabla 3.1.

Tabla 3.1. Características del quitosano de partida utilizado.

Quitosano en polvo	
Peso Molecular	56.100 g/mol
Grado de desacetilación	84±0.7 %
Humedad	5.3±0.50 %
Contenido de cenizas	0.39±0.10 %.

Una vez formados los filmes, se consideró importante estudiar las características relacionadas con la aplicación propuesta. Puesto que el objetivo es recubrir materiales implantables con filmes de quitosano, se decidió estudiar el espesor del filme utilizado, así como su grado de hidratación y los diferentes procesos por los que puede ser degradado.

El estudio de estas características específicas se inició con el espesor de los filmes, y con la selección de la manera más adecuada para medir este parámetro. De este modo, se realizaron diferentes ensayos previos, tanto de las técnicas a utilizar como de la metodología a emplear. Se seleccionó la microscopía interferométrica como método de medición más adecuado y se decidió realizar los filmes sobre cristales con una superficie de 1cm², para poder retirar parte del filme formado y medir así el espesor.

En las fotografías de la figura 3.5 se puede ver como se formaron los filmes de quitosano sobre los cristales de tamaño conocido y se procedió a retirar parte de este. En la figura 3.5 también se muestra las mediciones del espesor del filme realizadas y el ajuste lineal entre espesor y cantidad de quitosano utilizado en cada caso. A partir de este ajuste lineal, se determinó el volumen específico del quitosano en forma de filme ($0,38 \pm 0,04 \text{ cm}^3/\text{g}$).

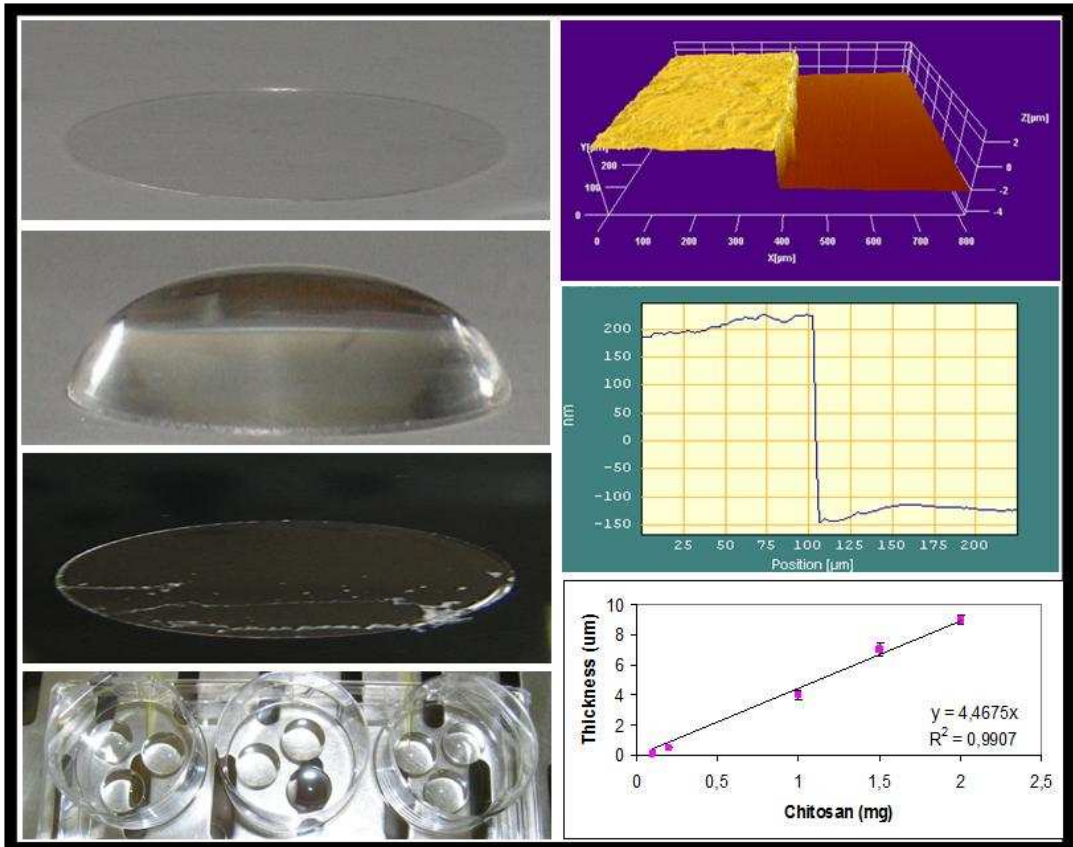


Figura 3.5. Estudio del espesor del filme formado. Las imágenes muestran la formación de filmes sobre cristal, la retirada de parte del filme y los triplicados realizados en cada caso. La figura superior corresponde a una imagen tridimensional del lugar de corte. La figura intermedia muestra el espesor del filme y la gráfica representa la relación lineal entre el espesor de filme medido y la cantidad de quitosano utilizado.

La siguiente característica a estudiar fue el grado de hidratación e hidrofiliicidad superficial de los filmes. Estos parámetros son importantes puesto que están relacionados con una correcta adhesión celular, así como con una posible liberación de las moléculas activas incluidas en el filme por un mecanismo de difusión.

La figura 3.6 muestra la cinética de hidratación de los filmes en contacto con PBS. En ella se puede ver que este es un proceso muy rápido, donde se obtiene de forma casi inmediata un valor de hidratación estable en el tiempo ($133.60 \pm 10,4\%$).

Por otro lado, la figura 3.6 muestra la medición del ángulo de contacto de una gota de agua depositada sobre el filme de quitosano. Este parámetro está relacionado con la hidrofiliicidad y la energía libre superficial del filme, y se considera que las células se adhieren a superficies cuyo ángulo de contacto es menor a 80° . En los ensayos realizados, el angulo de contacto medio de los filmes fue de $66 \pm 4,8^\circ$.

Además, también se realizó una evaluación cualitativa de la carga superficial de los filmes mediante su tinción con diferentes colorantes. La figura 3.6 muestra como los filmes de quitosano se tiñen con colorantes ácidos, como la eosina, lo que indica que existen cargas positivas en la superficie de estos. Por el contrario, colorantes básicos o neutros como la Hematoxilina, no tiñen los filmes. Este parámetro es importante, puesto que la membrana celular tiene cargas negativas. De hecho, las superficies para cultivo celular comerciales tienen cargas positivas para permitir esta adhesión celular.

Por tanto, el conjunto de estos ensayos indican que los filmes formados poseen características adecuadas para la adhesión celular, puesto que son hidrofílicos y tienen cargas positivas en la superficie.

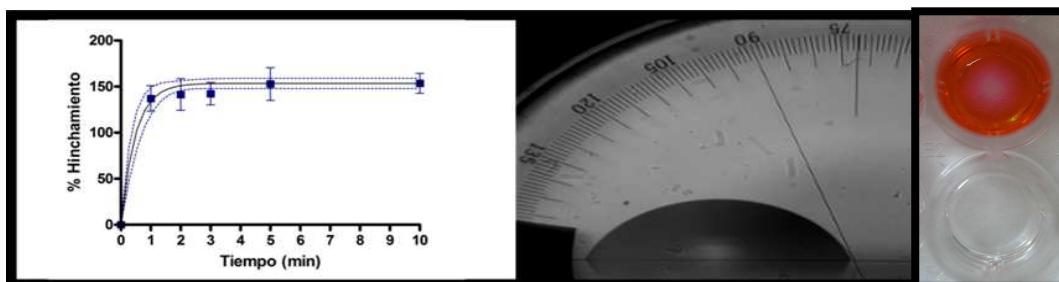


Figura 3.6. Grado de hidratación (gráfica), **hidrofiliicidad superficial de los filmes** (imagen central) y **tinción de filme con colorante ácido (Eosina)**(inferior, filme control).

Otro de los procesos de interés es la degradación de los filmes en función del pH del medio. *In vivo*, el proceso de curación de una herida comienza con la hemostasis y la consiguiente acidificación de la herida por las condiciones anaeróbicas⁶¹. Teniendo en cuenta la solubilidad del quitosano a pH ácido, una hipótesis a considerar es que, en ésta primera etapa de la implantación *in vivo*, el filme de quitosano se puede disolver al menos parcialmente. Este proceso sería importante no sólo para la estabilidad del filme, sino también como proceso de liberación de moléculas activas desde el mismo, en nuestro caso, rhBMP-2.

Para estudiar este fenómeno de disolución se realizaron experimentos con filmes de quitosano en contacto con medios de diferentes pH y a diferentes temperaturas. Estos ensayos abarcaron desde medios ácidos (tampones acético-acetato; pH 3, 4, 5) hasta medios con pH fisiológicos (tampones fosfato y PBS; pH 5, 6 y 7.4) y temperaturas de 4°C, temperatura ambiente (25°C) y 37°C.

Como se puede observar (figura 3.7.A-C), la velocidad de disolución depende de ambos parámetros, siendo ésta mayor a mayor temperatura y pH más ácido. También se puede observar que, en condiciones fisiológicas (medio PBS, pH 7.4, 37 °C), así como en el resto de tampones fosfato, el filme es prácticamente estable.

El ajuste de los datos a una ecuación exponencial permitió obtener las constantes de velocidad asociadas a estos procesos, así como los parámetros cinéticos del proceso a diferentes valores de pH.

La representación de Arrhenius de las constantes K (Figura 3.7.D) permite obtener la energía de activación del proceso, que está asociada a la pendiente obtenida. Como se observa en la figura, la pendiente es la misma para los diferentes pHs, lo que indica que la energía de activación del proceso es la misma en todos los casos. Por tanto, la velocidad de disolución depende la concentración de protones en el medio. Unido a esto, la escasa disolución de los filmes en tampones fosfato, más similares al suero fisiológico, hace suponer que la fuerza iónica es la que influye en este proceso de disolución⁶².

En la representación del inverso de la vida media (figura 3.7.E) se observa como se ralentiza la disolución al aumentar el pH. El ajuste lineal de estos datos indica que este proceso no se da a valores mayores de pH ~6,5, punto isoeléctrico del quitosano.

Por tanto, los datos indican que este proceso podría ser importante para la degradación inicial del filme y la liberación de la rhBMP-2. Sin embargo, es difícil evaluar la evolución “**real**” del pH en el lecho de la herida y el tiempo de duración del mismo, por

lo que la información obtenida de este proceso solo se puede considerar de manera cualitativa.

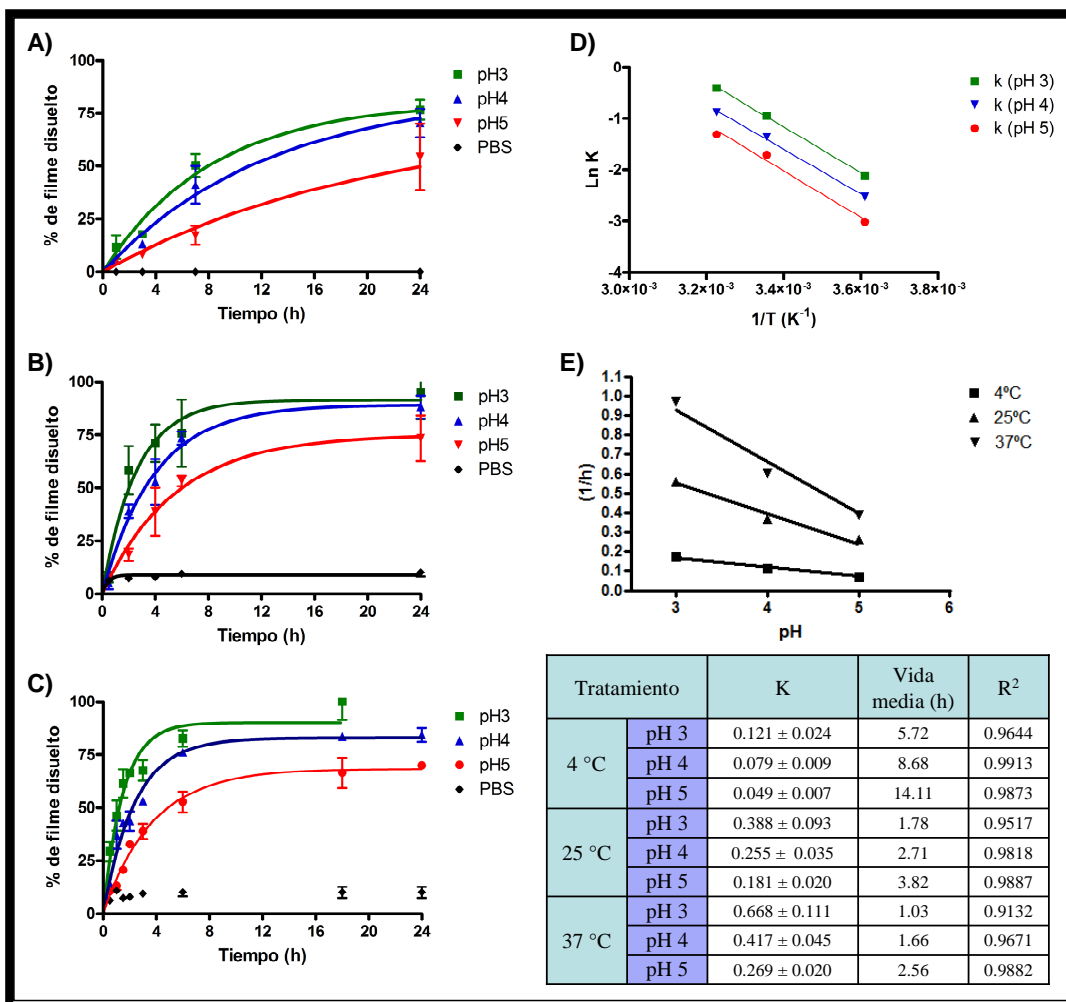


Figura 3.7. Cinética de disolución de los filmes de quitosano. Las gráficas de la derecha muestran la cinética de disolución de los filmes a diferentes temperaturas y valores de pH (A, 4°C; B, 25°C; C, 37°C). Los datos se ajustaron a la siguiente ecuación exponencial: $Y = Y_{max} * (1 - \exp(-K * X))$. La tabla muestra los valores obtenidos para las constantes de esta ecuación en cada caso. Las gráficas D-E corresponden a la representación de estas constantes y los correspondientes ajustes lineales.

La estabilidad de los filmes también se estudió teniendo en cuenta el hecho de que *in vivo*, el quitosano es degradable por hidrólisis enzimática. Estudios previos indican que enzimas ubicuas como la lisozima cortan las cadenas del quitosano disminuyendo de esta manera su peso molecular hasta hacerlo accesible a las células. El mecanismo enzimático consiste en un reconocimiento de tres unidades acetiladas consecutivas en el quitosano. En ese punto la enzima actúa y produce la ruptura de las cadenas polipeptídicas. Esta degradación está relacionada por tanto con el grado de acetilación del quitosano y, probablemente, con el Peso Molecular del biopolímero de partida. Los productos de degradación final, glucosaminas y sacáridos, forman parte del metabolismo normal de las células y pueden ser incorporados a glicoproteínas o ser excretados como dióxido de carbono durante la respiración.

Para el estudio de la degradación enzimática del quitosano se diseñaron varios experimentos *in vitro* que simulan este proceso en las distintas condiciones fisiológicas que puede encontrar el filme tras su implantación.

En primer lugar se simularon las condiciones de implantación iniciales, es decir, 37°C, pH ligeramente ácido (pH 5.4), tampón fosfato y presencia de lisozima. La figura 3.8.A muestra la cinética de las primeras 24 horas, donde se puede observar que el filme se disuelve (como en el control) mientras la enzima empieza a actuar sobre el quitosano (menor viscosidad que el control). Posteriormente (Figura 3.8.B), la enzima sigue actuando sobre las cadenas de quitosano disminuyendo el peso molecular. En este ensayo también se puede ver un descenso del peso molecular del quitosano control, debido a la rotura ácida de las cadenas de quitosano en disolución.

El siguiente ensayo se realizó en condiciones fisiológicas normales (PBS, pH 7.4, 37 °C). En este caso el filme no se disolvió y si se observó la degradación del quitosano presente en el filme por efecto de la lisozima (figura 3.8.C), confirmándose por tanto la degradación del filme por la lisozima.

Por tanto, los ensayos realizados indican que las enzimas presentes en el organismo (en este caso la lisozima) pueden degradar el filme de quitosano. Además, los ensayos indican que, una vez disuelto el filme, las enzimas siguen siendo capaces de degradar el quitosano en disolución, lo que permitiría la metabolización de sus componentes (glucosamina y N-acetil-glucosamina).

Por otro lado, también hay que tener en cuenta que seguramente, *in vivo*, este proceso sea mucho más lento, puesto que la concentración de lisozima en el organismo es menor a la utilizada en estos ensayos.

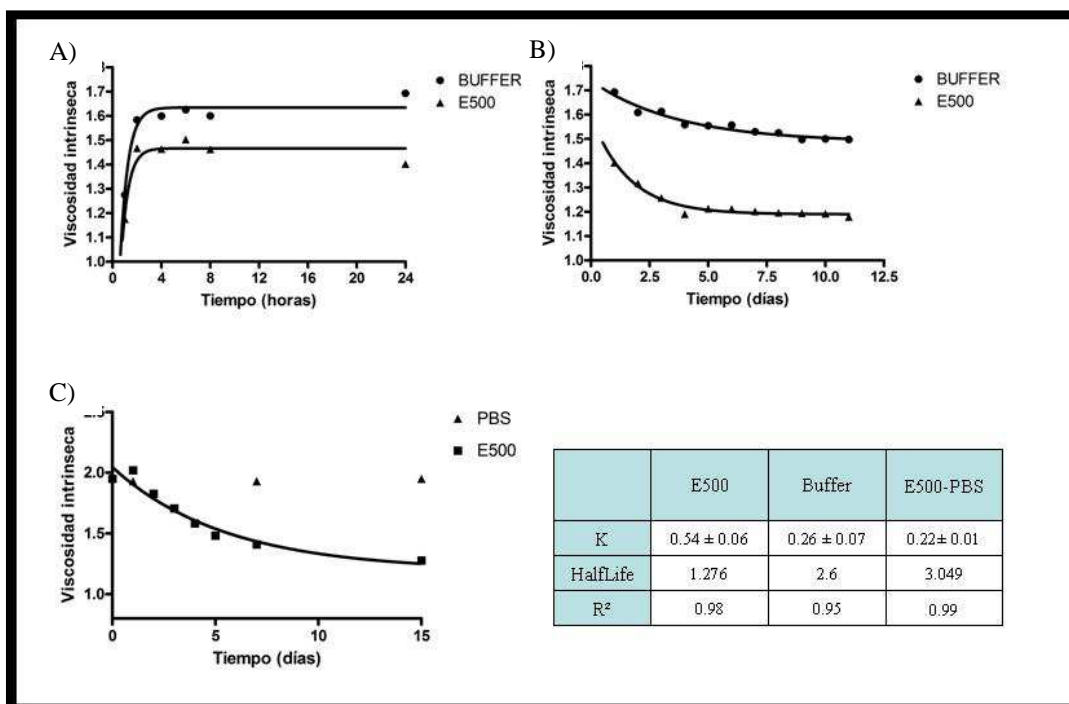


Figura 3.8. Degradación enzimática de los filmes. Las gráficas A-B corresponden a los ensayos de degradación realizados en tampón pH5.4. En la gráfica A se representan las primeras 24 horas de ensayo. En la gráfica B se presentan los datos de degradación asta el onceavo día.

La gráfica C representa la los datos obtenidos en los ensayos realizados a pH 7.

Los datos de las gráficas B-C se ajustaron a la ecuación: $Y = \text{Span} \cdot \exp(-K \cdot X) + \text{Plateau}$ y la tabla recopila las constantes de esta ecuación obtenidas en cada caso.

4.1.2.-FILMES DE QUITOSANO COMO SUSTRATO DE CRECIMIENTO CELULAR

Una vez estudiados los parámetros descritos, se sembraron células C2C12 sobre los filmes de quitosano para cuantificar la respuesta celular a este sustrato de crecimiento. Como se mencionó en la introducción, diversos estudios *in vitro* han revelado que el quitosano es biocompatible, es decir, las células se adhieren a él y proliferan de forma adecuada^{7, 16-25}. Se cree que este comportamiento se debe a la densidad de carga superficial, que depende del grado de desacetilación del quitosano. En nuestro caso, y como ya se mencionó anteriormente, el grado de desacetilación del material de partida se estimó en $84\pm 0.7\%$, valor que se considera adecuado para el crecimiento celular¹⁹.

Para la cuantificación de la adhesión y proliferación celular en el tiempo se utilizó el método Bradford (cuantificación de proteínas totales). Los datos representados en la figura 3.9 indican que las células se adhieren inicialmente de manera similar al control y crecen sobre los filmes de quitosano hasta llegar a confluencia. Sin embargo, este proceso de crecimiento es más lento que sobre la superficie control (plástico comercial para cultivos celulares). El ajuste exponencial de estos datos indica que las células C2C12 se dividen cada 1,22 días sobre la superficie control, mientras que tardan 1,78 días sobre los filmes de quitosano.

Para evaluar el efecto del sustrato en las células C2C12 se propuso la realización tanto de otros ensayos celulares como de expresión génica. En el primero de los casos, se intentó realizar los mismos ensayos realizados para la caracterización del efecto de la rhBMP-2 en el capítulo anterior. Sin embargo, algunos de los ensayos no se pudieron realizar (determinación del contenido en DNA), por interferencia del propio soporte en las mediciones a realizar. En cualquier caso, los ensayos accesibles mostraron que el crecimiento celular sobre filmes altera la viabilidad celular (calceína) y la actividad mitocondrial (MTT) (Figura 3.9).

Para estudiar el grado de adhesión celular sobre los filmes, las células confluentes se trataron con tripsina, una enzima que rompe los enlaces entre la membrana celular y la superficie de crecimiento. La figura 3.10 muestra el estado inicial donde se observa la similitud en la morfología de las células adheridas al film de quitosano y de las células adheridas en la superficie control. Una vez añadida la tripsina, se midió el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento hasta que las células se separan del sustrato.

