



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Gustavo Adolfo Rico Llanos

 <http://orcid.org/0000-0001-5991-848X>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

Agradecimientos.

Un trabajo como el que a continuación se presenta es la suma de una serie de experimentos que, puestos en conjunto, conforman un cuerpo único y que cuentan una historia científica. Cualquiera que haya hecho (o intentado hacer) algo de ciencia en su vida, sabrá que este es un camino en el que la proporción de fracasos con respecto a los éxitos suele ser bastante desfavorable. Cada gráfico es producto de otros 10 o 15 gráficos fallidos anteriores, cada foto “buena” se soporta sobre decenas de fotos no tan buenas que difícilmente saldrán de su carpeta de destino nunca más. En definitiva, la ciencia es un camino que puede ser altamente desalentador de no ser por la gente tan maravillosa que me ha acompañado y que creo, sinceramente, sois de una raza aparte. Aunque no haya forma de que quede plasmado en este trabajo, cada resultado, cada palabra, cada idea que está aquí escrita tiene, en mayor o menor medida, parte de vuestra impronta de forma subyacente.

En primer lugar, he de mencionar al jefe de este barco, **José Becerra**. No hay palabras para agradecer todo lo que te debo y que hayáis apostado por mí que no soy más que un grano de arena en el desierto repleto de gente que querría tener el honor de trabajar contigo. Eres un ejemplo a seguir para todos por tu capacidad incombustible de trabajo, tu constancia y por esa habilidad de crear puentes con la gente que sólo personas con tu carisma pueden tener.

A **Rick Visser** porque, a día de hoy, me cuesta muchísimo imaginar una relación director-estudiante más positiva que la que hemos tenido durante esta época. Es, por lejos, el período formativo más productivo de mi vida y eso, en gran medida, se debe a tu influencia en mí como investigador. Eres de los tipos más listos que he conocido y he aprendido más de las conversaciones aquellas, todas originadas en un “Oye Rick... ¿tienes 5 minutos?”, que de todos los papers que he podido leer. “Sobresaliente cum-laude” para ti como director (y como persona) sin lugar a duda ninguna. Mi admiración y amistad eternas mi estimado “boss”.

Al resto de los miembros de mi grupo que, con más o menos cercanía y durante distintos períodos, han aportado su granito de arena a este trabajo. Algunos que me acompañaron al comienzo como **Adrián Djalali**, **Rosa Belmonte** y **María García Bonilla** que me ayudaron durante las primeras fases de este trabajo y que me facilitaron la adaptación a un centro nuevo. *To the amazingly friendly Hertta Pulkkinen for making me company during more than one year and to be the best english teacher that I ever had.* También doy gracias a la última en llegar que es **Liliya Kazantseva** que es una gran compañera y con quien me divierto a diario detectando palabras “latinas” que nadie alrededor conseguiría comprender.

Agradezco mucho a **Leonor Santos** por las variadas y muy enriquecedoras conversaciones en los varios trenes que nos llevaron a los distintos Ciber y Redes, a **Pilar Arrabal** por su buen rollo constante y su contagiosa risa y a **Manuel Cifuentes** por acompañarnos en las primeras fases de este proyecto. Mi historia en el grupo es como la del hueso, empezó en cartílago y se ha ido “osificando” progresivamente por lo quiero acordarme también de **José Antonio Andrades**, **Silvia Claros** y **Pedro Jiménez Palomo** por darme la bienvenida al grupo, por apostar por mí en todo momento y por enseñarme tantas cosas que sigo aplicando hoy en día.

Quiero hacer una mención especial a mi amigo **Antonio Villatoro** que cada vez que nos vemos surgen 30 ideas diferentes y con quien tengo una conexión científica que espero que produzca cosas en el futuro. He de nombrar junto a él a su pupila **Cristina Alcoholado** que, desde la distancia, ha escuchado más de una de mis penas y a quien tengo en una estima muy alta.

A pesar de la escasez de compañía en el laboratorio, he tenido la suerte de caer en un sitio que, poco a poco, se fue llenando de “larcelers” y “teenagers” que es mi muy querida “cuadra”. Como dicta el protocolo, tengo que dirigirme en primer lugar a la *queen* **Silvia Barrena** quien nos inyecta de buen rollo, canciones y alegría a todos día a día. No te imaginas la cantidad de felicidad que nos das y lo mucho que me has aportado en este tiempo. Ya sabes lo mucho que te quiero “mi amor”. A **Lidia López** por sus muestras de cariño constantes y su amistad que espero seguir teniendo la dicha de disfrutar. A **Sara Cano** con quien he compartido montones de risas, vivencias, conversaciones y, sobre todo, ese sentimiento de que hacer un doctorado es una tarea imposible (al final, sí que se puede amiga)... y a **Paul Palmquist** (estos dos no se separan ni en esta oración) cuya capacidad de trabajo, aptitudes y subidas a la red del pádel no dejan de sorprendernos. *May the force be with you, my young friend.* A **María Isabel Castillo (Mari)** quien me alegra los días a un nivel que ni ella misma se puede imaginar. Ha sido un placer absoluto tenerte de vecina y compañera en este viaje (y en el viaje a Dubai, claro jejeje) y haber disfrutado de tantas conversaciones. A **Cristina Pongotke (Chispy)** que, casi siempre de forma accidental, es de las tías más graciosas de este planeta. Gracias por tu buen rollo... y por pasarme Mendeley con lo que te debo no haber transcrito las 187 referencias que hay en este trabajo. *Even thou they arrived at the end of my work, I want to thank the new members of this reign* **Ana, Precious, Claudia and Wouter** *to bring us their joyful presence.*

Quiero acordarme también de los postdoc de Bionand que, especialmente en las fases finales de la Tesis, han estado pendientes de mi progreso y animándome en todo momento a seguir como son **Juan Antonio, Elena, Yoana, Manolo, Carlos y Rebeca.**

Por supuesto, esto no funcionaría sin el trabajo maravilloso que hacen nuestro grupo de técnicos especialistas que son el motor científico de este centro como son **Reyes y Ale**, responsables silentes de cada uno de los *in vivo* existosos que hacemos; **John** que es el amo de las imágenes y con quien da gusto conversar de cualquier tema; **Eva** (que para nosotros nunca ha dejado de ser una de las nuestras) que tanto nos ayuda en todo y cuyas conversaciones hacen que las horas que pasamos cortando, montando o tiñendo pasen volando; **Luisa** que se come todos los marrones lo cual implica que nos lo ahorra al resto y cuyo trabajo es más que indispensable; **Carmen y Juan Félix** a quienes, aunque por razones técnicas no hemos trabajado juntos aún, agradezco igualmente el buen rollo que irradian cuando nos cruzamos en los pasillos o en el café.

También extendiendo mi agradecimiento al resto de técnicos e investigadores que ha formado o forma parte de Bionand y que me han alegrado muchos cafés, las incontables reuniones alrededor de palmeras, las paellas y las comidas de navidad como pueden ser **Dani, Anjara, Verena, Mariacristina, Nekane, Miriam, María, Violeta...** y al resto de compañeros que (aunque me esté dejando nombres fuera) mejoran significativamente la calidad científica pero, sobre todo, humana de este centro.