La figura 3.10 muestra como las células crecidas sobre quitosano siguen adheridas tras 15 minutos de tratamiento, y permanecen así hasta una hora, mientras que la mayoría

de las células se despegan de la superficie control en los primeros 3 minutos. Este resultado se explica por las propiedades de los filmes de quitosano descritas anteriormente. Por un lado, la carga positiva de la superficie del filme permite que las células sigan adheridas al quitosano. Por otro lado, la capacidad de hidratación del filme permite la incorporación de moléculas presentes en el medio de cultivo celular, que aumentan la adhesión de las células al sustrato e inhiben la actividad de la tripsina.

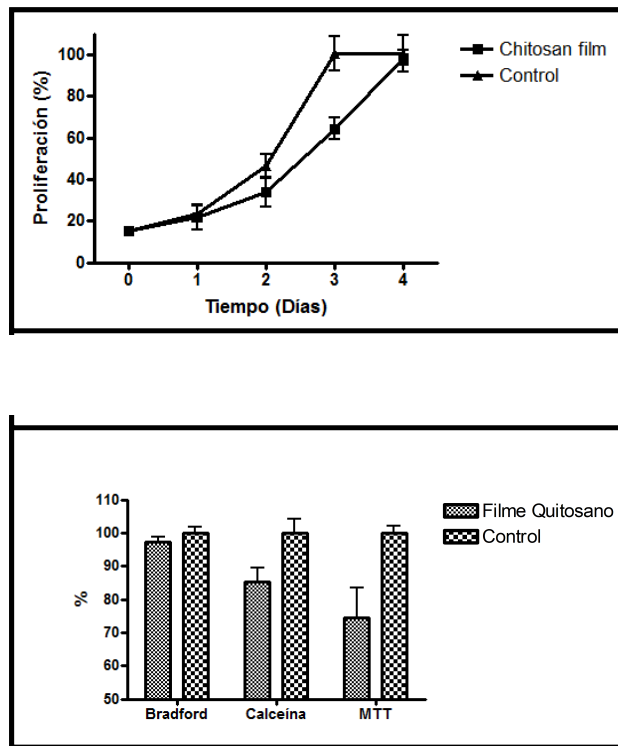


Figura 3.9. La gráfica superior representa la cinética de proliferación celular en la superficie control y en los filmes de quitosano. La gráfica inferior representa los datos obtenidos para diferentes parámetros celulares en las células crecidas en estas dos superficies.

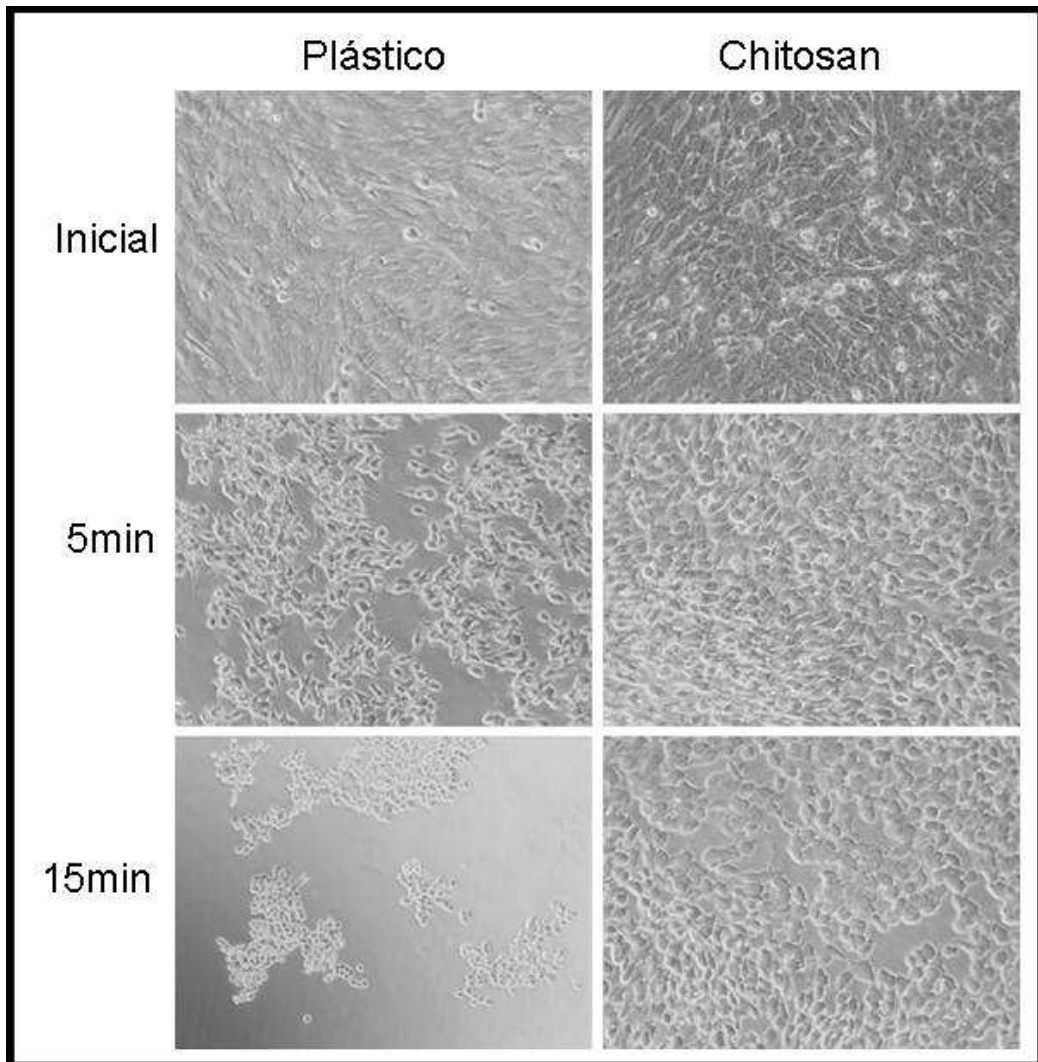


Figura 3.10. Ensayo de adhesión celular.

Los ensayos de expresión génica se llevaron a cabo con muestras de células crecidas sobre filmes durante cuatro días. La tabla de la figura 3.11 muestra todas las sondas cuya expresión se vio afectada (72 sondas correspondientes a 52 genes, de los cuales 37 están activados y 15 están inhibidos).

Estos genes se estudiaron mediante clasificaciones ontológicas. La figura 3.11.A ilustra los términos ontológicos relacionados con los genes activados. La mayoría de ellos están relacionados con la proliferación celular y la respuesta celular al quitosano como estímulo químico procedente de un organismo extraño. Por su parte, la figura 3.11.B

muestra los términos ontológicos relacionados con los genes inhibidos. En este caso, además de adhesión celular, se observan términos relacionados con desarrollo y diferenciación neuronal.

En todo caso, la lista de genes con cambios de expresión génica es muy reducida, lo que sugiere que las células admiten el crecimiento sobre esta superficie sin grandes dificultades.

Probe Set ID	fold_QvsC	Gene Symbol
1421041_s_at	6.657935	Gsta1 /// Gsta2
1421040_a_at	6.647488	Gsta2
1425832_a_at	5.878221	Cxcr6
1450297_at	3.957976	Il6
1422812_at	3.930006	Cxcr6
1448617_at	3.379263	Cd53
1423627_at	3.307592	Nqo1
1419082_at	3.117784	Serpinh2
1420380_at	3.018876	Ccl2
1421473_at	2.959978	Il1a
1419473_a_at	2.795448	Cck
1427760_s_at	2.704928	Pitf1 /// Pitf2 /// Mrppl3
1423756_s_at	2.693571	Igfbp4
1438527_at	2.609244	Ccl7
1421228_at	2.547764	Slc30a1
1436164_at	2.457071	Hmga2
1450781_at	2.434458	Aspn
1416652_at	2.431827	Ereg
1419431_at	2.399047	Igfbp4
1437405_a_at	2.394986	Hmga2
1422851_at	2.390598	2310032D16Rik
1429144_at	2.36927	Ptgfr
1420349_at	2.348901	Gas5
1455904_at	2.333763	Igfbp4
1437406_x_at	2.325589	Plek
1448748_at	2.317174	Hmga2
1450780_s_at	2.27205	493055M18Rik
1457292_at	2.269584	Bpgm
1415865_s_at	2.264942	Omd
1418745_at	2.252294	Nkd2
1434275_at	2.251628	Denr
1420367_at	2.216407	Egr3
1436329_at	2.217423	Plek
1448749_at	2.197845	Slc20a1
1448568_a_at	2.191622	Fgf7
1438405_at	2.186525	Il1r1
1422317_a_at	2.158373	1700012B09Rik
1428984_a_at	2.142763	Mal
1417275_at	2.13012	Igfbp4
1423757_x_at	2.125101	Hba-a1
1417714_x_at	2.118151	Gsta4
1416368_at	2.084856	Nr4a2
1455034_at	2.068221	Mbps2
1437495_at	2.063496	Hgf
1442884_at	2.062225	Cxcl1
1457644_s_at	2.061611	Hspa1b
1452318_a_at	2.051732	Nr4a2
1447863_s_at	2.049833	5033413D16Rik
1428694_at	2.046037	Il1r1
1425145_at	2.027788	Sfrs7
1436871_at	2.026278	Aspn
1448421_s_at	2.022586	1110007M04Rik
1435333_at	2.013489	Inrc15
1439837_at	2.006875	Fn1
1426642_at	2.002952	Tagln
1423505_at	2.015914	---
1436173_at	2.017142	Lpin1
1418288_at	2.020356	D5Ert6593e
1434442_at	2.028679	Al842788
1435589_at	2.032725	6330406I15Rik
1426937_at	2.065721	Gadd45a
1449519_at	2.120535	Krt1-19
1417156_at	2.141954	L1cam
1450435_at	2.344588	---
1434411_at	2.400968	Efemp1
1427183_at	2.481129	Tfrc
1452661_at	2.716918	Adm
1416077_at	2.886962	Cxcl12
1417574_at	3.159533	Postn
1423606_at	3.25402	Cxcl12
1448823_at	3.473069	Cxcl12

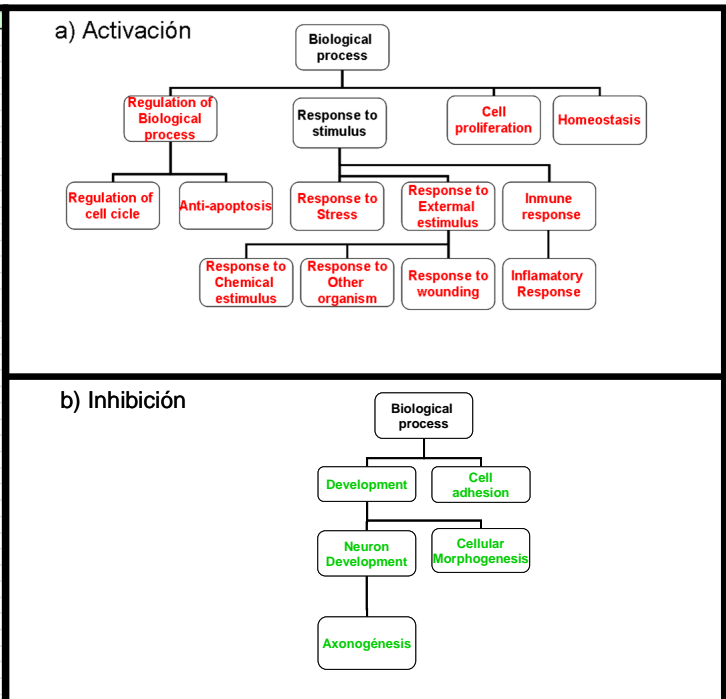


Figura 3.11.. Estudio de expresión génica. La tabla muestra los genes activados (rojo) o inhibidos (verde) por el crecimiento celular sobre filmes de quitosano. Los genes activados se estudiaron mediante clasificación ontológica y la figura A muestra la relación jerárquica entre los términos ontológicos estadísticamente significativos. Los genes inhibidos se estudiaron de la misma manera y la relación jerárquica obtenida se presenta en la figura B.

4.1.3.-FILMES DE QUITOSANO COMO PORTADORES DE rhBMP-2

Una vez estudiadas las características de los filmes de quitosano para su posible uso como recubrimiento de materiales implantables, se incorporó en los mismos la rhBMP-2. Puesto que se trata de un factor de diferenciación ósea, su correcta liberación estimularía la formación de este tejido, por lo que el desarrollo de un buen material transportador tendría amplias aplicaciones en el campo de la regeneración de tejido óseo.

Dado que los filmes de quitosano se hinchan en contacto con medio acuoso, los primeros ensayos se enfocaron en el estudio de la posible difusión de la rhBMP-2 desde los mismos. Para ello, se sumergieron en PBS filmes cargados con proteína (800µg) y se midió la cantidad de la misma liberada al medio durante 7 días. Al terminar el ensayo, se disolvieron los filmes en ácido acético para medir la cantidad de rhBMP-2 que no había difundido al medio durante el ensayo. La figura 3.12 indica que durante el tiempo que duró el ensayo no se difundió una cantidad apreciable de proteína en el medio. Además, la figura también refleja que la mayoría de la proteína cargada inicialmente en el filme permaneció retenida en éste al terminar el ensayo, por lo que solo una pequeña parte había difundido al medio.

Seguidamente se realizó un ensayo para determinar la actividad de la rhBMP-2 difundida. La actividad de rhBMP-2 sobre las células C2C12 implica la aparición de actividad fosfatasa alcalina, y bastan pequeñas cantidades de rhBMP-2 para iniciar este proceso. Dado que el ensayo anterior indica que el proceso de difusión de esta proteína desde el filme de quitosano es lento, se optó por usar este marcador para detectar el proceso de liberación de la proteína desde el filme. En este caso, se prepararon filmes activados con diferentes cantidades de proteína (1, 6 o 60 µg) y se pusieron en contacto con 400µl de medio de cultivo para permitir la libre difusión de la rhBMP-2. El medio se reemplazó diariamente durante 4 días y a continuación se empleó como medio de cultivo de células C2C12. La figura 3.12 indica la actividad fosfatasa alcalina (FA) en las células C2C12 tras 4 días de cultivo. Como se puede ver, la proteína difundida induce el inicio de la diferenciación ósea de estas células, aunque la cantidad de proteína difundida sea solo una pequeña fracción del total. El ensayo también indica que, con el tiempo, la cantidad de proteína que se difunde desde el film es menor aunque no se haya agotado el reservorio de las mismas dentro del filme, como indica el descenso en la actividad FA detectada.

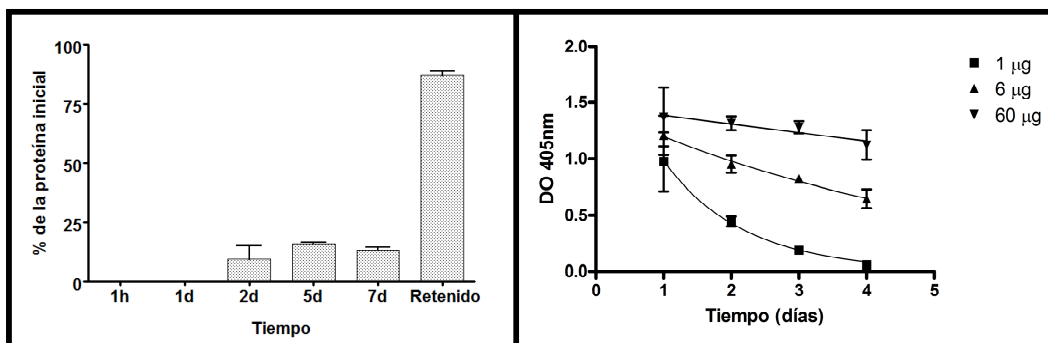


Figura 3.12. Ensayos de difusión de rhBMP-2. La primera gráfica representa la cantidad de rhBMP-2 liberada por difusión al medio PBS durante 7 días. También se representa la cantidad de rhBMP-2 que permanecía retenida en el filme al terminar el ensayo. La segunda figura representa la actividad FA de células cultivadas con medio DMEM utilizado para ensayos de difusión de rhBMP-2.

Puesto que en el apartado anterior se estudiaron posibles métodos de degradación del filme como son la disolución (ácida) y la degradación enzimática (tanto a valores de pH ácido como neutro), estos fenómenos se estudiaron como posibles vías de liberación de la rhBMP-2 retenida en el filme. En concreto, se prepararon filmes con rhBMP-2 y se realizaron ensayos similares a los anteriormente descritos. Posteriormente se midió la proteína liberada y ésta se utilizó para comprobar la actividad de la rhBMP-2 incluida en los filmes. La figura 3.13 muestra la actividad de 1µg de rhBMP-2, tanto retenida en el filme como liberada en los tres ensayos de liberación propuestos (difusión, disolución y degradación enzimática). Como se puede observar (figura 3.13), la proteína mantiene su actividad en todos los casos estudiados, lo que indica que ni el proceso de fabricación del filme ni los procesos de liberación la inactivan.

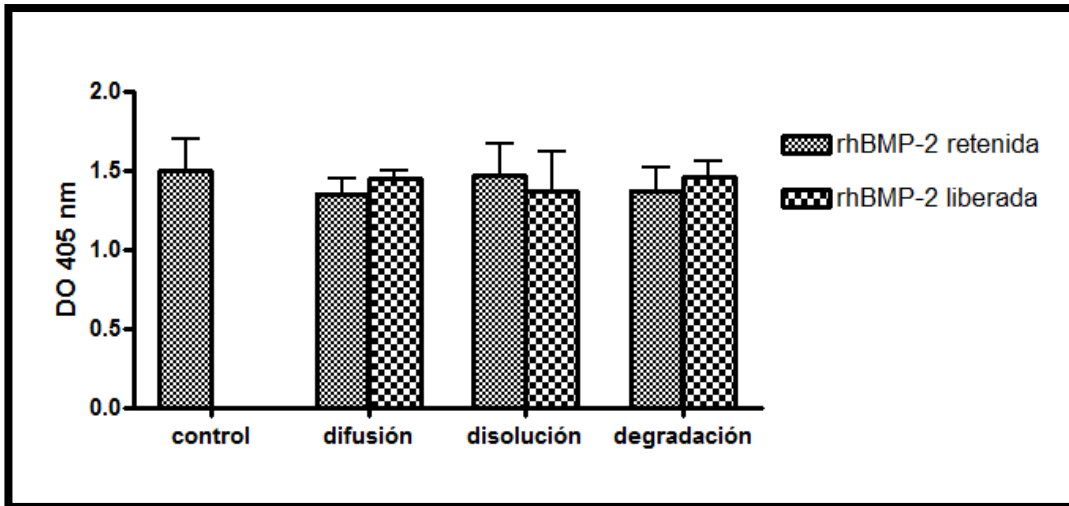


Figura 3.13. Ensayos de actividad de rhBMP-2 en los diferentes ensayos de liberación realizados. En todos los casos se utilizó 1 µg de muestra de rhBMP-2.

Puesto que las células crecen sobre los filmes de quitosano, se decidió realizar un ensayo para evaluar la respuesta celular en función de la cantidad de rhBMP-2 añadida en los mismos. Para ello se sembraron células sobre filmes con diferentes cantidades de rhBMP-2, añadiendo las mismas cantidades de rhBMP-2 a pocillos control, y midiendo la actividad fosfatasa alcalina (FA) a los 4 días. La figura 3.14 muestra como la actividad máxima en los pocillos control se logra con 100 nM de rhBMP-2, mientras que, cuando la rhBMP-2 está incluida en los filmes de quitosano, se precisa de una cantidad de proteína equivalente a 400nM para obtener ese mismo valor de actividad máxima. Estos resultados concuerdan con los datos de difusión previos que indicaban que solo una parte de la proteína difunde al medio, siendo accesible así para las células, por lo que una parte importante de la rhBMP-2 está secuestrada para ejercer su acción inicial, permitiendo así un reservorio de la misma liberable a lo largo del tiempo.

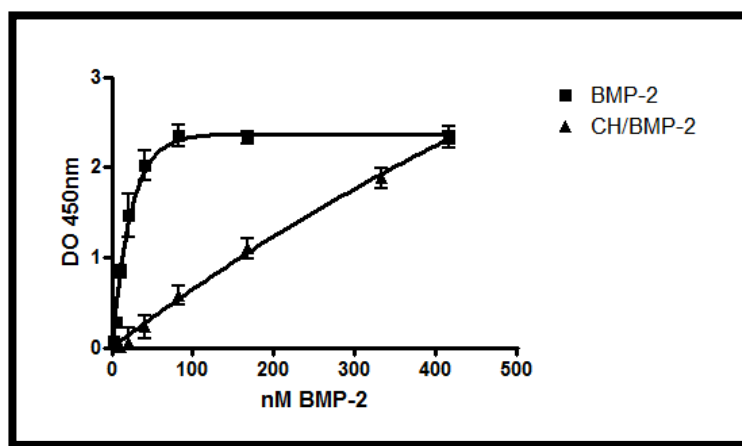


Figura 3.14. Ensayos de diferenciación celular. La rhBMP-2 se añadió en los filmes o en el medio de cultivo. La gráfica indica la diferencia de dosis de rhBMP-2 necesaria para obtener la misma respuesta celular. Los datos se ajustaron a la ecuación exponencial: $Y=Y_{\max}*(1-\exp(-K*X))$.

Puesto que estos filmes portadores de rhBMP-2 son el verdadero material novedoso, implantable y oseoinductor desarrollado, se decidió estudiar la respuesta génica de las células crecidas sobre ellos y compararla tanto con las de células crecidas sobre filmes sin rhBMP-2 (ensayo descrito anteriormente) como la de las células control estimuladas con rhBMP-2 (capítulo 2 de este trabajo).

En este caso, se obtuvieron 493 sondas con expresión alterada, correspondientes a 304 genes, de los cuales 157 están sobreexpresados y 147 están inhibidos. La tabla 3.2 es una comparativa de los resultados de expresión génica obtenidos para los tres tratamientos realizados durante este trabajo. En ella se han plasmado las coincidencias entre los genes obtenidos en los tratamientos. Como se puede observar, el 90% de la respuesta obtenida en las células crecidas sobre los filmes con rhBMP-2 coincide con la respuesta de las células control a rhBMP-2, y el 7,3% con la respuesta a los filmes de quitosano. De esta manera, se observa que tanto el efecto del sustrato como el de rhBMP-2 por separado son apreciables en el tratamiento conjunto, si bien la mayoría de la respuesta celular está determinada por la rhBMP-2.

Tabla 3.2. Genes modificados en cada tratamiento y relación entre los genes de cada tratamiento.

Tratamientos	BMP-2 (567sondas)	Quitosano (77sondas)	
Quitosano/rhBMP-2 (493 sondas)	444 90,1%	36 7,3%	Sondas comunes. En porcentaje.

Las tablas 3.3.A-B corresponden también a una comparativa de los términos ontológicos obtenidos en los diferentes tratamientos. Como se puede ver, no existe gran diferencia en la actividad de rhBMP-2, libre o inmovilizada en quitosano, sobre las células C2C12. La tabla 3.3.A recopila los términos relacionados con procesos celulares y la tabla 3.3.B recopila los términos relacionados con procesos de diferenciación celular. En esta última tabla se ha incluido adicionalmente un apartado para los términos relacionados solo con el crecimiento celular sobre quitosano.

	B treatment		CHB treatment		CH treatment	
	N° Genes	P-Value	N° Genes	P-Value	N° Genes	P-Value
Well known regulated genes		344		304		52
regulation of biological process	↑↓	97 7,0E-03	↑↓	84 9,9E-03		16 9,7E-02
regulation of cellular process	↑↓	90 4,2E-05	↑↓	81 2,2E-04		16 1,0E-02
reg. cel. Physiol. process	↑↓	79 1,8E-03	↑↓	74 1,4E-03		15 1,5E-02
Signal Transduction	↑	64 8,7E-03	↑	61 5,1E-03	↑	17 2,5E-04
morphogenesis	↑↓	50 3,9E-10	↑↓	50 1,7E-11	↓	8 6,5E-03
cell differentiation	↑↓	49 3,5E-10	↑↓	44 6,0E-09		6 5,4E-02
transcription regulator activ.	↑	37 9,5E-03	↑	31 5,3E-02		1 2,7E-01
cell adhesion	↑	24 4,8E-04	↑	22 8,5E-04	↓	4 8,6E-02
cellular morphogenesis	↑↓	22 1,9E-05	↑↓	24 3,7E-07	↓	6 1,1E-03
apoptosis	↑↓	20 3,5E-03	↑↓	23 7,5E-05		3 1,9E-01
cell development	↑↓	19 1,6E-05	↑↓	18 1,8E-05		3 6,4E-02
cell proliferation	↑	17 2,4E-03	↑	17 9,7E-04	↑	6 9,4E-04
cell migration		13 1,3E-03		13 5,8E-04	↓	3 3,5E-02
regulation of cell cycle		11 9,1E-02		10 1,1E-01	↑	5 3,4E-03
growth factor activity	↑	9 7,0E-03	↑	12 7,0E-05	↑	7 5,5E-07
regulation of cell size		7 3,1E-03		6 8,5E-03		1 2,5E-01
Homeostasis		6 1,8E-01		6 1,4E-01	↑	4 2,2E-03

Tabla 3.3.A. Comparativas de los términos ontológicos obtenidos tras el estudio completo de los tratamientos realizados. En la tabla A se recopilan los términos relacionados con procesos celulares.

	B treatment		CHB Treatment		CH Treatment	
	Nº Genes	P-Value	Nº Genes	P-Value	Nº Genes	P-Value
Development	↑↓ 100	2,7E-16	↑↓ 93	1,3E-15	↓ 15	1,1E-03
Anatomical structure development	↑↓ 81	8,6E-14	↑↓ 72	3,8E-13	11	1,2E-02
Bone dif. Pathway						
Bone remodeling	↑ 8	5,5E-04	↑ 9	5,2E-05	0	
skeletal development	↑ 10	8,0E-04	↑ 9	1,7E-03	0	
ossification	↑ 7	1,5E-03	↑ 8	1,5E-04	0	
biomineral formation	↑ 7	1,5E-03	↑ 8	1,5E-04	0	
TGFB signaling pathway	↑ 5	2,7E-03	↑ 6	2,4E-04	0	
Angiogenesis						
blood vessel development	↑ 13	1,5E-05	↑ 10	6,2E-04	2	7,8E-02
vasculature development	↑ 13	1,9E-05	↑ 10	7,5E-04	2	8,1E-02
blood vessel morphogenesis	↑ 11	7,2E-05	↑ 9	7,8E-04	2	5,9E-02
angiogenesis	↑ 8	2,2E-03	↑ 7	5,4E-03	2	4,5E-02
Miogenesis						
heart development	↓ 10	6,2E-05	↓ 9	1,7E-04	1	2,8E-01
troponin complex	↓ 3	6,9E-04	↓ 4	1,4E-05	0	
striated muscle thin filament	↓ 3	5,0E-03	↓ 4	2,5E-04	0	
sarcomere	↓ 5	1,3E-02	↓ 7	2,9E-04	0	
Structural constituent of cytoskeleton	↓ 6	1,5E-02	↓ 8	5,2E-04	1	2,6E-01
myofibril	↓ 5	1,8E-02	↓ 7	4,6E-04	1	1,7E-01
contractile fiber	↓ 5	2,1E-02	↓ 7	5,8E-04	0	
Neurogenesis						
nervous system development	↓ 29	3,4E-07	↓ 26	2,2E-06	↓ 5	1,6E-02
neurogenesis	↓ 18	1,1E-05	↓ 18	3,3E-06	↓ 4	8,6E-03
axonogenesis	↓ 11	6,6E-05	↓ 10	1,6E-04	↓ 3	6,8E-03
glial cell differentiation	↓ 3	3,1E-03	↓ 3	2,5E-03	0	
Epidermogenesis						
epidermis development	↑↓ 9	7,2E-06	↑↓ 8	3,1E-05	0	
Ectoderm development	↑↓ 9	1,3E-05	↑↓ 8	5,3E-05	0	
hair follicle development	↑ 4	3,5E-04	↑ 3	3,9E-03	0	
Embriogenesis						
Embryonic development	17	1,4E-03	13	1,2E-02	2	3,1E-01
Embryonic morphogenesis	10	2,0E-03	8	8,5E-03	1	4,0E-01
CH treatment altered GO terms						
inflammatory response	9	5,5E-03	6	8,1E-02	↑ 4	1,4E-03
response to wounding	12	1,2E-02	7	2,7E-01	↑ 5	8,8E-04
response to other organism	13	4,9E-02	9	2,9E-01	↑ 6	1,5E-03
immune response	17	8,2E-02	15	1,3E-01	↑ 7	1,6E-03
response to chemical stimulus	4	6,8E-01	3	5,6E-01	↑ 5	7,8E-05

Tabla 3.3.B. Comparativas de los términos ontológicos obtenidos tras el estudio completo de los tratamientos realizados. En la tabla B se recopilan los términos relacionados con procesos de diferenciación celular.

Para finalizar este apartado se procedió a la validación de los resultados obtenidos en los arrays mediante la técnica de PCR cuantitativa. Para ello se seleccionaron genes relacionados con el proceso de diferenciación ósea (Fmod, sp7, postn, Bambi, Smad6), genes relacionados con el fenotipo mioblástico de las células C2C12 (CdH15, Tnni2, MyogD) y genes alterados por el sustrato quitosano (Gsta1, Gsta2, Il-6, Ccl2, Lcam1, Cxcl12).

La figura 3.15 representa los datos obtenidos para estos genes. En un primer bloque se pueden ver los genes relacionados con el proceso de diferenciación ósea activados tanto en el tratamiento de rhBMP-2 como en el tratamiento de células crecidas sobre filmes de quitosano/rhBMP-2. Como se puede observar, los datos de activación de estos genes obtenidos en los tratamientos con rhBMP-2 son similares.

En un segundo bloque se observan los genes relacionados con el fenotipo mioblástico, el original de las células C2C12, tanto en el tratamiento de rhBMP-2 como en el tratamiento de células crecidas sobre filmes de quitosano/rhBMP-2. Estos genes están inhibidos en ambos tratamientos también de manera muy similar.

Por último, los dos últimos bloques comparan los datos obtenidos en los ensayos de array y en los ensayos de PCR cuantitativa para genes alterados por el sustrato quitosano. En este caso, también se puede observar que los datos de ambos ensayos concuerdan, validándose de ésta forma los resultados previos obtenidos del estudio de la expresión génica por microarrays.

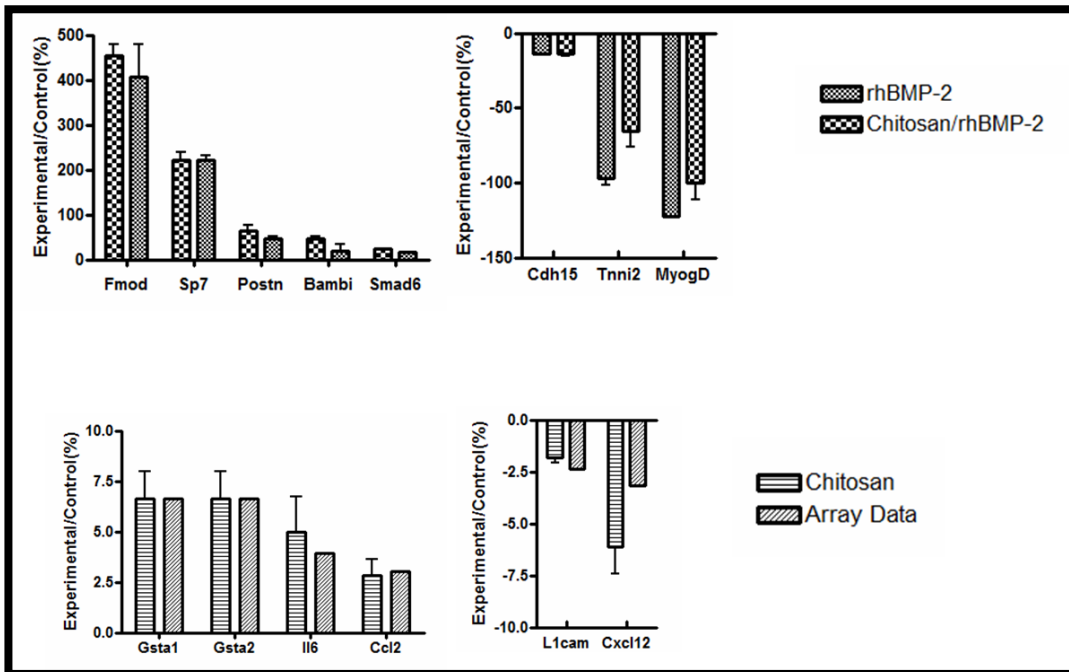


Figura 3.15. Ensayos de PCR cuantitativa. En la primera gráfica se representan los datos de los genes estudiados y relacionados con el proceso de diferenciación ósea. En la segunda gráfica se representan los genes relacionados con diferenciación mioblástica en los dos tratamientos indicados. En las gráficas inferiores se representan genes con la expresión modificada en el tratamiento de quitosano. En estas gráficas se presentan los datos obtenidos de estos genes tanto en el ensayo de PCR cuantitativa como en el array.

5.-CONCLUSIONES

Los resultados que se presentan en este apartado corresponden a los ensayos realizados para estudiar la viabilidad de los filmes de quitosano como portadores de rhBMP-2. En una primera parte, se han caracterizado diferentes parámetros físico-químicos de los filmes estudiando asimismo el comportamiento celular en respuesta al crecimiento sobre esta superficie. Posteriormente, se ha procedido a la incorporación de la rhBMP-2 a los filmes y se ha estudiado la actividad de la proteína retenida, se han evaluado diferentes mecanismos de liberación de la rhBMP-2 desde el filme y finalmente se ha caracterizado la actividad de la proteína liberada y la respuesta celular al material desarrollado.

De los ensayos realizados se han obtenido las siguientes conclusiones:

Los ensayos de caracterización de los filmes de quitosano indican que estos poseen propiedades adecuadas para su uso en regeneración tisular. Por un lado, el espesor del filme es modulable y directamente proporcional a la cantidad de quitosano utilizada para su formación. Por otro, los parámetros de rugosidad superficial, hidratación e hidrofiliidad corresponden a un material con capacidad para la adhesión celular.

Los ensayos realizados en relación a la respuesta del filme en diferentes fases del proceso de reparación tisular indican que, posiblemente, parte del filme se disuelva en las primeras fases del proceso, debido a acidificación inicial del lecho de la herida. La biodegradación posterior por efecto de la acción enzimática de la lisozima es un proceso con una cinética mucho más lenta.

Los ensayos de biocompatibilidad realizados indican que las células se adhieren y proliferan sobre los filmes de quitosano. En comparación con células crecidas sobre una superficie control, la proliferación sobre filmes de quitosano es ligeramente más lenta, indicando un retraso de unas 24 horas en los niveles de proliferación encontrados con respecto a la superficie control. Este tiempo posiblemente se deba al proceso de adaptación de las células a esta superficie. Los parámetros estudiados en relación a la viabilidad celular también se ven afectados, lo que parece corroborar la observación anterior.

Los estudios de expresión génica realizados indican que el crecimiento celular sobre filmes de quitosano no modifica radicalmente los patrones de expresión. Estas células sobrexpresan ligeramente genes relacionados con la respuesta inmune y respuesta a un estímulo externo (estímulo químico, herida o de un organismo externo).

Los ensayos realizados para comprobar la actividad de la rhBMP-2 incorporada en los filmes indican que el proceso de fabricación no inactiva la proteína.

Una vez incorporada la proteína, los ensayos de liberación de rhBMP-2 desde filmes de quitosano indican que el proceso de difusión de esta proteína es lento, pero suficiente para iniciar la respuesta celular. Consideramos que la liberación de rhBMP-2 desde los filmes aglutina tanto los procesos de difusión como los procesos de disolución y degradación enzimática ya mencionados. Dada la ausencia de conocimiento exacto de la duración de cada etapa en el proceso de curación de heridas, y sobre todo de la evolución temporal de los valores del pH *in vivo*, los valores obtenidos se han de considerar como límites superiores a los procesos de biodegradación reales.

Los ensayos de respuesta celular de aparición de fenotipos osteoblástico como consecuencia del cultivo sobre filme de quitosano/rhBMP-2, indican que, con respecto a la adición directa del agente osteoinductor al medio de cultivo, se necesita una dosis cuatro veces mayor de rhBMP-2 incorporada en los filmes para obtener la máxima respuesta celular. Estos datos corroboran los datos de difusión, puesto que aun siendo completamente activa, los resultados indican que la mayoría de la rhBMP-2 no está accesible para la diferenciación celular.

Finalmente, los ensayos de expresión génica indican que la respuesta celular a la adición directa de la rhBMP-2 y la respuesta celular cuando se crecen sobre filmes de quitosano/rhBMP-2 es muy similar, lo que indica que esta superficie de crecimiento no modifica sustancialmente la respuesta a rhBMP-2.

6.- **REFERENCIAS:**

1. Li, R. H. & Wozney, J. M. Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. *Trends Biotechnol.* **19**, 255-265 (2001).
2. Seeherman, H. & Wozney, J. M. Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 329-345 (2005).
3. Luginbuehl, V., Meinel, L., Merkle, H. P. & Gander, B. Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **58**, 197-208 (2004).
4. Kirker-Head, C. A. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **43**, 65-92 (2000).
5. Seeherman, H., Wozney, J. & Li, R. Bone morphogenetic protein delivery systems. *Spine* **27**, S16-23 (2002).
6. Roberts, G. in *Chitin Chemistry* 274-325 (Macmillan Press Ltd., London, 1992).
7. Khor, E. & Lim, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* **24**, 2339-2349 (2003).
8. Abram, A. & Higuera, I. in *Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones* (Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo Editorial, 2004).
9. Kumar, M. N., Muzzarelli, R. A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H. & Domb, A. J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem. Rev.* **104**, 6017-6084 (2004).
10. MUZZARELLI, R. & MUZZARELLI, C. Chitosan chemistry: Relevance to the biomedical sciences. *Advances in polymer science* **186**, 151-209 (2005).
11. Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* **31**, 603-632 (2006).
12. Shi, C. *et al.* Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. *J. Surg. Res.* **133**, 185-192 (2006).

13. Ghanem, A. & Katalinich, M. Characterization of chitosan films for tissue engineering applications. *Applied Bionics and Biomechanics* **2**, 9-16 (2005).
14. Sastre, R., de Aza, S. & San Román, J. in *Biomateriales para la salud* (Faenza Editrice Ibérica, España, Portugal, Chile, 2004).
15. Rao, S. B. & Sharma, C. P. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *J. Biomed. Mater. Res.* **34**, 21-28 (1997).
16. Chung, T. W., Lu, Y. F., Wang, S. S., Lin, Y. S. & Chu, S. H. Growth of human endothelial cells on photochemically grafted Gly-Arg-Gly-Asp (GRGD) chitosans. *Biomaterials* **23**, 4803-4809 (2002).
17. Fakhry, A., Schneider, G. B., Zaharias, R. & Senel, S. Chitosan supports the initial attachment and spreading of osteoblasts preferentially over fibroblasts. *Biomaterials* **25**, 2075-2079 (2004).
18. Lee, J. E. *et al.* Effects of a chitosan scaffold containing TGF-beta1 encapsulated chitosan microspheres on in vitro chondrocyte culture. *Artif. Organs* **28**, 829-839 (2004).
19. Chatelet, C., Damour, O. & Domard, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials* **22**, 261-268 (2001).
20. Wang, Y. C., Lin, M. C., Wang da, M. & Hsieh, H. J. Fabrication of a novel porous PGA-chitosan hybrid matrix for tissue engineering. *Biomaterials* **24**, 1047-1057 (2003).
21. Hamilton, V. *et al.* Characterization of chitosan films and effects on fibroblast cell attachment and proliferation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **17**, 1373-1381 (2006).
22. Huang, Y., Onyeri, S., Siewe, M., Moshfeghian, A. & Madihally, S. V. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* **26**, 7616-7627 (2005).
23. Dhiman, H. K., Ray, A. R. & Panda, A. K. Characterization and evaluation of chitosan matrix for in vitro growth of MCF-7 breast cancer cell lines. *Biomaterials* **25**, 5147-5154 (2004).

24. Freier, T., Koh, H. S., Kazazian, K. & Shoichet, M. S. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation. *Biomaterials* **26**, 5872-5878 (2005).
25. Prasitsilp, M., Jenwithisuk, R., Kongsuwan, K., Damrongchai, N. & Watts, P. Cellular responses to chitosan in vitro: the importance of deacetylation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **11**, 773-778 (2000).
26. Koping-Hoggard, M. *et al.* Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. *Gene Ther.* **8**, 1108-1121 (2001).
27. Strand, S. P., Danielsen, S., Christensen, B. E. & Varum, K. M. Influence of chitosan structure on the formation and stability of DNA-chitosan polyelectrolyte complexes. *Biomacromolecules* **6**, 3357-3366 (2005).
28. Kiang, T., Wen, J., Lim, H. W. & Leong, K. W. The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. *Biomaterials* **25**, 5293-5301 (2004).
29. Zhang, X. *et al.* Direct chitosan-mediated gene delivery to the rabbit knee joints in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 202-208 (2006).
30. Lee, J. Y. *et al.* Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. *J. Controlled Release* **78**, 187-197 (2002).
31. Park, Y. J. *et al.* Controlled release of platelet-derived growth factor-BB from chondroitin sulfate-chitosan sponge for guided bone regeneration. *J. Control. Release* **67**, 385-394 (2000).
32. Obara, K. *et al.* Photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2 stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice. *Biomaterials* **24**, 3437-3444 (2003).
33. Cho, B. C. *et al.* The bone regenerative effect of chitosan microsphere-encapsulated growth hormone on bony consolidation in mandibular distraction osteogenesis in a dog model. *J. Craniofac. Surg.* **15**, 299-311; discussion 312-3 (2004).

34. Ozbas-Turan, S., Akbuga, J. & Aral, C. Controlled release of interleukin-2 from chitosan microspheres. *J. Pharm. Sci.* **91**, 1245-1251 (2002).
35. Klokkevold, P. R., Vandemark, L., Kenney, E. B. & Bernard, G. W. Osteogenesis enhanced by chitosan (poly-N-acetyl glucosaminoglycan) in vitro. *J. Periodontol.* **67**, 1170-1175 (1996).
36. Muzzarelli, R. A. *et al.* Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials* **15**, 1075-1081 (1994).
37. Ohara, N. *et al.* Early gene expression analyzed by cDNA microarray and RT-PCR in osteoblasts cultured with water-soluble and low molecular chitooligosaccharide. *Biomaterials* **25**, 1749-1754 (2004).
38. Matsunaga, T. *et al.* Chitosan monomer promotes tissue regeneration on dental pulp wounds. *J. Biomed. Mater. Res. A.* **76**, 711-720 (2006).
39. Amaral, I. F., Lamghari, M., Sousa, S. R., Sampaio, P. & Barbosa, M. A. Rat bone marrow stromal cell osteogenic differentiation and fibronectin adsorption on chitosan membranes: the effect of the degree of acetylation. *J. Biomed. Mater. Res. A.* **75**, 387-397 (2005).
40. Madhally, S. V. & Matthew, H. W. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* **20**, 1133-1142 (1999).
41. Nettles, D. L., Elder, S. H. & Gilbert, J. A. Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng.* **8**, 1009-1016 (2002).
42. Di Martino, A., Sittinger, M. & Risbud, M. V. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* **26**, 5983-5990 (2005).
43. Wang, X., Ma, J., Wang, Y. & He, B. Bone repair in radii and tibias of rabbits with phosphorylated chitosan reinforced calcium phosphate cements. *Biomaterials* **23**, 4167-4176 (2002).

44. Zhang, Y., Ni, M., Zhang, M. & Ratner, B. Calcium phosphate-chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. *Tissue Eng.* **9**, 337-345 (2003).
45. Li, Z. *et al.* Preparation and in vitro investigation of chitosan/nano-hydroxyapatite composite used as bone substitute materials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **16**, 213-219 (2005).
46. Hu, Q., Li, B., Wang, M. & Shen, J. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. *Biomaterials* **25**, 779-785 (2004).
47. Lee, Y. M. *et al.* Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges. *J. Periodontol.* **71**, 410-417 (2000).
48. Bumgardner, J. D. *et al.* Chitosan: potential use as a bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **14**, 423-438 (2003).
49. Zhu, Y., Gao, C., Liu, X. & Shen, J. Surface modification of polycaprolactone membrane via aminolysis and biomacromolecule immobilization for promoting cytocompatibility of human endothelial cells. *Biomacromolecules* **3**, 1312-1319 (2002).
50. Mei, N. *et al.* Biocompatibility of Poly(epsilon-caprolactone) scaffold modified by chitosan--the fibroblasts proliferation in vitro. *J. Biomater. Appl.* **19**, 323-339 (2005).
51. Wang, X. H. *et al.* Covalent immobilization of chitosan and heparin on PLGA surface. *Int. J. Biol. Macromol.* **33**, 95-100 (2003).
52. Ma, Z., Gao, C., Gong, Y., Ji, J. & Shen, J. Immobilization of natural macromolecules on poly-L-lactic acid membrane surface in order to improve its cytocompatibility. *J. Biomed. Mater. Res.* **63**, 838-847 (2002).
53. Cui, Y. L. *et al.* Biomimetic surface modification of poly(L-lactic acid) with chitosan and its effects on articular chondrocytes in vitro. *Biomaterials* **24**, 3859-3868 (2003).
54. Cai, K. *et al.* Surface modification of poly (D,L-lactic acid) with chitosan and its effects on the culture of osteoblasts in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* **60**, 398-404 (2002).