Agradezco mucho también a la “rubita guapa” **María Dolores, Ainhoa, Mariló, Juanma, Pepe, Roberto, Diana** y, por supuesto, a **Nono**, que mantienen este centro

funcionando y han hecho que sea, más que un centro de trabajo, una especie de gran familia en la que he contado con todas las herramientas óptimas para desarrollar una empresa de esta envergadura, en gran medida, gracias a vuestra labor.

Este viaje comenzó a 7.000 kilómetros de distancia en mi país, Venezuela. Para la fecha de escritura de este trabajo somos más de 2 millones de personas (y la cifra va en aumento) las que hemos abandonado el país en los últimos 18 años, huyendo de una situación que, cuando pensamos que no puede empeorar más, sigue deteriorándose hasta el extremo del hambre y la más paupérrima miseria. Esto hace que este párrafo en el que me dispondría, en un escenario normal, a citar a mis amigos de “fuera del trabajo”, este comentario se extienda hasta Toulouse, Madrid, Florida, República Dominicana, Santiago de Chile, Quito, Chicago, Nueva York, Copenhague... debido a la diáspora que ha separado (pero nunca roto) amistades y familias por doquier, infringiendo un daño social tan grande del cual no estoy seguro que podamos recuperarnos a tiempo para que yo lo vea. Es por ello que agradezco a todos aquellos amigos que han tenido que nadar contra la corriente y que, desde la distancia y la soledad de la inmigración, me han seguido apoyando en la medida de sus posibilidades. Esto va por **Jonathan, Marco, Simón, Lionel, David...** en fin...

Por supuesto, mi familia ha sido fundamental en este proceso. La suerte (o como se le quiera llamar) ha hecho que cayera en Málaga y esto ha implicado la cercanía de mi familia paterna que, literalmente, nos han salvado el pellejo en el peor momento posible. Es por ello que agradezco a **mi padre** quien, falto de toda la expresividad y efusividad que otros tienen (y que yo no necesito), ha sido el apoyo más constante, el soporte más sólido y el tipo con más detalles imperceptibles para otros ojos, que mejoran la vida de los que te rodeamos. Eres totalmente imprescindible. A **Arelis**, la definición del altruismo puro, que es una luchadora nata y que ha tenido la capacidad de remar siempre hacia adelante tirando de todos sin perder la positividad y la sonrisa. Mi agradecimiento eterno. A mis niñas **Paola y Mariana** que son dos soles que todo lo iluminan a su paso y de quienes voy fardando a cada paso que doy.

También tengo que agradecer a **Ana** (la mayor del rebaño), que siempre ha sido un referente para mí y, si me va bien a día de hoy, es en gran medida porque me he pasado la vida mirándome en tu espejo. A pesar de los problemas, ha sido un placer compartir contigo y con **Nau** parte de este período de mi vida y haber contado con la presencia de **Daliana** en este tiempo, ha sido un estímulo extra para mí que nunca habrá forma de cuantificar.

Sin lugar a dudas, el precio más alto que he tenido que pagar con mi partida para emprender este viaje ha sido dejar atrás a **mi madre**. Es imposible que un cuerpo tan pequeño contenga a una persona tan absolutamente monumental como tú. Te debo todo lo que soy, todo lo que tengo y no tendré vida para retribuirte todo el sacrificio que has hecho para sacarnos adelante.

Por supuesto, tengo que cerrar con **Brenda**. No hay palabras posibles para expresar mi gratitud hacia ti. Esta Tesis va de sinergias entre factores y péptidos pero la más importante de las sinergias es la que se forma entre tú y yo y que sigue intacta desde el primer instante que te conocí en ese patio de recreos. Gracias por nunca dejarme desfallecer (a pesar de mis constantes intentos).

¡Gracias a todos!

Financiación.

Durante el desarrollo de este trabajo el doctorando ha disfrutado de una beca para personal investigador en formación con cargo al proyecto de investigación de excelencia de la Junta de Andalucía (P11-CVI 07245).

El presente trabajo de investigación ha sido financiado con fondos provenientes de los siguientes proyectos:

- Junta de Andalucía, Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo (P11-CVI 07245).
- Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (BIO2015-66266-R).
- Junta de Andalucía, Consejería de Salud (PI-0332-2016).
- Red de Terapia Celular, Instituto de Salud Carlos III (RD16/0011/0022).

Índice.

Agradecimientos	1
Financiación	4
Índice de figuras	12
Índice de tablas	16
Lista de abreviaturas	17

1 Introducción general.....21

1.1	Características generales del tejido óseo.	22
1.2	Estructura general del hueso.....	22
1.3	Composición del tejido óseo.	23
1.4	Células del tejido óseo.....	25
1.4.1	Células madre mesenquimales (MSC).	26
1.4.2	Osteoblastos.....	26
1.4.3	Osteocitos.....	27
1.4.4	Osteoclastos.	27
1.5	Proceso de formación ósea.	28
1.5.1	Osificación intramembranosa.....	28
1.5.2	Osificación endocondral.	28
1.6	Regeneración del tejido óseo: la reparación de fracturas.	29
1.6.1	Hematoma y respuesta inflamatoria aguda.....	30
1.6.2	Formación de tejido granular.	32
1.6.3	Generación del callo cartilaginoso.....	32
1.6.4	Revascularización y neoangiogénesis.	32
1.6.5	Mineralización y resorción del callo cartilaginoso.	33
1.6.6	Remodelación ósea.	33
1.7	Rutas de señalización asociadas a la osificación.	34
1.7.1	Ruta de las BMP/TGF- β	34
1.7.2	Otras rutas de señalización que participan en el proceso de osificación.....	35
1.7.3	Genes implicados en la diferenciación osteogénica.	37
1.8	La regeneración ósea en escenarios desfavorables.....	40

1.8.1	Aspectos clínicos y económicos asociados a los procedimientos ortopédicos. ...40
1.8.2	El injerto de hueso autólogo como procedimiento <i>gold standard</i> en medicina ortopédica.41
1.8.3	Alternativas terapéuticas para facilitar la regeneración ósea en escenarios desfavorables.43
1.9	El sistema colágeno-BMP como alternativa terapéutica en regeneración ósea.46
1.9.1	Ventajas del uso del sistema colágeno-BMP para la mejora de la osificación en escenarios desfavorables.....48
1.9.2	Desventajas asociadas a la administración de BMP en la clínica.48
2	Hipótesis y objetivos generales.51
2.1	Hipótesis.....52
2.2	Objetivos generales.....53
3	Sección A: Péptidos biomiméticos para la mejora del potencial osteogénico del sistema colágeno-BMP.54
3.1	Introducción a la sección A.55
3.1.1	Interacción entre las células y la matriz extracelular.55
3.1.2	La utilización de péptidos en ingeniería tisular ósea.57
3.1.3	Empleo de péptidos involucrados en la adhesión celular.58
3.1.4	Empleo de dominios de unión como alternativa a las uniones covalentes entre los péptidos biomiméticos y el colágeno.63
3.2	Objetivos específicos de la sección A.....64
3.3	Materiales y métodos (Sección A).65
3.3.1	Caracterización de la pegada de vCBD-RGD y cCBD-PHSRN a las esponjas de colágeno.66
3.3.2	Ensayos de actividad biológica de los péptidos <i>in vitro</i> en cultivos bidimensionales.....69
3.3.3	Ensayos de actividad biológica de los péptidos <i>in vitro</i> en cultivos sobre las esponjas de Helistat.....72
3.3.4	Ensayo <i>in vivo</i> de osificación ectópica de esponjas funcionalizadas con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN.76

3.4	Resultados (Sección A).	77
3.4.1	Propiedades de los dominios de unión a colágeno.	77
3.4.2	Actividad de los dominios biomiméticos en cultivos convencionales.	84
3.4.3	Caracterización de la funcionalización de Helistat con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN.	88
3.4.4	Diferenciación de células sembradas sobre Helistat funcionalizado con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN en presencia de medio suplementado con rhBMP-2.	99
3.4.5	Actividad biológica <i>in vivo</i> de la funcionalización de Helistat con vCBD-RGD y/ cCBD-PHSRN.	105

4 Sección B: Combinación de factores de crecimiento alternativos a BMP-2 para la mejora del sistema colágeno-BMP: BMP-6 e IGF-1110

4.1	Introducción a la sección B.	111
4.1.1	Uso de factores de crecimiento alternativos a las BMP-2 o -7: la BMP-6.	111
4.1.2	Uso de factores de crecimiento alternativos a la BMP-2 o BMP-7: Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1).	115
4.1.3	Uso de IGF-1 en combinación con BMP para la mejora de la osificación.	119
4.2	Objetivos específicos de la sección B.	121
4.3	Materiales y métodos (Sección B).	122
4.3.1	Tratamiento de las MC3T3-E1 con BMP-2 o BMP-6 mezclado con IGF-1 (BMP + IGF-1).	123
4.3.2	Medición de la expresión de genes marcadores de osteogénesis en respuesta al tratamiento con BMP + IGF-1.	123
4.3.3	Estudio de la actividad fosfatasa alcalina en respuesta a BMP + IGF-1.	124
4.3.4	Ensayo de mineralización <i>in vitro</i> sobre cultivos de MC3T3-E1 en respuesta a BMP + IGF-1.	124
4.3.5	Ensayo <i>in vivo</i> de osificación ectópica de esponjas cargadas con BMP + IGF-1.	125
4.4	Resultados (Sección B).	126
4.4.1	Ensayos de diferenciación osteogénica <i>in vitro</i> .	126
4.4.2	Ensayos de osificación ectópica <i>in vivo</i> .	130

5 Sección C: Liberación controlada de factores de crecimiento alternativos a BMP-2 como estrategia para incrementar su potencial osteogénico.134

5.1 Introducción a la sección C.135

5.1.1 Distribución temporal de los factores de crecimiento que regulan la osificación.136

5.1.2 Modelos de administración controlada de factores de crecimiento en ingeniería tisular ósea.137

5.1.3 Influencia de la administración controlada de factores de crecimiento sobre el proceso de osificación.140

5.2 Objetivos específicos de la sección C.144

5.3 Materiales y métodos (Sección C).145

5.3.1 Tratamiento con BMP y/o IGF-1 suministrado en forma de pulsos secuenciales...146

5.3.2 Actividad fosfatasa alcalina.146

5.3.3 Mineralización *in vitro*.147

5.3.4 Recubrimiento de Helistat con alginato y/o gelatina.....147

5.3.5 Detección de la liberación de BMP-2 cargado sobre Helistat recubierto con alginato y gelatina por *immunoblot*.....149

5.3.6 Ensayo prospectivo de osificación ectópica *in vivo* de Helistat recubierto de alginato (A2/G0) cargado con BMP-2.150

5.3.7 Ensayo cuantitativo de liberación de BMP-6 e IGF-1 cargado sobre esponjas recubiertas de alginato y/o gelatina por ELISA directo.150

5.4 Resultados (Sección C).152

5.4.1 Actividad fosfatasa alcalina en respuesta a pulsos secuenciales de BMP y/o IGF-1.152

5.4.2 Ensayo de mineralización *in vitro* en respuesta a la administración de pulsos secuenciales de BMP y/o IGF-1.....153

5.4.3 Caracterización de la liberación de BMP-2 cargada sobre esponjas recubiertas de alginato.154

5.4.4 Caracterización de la liberación de BMP-2 cargada sobre esponjas recubiertas de alginato y gelatina.....158

5.4.5 Cuantificación de la liberación de BMP-6 e IGF-1 cargado sobre Helistat recubierto de alginato mediante ELISA.....160

6	Discusión.	162
6.1	Péptidos biomiméticos.	163
6.1.1	vCBD-RGD y cCBD-PHSRN se unen de forma estable a Helistat y se alcanzan densidades de péptido por unidad de área superiores que para la esponja de Nimni.	163
6.1.2	La co-funcionalización de Helistat con ambos péptidos de forma simultánea fue posible, sin que hubiera interferencia aparente en cuanto a la estabilidad de la unión de ambas moléculas.	164
6.1.3	Las proporciones utilizadas de ambos péptidos influyen directamente sobre el posible efecto aditivo o sinérgico de la presencia de cCBD-PHSRN sobre la acción de vCBD-RGD.	165
6.1.4	La co-funcionalización de Helistat con vCBD-RGD y cCBD-PHSRN favoreció la adhesión celular pero no tuvo efectos sobre la diferenciación osteogénica.	167
6.1.5	La co-funcionalización de Helistat con vCBD-RGD y cCBD-PHSRN no favoreció de forma autónoma la osteogénesis.	168
6.1.6	La co-funcionalización con vCBD-RGD y cCBD-PHSRN pudiera mejorar la diferenciación osteogénica mediada por BMP-2.	169
6.1.7	La co-funcionalización con vCBD-RGD y cCBD-PHSRN de Helistat no mejoró la osificación ectópica <i>in vivo</i> inducida por BMP-2.	170
6.2	Combinación de factores de crecimiento.	171
6.2.1	La adición de IGF-1 multiplica la capacidad de BMP-2 y -6 de incrementar la expresión de <i>mAlp</i> y <i>mBglap</i> .	171
6.2.2	La mezcla de IGF-1 con BMP-2 o -6 actúa de forma sinérgica sobre el aumento que éstas inducen de la actividad fosfatasa alcalina y dicho efecto es significativamente mayor para BMP-6 que para -2.	172
6.2.3	Los efectos de IGF-1 sobre la osteogénesis mediada por BMP-2 o -6 parecen ocurrir de forma independiente de <i>Runx2</i> en el modelo empleado.	172
6.2.4	Para las concentraciones de BMP testadas, únicamente se observó mineralización de la matriz extracelular <i>in vitro</i> en aquellas condiciones en las que se suplementó tanto BMP-2 como -6 con IGF-1.	173
6.2.5	Sólo las esponjas cargadas con BMP-6 indujeron la formación de hueso ectópico en los experimentos <i>in vivo</i> y sólo su mezcla con IGF-1 generó diferencias significativas en la acumulación de calcio.	173
6.2.6	Las discrepancias entre la mineralización <i>in vitro</i> y la acumulación de calcio <i>in vivo</i> podrían estar asociadas a los patrones temporales de administración de los factores.	174