55. Muzzarelli, R. A. A. *et al.* Osteoinduction by Chitosan-Complexed BMP: Morpho-Structural Responses in an Osteoporotic Model. *J. Bioact. Compatible Polym.* **12**, 321 (1997).
56. Park, Y. J. *et al.* Immobilization of bone morphogenetic protein-2 on a nanofibrous chitosan membrane for enhanced guided bone regeneration. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **43**, 17-24 (2006).
57. Park, D. J. *et al.* Injectable bone using chitosan-alginate gel/mesenchymal stem cells/BMP-2 composites. *J. Craniomaxillofac. Surg.* **33**, 50-54 (2005).
58. ASTM F2103 - 01(2007)e2 Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Product Applications. *International Standards worldwide, Book of Standards* **13** (2007).
59. Hirai, A., Odani, H. & Nakajima, A. Determination of degree of deacetylation of **chitosan** by ¹H NMR spectroscopy. *Polym. Bull.* **26**, 87-94 (1991).
60. Lopez-Lacomba, J. L., Garcia-Cantalejo, J. M., Sanz Casado, J. V. & Ramos, V. Method for the production of chitosan-based films with enhanced cell adhering capacity, resulting product and application. **P200002057** (2000).
61. Lynch, S. E., Genco, R. J. & Marx, R. E. in *Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics* (Quintessence Pub. Co, 1999).
62. Lim, L. Y. & Wan, L. S. C. Heat Treatment of Chitosan Films. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **21**, 839-846 (1995).

CAPÍTULO 4:
Evaluación del recubrimiento de
implantes de titanio

1.-INTRODUCCIÓN

Como ya se mencionó en la introducción, actualmente se estudian diferentes tipos de materiales para la regeneración de tejido óseo.

Tradicionalmente, los defectos óseos se han tratado implantando tejidos autólogos, alogénicos o xenogénicos o implantando materiales sustitutivos. Actualmente existe una gran variedad de empresas que comercializan la fase mineral del hueso, generalmente bovino, en forma de gránulos para rellenos óseos. En paralelo, también han surgido un gran número de implantes sintéticos fabricados en materiales calcáreos (hidroxiapatita, fosfato tricálcico...), que se comercializan en una gran variedad de estructuras tridimensionales y porosidades. Dentro de este apartado, también existen productos tridimensionales de hidroxiapatita derivados del coral.

Teniendo en cuenta la función mecánica del esqueleto, la reparación ósea de huesos largos precisa del uso de materiales rígidos de sujeción que intenten mimetizar las propiedades mecánicas y elásticas del mismo. Por este motivo, los implantes usados en traumatología generalmente son de titanio. Este metal también suele ser el material de elección para la fabricación de fijaciones óseas como los implantes dentales.

Tabla 4.1. Materiales implantables de uso clínico.

Material de implante	Uso	Marca comercial
Fracción mineral del Hueso	Rellenos óseos	Oseograft, Bio-Oss, Endobon,...
Fracción no mineral de Hueso (colágeno, fracción proteica)	Rellenos óseos	Grafton, Reguarde, Healos...
Matrices porosas de material calcáreo (Hidroxiapatita, fosfato tricálcico)	Rellenos óseos	Sintéticos: ApaPore, BoneSave, Kasios, Camceram, Ostetic, Pro Osteon, PepGen, Isotis accell, etc... Coralinos: Algipore, HAP-200,...
Titanio	Fijaciones y sujeciones	Implantes dentales Traumatología:

1.1.-RECUBRIMIENTO DE IMPLANTES DENTALES DE TITANIO CON FILMES DE QUITOSAN/rhBMP-2

Los implantes dentales de titanio son ampliamente utilizados debido a sus conocidas características de biocompatibilidad y adecuadas propiedades mecánicas. Sin embargo, el éxito clínico de cualquier implante depende, entre otros factores, del comportamiento frente a la corrosión en el medio fisiológico, del diseño del implante y principalmente de la calidad de la superficie del mismo, que contempla sus propiedades fisicoquímicas y topográficas. En este sentido, la superficie de los implantes de titanio puede influir en el desarrollo de una mejor respuesta tisular del huésped a los implantes¹.

Existen técnicas para proporcionar rugosidad a la superficie de los implantes, a fin de aumentar la superficie de contacto con el hueso y mejorar así la oseointegración^{2, 3}. El incremento de la rugosidad del implante mejora la adhesión y proliferación celular en la superficie del mismo⁴⁻⁶. Diversos estudios realizados en animales de experimentación han demostrado que la oseointegración mejora por el incremento de la rugosidad de la superficie⁷⁻⁹. En este sentido, diversos estudios clínicos han demostrado una mejor oseointegración y similar tasa de éxito de los implantes con una superficie rugosa^{10, 11}.

Entre los procedimientos usados para mejorar la superficie de este tipo de elementos fabricados en titanio, los más utilizados son los tratamientos superficiales basados en tratamientos químicos, mediante el ataque ácido (ácido sulfúrico, clorhídrico, fluorhídrico, etc.) y los tratamientos superficiales físicos, como puede ser el chorreado con diferentes tipos de partículas de distinta granulometría y dureza^{2, 3}.

Por otra parte, la modificación superficial de los implantes también se realiza utilizando recubrimientos, con el fin de mejorar la formación ósea y la oseointegración del implante en el tejido. Los materiales de recubrimiento más utilizados son fosfatos cálcicos¹²⁻¹⁶, el colágeno¹⁷⁻²⁶ y materiales poliméricos²⁷⁻³³, que asociados a factores óseos como la BMP-2, se consideran recubrimientos osteoinductivos. Además, también se trabaja en la incorporación de esta proteína directamente sobre superficies de titanio, mediante adsorción o inmovilización covalente³⁴⁻³⁶.

Actualmente se comercializan tanto los implantes con tratamientos superficiales químicos y físicos como los implantes recubiertos con fosfatos cálcicos. Sin embargo, los implantes portadores de rhBMP-2 se encuentran aun en fases de desarrollo y estudio en diferentes modelos animales.

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

La hipótesis de trabajo planteada fue la siguiente: puesto que los filmes de quitosano presentan unas características adecuadas para ser considerados portadores de rhBMP-2, el recubrimiento de implantes de titanio con filmes de quitosano/rhBMP-2 podría inducir la formación de hueso alrededor del implante, reduciendo el periodo de integración del implante en el hueso.

Por tanto el objetivo de este capítulo es:

La evaluación del recubrimiento de implantes de titanio con filmes de quitosano/rhBMP-2.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.- MATERIALES Y MÉTODOS:

Los materiales y métodos referentes a la producción de la rhBMP-2, a los cultivos celulares y a los ensayos celulares se especifican en el apartado “Materiales y Métodos” del capítulo 2 de este trabajo. Por su parte, los materiales y métodos referentes a la fabricación y caracterización de los filmes de quitosano/rhBMP-2 se especifican en el apartado “Materiales y Métodos” capítulo 3 de este trabajo.

Los protocolos de experimentación y de manipulación animal aquí descritos fueron aprobados por el comité de experimentación animal de la Universidad Complutense, de acuerdo con la normativa ética de uso de experimentación animal de la comunidad Europea.

3.1-IMPLANTES DE TITANIO

3.1.1.-TRATAMIENTO SUPERFICIAL DE LOS IMPLANTES

Para la obtención de una superficie rugosa se realizó un tratamiento conjunto de chorreado y grabado ácido de los implantes de titanio. Inicialmente, se chorrearon las muestras con partículas de sílice de 250 μm de diámetro durante 2 minutos (Cabina de chorreado R-080280, Mestra). Posteriormente, los implantes se lavaron con agua destilada y se sumergieron en una solución de ácido clorhídrico 6,4 M, en agitación durante 12 horas. Finalmente, los implantes se lavaron nuevamente con agua destilada y se secaron.

3.1.2.-RECUBRIMIENTO DE IMPLANTES CON QUITOSANO/rhBMP-2.

El recubrimiento de los implantes se realizó de manera muy similar a la formación de filmes anteriormente descrita. Brevemente, los implantes se recubrieron con una cantidad determinada de quitosano/rhBMP-2 y se secaron en condiciones estériles. Posteriormente los filmes formados en la superficie de los implantes se neutralizaron con tampón fosfato.

3.1.3.-CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LOS IMPLANTES.

Para caracterizar la superficie de los implantes las muestras se metalizaron con oro en un equipo Pelco 91000. Posteriormente, se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL JSM-35 CF para visualizar la superficie de los filmes a diferentes aumentos.

3.1.4.-ENSAYOS CELULARES SOBRE IMPLANTES DE TITANIO

Los implantes de titanio se sumergieron en medio de cultivo celular y se sembraron células sobre estos (10000 células/cm²). A los dos días se obtuvieron muestras y se fijaron en una solución tampón de formol neutro al 10% para su posterior estudio por microscopía electrónica de barrido. Por otro lado, se mantuvieron muestras en cultivo hasta los cuatro días y se procedió a la cuantificación de proteínas totales y de actividad fosfatasa alcalina siguiendo los protocolos descritos anteriormente.

3.1.5.-MODELO ECTÓPICO DE IMPLANTACIÓN DE MUESTRAS

Para testar la formación ósea en los implantes activados con rhBMP-2 se procedió a implantar muestras de titanio en tejido muscular de ratones de raza BALB/c. Para ello, los ratones se anestesiaron con isoflurano (5% de isoflurano en una mezcla gaseosa de O₂ al 30% y N₂O al 70%). Tanto los implantes control como los implantes recubiertos con quitosano/rhBMP-2 (100 µg de proteína por implante) se insertaron en bolsas musculares realizadas en la espalda de los animales. Estos se sacrificaron tres semanas después de la operación y las muestras se se fijaron en una solución tampón de formol al 10% para su estudio posterior.

3.1.6.-ANÁLISIS DE MUESTRAS POR MICROTOMOGRFÍA COMPUTERIZADA.

Para el estudio no destructivo de las muestras se utilizó un microtomógrafo computerizado (Vista CT). Las imágenes de rayos X se obtuvieron con los siguientes parámetros: Voltaje del tubo, 50 kV; Amperaje del tubo, 200 µA; filtro de aluminio de 0.5 mm; Rotación angular de barrido de 180°; Incremento angular de 0.40°; Resolución de 50 µm. Las imágenes binarias (8-bit BMP images) se procesaron y se reconstruyeron con el programa ImageJ.

3.1.7.-MODELO DE IMPLANTACIÓN ÓSEA DE LAS MUESTRAS.

Para evaluar la actividad *in vivo* de los implantes, éstos se colocaron en fémur de conejos de raza Neozelandesa. Los conejos se anestesiaron mediante inyección intramuscular de 2% Rompun (1 mL/10 kg, Bayer) e Imalgene 1000 (ketamina 20 mg/kg, Merial). Se hicieron dos orificios en cada fémur utilizando una trefina de 4,3 mm de diámetro con irrigación constante de suero salino. Los implantes control se colocaron

siempre en los orificios del fémur izquierdo. En el fémur derecho se pusieron los implantes recubiertos con quitosano/rhBMP-2. Tras un periodo de 3 semanas de implantación, los sujetos experimentales fueron sacrificados. Las muestras fotografiaron y se fijaron en una solución tampón de formol al 10% para su posterior estudio.

3.1.8.-ESTUDIO DE LAS MUESTRAS POR RAYOS X.

Una vez recolectadas las muestras, se obtuvieron radiografías de las mismas.

3.1.9.-CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LOS IMPLANTES.

Para caracterizar la superficie de los implantes, estos se desinsertaron del hueso y se obtuvieron imágenes de SEM, tal y como se ha descrito anteriormente.

3.2.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Cada experimento se realizó por triplicado. Los resultados se expresaron como promedio \pm la desviación estandar. Los análisis de ajustes de datos lineales y no lineales se llevaron a cabo empleando el programa Graph Pad PrismTM

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.-RECUBRIMIENTO DE IMPLANTES DENTALES DE TITANIO CON FILMES DE QUITOSAN/RHBMP-2

4.1.1.-TRATAMIENTO SUPERFICIAL DE LOS IMPLANTES

En un primer paso se modificó la superficie de los implantes de titanio empleando un tratamiento físico y uno químico. En concreto, se chorrearon los implantes con sílice y se sumergieron en ácido clorhídrico, siguiendo protocolos anteriormente descritos^{37, 38}.

La figura 4.1 muestra la superficie de los implantes mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). En la imagen A se observa la superficie inicial del implante, donde se aprecian las marcas producidas en el maquinado de la pieza. La imagen B corresponde a la superficie de un implante tratado únicamente con ácido clorhídrico, donde se puede apreciar que este tratamiento aislado sólo erosiona levemente la superficie del implante. En la imagen C se muestra la superficie de un implante chorreado con sílice, donde se puede observar que este tratamiento, por si solo, no modifica de manera sustancial la superficie. La figura D muestra la superficie de un implante después de ser chorreado con sílice y posteriormente tratado con ácido clorhídrico. En este caso, la rugosidad superficial aumenta de manera espectacular con respecto a la de los implantes maquinados iniciales, debido al tratamiento conjunto.

Para realizar los estudios de este apartado se usaron diferentes modelos de implantes. La figura 4.2 muestra los dos tipos de implantes de titanio con los que se trabajó. En algunos ensayos se utilizaron piezas de titanio diseñadas expresamente para poder trabajar con una superficie horizontal y homogénea relativamente grande (1 cm²). En otros casos, se utilizaron implantes idénticos a los implantes dentales que se utilizan en clínica. Las imágenes superiores corresponden a implantes maquinados, tal y como llegaron de fábrica. Las imágenes inferiores corresponden a implantes chorreados con sílice y posteriormente tratados con ácido clorhídrico. Las imágenes de la derecha muestran la superficie de los implantes observada por microscopía óptica de superficie.

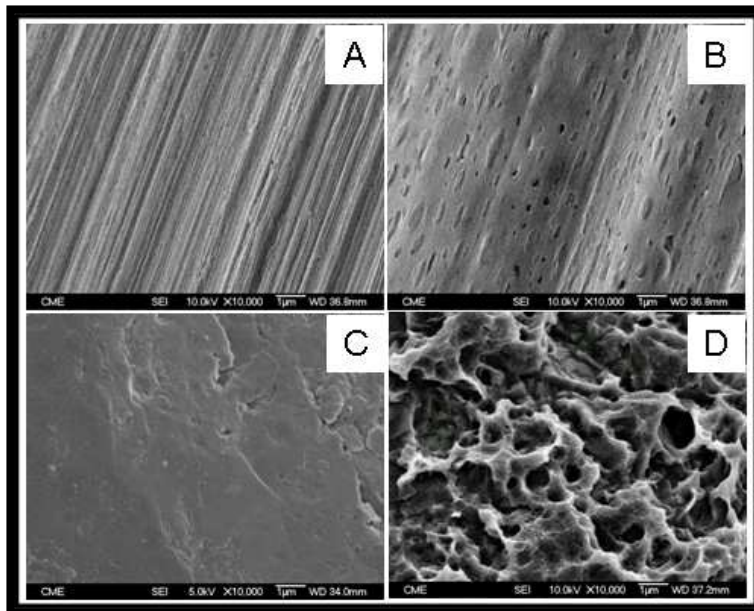


Figura 4.1. Imágenes SEM de la superficie de los implantes (10000x).



Figura 4.2. Imágenes de los implantes utilizados y estructura superficial observada mediante microscopía óptica.

Partiendo de piezas de titanio tratadas se procedió a formar filmes de quitosano sobre su superficie. Para ello se emplearon los dos tipos de implantes y se utilizaron soluciones de quitosano de diferentes concentraciones. En la figura 4.3 se puede observar que la cantidad de quitosano influye en el espesor del filme formado, afectando a la topografía superficial. Es, pues, importante el controlar la cantidad de quitosano a utilizar, puesto que el espesor del filme puede llegar a suavizar la rugosidad de la superficie del implante. 200 μ L de una solución de quitosano al 1% forman un filme que recubre totalmente la superficie, disminuyendo fuertemente la rugosidad inicial, mientras que el uso del mismo volumen (200 μ L) pero de una solución al 0,1% permite seguir manteniendo la estructura rugosa superficial inicial.

En los capítulos anteriores se estudió la biocompatibilidad de los filmes y su capacidad de transportar y liberar la rhBMP-2. En esta sección, se ha procedido al estudio del comportamiento celular en la aplicación propuesta. Para ello, se utilizaron las piezas de titanio especialmente diseñadas y se recubrieron con filmes de quitosano, con y sin rhBMP-2.

La figura 4.4 muestra la morfología de las células C2C12 crecidas sobre diferentes superficies: superficie control (A), implantes maquinados (B), implantes tratados (C) e implantes recubiertos con quitosano (D). En la gráfica se representa tanto la proliferación celular (a través del contenido de proteínas totales mediante el método de Bradford) como la expresión de actividad FA. Como se puede observar, la proliferación celular es similar en todos los casos, pero las células solo evolucionan hacia fenotipo osteoblástico en presencia de la rhBMP-2.

Los datos experimentales de esta sección concuerdan con los obtenidos en los apartados anteriores, donde se estudiaba la respuesta celular a los filmes de quitosano/rhBMP-2, indicando la validez de la aproximación del uso de los filmes de quitosano activados con rhBMP-2 como estimuladores de la osteoinducción, independientemente de la superficie a recubrir.

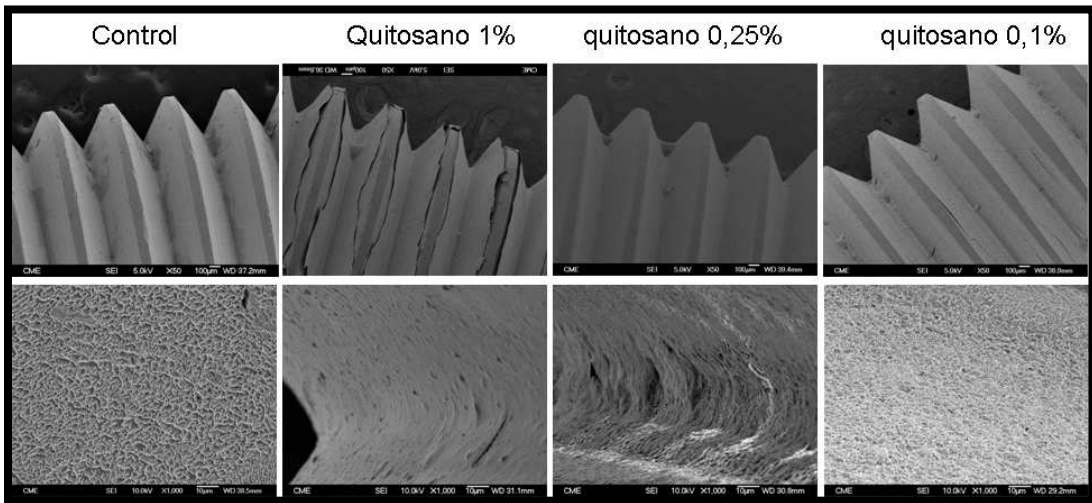


Figura 4.3. Imágenes SEM de la superficie de implantes recubiertos con quitosano (imágenes superiores, 50x) (imágenes inferiores, 1000x)

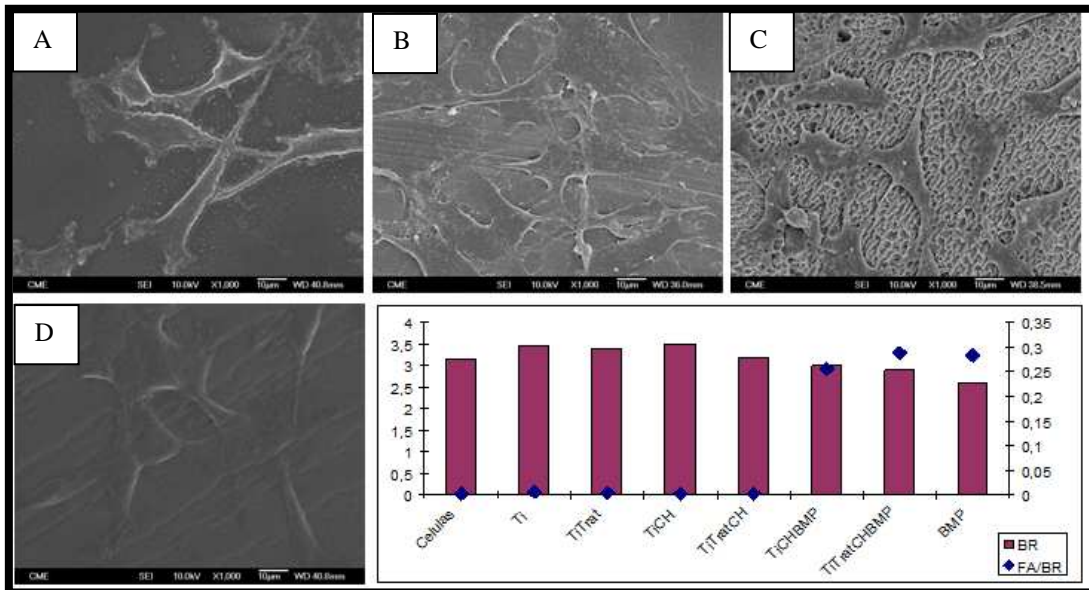


Figura 4.4. Ensayos celulares in vitro sobre implantes de titanio. Las imágenes muestran la morfología celular en los diferentes casos estudiados. La tabla indica los datos de proliferación y diferenciación celular obtenidos (Ti, titanio; TiTrat, titanio tratado; TiCH, titanio recubierto con quitosano; TiTratCH, implante tratado y recubierto con quitosano)

4.1.2.-ESTUDIOS *IN VIVO*

Los experimentos realizados *in vitro* mostraron resultados positivos, por lo que se pasó a evaluar la validez de la aproximación desarrollada en esta Tesis Doctoral mediante ensayos *in vivo* en diferentes modelos experimentales. Se utilizaron dos modelos distintos, en diferentes especies animales y localizaciones anatómicas.