6.3	Administración controlada de factores	175
6.3.1	Retención de factores de crecimiento en el colágeno.	175
6.3.2	La administración de BMP-2 o -6 seguida de IGF-1 genera un aumento significativo de la actividad fosfatasa alcalina con respecto a las demás secuencias temporales probadas.....	176
6.3.3	Únicamente las condiciones en las que se realizaron pulsos de BMP-6 entre los días 0 - 4 fueron capaces de inducir la mineralización de la matriz extracelular. La presencia de IGF-1 durante ese mismo período fue más bien en detrimento de este efecto.	176
6.3.4	Las esponjas recubiertas de alginato presentaron una capacidad de retención de la BMP-2 mayor que la esperada y no indujeron la formación de hueso ectópico en un modelo <i>in vivo</i>	177
6.3.5	La inclusión de gelatina en la mezcla de recubrimiento aumentó la liberación de BMP-2 al medio, posiblemente, por el aumento de sus tasas de degradación.	179
6.3.6	A falta de realizar más pruebas, la liberación de BMP-6 e IGF-1 cargadas sobre Helistat se modifica como resultado del recubrimiento con alginato.	179
6.4	Perspectivas de futuro.....	180
7	Conclusiones.	183
8	Anexos.	185
8.1	Experimentos de biología molecular.	186
8.1.1	Ensayo de pegada de vCBD-RGD y cCBD-PHSRN a esponjas de colágeno.	186
8.1.2	Método del ácido bicinconínico (BCA) para cuantificación de proteína total.	186
8.1.3	Adición de biotina al vCBD-RGD y al cCBD-PHSRN.....	187
8.1.4	Purificación de los péptidos biotinilados.	187
8.1.5	Cuantificación de biotina.	188
8.1.6	<i>Blot</i> directo sobre esponjas cargadas con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN biotinilados.....	189
8.1.7	Recubrimiento de esponjas de Helistat con mezclas de alginato y gelatina.	189
8.1.8	Detección por <i>immunoblot</i> de BMP-2 presente en lavados realizados sobre esponjas.....	191
8.1.9	<i>Immunoblot</i> directo sobre esponjas de colágeno para detección de BMP-2 retenida.	192

8.1.10	Cuantificación por ELISA de BMP-6 e IGF-1 liberado a partir de Helistat recubierto con alginato.	193
8.2	Experimentos <i>in vitro</i> con cultivos celulares.....	194
8.2.1	Cultivo y mantenimiento de células para experimentos <i>in vitro</i>	194
8.2.2	Aislamiento de células madre de médula ósea de rata.	194
8.2.3	Adhesión de células sobre biomateriales	195
8.2.4	Tinción de células en cultivo con Cell Tracker green (CMFDA).	197
8.2.5	Medición de la adhesión de células mediante ensayo de XTT.	197
8.2.6	Método del Alamar Blue para estimación del número total de células presentes en esponjas cultivadas.	198
8.2.7	Lisis de células cultivadas sobre biomateriales.	199
8.2.8	Cuantificación de DNA de doble cadena total.	199
8.2.9	Actividad fosfatasa alcalina (FA) sobre células en cultivo.	200
8.2.10	Tinción de rojo de alizarina.	201
8.2.11	Aislamiento de RNA total y retrotranscripción.	202
8.2.12	Análisis de la expresión de genes marcadores de osteogénesis.	203
8.3	Experimentos de osificación ectópica <i>in vivo</i> en ratas.....	206
8.3.1	Ensayos de implantación ectópica intramuscular en ratas.	206
8.3.2	Procesamiento histológico de las muestras.....	208
8.3.3	Medición de calcio total a partir de implantes ectópicos.	208
9	Bibliografía	210
10	Publicaciones relacionadas con la Tesis Doctoral.	224

Índice de figuras.

Figura 1. Corte longitudinal de un fémur.	23
Figura 2. Representación de la estructura general del hueso cortical del fémur de un mamífero.	24
Figura 3. Representación esquemática del proceso de diferenciación osteoblástica.	26
Figura 4. Ejemplos de las vías de osificación de un hueso tras una fractura.	29
Figura 5. Esquema del proceso de regeneración del tejido óseo tras sufrir una fractura..	31
Figura 6. Rutas de señalización de BMP/TGF- β	35
Figura 7. Representación esquemática de las propiedades que puede tener un implante en cuanto a su capacidad de promover la regeneración ósea.	42
Figura 8. Vías de recepción de señales bioquímicas y físicas desde el exterior celular hacia su interior.	56
Figura 9. Esquema general de la ruta de señalización a través de receptores integrinas.	59
Figura 10. Disposición espacial de las secuencias que contienen RGD y PHSRN en la molécula de fibronectina.	62
Figura 11. Proceso de obtención de las esponjas de colágeno.	66
Figura 12. Esquema general del diseño de los péptidos biomiméticos.	67
Figura 13. Esquema de gradientes cruzados para funcionalizar placas recubiertas de colágeno.	70
Figura 14. Protocolo esquematizado de los ensayos de actividad biológica <i>in vitro</i> de células sembradas mediante diferentes metodología sobre Helistat funcionalizada con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN.	72
Figura 15. Ensayo de pegada de vCBD-RGD a las esponjas de Nimni y Helistat cargadas con 1.000 ng, 2.000 ng y 5.000 ng de vCBD-RGD de partida.	78
Figura 16. Ensayo de pegada de cCBD-PHSRN a las esponjas de Nimni y Helistat cargadas con 1.000 ng, 2.000 ng y 5.000 ng de vCBD-RGD de partida.	80
Figura 17. Detección por <i>blot</i> de vCBD-RGD o cCBD-PHSRN retenido en Helistat tras lavados sucesivos en PBS.	82
Figura 18. <i>Blot</i> de esponjas cargadas con mezclas de 2 μ g de vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN con y sin biotinar tras ser lavadas extensamente con PBS.	83

Figura 19. Registro fotográfico de retención de vCBD-RGD-FITC y/o cCBD-PHSRN-TMR de forma simultánea en Helistat.	84
Figura 20. Actividad FA de MC3T3-E1 en respuesta a la adición de vCBD-RGD solubilizado en el medio.	85
Figura 21. Actividad FA de MC3T3-E1 en respuesta a la adición de diferentes mezclas vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN solubilizado en el medio de cultivo.	86
Figura 22. Adhesión de MC3T3-E1 a superficies de colágeno funcionalizadas con gradientes de mezclas de vCBD-RGD y cCBD-PHSRN.	87
Figura 23. Adhesión de MC3T3-E1 a Helistat mediante cultivo en agitación orbital.	89
Figura 24. Adhesión de MC3T3-E1 a Helistat funcionalizado con vCBD-RGD.	90
Figura 25. Curva de proliferación de MC3T3-E1 sembradas en suspensión sobre Helistat funcionalizado con vCBD-RGD.	91
Figura 26. Observación en un estereoscopio de fluorescencia de MC3T3-E1 sembradas en agitación orbital sobre Helistat funcionalizado con vCBD-RGD teñidas con <i>Cell Tracker Green</i>	92
Figura 27. Adhesión de rBMSC a Helistat mediante cultivo en agitación orbital.	93
Figura 28. Adhesión de rBMSC a Helistat funcionalizado con vCBD-RGD.	94
Figura 29. Curva de proliferación de rBMSC sembradas en suspensión sobre Helistat funcionalizado con vCBD-RGD.	95
Figura 30. Adhesión de células sobre Helistat funcionalizado con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN.	96
Figura 31. Medición de la expresión de genes marcadores de osteogénesis en respuesta a los péptidos biomiméticos.	97
Figura 32. Actividad FA de MC3T3-E1 sembradas en Helistat funcionalizado con vCBD-RGD y/ cCBD-PHSRN.	98
Figura 33. Curva de actividad FA de MC3T3-E1 sembradas sobre Helistat.	100
Figura 34. Expresión de genes marcadores de osteogénesis en respuesta a la funcionalización de vCBD-RGD en presencia de 50 ng/mL de rhBMP-2.	101
Figura 35. Actividad FA total y normalizada de MC3T3-E1 y rBMSC sembradas en esponjas funcionalizadas con vCBD-RGD y/ cCBD-PHSRN y cultivadas en medio suplementado con 50 ng/mL de rhBMP-2.	103
Figura 36. Tinción con rojo de alizarina de esponjas funcionalizadas con los péptidos biomiméticos.	104