Como modelo de estudio inicial se seleccionó la implantación en tejido muscular de ratón. Se consideró éste un modelo adecuado, ya que existe una amplia bibliografía con respecto a la capacidad de formación ósea en este tejido inducida por la rhBMP-2 (formación de hueso ectópico). Además, gran parte de la experimentación *in vitro* se desarrolló sobre células C2C12, procedentes de tejido muscular de ratón adulto.

La Figura 4.5 muestra la cirugía y la localización anatómica del implante. Los animales se sacrificaron tres semanas después, se recogieron las muestras y se estudió la formación ósea mediante técnicas de rayos X (microCT). Las imágenes de la derecha de la figura 4.5 corresponden a radiografías de las muestras y las imágenes centrales corresponden a reconstrucciones tridimensionales de las mismas. Las imágenes muestran como en la superficie del implante recubierto con el filme de quitosano/rhBMP-2 se formó hueso, mientras que los implantes control no presentaron esta formación de tejido.

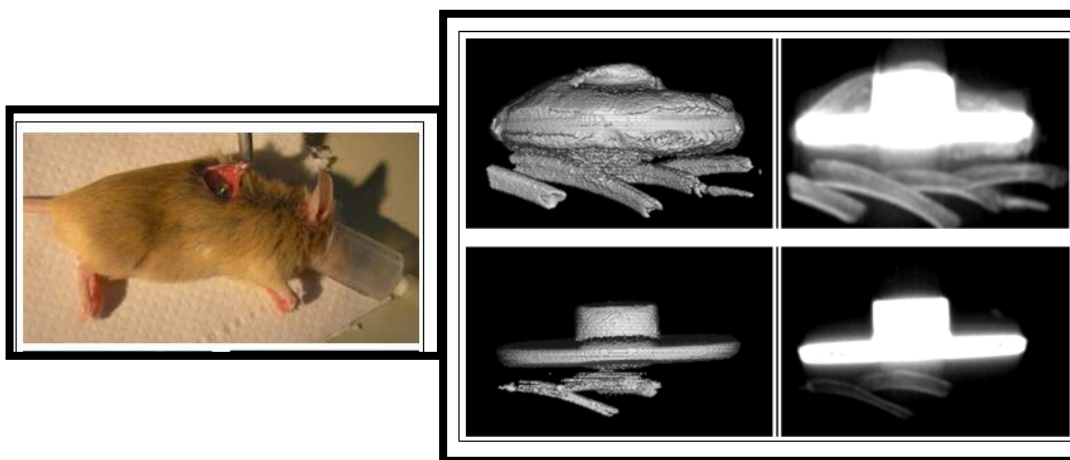


Figura 4.5. Implante de muestras en tejido muscular de ratón. Las imágenes superiores corresponden a implantes recubiertos con quitosano/rhBMP-2. Las inferiores corresponden a muestras control.

En un segundo modelo de estudio se emplearon conejos de raza neozelandesa y se colocaron implantes en la meseta tibial. Este modelo animal es el más utilizado para la experimentación de implantes de titanio, puesto que el conejo presenta un esqueleto lo suficientemente desarrollado como para permitir la colocación de muestras de tamaño similar a las de uso clínico.

Tres semanas después de la cirugía los implantes se retiraron para su estudio por microscopía electrónica de barrido. La figura 4.6 muestra la superficie de implantes recubiertos de quitosano/rhBMP-2 (200 μ L al 1% de quitosano). Como se puede observar, parte de la estructura rugosa del titanio está expuesta por la desaparición del filme en esas zonas. Además, el filme remanente presenta grietas en su estructura. Ambas observaciones indican que, de alguna manera, el filme se degrada *in vivo*. Estas observaciones corroboran los estudios de degradación *in vitro* realizados en apartados anteriores, y estarían relacionadas con el proceso de liberación de la rhBMP-2 activa.

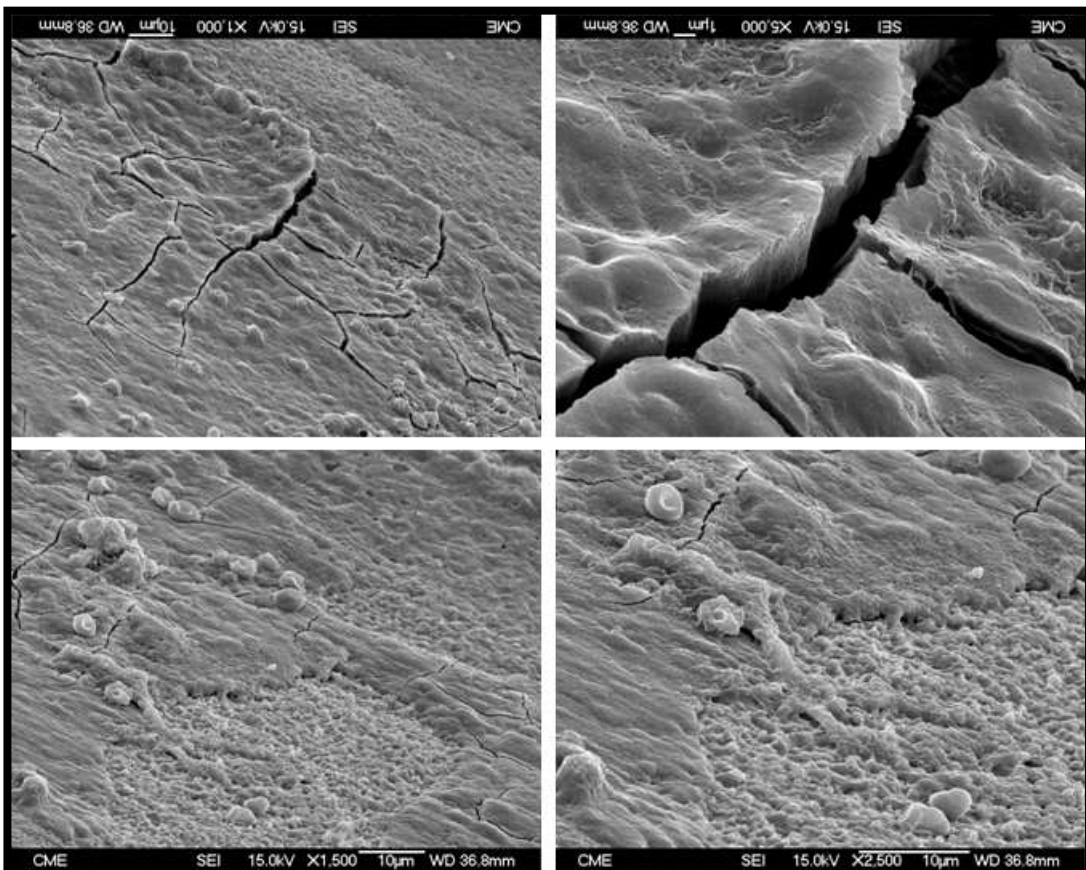


Figura 4.6. Imágenes SEM de la superficie de tornillos recubiertos, implantados y extraídos de tibia de conejo.

Por otro lado, las figura 4.7 muestra la adhesión *in vivo* de diferentes tipos celulares al filme. Como se puede observar, se encontraron eritrocitos (A,C) y granulocitos (C), como es de esperar en un implante colocado sobre una herida abierta. Además, también se encontraron otro tipo de células adherentes en la superficie de los implantes (B,D).

La figura 4.8 muestra diferentes estadios celulares y estructuras tisulares observadas en el mismo tipo de muestras. Las imágenes muestran como estas células se encuentran tanto aisladas como grupo, lo que indica que proliferan sobre la superficie del implante recubierto. Las imágenes también muestran la formación de tejido óseo, desde pequeños agregados en la superficie del implante hasta el recubrimiento total del mismo por hueso neoformado.

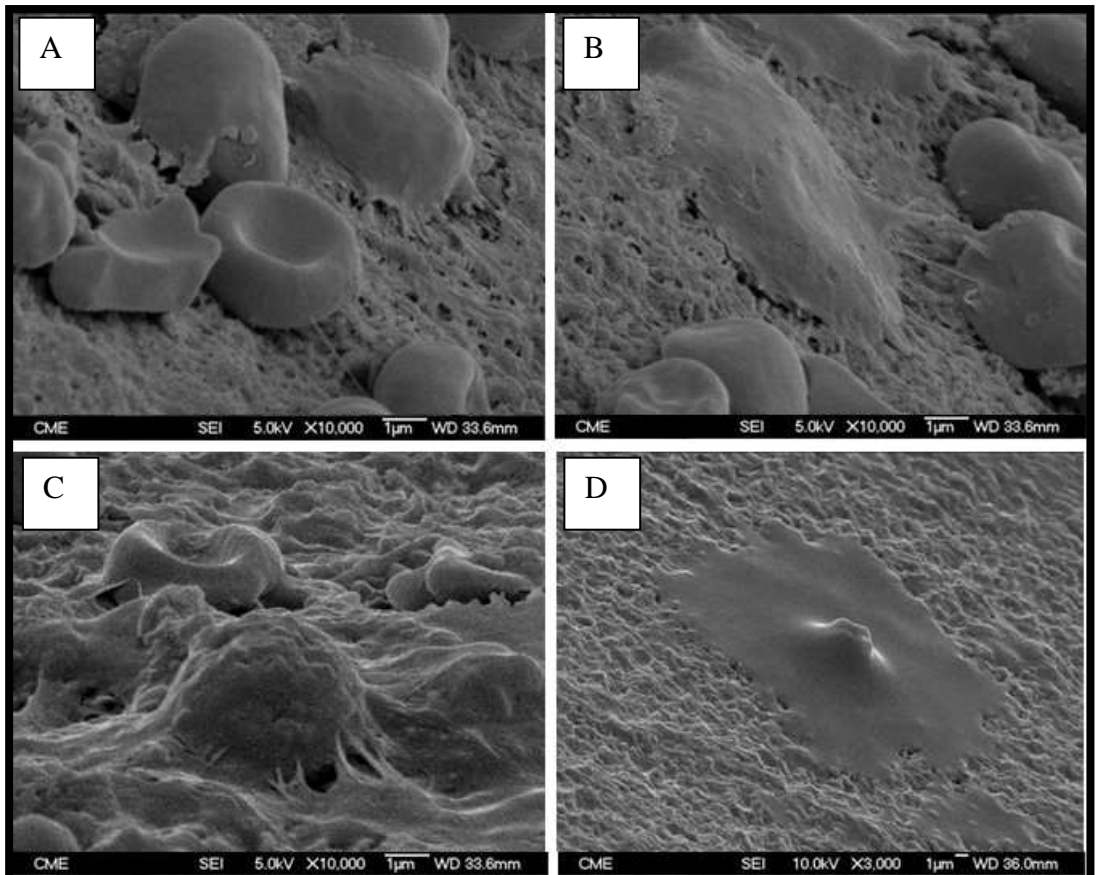


Figura 4.7. Adhesión *in vivo* de diferentes tipos de células a los implantes recubiertos con quitosano/rhBMP-2.

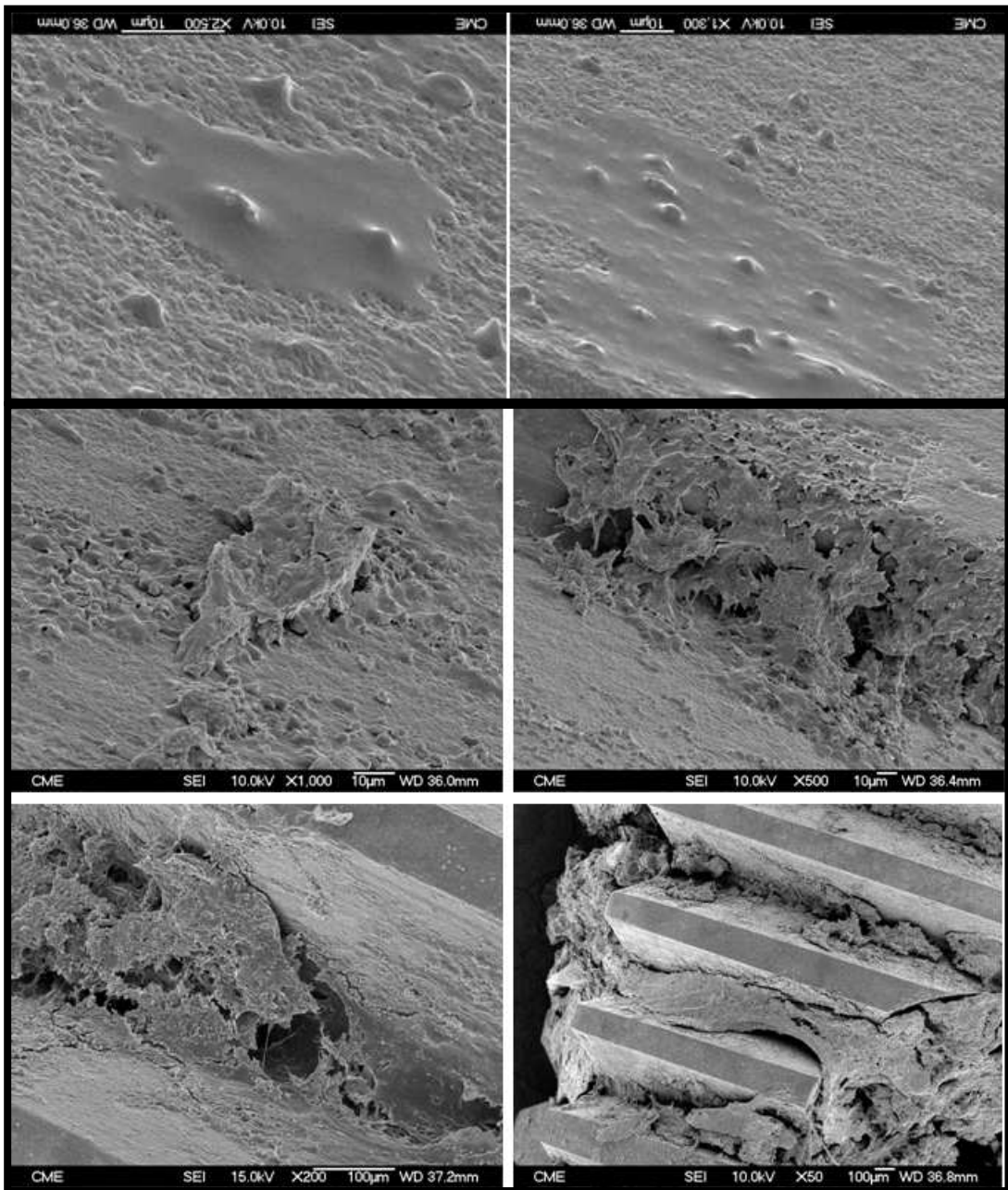


Figura 4.8. Células y estructuras tisulares observadas en implantes recubiertos con quitosano/rhBMP-2. Las imágenes van de mayor a menor aumento.

La formación de tejido óseo alrededor de los implantes recubiertos se evaluó mediante técnicas radiográficas (radiografías y microCT). La radiografía de la figura 4.9 muestra la formación de tejido radio-opaco rodeando los implante recubiertos (derecha). La fotografía de la figura 4.9 muestra como el implante superior recubierto con quitosano/rhBMP-2 presenta mayor cantidad de hueso que el implante control inferior. Por su parte, en la reconstrucción tridimensional de las muestras queda patente nuevamente la mayor formación de tejido óseo rodeando el implante recubierto (derecha) frente al implante control (Izquierda).

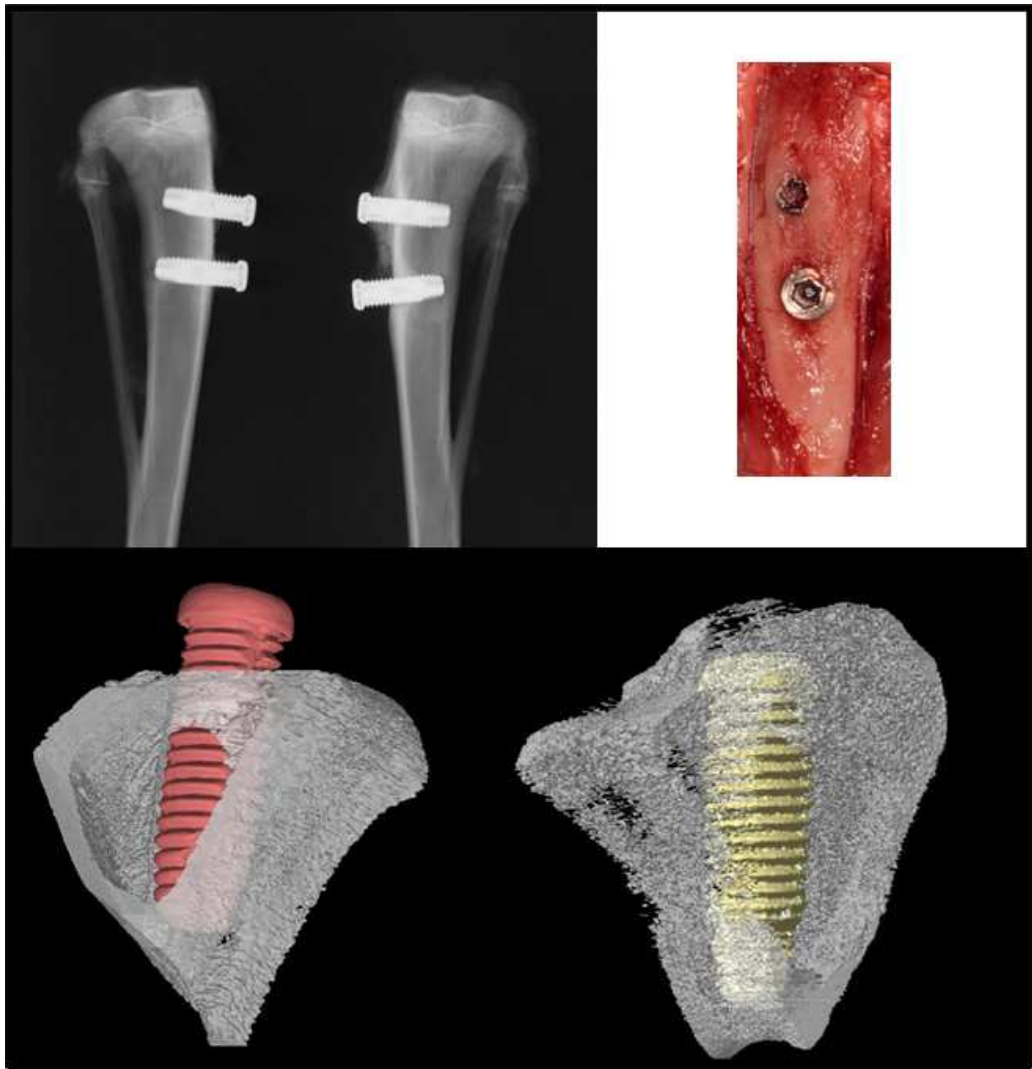


Figura 4.9. Evaluación del hueso neoformado por técnicas de rayos X.

5.- CONCLUSIONES

De entre los trabajos realizados, en el presente apartado se han recopilado aquellos relacionados con la posible aplicación de los filmes de quitosano/rhBMP-2 como material de recubrimiento de implantes de titanio. Los resultados corresponden tanto a ensayos realizados sobre el material como a ensayos de compatibilidad/diferenciación celular *in vitro* y ensayos de implantación de muestras *in vivo*:

Los ensayos del material demuestran que el espesor del filme influye en la rugosidad superficial del implante.

Los ensayos celulares efectuados indican que el recubrimiento sobre discos de titanio permite la proliferación celular y es capaz de inducir la diferenciación de las células adheridas hacia linaje osteoblástico.

Los ensayos de realizados *in vivo* insertando implantes en bolsas musculares de ratón demuestran que los implantes recubiertos con quitosano/rhBMP-2 inducen formación de hueso ectópico. Este hecho indica que la rhBMP-2 incorporada al filme mantiene su actividad *in vivo* y que es capaz de formar hueso a partir de células del tejido muscular. Por tanto, estos resultados validan el material desarrollado en unos de los modelos más usados como control de actividad biológica de la rhBMP-2 *in vivo*.

Los ensayos realizados *in vivo* en tibia de conejo de raza neozelandesa colocando implantes, de un diseño similar a los utilizados corrientemente en la práctica estomatológica, recubiertos con filmes de quitosano/rhBMP-2 indican una notable formación de hueso, incluso una creación vertical de hueso, no presente en los implantes controles. Este hecho valida el uso de esta aproximación para estimular notablemente la neoformación ósea alrededor del implante. Actualmente, no existe ningún implante comercial con características similares.

El examen mediante SEM realizado sobre implantes retirados tras 3 semanas de su colocación *in vivo* indica que, tras ese tiempo, aún quedan remanentes importantes del filme de recubrimiento activado, corroborando la conclusión anterior de que los parámetros cinéticos determinados en la experimentación *in vitro* deben tomarse como límites superiores de la velocidad de degradación real

6.- REFERENCIAS:

1. Brunette, D. M. in *Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications* (Springer, 2001).
2. Sykaras, N., Iacopino, A. M., Marker, V. A., Triplett, R. G. & Woody, R. D. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **15**, 675-690 (2000).
3. Lim, Y. J., Oshida, Y., Andres, C. J. & Barco, M. T. Surface characterizations of variously treated titanium materials. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **16**, 333-342 (2001).
4. Orsini, G., Assenza, B., Scarano, A., Piattelli, M. & Piattelli, A. Surface analysis of machined versus sandblasted and acid-etched titanium implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **15**, 779-784 (2000).
5. Zhu, X., Chen, J., Scheideler, L., Reichl, R. & Geis-Gerstorfer, J. Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. *Biomaterials* **25**, 4087-4103 (2004).
6. Xavier, S. P., Carvalho, P. S., Beloti, M. M. & Rosa, A. L. Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments. *J. Dent.* **31**, 173-180 (2003).
7. Klokkevold, P. R., Nishimura, R. D., Adachi, M. & Caputo, A. Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit. *Clin. Oral Implants Res.* **8**, 442-447 (1997).
8. Buser, D., Nydegger, T., Hirt, H. P., Cochran, D. L. & Nolte, L. P. Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **13**, 611-619 (1998).
9. Abrahamsson, I., Zitzmann, N. U., Berglundh, T., Wennerberg, A. & Lindhe, J. Bone and soft tissue integration to titanium implants with different surface topography: an experimental study in the dog. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **16**, 323-332 (2001).

10. Khang, W., Feldman, S., Hawley, C. E. & Gunsolley, J. A multi-center study comparing dual acid-etched and machined-surfaced implants in various bone qualities. *J. Periodontol.* **72**, 1384-1390 (2001).
11. Cochran, D. L. A comparison of endosseous dental implant surfaces. *J. Periodontol.* **70**, 1523-1539 (1999).
12. Liu, Y., de Groot, K. & Hunziker, E. B. Osteoinductive implants: the mise-en-scene for drug-bearing biomimetic coatings. *Ann. Biomed. Eng.* **32**, 398-406 (2004).
13. Du, C. *et al.* Apatite/amelogenin coating on titanium promotes osteogenic gene expression. *J. Dent. Res.* **84**, 1070-1074 (2005).
14. Liu, Y., Hunziker, E. B., Layrolle, P., De Bruijn, J. D. & De Groot, K. Bone morphogenetic protein 2 incorporated into biomimetic coatings retains its biological activity. *Tissue Eng.* **10**, 101-108 (2004).
15. Liu, Y., de Groot, K. & Hunziker, E. B. BMP-2 liberated from biomimetic implant coatings induces and sustains direct ossification in an ectopic rat model. *Bone* **36**, 745-757 (2005).
16. Liu, Y., Huse, R. O., de Groot, K., Buser, D. & Hunziker, E. B. Delivery mode and efficacy of BMP-2 in association with implants. *J. Dent. Res.* **86**, 84-89 (2007).
17. Becker, D. *et al.* Proliferation and differentiation of rat calvarial osteoblasts on type I collagen-coated titanium alloy. *J. Biomed. Mater. Res.* **59**, 516-527 (2002).
18. Morra, M. *et al.* Collagen I-coated titanium surfaces: mesenchymal cell adhesion and in vivo evaluation in trabecular bone implants. *J. Biomed. Mater. Res. A.* **78**, 449-458 (2006).
19. Becker, J. *et al.* Bone apposition to titanium implants biocoated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). A pilot study in dogs. *Clin. Oral Investig.* **10**, 217-224 (2006).

20. Bessho, K., Carnes, D. L., Cavin, R., Chen, H. Y. & Ong, J. L. BMP stimulation of bone response adjacent to titanium implants in vivo. *Clin. Oral Implants Res.* **10**, 212-218 (1999).
21. Cochran, D. L., Schenk, R., Buser, D., Wozney, J. M. & Jones, A. A. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulation of bone formation around endosseous dental implants. *J. Periodontol.* **70**, 139-150 (1999).
22. Ripamonti, U., Crooks, J., Petit, J. C. & Rueger, D. C. Periodontal tissue regeneration by combined applications of recombinant human osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-2. A pilot study in Chacma baboons (*Papio ursinus*). *Eur. J. Oral Sci.* **109**, 241-248 (2001).
23. Sykaras, N., Iacopino, A. M., Triplett, R. G. & Marker, V. A. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the osseointegration of dental implants: a biomechanics study. *Clin. Oral Investig.* **8**, 196-205 (2004).
24. Sykaras, N., Woody, R. D., Iacopino, A. M., Triplett, R. G. & Nunn, M. E. Osseointegration of dental implants complexed with rhBMP-2: a comparative histomorphometric and radiographic evaluation. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **19**, 667-678 (2004).
25. Wikesjo, U. M. *et al.* rhBMP-2 significantly enhances guided bone regeneration. *Clin. Oral Implants Res.* **15**, 194-204 (2004).
26. Schliephake, H. *et al.* Effect of immobilized bone morphogenic protein 2 coating of titanium implants on peri-implant bone formation. *Clin. Oral Implants Res.* **16**, 563-569 (2005).
27. Brama, M. *et al.* Effect of titanium carbide coating on the osseointegration response in vitro and in vivo. *Biomaterials* **28**, 595-608 (2007).
28. Bumgardner, J. D. *et al.* Chitosan: potential use as a bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **14**, 423-438 (2003).

29. Bumgardner, J. D. *et al.* Contact angle, protein adsorption and osteoblast precursor cell attachment to chitosan coatings bonded to titanium. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **14**, 1401-1409 (2003).
30. BUMGARDNER, J. *et al.* Osseointegration of Chitosan Coated Titanium in Rabbit Tibia. (2007).
31. Schmidmaier, G. *et al.* Bone morphogenetic protein-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodeling in fracture treatment: a biomechanical and histological study in rats. *Bone* **30**, 816-822 (2002).
32. Wildemann, B. *et al.* Local and controlled release of growth factors (combination of IGF-I and TGF-beta I, and BMP-2 alone) from a polylactide coating of titanium implants does not lead to ectopic bone formation in sheep muscle. *J. Control. Release* **95**, 249-256 (2004).
33. Thorey, F. *et al.* Improved osseointegration of titanium implants after surface coating with polymers in a rabbit model. *Orthopade* **34**, 1112, 1114-7 (2005).
34. Jennissen, H. P. Accelerated and improved osteointegration of implants biocoated with bone morphogenetic protein 2 (BMP-2). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **961**, 139-142 (2002).
35. Voggenreiter, G. *et al.* Assessment of the biological activity of chemically immobilized rhBMP-2 on titanium surfaces in vivo. *Materialwiss.Werkstofftech* **32**, 942-948 (2001).
36. Hall, J., Sorensen, R. G., Wozney, J. M. & Wikesjo, U. M. Bone formation at rhBMP-2-coated titanium implants in the rat ectopic model. *J. Clin. Periodontol.* **34**, 444-451 (2007).
37. Wong, M., Eulenberger, J., Schenk, R. & Hunziker, E. Effect of surface topology on the osseointegration of dental implants in trabecular bone. *J. Biomed. Mater. Res.* **29**, 1567-1575 (1995).
38. Abron, A., Hopfensperger, M., Thompson, J. & Cooper, L. F. Evaluation of a predictive model for implant surface topography effects on early osseointegration in the rat tibia model. *J. Prosthet. Dent.* **85**, 40-46 (2001).

CAPÍTULO 5:
Evaluación del recubrimiento de
matrices porosas de β -TCP

1.- INTRODUCCIÓN

Los cementos de fosfatos de calcio son objeto de una intensa investigación como sustitutos de hueso en cirugía ortopédica, en estomatología y aplicaciones odontológicas, debido a sus propiedades bioactivas. Estos biomateriales muestran una rápida deposición de hueso nuevo en su superficie y se consideran sumamente biocompatibles. Además, son muy versátiles pudiéndose aplicar como gránulos, polvo o bloques tridimensionales¹⁻⁵.

La hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] es el material más estudiado de este grupo, puesto que es la fracción mineral del propio hueso. Sin embargo, también se utilizan otros compuestos cerámicos basados en el β -TCP. La ventaja de este material radica en que, además de ser biocompatible, es reabsorbido durante el proceso de regeneración ósea y sustituido por hueso neoformado, mientras que la biodegradación de la hidroxiapatita es extraordinariamente más lenta.

Las matrices tridimensionales de cemento porosas se emplean en biotecnología y medicina como soportes para la migración y penetración de células y como materiales de relleno óseo. Aunque esta porosidad permite la colonización ósea en el interior de sus poros, no existe un criterio unificado en relación al tamaño de poro más adecuado, puesto que esta característica debilita la estructura y limita su utilización en áreas de carga. Existen multitud de estudios *in vitro*⁶⁻⁸ donde se demuestran las propiedades osteoconductoras de las matrices porosas, actuando como puente estructural y modelo para la formación de tejido óseo.

Por otro lado, se han intentado mejorar las características de las cerámicas porosas incluyendo en estas proteínas osteoinductivas, como las BMPs. Para ello, se ha estudiado la incorporación de rhBMP-2 en cerámicas por adsorción superficial⁹⁻¹⁸, durante el procesado de la muestra¹⁹⁻²¹ o mediante la incorporación de otros materiales portadores^{21-23, 23-27}, obteniéndose buenos resultados de formación ósea.

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Se planteó la hipótesis de que la incorporación de factores osteoinductores, como rhBMP-2, en las estructuras de cementos porosos mediante un recubrimiento de quitosano mejoraría la integración de estas construcciones. Para ello, se emplearon los filmes de quitosano activados con rhBMP-2 como recubrimiento de las cerámicas porosas de β -TCP y se estudiaron las características de estas estructuras a nivel físico-químico, de biocompatibilidad y de respuesta tisular *in vivo*.

Por tanto, el objetivo planteado fue el siguiente:

Evaluar del recubrimiento de matrices porosas de β -TCP con filmes de quitosano/rhBMP-2.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos referentes a la producción de la rhBMP-2, a los cultivos celulares y a los ensayos celulares se especifican en el apartado “Materiales y Métodos” del capítulo 2 de este trabajo. Por su parte, los materiales y métodos referentes a la fabricación y caracterización de los filmes de quitosano/rhBMP-2 se especifican en el apartado “Materiales y Métodos” del capítulo 3 de este trabajo.

Los protocolos de experimentación y de manipulación animal aquí descritos fueron aprobados por el comité de experimentación animal de la Universidad Complutense, de acuerdo con la normativa ética de uso de experimentación animal de la comunidad Europea.

3.1.- CERÁMICA POROSA

3.1.1.-PREPARACIÓN DE LA CERÁMICA POROSA DE β -TCP.

Se preparó la cerámica porosa de fosfato de calcio empleando una mezcla de 61.3% en peso (p/p) de beta fosfato tricálcico (β -TCP), 34.4% en peso (p/p) de fosfato monobásico de calcio y 4.3% de carbonato de calcio. Se agregó una solución de ácido acético (50mM) como componente líquido de la mezcla. En estas condiciones se formó una pasta moldeable, actuando el CO₂ desprendido como agente porógeno. Dicha pasta se dejó secar en campana de flujo laminar vertical. De la cerámica formada se obtuvieron discos de 5,78 mm de diámetro y 2,9 mm de espesor empleando una trefina. Los discos se esterilizaron a 200 °C durante una hora en mufla (VulcanTM A-130, NEY).

3.1.2.-RECUBRIMIENTO DE CERÁMICAS CON QUITOSANO/rhBMP-2.

En un primer paso las cerámicas (estériles) se lavaron con medio de cultivo celular (DMEM realizándose distintos cambios de dicho medio, durante 2-3 días. Posteriormente se retiró el medio y se dejaron secar en campana de flujo laminar vertical. Los filmes de quitosano se formaron sobre las cerámicas como se ha descrito previamente. A cada cerámica se le añadió 50 μ g de rhBMP-2 diluido en la solución de quitosano.

3.1.3.-CARACTERIZACIÓN DE LA CERÁMICA

3.1.3.1.-*Análisis de la microestructura tridimensional.*

La técnica de microCT se empleó para estudiar la estructura tridimensional de las cerámicas (Skyscan 1172, Trabeculae, Empresa de Base Tecnológica, España). Se emplearon los siguientes parámetros para las determinaciones: 50 kV y 200 μ A, y filtro de aluminio de 0.5 mm. Se empleó una rotación angular de barrido de 180° con un incremento angular de 0.40°.

3.1.3.2.-*Estudio de la estructura cristalina de las cerámicas*

La estructura cristalina de las cerámicas se estudió en muestras molidas, mediante la técnica de difracción de rayos X (X-RD). Los patrones de difracción se obtuvieron a temperatura ambiente ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) en un equipo PHILIPS X'PERT MPD (45kV y 40mA). El escaneado se realizó en rango de 5-50° 2Theta, con intervalos de 0.04° 2Th por segundo.

3.1.3.3.-*Evaluación de la composición química de las cerámicas*

Para este estudio se utilizó la técnica de análisis infrarrojo (FT-IR). Los espectros de las muestras molidas se obtuvieron a una resolución de 4 μ m por acumulación de 128 scaneados (Nicolet Magna IR 750 Series II spectrophotometer).

3.1.3.4.-*Estudio de la porosidad.*

El porcentaje de porosidad (Po) se determinó empleando las imágenes obtenidas de los cortes transversales mediante microCT.

3.1.3.5.-*Estudio de la microporosidad.*

Las muestras cerámicas se dispersaron por ultrasonidos en acetona. Unas cuantas gotas de esta solución se depositaron sobre láminas de carbón y se visualizaron mediante un microscopio electrónico de transmisión a 200KeV (Jeol 2000).

3.1.3.6.-*Ensayo de compresión.*

Para medir la dureza de las cerámicas se empleó un Pharmatest PTB 311E Tablet Testing Instrument. Las medidas fueron determinadas a 21.3 °C y una humedad del 32%. El ensayo se realizó con un incremento lineal de fuerza de 5 N/s.

3.1.4.-ESTUDIOS DE BIOCMPATIBILIDAD DE LAS CERÁMICAS IN VITRO.

Los diferentes discos cerámicos se introdujeron en pocillos de placas de cultivo celular de 1 cm². A Estos pocillos se les añadió medio de cultivo y se sembraron 10.000 células por pocillo. A los cuatro días de cultivo celular, se realizaron ensayos de cuantificación de MTT y fosfatasa alcalina, siguiendo los protocolos anteriormente descritos.

3.1.5.-ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA SUPERFICIAL DE LAS CERÁMICAS Y ADHESIÓN CELULAR

Para estos estudios se utilizó un microscopio electrónico de barrido ambiental a 10kV (Philips XL30ESEM). Las muestras cerámicas control y sembradas con células C2C12 se introdujeron directamente en el microscopio y se obtuvieron imágenes a diferentes aumentos.

3.1.6.-COMPOSICIÓN SUPERFICIAL DE LAS CERÁMICAS

Para estos estudios se utilizó la técnica de dispersión de energía de rayos X (EDAX) acoplada a un microscopio electrónico de barrido ambiental (Philips XL30ESEM). Los ensayos se realizaron a 15kV, a una resolución de 131,2 eV y en una ventana de análisis de 10 mm².

3.1.7.-MODELO DE IMPLANTE EN CALOTA CRANEAL

Para el estudio de la formación ósea en estas cerámicas, se implantaron muestras en calota craneal de conejos. Los conejos fueron anestesiados por inyección intramuscular de 2% Rompun (1 mL/10 kg, Bayer) e Imalgene 1000 (ketamina 20 mg/kg, Merial). La zona del cráneo y se preparó y cubrió en condiciones estériles. Se realizó una incisión en la parte del cráneo dejando al descubierto el periostio y levantando éste. Se hicieron dos defectos en el cráneo de 8 mm de diámetro utilizando una trefina con irrigación constante de suero salino e inmediatamente se implantó en el defecto de la parte izquierda del cráneo una cerámica activada de diámetro similar al orificio realizado. El orificio parietal contralateral derecho se dejó sin implante (control). Tras un periodo de 3 semanas de implantación, los sujetos experimentales fueron sacrificados, se fotografiaron las muestras y se fijaron en formalina 10% para su estudio posterior.

3.1.8.-ESTUDIOS HISTOLÓGICOS DE LAS CERÁMICAS IMPLANTADAS.

Las muestras se fijaron en formalina al 10% y posteriormente fueron decalcificadas con 10% de ácido nítrico durante 3 días. Tras la decalcificación, las muestras se embebieron en parafina y se cortaron láminas de 4 μ m de grosor. Estas láminas se tiñeron con las tinciones convencionales de hematoxilina & eosina, Tricrómico de Masson y Rojo Sirio. Las muestras se examinaron y observaron empleando un microscopio Olympus BX51. Todo el proceso histológico fue realizado por el servicio de histología de Dominion Pharmakine (www.pharmakine.com).

3.2- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Cada experimento se realizó por triplicado. Los resultados se expresaron como promedio \pm la desviación estandar. Los análisis de ajustes de datos lineales y no lineales se llevaron a cabo empleando el programa Graph Pad PrismTM

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.-CARACTERIZACIÓN DE MATRICES POROSAS β -TCP RECUBIERTAS CON QUITOSANO/rhBMP-2

Las cerámicas se prepararon empleando β -TCP en polvo, ácido acético y carbonato cálcico. El ácido acético reacciona con los fosfatos, fraguando la mezcla, y con el carbonato de calcio, liberando CO_2 , que actúa como agente porógeno. La matriz porosa obtenida se puede cortar para obtener piezas del tamaño deseado que, a su vez, se pueden esterilizar a altas temperaturas. Posteriormente, las cerámicas se neutralizan con medio de cultivo celular y se dejan secar nuevamente. De esta manera, se obtienen discos estériles de unos 5,8 mm de diámetro, 2,9 mm de espesor y un 53% de porosidad, que se utilizaron como material de partida para ser recubiertos con filmes de quitosano/rhBMP-2.

Los materiales obtenidos se caracterizaron a fin de conocer el efecto del recubrimiento sobre parámetros de importancia para su aplicación posterior. Por un lado, se estudió la composición química de las cerámicas y parámetros físicos como la estructura porosa del material (distribución de tamaño de poros) y su resistencia a la compresión. Por otro, se estudió la estructura superficial obtenida tras el recubrimiento realizado.

La estructura cristalina de las cerámicas se estudió mediante difracción de rayos X (X-RD). Para ello, se molieron las cerámicas obtenidas en cada fase del proceso de fabricación. La figura 5.1 muestra el espectro de difracción de rayos X de cada una de estas fases y, como se puede apreciar, el espectro de difracción es diferente en cada paso de fabricación, indicando un cambio en la cristalinidad de las muestras durante su preparación. No se observan, sin embargo, cambios en la cristalinidad de la estructura cuando la cerámica se cubre con el filme de quitosano. Este hecho es debido, probablemente, a la relación de pesos entre los componentes del producto (el 99,3% del peso corresponde a la cerámica frente a 0,7% que corresponde al quitosano).

Para evaluar la composición química de las cerámicas control y recubierta con quitosano se utilizó la espectroscopía infrarroja (FT-IR). Como en el caso anterior, la relación de pesos entre los componentes a estudio es muy desigual, por lo que en la figura 4.2.1 no se observan las bandas de absorción características del quitosano [$3250\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ ($-\text{OH}$), 1655 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$) y 1590 cm^{-1} (NH)]. Por su parte, sí se observan los picos de absorción característicos de los componentes de la cerámica (965 cm^{-1} [ν_1 de PO_4], 1085 cm^{-1} [ν_3 de PO_4] y 565 cm^{-1} [ν_4 de PO_4]).

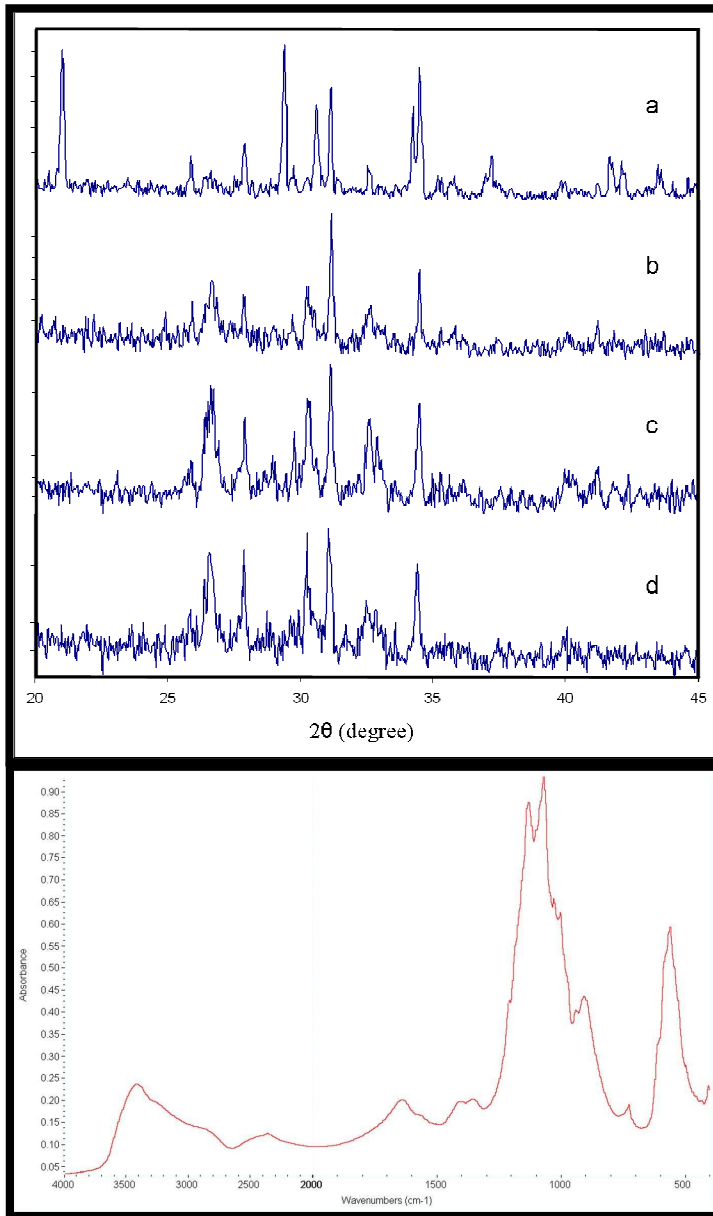


Figura 5.1. espectros de difracción y espectroscopía infrarroja (FT-IR). La figura superior corresponde a los espectros de difracción de (a) cerámica β -TCP, (b) Cerámica esterilizada, (c) Cerámica esterilizada y tratada con medio de cultivo y (d) Cerámica final recubierta de quitosano. La figura inferior corresponde al espectro infrarrojo de la Cerámica recubierta de quitosano.

En lo referente al estudio de los parámetros físicos de la estructura, estos se iniciaron con la evaluación la estructura porosa de la cerámica a nivel macroscópico. Las figuras 5.2 A-B muestran las medidas de porosidad obtenidas mediante microCT, técnica que permite medir diámetros de poro de hasta 5 μm . Como se puede observar, las cerámicas control (A) muestran una distribución Gaussiana de la porosidad en torno a una moda de poros con 300 μm de diámetro. Por su parte, la figura 5.2B muestra que el recubrimiento de quitosano modifica considerablemente esta distribución del tamaño de los poros, y además reduce la moda a 200 μm . Estos datos indican que la solución de quitosano penetra en estos poros, formándose así el filme en las paredes interiores de estos y reduciendo su diámetro total.