Figura 37. Análisis histológico de la osificación ectópica <i>in vivo</i> de las esponjas funcionalizadas con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN (en los que no se observó formación de hueso).....	106
Figura 38. Análisis histológico de la osificación ectópica <i>in vivo</i> de las esponjas funcionalizadas con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN (en los que hubo evidencias de osificación)..	107
Figura 39. Contenido de calcio de las esponjas funcionalizadas con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN tras 3 semanas de su implantación.	108
Figura 40. Relación filogenética entre algunos miembros de la familia de las BMP.....	112
Figura 41. Representación esquemática de la vía de señalización de IGF-1.....	117
Figura 42. Expresión de genes marcadores de diferenciación osteogénica en respuesta a los tratamientos con BMP + IGF-1.	127
Figura 43. Actividad FA total, DNA total y actividad FA normalizada de MC3T3-E1 en respuesta a los tratamientos con BMP + IGF-1.	128
Figura 44. Ensayo de mineralización <i>in vitro</i> en respuesta al tratamiento con BMP + IGF-1. ..	129
Figura 45. Análisis histológico de la osificación ectópica <i>in vivo</i> de las esponjas cargadas con los tratamientos de BMP y/o IGF-1.....	132
Figura 46. Contenido de calcio de las esponjas cargadas con BMP y/o IGF-1 tras 3 semanas de su implantación.....	133
Figura 47. Esquema de la expresión temporal de algunos de los factores que intervienen en el proceso de osificación.....	136
Figura 48. Representación esquemática de las diferentes metodologías para retener un factor de crecimiento sobre un material y sus formas de liberación posterior.	138
Figura 49. Representación esquemática de un biomaterial diseñado para liberar de forma secuencial VEGF y BMP-2.	142
Figura 50. Esquema de inducción para los experimentos <i>in vitro</i> para testar el efecto sobre la diferenciación osteoblástica de la administración secuencial de BMP y/o IGF-1.	146
Figura 51. Esquema en imágenes del proceso de recubrimiento con alginato y/o gelatina de las esponjas de Helistat.	148
Figura 52. Actividad FA total de MC3T3-E1 sometidas al tratamiento con pulsos secuenciales de BMP y/o IGF-1.	152
Figura 53. Tinción con rojo de alizarina de MC3T3-E1 tras 21 días de tratamiento con pulsos secuenciales de BMP y/o IGF-1.	153
Figura 54. Cuantificación del colorante extraído a partir de los cultivos sometidos a la tinción con rojo de alizarina.	154

Figura 55. Liberación de BMP-2 cargada sobre Helistat recubierto con alginato.	156
Figura 56. Análisis histológico de esponjas de Helistat recubiertas de alginato (A2/G0) cargadas con 1 µg de BMP-2.	157
Figura 57. Liberación de BMP-2 cargada sobre Helistat recubierto con alginato y gelatina. ...	159
Figura 58. Cuantificación por ELISA de BMP-6 e IGF-1 liberado a partir de Helistat recubierto de alginato.	161
Figura 59. Esquema general del diseño experimental para la medición de la expresión relativa de un gen.	204
Figura 60. Esquema representativo de los ciclos de amplificación y las condiciones de las curvas de fusión para las qPCR realizadas para todos los genes estudiados.	206
Figura 61. Fotografía de la ubicación de los implantes.	207

Índice de tablas.

Tabla 1. Algunas proteínas morfogenéticas de hueso (BMP) que intervienen en el proceso de osificación.	36
Tabla 2. Genes asociados al proceso de diferenciación osteoblástica.	39
Tabla 3. Algunos polímeros naturales biodegradables que se utilizan comúnmente en diferentes aplicaciones biomédicas.	47
Tabla 4. Efectos secundarios asociados a la administración de rhBMP-2 en fusiones espinales.	50
Tabla 5. Comparativa de la eficiencia de pegada de vCBD-RGD en las esponjas de colágeno. ..	79
Tabla 6. Comparativa de la eficiencia de pegada de cCBD-PHSRN en las esponjas de colágeno.	81
Tabla 7. Receptores de BMP.	113
Tabla 8. Esquema de tratamientos cargados sobre Helistat para su implante en el modelo <i>in vivo</i>	125
Tabla 9. Secuencia de tratamientos de FGF-2 y BMP-2 sobre cultivos de MSC.	141
Tabla 10. Pulsos de BMP y/o IGF-1 aplicados sobre los cultivos de MC3T3-E1.	147
Tabla 11. Esponjas recubiertas con diferentes mezclas de alginato y gelatina.	148
Tabla 12. Preparación de soluciones de recubrimiento de alginato y gelatina..	190
Tabla 13. Condiciones generales de la mezcla de reacción preparada por muestra de qPCR.	204
Tabla 14. Secuencias de oligonucleótidos empleados para la amplificación por qPCR para muestras de ratón.	205
Tabla 15. Secuencias de oligonucleótidos empleados para la amplificación por qPCR para muestras de rata.	205

Lista de abreviaturas.

A

ABC: Complejo avidina-biotina.

AGN1: Angiopoietina 1.

AGN2: Angiopoietina 2.

AKT: Proteín quinasa B.

ALK: Activin receptor-like kinase.

Alp: Gen de la fosfatasa alcalina.

ANOVA: Análisis de varianza.

ATP: Adenosín trifosfato.

B

BCA: Ácido bicinconínico.

Bglap: Gen de la Osteocalcina (*bone gamma-carboxyglutamate protein*)

BMP: Proteína morfogenética de hueso.

BMPR: Receptor de BMP.

BSA: Albúmina de suero bovino.

BSP: Sialoproteína ósea.

C

cCBD: Dominio de unión a colágeno derivado de la collagenasa de *Clostridium histolyticum*.

cDNA: DNA complementario.

CMFDA: 5-chloromethylfluorescein diacetate.

Col1a1: Gen del Colágeno tipo 1 alfa 1.

D

Da: Daltons.

Dlx5: Gen de la Distal-less homeobox 5.

DNA: Ácido desoxiribonucleico.

E

ECCAC: *European Collection of Authenticated Cell Cultures.*

ECL: Quimioluminiscencia mejorada.

ECM: Matriz extracelular.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EGF: Factor de crecimiento epidermal.

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

EMA: Agencia europea del medicamento (*European medicines agency*).

ERK: *Extracellular signal-regulated kinases.*

F

FA: Fosfatasa alcalina.

FAK: *Focal adhesion kinase.*

FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos (*Food and Drug Administration*).

FGF-2: Factor de crecimiento de fibroblastos (*fibroblast growth factor*).

FGFR: Receptor de FGF.

FITC: Fluoresceína.

G

GAG: Glucosaminoglicanos.

***Gapdh*:** Gen de la Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

GDF: *Growth differentiation factor.*

H

HA: Hidroxiapatita.

HABA: Ácido 4'-hidroxiazobencen-2-carboxílico (*4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid*).

HCl: Ácido clorhídrico.

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia.

***Hprt*:** Gen de la Hipoxantina guanina fosforibosil-transferasa.

HUVEC: Células humanas endoteliales de la vena del cordón umbilical (*Human umbilical vein endothelial cells*).

I

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (*Insulin-like growth factor 1*).

IgG: Inmunoglobulina G.

IL: Interleuquina.

INF γ : Interferón gamma.

IRS-1: *Insulin receptor substrate 1.*

J

JNK: quinasas c-Jun N-terminal (*c-Jun N-terminal kinases*).

M

MAB: Anticuerpo monoclonal.

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos (*Mitogen-activated protein kinase*).

M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos (*Macrophage colony-stimulating factor*).

MEM: *Minimum Essential Medium Eagle*.

mRNA: RNA mensajero.

MSC: Células madre mesenquimales.

mTOR: *Mechanistic target of rapamycin*.

MW: Masa molecular.

N

NK: *Natural killer*.

O

OCC: Cresolftaleína complexona.

OP: Proteína osteogénica (*Osteogenic protein*).

OPG: Osteoprotegerina.

OPN: Osteopontina.

OSX: Ostérix.

P

PBS: Tampón fosfato salino (*Phosphate buffered saline*).

PBST: PBS + 1% Tween-20.

PCL: Policaprolactona.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas (*Platelet derived growth factor*).

PEGDA: Poli(etilen glicol) diacrilato.

PGA: Ácido poliglicólico.

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa (*Phosphatidylinositol-3-kinase*).

PLA: Ácido poliláctico.

PLGA: Ácido poli(láctico co-glicólico).

PLLA: Ácido poliláctico.

Q

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (*Quantitative polymerase chain reaction*).

R

RANKL: Ligando del receptor activador para el factor nuclear κB (*Receptor Activator for Nuclear Factor κB Ligand*).

rBMSC: Células madre mesenquimales derivadas de médula ósea de rata.

rhBMP: BMP recombinante humana.

RNA: Ácido ribonucleico.

RUNX2: *Runt-related transcription factor 2*.

Runx2: Gen de RUNX2.

S

Sala GMP: Sala blanca (*Good Manufacturing Practices*).

Sp7: Gen de Ostéix.

Spp1: Gen de la osteopontina (*secreted phosphoprotein 1*).

T

TBS: Solución salina tamponada con Tris (*Tris-buffered saline*).

TCP: Fosfato tricálcico (*Tricalcium phosphate*).

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta (*Transforming growth factor beta*).

TMB: 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina.

TMR: Rodamina.

TNF: Factor de necrosis tumoral (*tumor necrosis factor*).

TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano.

TTBS: TBS + 1% Tween-20.

V

vCBD: Dominio de unión a colágeno derivado del factor de von Willebrand.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*).

VEGFR: Receptor de VEGF.

X

XTT: 2,3-Bis-(2-Metoxi-4-Nitro-5-Sulfofenil)-2H-Tetrazolio-5-Carboxanilida.

1 Introducción general.

1.1 Características generales del tejido óseo.

El hueso es un tejido conectivo vascularizado formado por una matriz proteica fundamentalmente conformada por fibras de colágeno. Sobre ella se depositan sales de calcio (fosfatos, carbonatos o, en algunos casos, fluoruros) en forma de apatita. Esta matriz ósea mineralizada es depositada por las células formadoras de hueso, que son los osteoblastos y osteocitos.

Los huesos son el principal elemento de sostén estructural de los vertebrados. Gracias a su característica rigidez, sirven de marco sobre el cual se realiza la locomoción. Por otro lado, proveen de protección mecánica a los órganos vitales como el cerebro, la médula espinal, el corazón y los pulmones.

Dada su composición, también ejerce funciones de reservorio de minerales como el calcio y el fósforo. Específicamente para el calcio, se ha determinado que el 98 % de este mineral está almacenado en los huesos, mientras que únicamente el 2 % restante se encuentra en su forma libre. El balance entre formación y resorción ósea interviene de forma directa sobre la homeostasis de estos minerales, regulando sus niveles en sangre (Boskey, 2006).

En el interior de los huesos, está contenida la médula ósea, que es el tejido en el cual ocurre la hematopoyesis, dando lugar a la formación de los eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Además, es un importante reservorio de células madre multipotentes, también denominadas células madre mesenquimales (MSC) (Lian y Stein, 2006).

1.2 Estructura general del hueso.

Existen dos tipos de hueso que pueden distinguirse histológica y radiológicamente: el hueso compacto o cortical y el hueso esponjoso o trabecular. Aunque el hueso cortical es más laxo durante el proceso de su formación o tras la curación de una fractura, en su estadio maduro se convierte en una estructura densa y muy compacta. Por su parte, en el hueso trabecular, la matriz extracelular (ECM) y las células embebidas en ella se organizan en forma de espículas finas interconectadas entre sí (**Figura 1**).

Histológicamente, el hueso cortical presenta una matriz sólida mineralizada interconectada por un complejo sistema de canales y canalículos (**Figura 2**). El hueso maduro está organizado en unidades anatómicas y funcionales denominados sistemas de Havers u osteonas. Estas estructuras están formadas por canales longitudinales que contienen vasos sanguíneos y nervios rodeados por estructuras concéntricas de matriz ósea madura, denominadas lamelas o laminillas (Boskey, 2006).

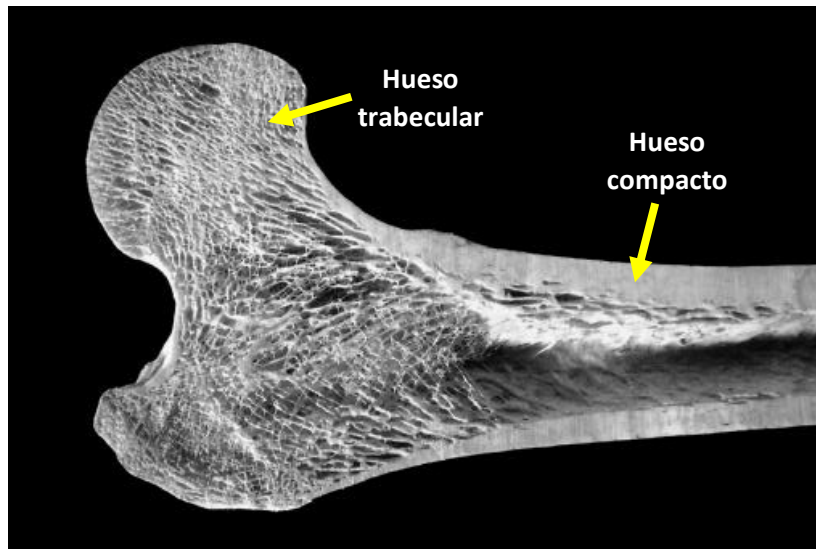


Figura 1. Corte longitudinal de un fémur. Se destaca una zona con hueso trabecular en el que se observa la disposición en forma de espículas continuas que dan lugar a una estructura esponjosa. Por otro lado, el hueso compacto presenta una estructura macroscópica completamente continua y homogénea (Imagen tomada de *Kuratorium für Knochengesundheit*).