Para estudiar la porosidad en el rango de nanómetros se realizaron estudios de microscopía TEM. La figura 5.2C muestra una imagen TEM de una cerámica control y la figura 5.2D muestra una imagen de una cerámica recubierta. Como se puede observar, la porosidad a este nivel no se ve alterada por el recubrimiento, lo que sugiere que los poros de menor tamaño no llegan a ser mojados por la solución relativamente viscosa de quitosano, utilizada para formar el recubrimiento.

Puesto que la porosidad macroscópica se ve afectada por el recubrimiento, y esta característica influye en la dureza del material, se estudió la resistencia de las cerámicas a una fuerza de compresión. La figura 5.3 muestra la dureza de las cerámicas en los diferentes pasos del proceso de fabricación. Si bien la resistencia a la compresión inicial es pequeña ($30\pm 16,3\text{N}$) y similar a otros estudios similares²⁸⁻³¹, el proceso de esterilización por calor hace que se creen enlaces covalentes entre los componentes de la cerámica³², aumentando así la dureza de esta ($167\pm 15,5\text{N}$). El tratamiento posterior con medio de cultivo es indispensable para que las células se adhieran al material. Además, este medio contiene diferentes sales inorgánicas que forman nuevos cristales de fosfatos en la superficie de las cerámicas³³⁻³⁵, aumentando su dureza ($217\pm 18,7\text{N}$). Finalmente, el recubrimiento de la estructura con quitosano también aumenta la dureza de la cerámica hasta $296\pm 15,2\text{N}$, lo que implica una mejora en este parámetro, importante para la aplicación deseada (implante en tejido óseo).

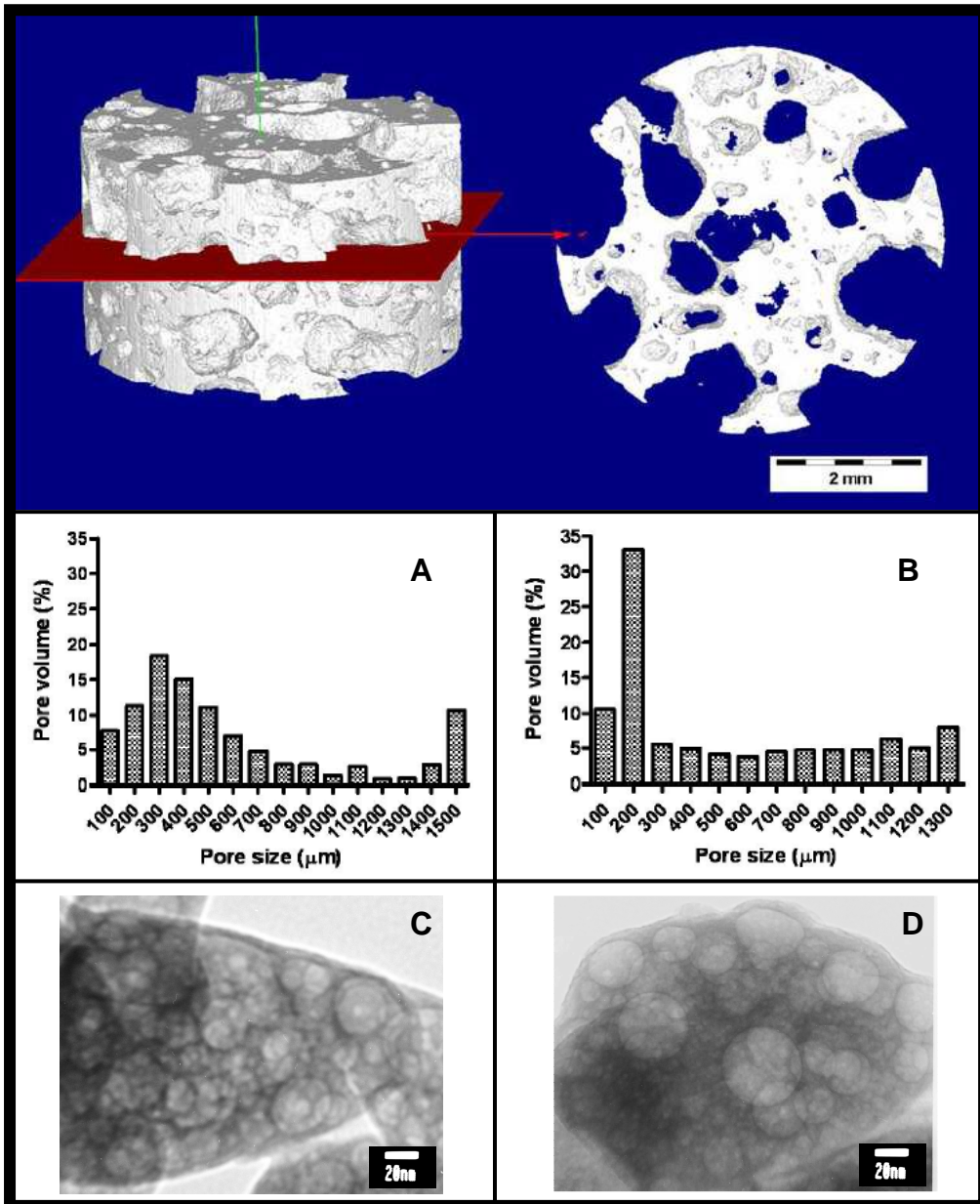


Figura 5.2. Medidas de porosidad de las cerámicas. En las imágenes superiores se puede apreciar la estructura macroporosa de la muestra estudiada por μCT . Las gráficas intermedias corresponden al estudio de porosidad realizado con la misma técnica donde se puede ver la distribución de poros de una cerámica control (izq) y la de una cerámica recubierta (der).

En las imágenes inferiores (control, izq; recubierta, der) se puede ver la porosidad estudiada por TEM.

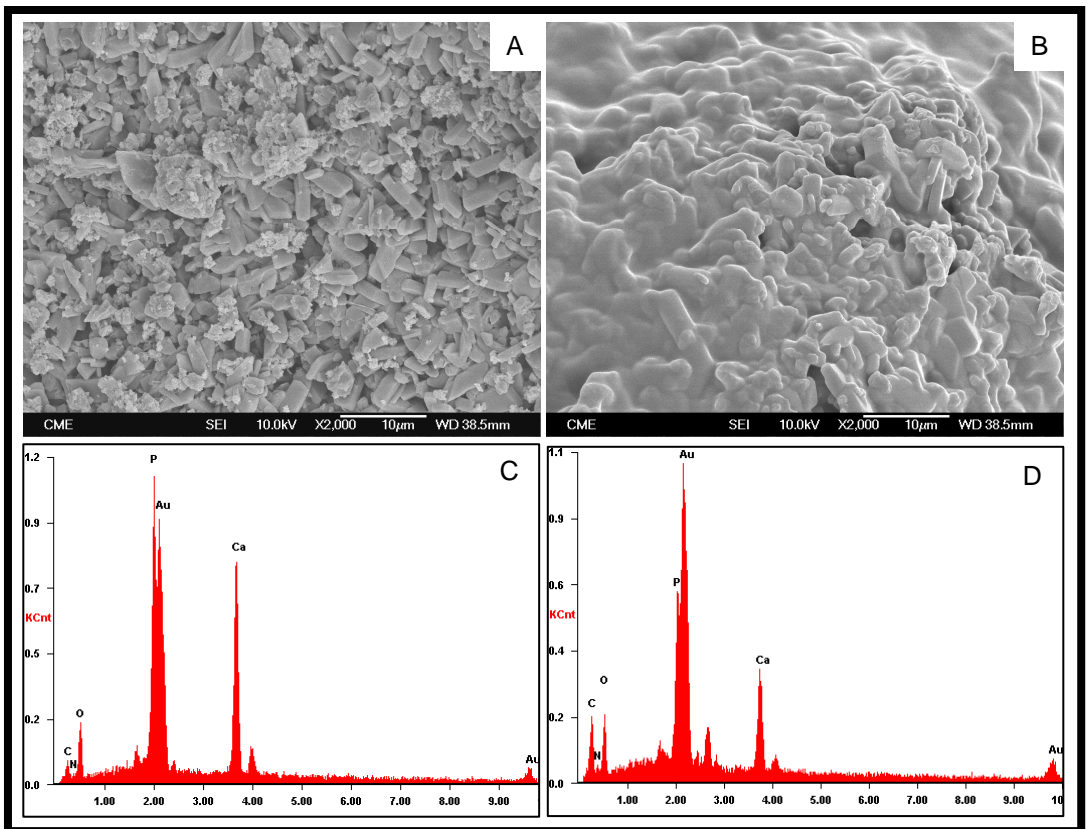
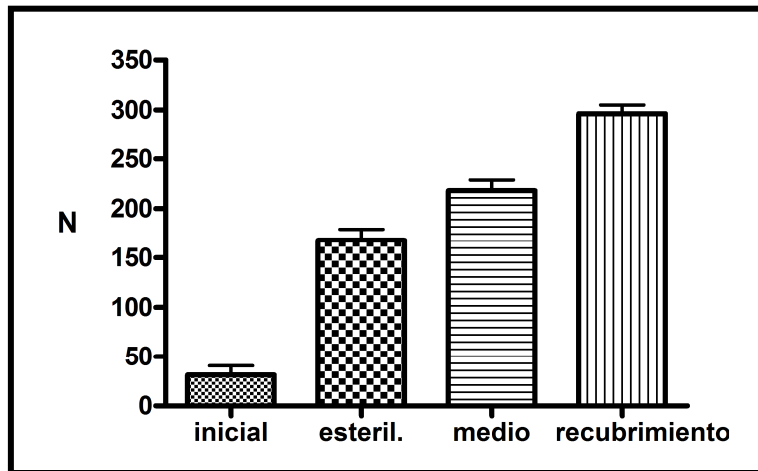


Figura 5.3. Ensayos de dureza y estudio de la superficie de las cerámicas por SEM. La figura superior corresponde a los ensayos de dureza realizados con las cerámicas obtenidas en diferentes fases del proceso de producción. La figura inferior corresponde a los estudios de SEM y EDAX de cerámicas control (izq) y recubiertas con quitosano (der).

Para finalizar este apartado, se evaluó la superficie de las cerámicas empleando la técnica de SEM. En las figuras (figura 5.3.A-B) se observa el filme de quitosano que recubre la superficie de la cerámica. Este hecho se corroboró adicionalmente a través de la detección de los elementos químicos presentes en la superficie de la cerámica mediante el la técnica de dispersión de energía de rayos X (EDAX) (figura 5.3.C-D). Este análisis indica un aumento significativo de carbono en las muestras recubiertas, elemento que forma parte de la estructura química del quitosano pero no de la cerámica, lo que indica que el filme de quitosano está en la superficie de la misma.

4.2.-ENSAYOS CELULARES E IMPLANTACIÓN DE LAS CERÁMICAS *IN VIVO*

Para estudiar la biocompatibilidad de las cerámicas se prepararon cerámicas control, cerámicas con rhBMP-2 adsorbida en la superficie, cerámicas recubiertas con quitosano y cerámicas recubiertas con quitosano/rhBMP-2. Posteriormente, se sembraron las células C2C12 sobre ellas y se observó que las células se adhieren tanto a las cerámicas control como a las cerámicas recubiertas (figura 5.4). La proliferación y la diferenciación celular se cuantificaron mediante ensayos de MTT y FA, y en la figura 5.5 se presentan los resultados de estos ensayos (datos normalizados con el tratamiento control positivo de rhBMP-2 y representados en porcentaje). Como se puede observar, las células proliferan de manera similar tanto en cerámicas control como en cerámicas recubiertas, pero sólo se diferencian en presencia de rhBMP-2.

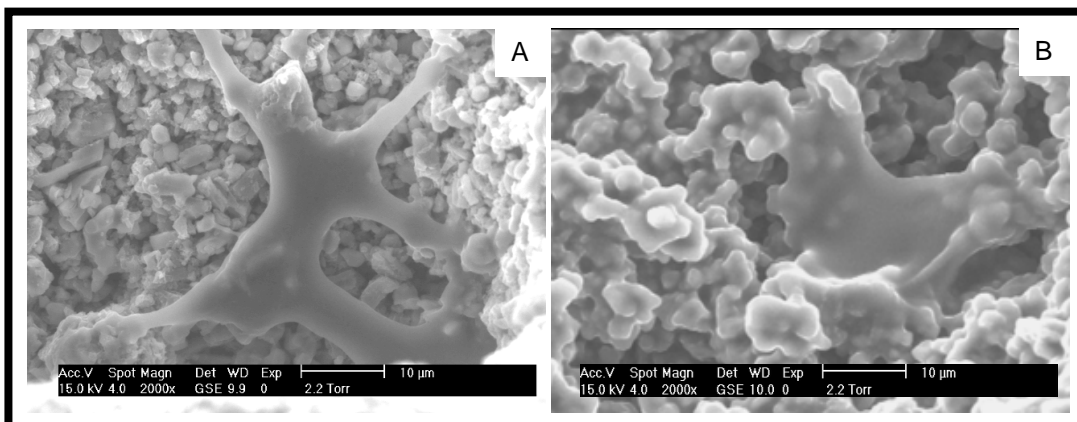


Figura 5.4. Adhesión celular a cerámicas control y cerámicas recubiertas con quitosano. En la primera imagen (A) se observa una célula C2C12 adherida a una cerámica control y en la imagen (B) se observa una célula adherida a una cerámica recubierta.

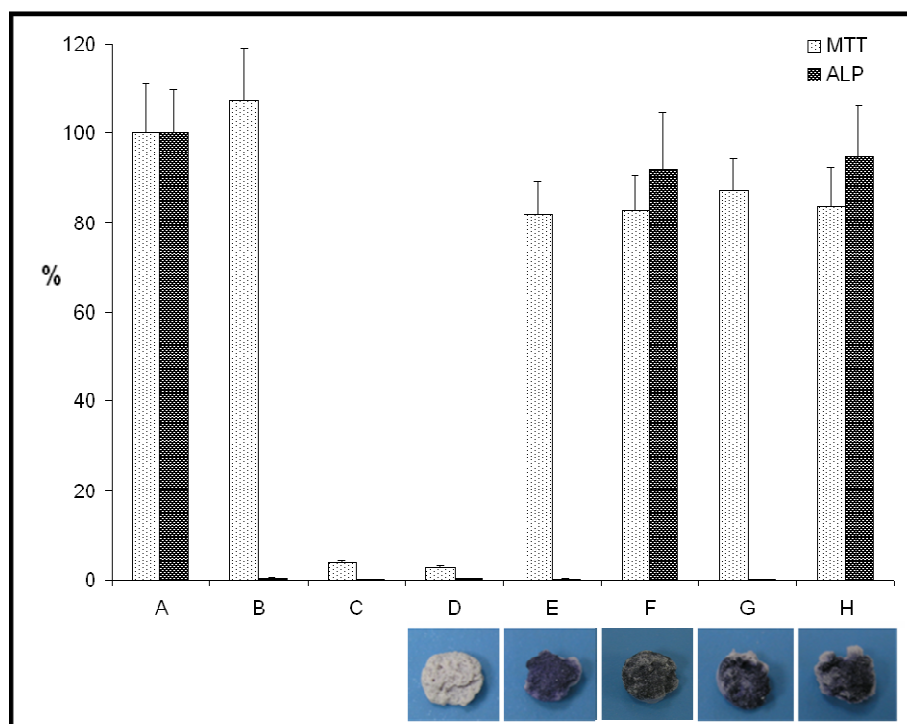


Figura 5.5. Cuantificación de la proliferación y diferenciación celular sobre cerámicas. (Cuantificación de MTT y FA). (A) Control positivo de rhBMP-2, (B) Control, (C) control vacío, (D) Cerámica sin células, (E) cerámica con células, (F) Cerámica con células y rhBMP-2, (G) cerámica recubierta de quitosano y con células, (H) cerámica recubierta de quitosano/ rhBMP-2 y con

Las diferentes cerámicas se implantaron en defectos craneales no críticos realizados en conejos, los cuales se sacrificaron a las tres semanas. La figura 5.6 muestra tanto el aspecto macroscópico como las histologías realizadas de las muestras obtenidas. Las imágenes muestran que tanto en las cerámicas control (B) como en las cerámicas recubiertas con quitosano (D) se formó tejido rodeando el implante³⁶, pero no en el interior de éste. Por su parte, los dos tipos de cerámicas con rhBMP-2 (C,E) presentaron formación de tejido óseo en el interior de las mismas, lo que indica que las células del entorno migraron al interior del implante y se diferenciaron a hueso gracias a la rhBMP-2.

En comparación con la imagen C-3, la imagen E-3 muestra una mayor formación de tejido óseo en el interior del implante recubierto con quitosano/rhBMP-2. Este resultado indica la eficacia de los filmes de quitosano activados con rhBMP-2 para la osteoinducción en este tipo de defectos, no sólo debido a la mayor cantidad de hueso formado, sino también por la mejora de las propiedades mecánicas antes mencionada.

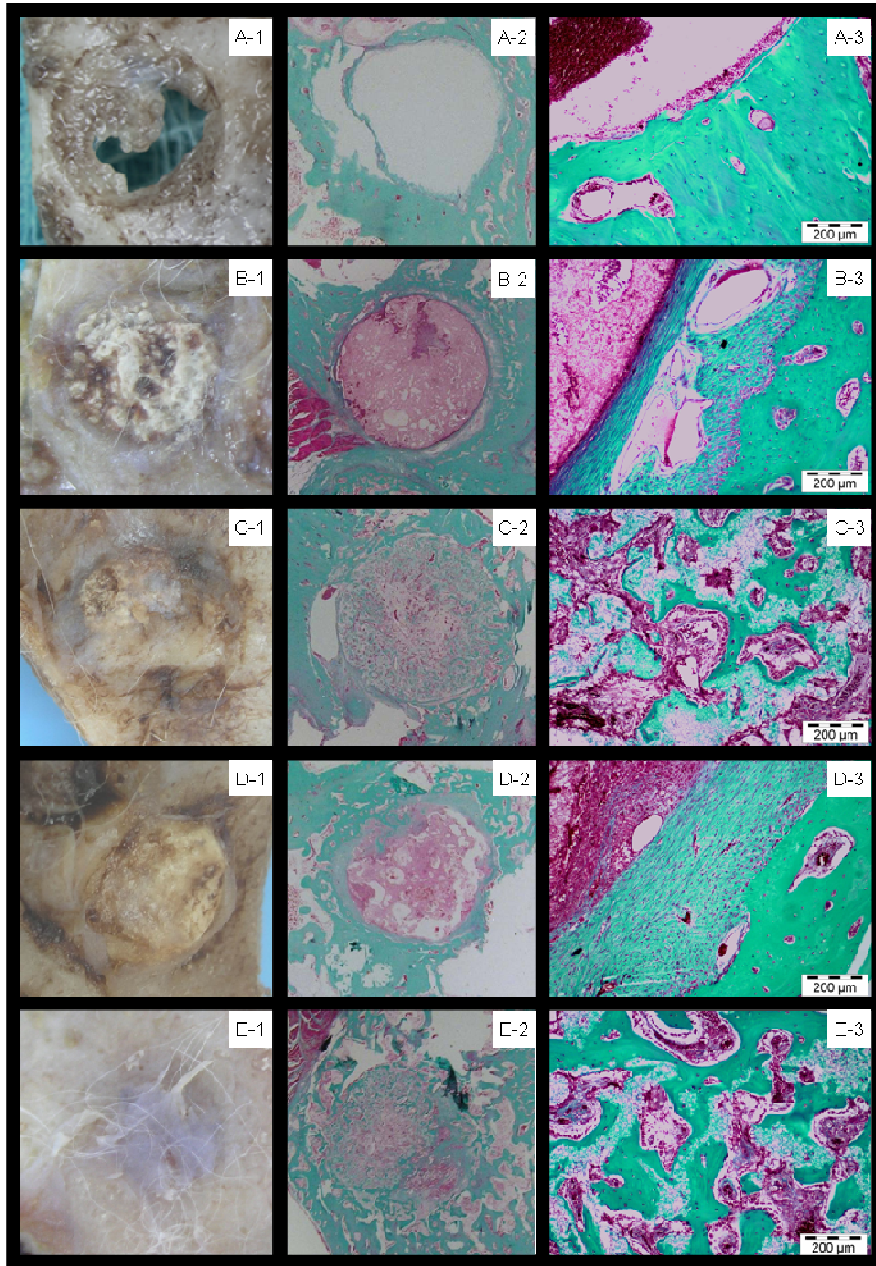


Figura 5.6. Ensayos de implantación in vivo. (A) Controles vacíos, (B) Cerámicas control, (C) Cerámicas con rhBMP-2, (D) Cerámicas recubiertas con quitosano, (E) Cerámicas recubiertas con quitosano/rhBMP-2. Las imágenes (1) corresponden al aspecto macroscópico de las muestras 3 semanas después de la operación. Las imágenes (2) corresponden a cortes histológicos de las muestras teñidos con la tinción de "Tricrómico de Masson". Las imágenes (3) corresponden a detalles de la misma tinción.

5.- CONCLUSIONES

En este apartado se han agrupado los resultados obtenidos en la experimentación realizada de recubrimiento de matrices cerámicas porosas de β -TCP con filmes de quitosano activados para la osteoinducción con rhBMP-2:

Los ensayos de caracterización del material indican que el recubrimiento de quitosano se encuentra en la superficie, tanto externa como interna de la matriz soporte, modifica la porosidad, la rugosidad superficial e influye de forma positiva en alguna de las propiedades mecánicas, aumentando la dureza de la matriz.

Los ensayos celulares realizados indican una buena biocompatibilidad tanto de la matriz de β -TCP como de la matriz recubierta con quitosano.

La incorporación de rhBMP-2, tanto en la superficie de la matriz como en el recubrimiento de quitosano, induce la diferenciación ósea de las células sembradas.

La experimentación *in vivo* realizada en defectos de curación retardada, practicados en la calota de conejos de raza neozelandesa, indican un mayor estímulo de la neoformación ósea en el caso de la cerámica recubiertas con quitosán/rhBMP-2, comparada con la adición directa del agente recombinante sobre la misma.