Además de las uniones longitudinales a través de los canales haversianos, el tejido presenta canales transversales que perforan las laminillas, denominados canales de Volkmann. Éstos interconectan las diferentes osteonas entre sí y con la médula ósea. A escala celular, el sistema se comunica con los osteocitos que ocupan lagunas en la ECM que los circunda, a través de un intrincado sistema de canalículos (**Figura 2**) (Boskey, 2006).

El hueso esponjoso se caracteriza por la presencia de grandes espacios, denominados cavidades vasculares, en los que se encuentran gran cantidad de elementos del sistema hematopoyético. Estos espacios están delimitados por estructuras conocidas como trabéculas óseas, las cuales presentan una matriz ósea mineralizada con gran cantidad de osteocitos embebidos en ella (Boskey, 2006).

1.3 Composición del tejido óseo.

El tejido óseo está compuesto por una fase orgánica, fundamentalmente de colágeno tipo I, y de una fase inorgánica de fosfato cálcico en forma de hidroxipatita. La proporción entre estas dos fases varía en relación con la zona anatómica o la edad del individuo pero, en líneas generales, encontramos que alrededor de un 65 % de su peso corresponde a contenido mineral, mientras que entre un 20 y 25 % está compuesto de colágeno. A pesar de ser un tejido duro y rígido, un 10 % de su peso está compuesto por agua. En torno a 1-2 % del material corresponde a proteínas no-colágenas que, a pesar de estar presentes en baja proporción, son de vital importancia desde el punto de vista mecánico y regulatorio (Martin et al., 2015).

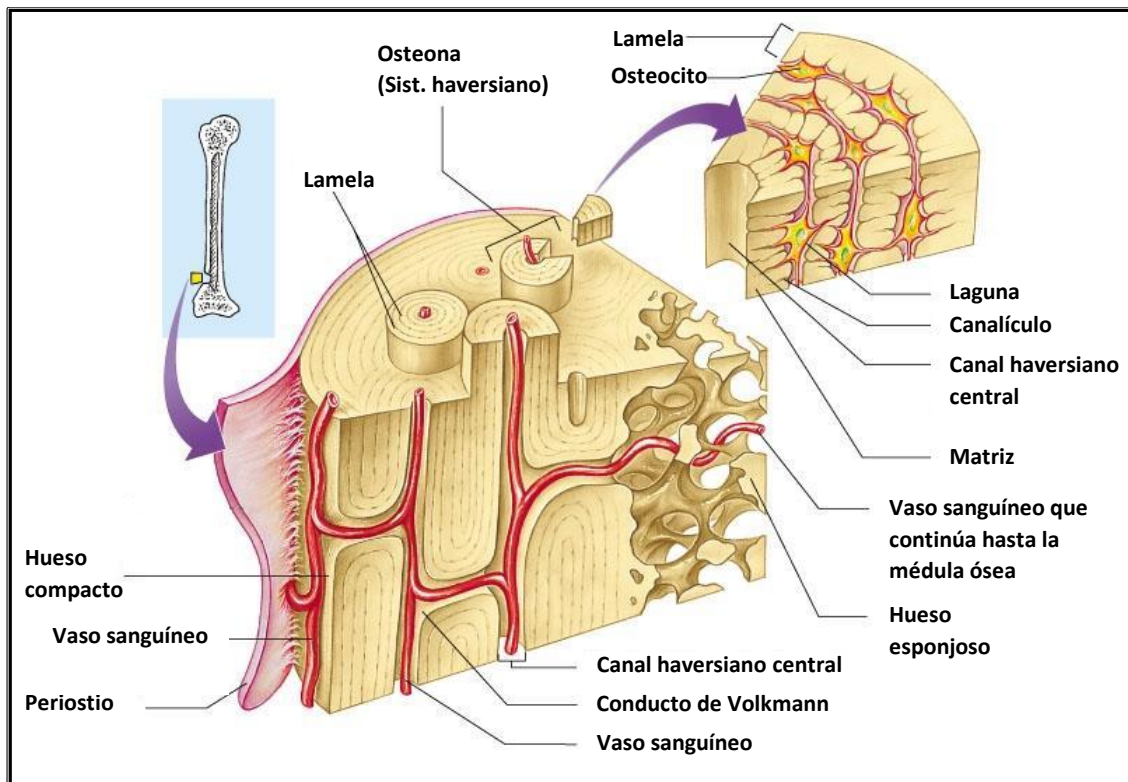


Figura 2. Representación de la estructura general del hueso cortical del fémur de un mamífero. Se observa un esquema general de los diferentes componentes en un corte longitudinal de un hueso maduro. Arriba a la derecha, se presenta un detalle a escala celular de una sección longitudinal de una osteona. (Imagen modificada de Pearson Education, Inc. Publishing as Benjamin Cummings)

El colágeno tipo I es la proteína extracelular más abundante en los mamíferos, especialmente presente en el hueso. Forma parte del grupo de los colágenos fibrilares, junto con los colágenos tipo II, III, V, XI, XXIV y XXVII. Su característica principal es que presentan una estructura de triple hélice de largas cadenas que se disponen a su vez, en fibrillas altamente organizadas. Esta formación le confiere a la estructura una alta resistencia a la tensión lo cual juega un papel crucial brindando solidez a tejidos como el esqueleto, la piel, vasos sanguíneos, intestinos y otros (Hall y Hall, 2015).

Por su parte, la fase inorgánica consiste casi en su totalidad de un mineral en forma de apatita, altamente sustituido $[(Ca_{10}PO_4)_6(OH)_2]$. Éste se nuclea en los extremos de las fibrillas de colágeno y en los espacios que corren longitudinalmente entre ellas. Los cristales crecen con el tiempo de forma paralela, tanto unos con otros como con respecto a las fibrillas de colágeno. De esta manera, el hueso completamente mineralizado termina formando un continuo que, de retirarse la materia orgánica, se mantendría como una pieza mineral sólida (Martin et al., 2015).

La interacción entre colágeno y mineral determina de forma directa las dos propiedades físicas fundamentales del hueso: dureza y elasticidad. Un hueso hipotético en el que sólo encontráramos una fase mineral, tendría unos niveles muy altos de dureza. Esto se traduce en que sería más difícil que apareciera una fractura pero, al formarse una grieta, la misma se propagaría muy fácilmente por la frágil estructura. La presencia de colágeno confiere al conjunto la elasticidad necesaria para que disminuya la fragilidad y, por tanto, el riesgo de

ruptura. Sin embargo, huesos con niveles de mineralización muy bajos son muy débiles y, por ende, proclives a sufrir fracturas (Ciarelli et al., 2003).