El hecho anterior, junto con la posibilidad de una liberación prolongada en el tiempo del agente osteoinductor, gracias a su inclusión en el filme de quitosano que actúa como reservorio de la proteína recombinante (según indican los resultados expuestos en la sección 4), nos hacen proponer el uso de este tipo de recubrimiento para la regeneración ósea en defectos de tamaño crítico.

La mejora de las propiedades mecánicas ya señaladas, junto con una mayor homogenización del tamaño de poro detectado aportan ventajas adicionales a esta aproximación

6.- REFERENCIAS.

1. Yuan, H. *et al.* Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **9**, 723-726 (1998).
2. Dorozhkin, S. V. Calcium orthophosphates. *J. Mater. Sci.* **42**, 1061-1095 (2007).
3. LeGeros, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin. Orthop. Relat. Res.* (**395**), 81-98 (2002).
4. Heini, P. F. & Berlemann, U. Bone substitutes in vertebroplasty. *Eur. Spine J.* **10 Suppl 2**, S205-13 (2001).
5. Hench, L. Bioceramics: From Concept to Clinic. *J Am Ceram Soc* **74**, 1487-1510 (1991).
6. Sanchez-Salcedo, S., Izquierdo-Barba, I., Arcos, D. & Vallet-Regi, M. In vitro evaluation of potential calcium phosphate scaffolds for tissue engineering. *Tissue Eng.* **12**, 279-290 (2006).
7. Peter, S. J. *et al.* In vitro degradation of a poly (propylene fumarate)/-tricalcium phosphate composite orthopaedic scaffold. *Tissue Eng.* **3**, 207-215 (1997).
8. Kim, S. S., Park, M. S., Gwak, S. J., Choi, C. Y. & Kim, B. S. Accelerated bonelike apatite growth on porous polymer/ceramic composite scaffolds in vitro. *Tissue Eng.* **12**, 2997-3006 (2006).
9. Hoshino, M., Egi, T., Terai, H., Namikawa, T. & Takaoka, K. Repair of long intercalated rib defects using porous beta-tricalcium phosphate cylinders containing recombinant human bone morphogenetic protein-2 in dogs. *Biomaterials* **27**, 4934-4940 (2006).
10. Ruhe, P. Q. *et al.* In vivo release of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement pretreated with albumin. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **17**, 919-927 (2006).

11. Ruhe, P. Q., Kroese-Deutman, H. C., Wolke, J. G., Spauwen, P. H. & Jansen, J. A. Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants in cranial defects in rabbits. *Biomaterials* **25**, 2123-2132 (2004).
12. Jingushi, S. *et al.* 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. *J. Orthop. Sci.* **7**, 490-494 (2002).
13. Liang, G. *et al.* Ectopic osteoinduction and early degradation of recombinant human bone morphogenetic protein-2-loaded porous beta-tricalcium phosphate in mice. *Biomaterials* **26**, 4265-4271 (2005).
14. Chen, W. J., Jingushi, S., Hirata, G., Matsumoto, Y. & Iwamoto, Y. Intramuscular bone induction by the simultaneous administration of recombinant human bone morphogenetic protein 2 and bisphosphonate for autobone graft. *Tissue Eng.* **10**, 1652-1661 (2004).
15. Tsuruga, E., Takita, H., Itoh, H., Wakisaka, Y. & Kuboki, Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J. Biochem. (Tokyo)* **121**, 317-324 (1997).
16. Kuboki, Y., Jin, Q. & Takita, H. Geometry of Carriers Controlling Phenotypic Expression in BMP-Induced Osteogenesis and Chondrogenesis. *The Journal of Bone and Joint Surgery* **83**, 105-115 (2001).
17. Yuan, H., De Bruijn, J. D., Zhang, X., Van Blitterswijk, C. A. & De Groot, K. Use of an osteoinductive biomaterial as a bone morphogenetic protein carrier. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **12**, 761-766 (2001).
18. Ohyama, T., Kubo, Y., Iwata, H. & Taki, W. 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. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* **44**, 234-40; discussion 241 (2004).
19. Niedhart, C. *et al.* Stimulation of bone formation with an in situ setting tricalcium phosphate/rhBMP-2 composite in rats. *J. Biomed. Mater. Res. A.* **65**, 17-23 (2003).

20. Seeherman, H. *et al.* rhBMP-2/calcium phosphate matrix accelerates osteotomy-site healing in a nonhuman primate model at multiple treatment times and concentrations. *J. Bone Joint Surg. Am.* **88**, 144-160 (2006).
21. Seeherman, H. J. *et al.* rhBMP-2 delivered in a calcium phosphate cement accelerates bridging of critical-sized defects in rabbit radii. *J. Bone Joint Surg. Am.* **88**, 1553-1565 (2006).
22. Ruhe, P. Q. *et al.* Controlled release of rhBMP-2 loaded poly(dl-lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement composites in vivo. *J. Control. Release* **106**, 162-171 (2005).
23. Ruhe, P. Q. *et al.* rhBMP-2 release from injectable poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/calcium-phosphate cement composites. *J. Bone Joint Surg. Am.* **85-A Suppl 3**, 75-81 (2003).
24. Hoshino, M. *et al.* 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. *J. Orthop. Res.* (2007).
25. Takahashi, Y., Yamamoto, M. & Tabata, Y. Enhanced osteoinduction by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from biodegradable sponge composed of gelatin and beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials* **26**, 4856-4865 (2005).
26. Blumenthal, N. M. *et al.* 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. *J. Periodontol.* **73**, 1494-1506 (2002).
27. Namikawa, T. *et al.* Experimental spinal fusion with recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered by a synthetic polymer and beta-tricalcium phosphate in a rabbit model. *Spine* **30**, 1717-1722 (2005).
28. Kwon, S. *et al.* Calcium Phosphate Bioceramics with Various Porosities and Dissolution Rates. *J Am Ceram Soc* **85**, 3129-3131 (2002).

29. Metsger, D. S., Rieger, M. R. & Foreman, D. W. Mechanical properties of sintered hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramic. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **10**, 9-17 (1999).
30. Gbureck, U., Grolms, O., Barralet, J. E., Grover, L. M. & Thull, R. Mechanical activation and cement formation of beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials* **24**, 4123-4131 (2003).
31. Jinawath, S. & Sujaridworakun, P. Fabrication of porous calcium phosphates. *Materials Science & Engineering C* **22**, 41-46 (2002).
32. Sous, M. *et al.* Cellular biocompatibility and resistance to compression of macroporous beta-tricalcium phosphate ceramics. *Biomaterials* **19**, 2147-2153 (1998).
33. Sun, R., Li, M., Lu, Y. & Wang, A. Immersion behavior of hydroxyapatite(HA) powders before and after sintering. *Mater Charact* **56**, 250-254 (2006).
34. Leeuwenburgh, S. C., Wolke, J. G., Siebers, M. C., Schoonman, J. & Jansen, J. A. In vitro and in vivo reactivity of porous, electrosprayed calcium phosphate coatings. *Biomaterials* **27**, 3368-3378 (2006).
35. Leng, Y., Chen, J. & Qu, S. TEM study of calcium phosphate precipitation on HA/TCP ceramics. *Biomaterials* **24**, 2125-2131 (2003).
36. von Doernberg, M. C. *et al.* In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomaterials* **27**, 5186-5198 (2006).

CONCLUSIONES

Los resultados de los trabajos experimentales recogidos en esta memoria han dado lugar a las siguientes conclusiones, que se presentan divididas en función de los capítulos expuestos.

Conclusiones con respecto a la rhBMP-2

En este apartado se han agrupado los resultados obtenidos en relación a la respuesta de las células C2C12 a la rhBMP-2 obtenida en el laboratorio.

Los estudios efectuados indican que la respuesta de las células C2C12 a rhBMP-2 sigue un comportamiento dosis-dependiente. Tras cuatro días de tratamiento, se observan cambios en parámetros celulares tales como cantidad de DNA, viabilidad celular y, en especial, la aparición de marcadores óseos (FA). Otros parámetros celulares asociables a la aparición del fenotipo osteoblástico, como son la morfología o la capacidad de migración celular, también se ven afectados en este periodo de tiempo. Tomados en conjunto, estos resultados indican la existencia de cambios drásticos en las células estudiadas como consecuencia del efecto morfodiferenciador de la rhBMP-2.

Los estudios de expresión génica indican un cambio de expresión a nivel global, corroborando los resultados de los ensayos concretos mencionados en el apartado anterior. El tratamiento con rhBMP-2 induce la sobreexpresión de genes relacionados con la diferenciación ósea y la angiogénesis, mientras que genes relacionados con la diferenciación mioblástica y neural están inhibidos. Además, los estudios realizados indican que, en este proceso de transdiferenciación, están implicados múltiples procesos celulares. Estos resultados se han confirmado cuantitativamente para los distintos genes seleccionados.

Conclusiones con respecto al Quitosano

Los resultados que se presentan en este apartado corresponden a los ensayos realizados para estudiar la viabilidad de los filmes de quitosano como portadores de rhBMP-2. En una primera parte, se han caracterizado diferentes parámetros físico-químicos de los filmes estudiando asimismo el comportamiento celular en respuesta al crecimiento sobre esta superficie. Posteriormente, se ha procedido a la incorporación de la rhBMP-2 a los filmes y se ha estudiado la actividad de la proteína retenida, se han evaluado diferentes mecanismos de liberación de la rhBMP-2 desde el filme y finalmente se ha caracterizado la actividad de la proteína liberada y la respuesta celular al material desarrollado.

De los ensayos realizados se han obtenido las siguientes conclusiones:

Los ensayos de caracterización de los filmes de quitosano indican que estos poseen propiedades adecuadas para su uso en regeneración tisular. Por un lado, el espesor del filme es modulable y directamente proporcional a la cantidad de quitosano utilizada para su formación. Por otro, los parámetros de rugosidad superficial, hidratación e hidrofiliidad corresponden a un material con capacidad para la adhesión celular.

Los ensayos realizados en relación a la respuesta del filme en diferentes fases del proceso de reparación tisular indican que, posiblemente, parte del filme se disuelva en las primeras fases del proceso, debido a acidificación inicial del lecho de la herida. La biodegradación posterior por efecto de la acción enzimática de la lisozima es un proceso con una cinética mucho más lenta.

Los ensayos de biocompatibilidad realizados indican que las células se adhieren y proliferan sobre los filmes de quitosano. En comparación con células crecidas sobre una superficie control, la proliferación sobre filmes de quitosano es ligeramente más lenta, indicando un retraso de unas 24 horas en los niveles de proliferación encontrados con respecto a la superficie control. Este tiempo posiblemente se deba al proceso de adaptación de las células a esta superficie. Los parámetros estudiados en relación a la viabilidad celular también se ven afectados, lo que parece corroborar la observación anterior.

Los estudios de expresión génica realizados indican que el crecimiento celular sobre filmes de quitosano no modifica radicalmente los patrones de expresión. Estas células sobrexpresan ligeramente genes relacionados con la respuesta inmune y respuesta a un estímulo externo (estímulo químico, herida o de un organismo externo).

Los ensayos realizados para comprobar la actividad de la rhBMP-2 incorporada en los filmes indican que el proceso de fabricación no inactiva la proteína.

Una vez incorporada la proteína, los ensayos de liberación de rhBMP-2 desde filmes de quitosano indican que el proceso de difusión de esta proteína es lento, pero suficiente para iniciar la respuesta celular. Consideramos que la liberación de rhBMP-2 desde los filmes aglutina tanto los procesos de difusión como los procesos de disolución y degradación enzimática ya mencionados. Dada la ausencia de conocimiento exacto de la duración de cada etapa en el proceso de curación de heridas, y sobre todo de la evolución temporal de los valores del pH *in vivo*, los valores obtenidos se han de considerar como límites superiores a los procesos de biodegradación reales.

Los ensayos de respuesta celular de aparición de fenotipos osteoblástico como consecuencia del cultivo sobre filme de quitosano/rhBMP-2, indican que, con respecto a la adición directa del agente osteoinductor al medio de cultivo, se necesita una dosis cuatro veces mayor de rhBMP-2 incorporada en los filmes para obtener la máxima respuesta celular. Estos datos corroboran los datos de difusión, puesto que aun siendo completamente activa, los resultados indican que la mayoría de la rhBMP-2 no está accesible para la diferenciación celular.

Finalmente, los ensayos de expresión génica indican que la respuesta celular a la adición directa de la rhBMP-2 y la respuesta celular cuando se crecen sobre filmes de quitosano/rhBMP-2 es muy similar, lo que indica que esta superficie de crecimiento no modifica sustancialmente la respuesta a rhBMP-2.

Conclusiones con respecto al uso de implantes de Ti como soporte primario.

De entre los trabajos realizados, en el presente apartado se han recopilado aquellos relacionados con la posible aplicación de los filmes de quitosano/rhBMP-2 como material de recubrimiento de implantes de titanio.

Los resultados corresponden tanto a ensayos realizados sobre el material como a ensayos de compatibilidad/diferenciación celular *in vitro* y ensayos de implantación de muestras *in vivo*.

Los ensayos del material demuestran que el espesor del filme influye en la rugosidad superficial del implante. **(DAR ALGUNA CONDICIÓN)**

Los ensayos celulares efectuados indican que el recubrimiento sobre discos de titanio permite la proliferación celular y es capaz de inducir la diferenciación de las células adheridas hacia linaje osteoblástico.

Los ensayos de realizados *in vivo* insertando implantes en bolsas musculares de ratón demuestran que los implantes recubiertos con quitosano/rhBMP-2 inducen formación de hueso ectópico. Este hecho indica que la rhBMP-2 incorporada al filme mantiene su actividad *in vivo* y que es capaz de formar hueso a partir de células del tejido muscular. Por tanto, estos resultados validan el material desarrollado en unos de los modelos más usados como control de actividad biológica de la rhBMP-2 *in vivo*.

Los ensayos realizados *in vivo* en tibia de conejo de raza neozelandesa colocando implantes, de un diseño similar a los utilizados corrientemente en la práctica estomatológica, recubiertos con filmes de quitosano/rhBMP-2 indican una notable formación de hueso, incluso una creación vertical de hueso, no presente en los implantes controles. Este hecho valida el uso de esta aproximación para estimular notablemente la neoformación ósea alrededor del implante. Actualmente, no existe ningún implante comercial con características similares.

El examen mediante SEM realizado sobre implantes retirados tras 3 semanas de su colocación *in vivo* indica que, tras ese tiempo, aún quedan remanentes importantes del filme de recubrimiento activado, corroborando la conclusión anterior de que los

parámetros cinéticos determinados en la experimentación *in vitro* deben tomarse como límites superiores de la velocidad de degradación real

Conclusiones con respecto al uso de cerámicas porosas de β -TCP como soporte primario

En este apartado se han agrupado los resultados obtenidos en la experimentación realizada de recubrimiento de matrices cerámicas porosas de β -TCP con filmes de quitosano activados para la osteoinducción con rhBMP-2.

Los ensayos de caracterización del material indican que el recubrimiento de quitosano se encuentra en la superficie, tanto externa como interna de la matriz soporte, modifica la porosidad, la rugosidad superficial e influye de forma positiva en alguna de las propiedades mecánicas, aumentando la dureza de la matriz.

Los ensayos celulares realizados indican una buena biocompatibilidad tanto de la matriz de β -TCP como de la matriz recubierta con quitosano.

La incorporación de rhBMP-2, tanto en la superficie de la matriz como en el recubrimiento de quitosano, induce la diferenciación ósea de las células sembradas.

La experimentación *in vivo* realizada en defectos de curación retardada, practicados en la calota de conejos de raza neozelandesa, indican un mayor estímulo de la neoformación ósea en el caso de la cerámica recubiertas con quitosán/rhBMP-2, comparada con la adición directa del agente recombinante sobre la misma.

El hecho anterior, junto con la posibilidad de una liberación prolongada en el tiempo del agente osteoinductor, gracias a su inclusión en el filme de quitosano que actúa como reservorio de la proteína recombinante (según indican los resultados expuestos en la sección 4), nos hacen proponer el uso de este tipo de recubrimiento para la regeneración ósea en defectos de tamaño crítico.

La mejora de las propiedades mecánicas ya señaladas, junto con una mayor homogenización del tamaño de poro detectado aportan ventajas adicionales a esta aproximación

Conclusión final

Atendiendo al objetivo general del trabajo y al conjunto de resultados y conclusiones previas expuestas, se propone la siguiente conclusión final global:

Los filmes de quitosano/rhBMP-2 desarrollados como soporte bioactivo poseen las características adecuadas para la adhesión, proliferación y diferenciación celular, así como para la liberación de la proteína en forma activa. Puesto que, además, el quitosano no interfiere en la respuesta celular a la rhBMP-2, se puede considerar que estos filmes son adecuados para el recubrimiento de materiales destinados a la regeneración de tejido óseo. En los dos modelos de aplicación estudiados sobre materiales de uso clínico, como son los implantes de titanio y las matrices porosas de β -TCP, el recubrimiento aporta propiedades osteoinductoras.

ANEXO: PUBLICACIONES



Fruto de este trabajo de investigación y del trabajo realizado en el laboratorio, se han publicado los siguientes **trabajos en revistas internacionales indexadas**:

1. **Abarrategi, A.**, Civantos, A., Ramos, V., Sanz-Casado, J. & López-Lacomba, J.
Chitosan Film as rhBMP-2 Carrier: Delivery Properties for Bone Tissue Application.
Biomacromolecules 9, 711-718 (2008).
 2. **Abarrategi, A.**, Moreno-Vicente, C., Ramos, V., Aranaz, I., Casado, J.V. & Lopez-Lacomba, J.L.
Improvement of Porous beta-TCP Scaffolds with rhBMP-2 Chitosan Carrier Film for Bone Tissue Application.
Tissue Eng. Part A. in press (2008).
 3. **Abarrategi, A.**, Gutierrez, M.C., Moreno-Vicente, C., Hortiguela, M.J., Ramos, V., Lopez-Lacomba, J.L., Ferrer, M.L. & Del Monte, F.
Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes.
Biomaterials 29, 94-102 (2008).
 4. Lopez-Lacomba, J. L., Garcia-Cantalejo, J.M., Sanz Casado, J.V., **Abarrategi, A.**, Correas Magana, V. & Ramos, V.
Use of rhBMP-2 activated chitosan films to improve osseointegration.
Biomacromolecules 7, 792-798 (2006).
 5. Ramos, V. M., Rodríguez, N.M., Henning, I., Díaz, M.F., Monachesi, M.P., Rodríguez, M.S., **Abarrategi, A.**, Correas-Magaña, V., López-Lacomba, J.L. & Agulló, E.
Poly (ethylene glycol)-crosslinked N-methylene phosphonic chitosan. Preparation and characterization.
Carbohydr. Polym. 64, 328-336 (2006).
-

Los resultados de este trabajo de investigación se han presentado (en formato escrito) en diferentes **congresos internacionales**, y se han dividido de la siguiente manera:

- 1) **Caracterización de filmes de Quitosano/rhBMP-2.**
- 2) **Filmes de Quitosano/rhBMP-2 sobre implantes de titanio.**
- 3) **Filmes de Quitosano/rhBMP-2 sobre implantes de β -TCP.**

1) **Caracterización de filmes de Quitosano/rhBMP-2:**

A. Abarrategi, C. Moreno-Vicente, A. Civantos, V.M. Ramos, J.V. Sanz-Casado and J.L. López-Lacomba.

CHITOSAN FILMS: RHBMP-2 CARRIERS FOR BONE TISSUE APPLICATIONS.

8th World Biomaterials Congress.

Amsterdam, Nederland, 28 May-1 June. 2008

A. Abarrategi, C. Moreno-Vicente, J.M.G. García-Cantalejo, V. Ramos, J.V. Sanz-Casado, F.M. Marco and J.L. López-Lacomba.

TRANSCRIPTIONAL EXPRESSION ANALYSIS OF C2C12 CELLS GROWN ON CHITOSAN/RHBMP2 FILMS

5th Annual Meeting of the EUROPEAN TISSUE ENGINEERING SOCIETY (ETES).

Róterdam, Nederland, 8-11 October. 2006

J.L. Lopez-Lacomba, **A. Abarrategi**, V. Ramos, C. Moreno, J.V. Sanz-Casado

CHITOSAN FILMS: IN VITRO CHARACTERIZATION FOR ITS USE IN BONE TISSUE ENGINEERING.

20th European Conference on Biomaterials.

Nantes, France, 27 September - 1 October. 2006

A. Abarrategi, V. Correas-Magaña, V. Ramos and J. Lopez Lacomba.

STROMAL STEM CELL (SSC) ONTO CHITOSAN FILMS: ADHESION, PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION WITH RHBMP-2.

6th Advanced Course in Cell-Material Interactions at Molecular Level

Oporto, Portugal, del 20 al 25 de junio. 2005

2) Filmes de Quitosano/rhBMP-2 sobre implantes de titanio:

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.

rhBMP-2/CHITOSAN FILM AS TITANIUM IMPLANT COATING: *IN VITRO* CHARACTERIZATION AND *IN VIVO* BONE FORMATION.

3RD World congress on regenerative medicine.

Leipzig, Germany, 18-20 October 2007

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.

2nd International Conference “Strategies in Tissue Engineering“.

Würzburg, Germany, May 31 – June 2. 2006

A. Abarrategi, V. Correas-Magaña, V. Ramos and J. Lopez Lacomba.

CHITOSAN-BMP-2 FILMS: POTENTIAL COATING FOR SURGICAL IMPLANTS.

4th Annual Meeting of the EUROPEAN TISSUE ENGINEERING SOCIETY (ETES)

Munich, Germany, del 31 de agosto al 3 de septiembre. 2005

3) Filmes de Quitosano/rhBMP-2 sobre implantes de β -TCP:

C. Moreno-Vicente, A. Civantos, **A. Abarrategi**, V. Ramos and J.L. López-Lacomba.
POROUS β -TCP ACTIVATION WITH A CHITOSAN/rhBMP-2 COATING.
ECM VIII: Bone Tissue Engineering.
Davos, Switzerland, 25-28 June. 2007.

J.L. López-Lacomba, V.M. Ramos, **A. Abarrategi**, V. Correas-Magaña, C. Moreno-Vicente and JV Sanz-Casado.
IN VITRO AND IN VIVO TESTING OF MICRO POROUS CEMENT.
CIMTEC2006, 11th Internacional Ceramics Congress
Acireale, Sicily, Italy, June 4-9. 2006