Dentro de la matriz orgánica del tejido óseo también se puede identificar un gran número de proteínas no-colágenas. A pesar de que representan una proporción mucho menor del volumen total de tejido, estas moléculas influyen en la conformación de la estructura del hueso y participan en la regulación de la formación, remodelado y resorción ósea. Entre las proteínas no-colágenas se pueden distinguir:

1. **Proteoglicanos:** Son proteínas enlazadas covalentemente a largas cadenas de polisacáridos (glicosaminoglicanos). Son más representativas del cartílago pero están presentes también en el hueso. En líneas generales, interactúan con las fibras de colágeno y ocupan espacios que, eventualmente, se convertirán en hueso. Algunos de los más representativos son el versicano, la decorina y la fibromodulina (Gehron Robey, 2008).
2. **Glicoproteínas:** En el tejido óseo, la mayoría de las proteínas de la ECM son modificadas postraduccionalmente para contener oligosacáridos. En este grupo se encuentran proteínas con el potencial de regular la disponibilidad de iones fosfato, como la fosfatasa alcalina (FA), así como de servir de andamio para mediar la deposición de la matriz mineral de hidroxapatita, como la osteonectina. También se pueden encontrar una gran cantidad de glicoproteínas con dominios de unión que intervienen directamente en la adhesión de células a la ECM como la fibronectina, vitronectina, osteopontina, sialoproteína ósea y las trombospondinas (Gehron Robey, 2008).

1.4 Células del tejido óseo.

El hueso presenta varios tipos celulares que intervienen en la formación y mantenimiento del tejido. Básicamente, pueden distinguirse cuatro tipos de células óseas: osteoblastos, osteocitos, células de revestimiento óseo y osteoclastos. Las tres primeras podrían clasificarse en otra subcategoría de *células formadoras de hueso*, todas provenientes de la diferenciación de MSC. Por su parte, los osteoclastos están relacionados con los macrófagos, por lo que se generan como resultado de la diferenciación de precursores hematopoyéticos.

Los osteocitos son las células más abundantes del tejido óseo, encontrándose diez de ellos por cada osteoblasto presente en el hueso maduro y un número muy inferior de osteoclastos (Väänänen y Zhao, 2008). Las MSC residentes en los tejidos tienen la capacidad de diferenciarse a varios linajes, entre los cuales se encuentra el osteogénico.

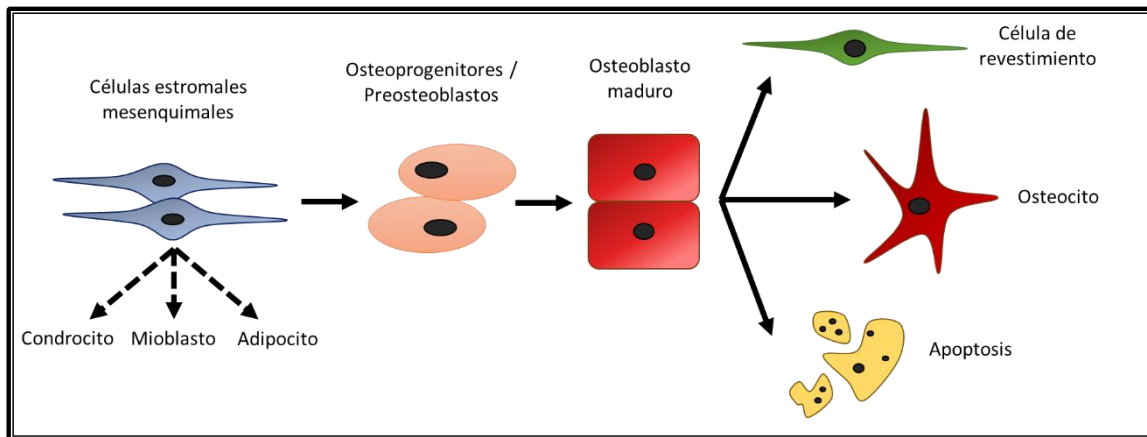


Figura 3. Representación esquemática del proceso de diferenciación osteoblástica.

1.4.1 Células madre mesenquimales (MSC).

En el año 1991, Fridenshtein fue el primero en probar la presencia de células en la médula ósea con la capacidad de formar hueso cuando se trasplantaban *in vivo* introducidas en cámaras de difusión (Fridenshtein, 1991). Más adelante, se demostró que estas células podían mantenerse indiferenciadas en cultivo y que, con los estímulos adecuados, podían diferenciarse a los linajes mesenquimales de tejidos como grasa, cartílago, hueso, tendón y músculo (Pittenger et al., 1999).

En la actualidad, se manejan diferentes teorías sobre las características y el origen de los precursores indiferenciados que dan lugar a la formación de los fenotipos celulares asociados al hueso. Sin embargo, todas convergen en que la diferenciación osteogénica progresa desde la célula indiferenciada (célula madre mesenquimal, célula estromal multipotente, pericito y otras denominaciones) pasando por varios linajes intermedios que se denominan osteoprogenitores, hasta derivar en osteoblastos maduros (Bianco, 2014).

Como se esquematiza en la **Figura 3**, los osteoblastos pueden tener 3 destinos diferentes: pueden generar matriz ósea quedando embebidos completamente en ella y diferenciarse a osteocitos, pueden entrar en un estado de quiescencia convirtiéndose en células de revestimiento o entrar en apoptosis (Manolagas, 2000).

1.4.2 Osteoblastos.

Los osteoblastos tienen como función principal la biosíntesis y organización de la ECM ósea. En un hueso que crece activamente, los osteoblastos se encargan de generar la matriz orgánica. De esta manera, expanden el volumen de hueso formado en osteoides y secretan diferentes factores que disparan el inicio de la deposición de la matriz mineral. Además, se ha descrito que los osteoblastos juegan un papel esencial de mediación endocrina y paracrina en el proceso osteogénico. Son células altamente reactivas a las señales endocrinas y, a su vez,

producen una gran cantidad de factores autocrinos y paracrinos que inducen la llegada de células precursoras y la maduración de preosteoblastos (Lian y Stein, 2006).

En líneas generales, cuando los preosteoblastos cesan su actividad proliferativa, sufren un cambio clave, pasando de ser células alargadas a ser células en forma cuboidal que comienzan a secretar las proteínas de la matriz orgánica dirigidas al frente de mineralización. En este punto, se activa una fuerte actividad fosfatasa alcalina que prepara la matriz para el inicio de la mineralización. Una vez que el osteoblasto maduro es rodeado por la matriz que comienza a mineralizar, se activa la diferenciación hacia el fenotipo osteocítico o bien inicia el proceso de apoptosis. Se ha estimado que entre un 50-70% de los osteoblastos presentes en los sitios de remodelación o formación de hueso no terminan derivando en osteocitos o células de recubrimiento (Jilka et al., 1998; Lian y Stein, 2006).

1.4.3 Osteocitos.

Como ya se ha dicho anteriormente, los osteocitos son las células más abundantes en el tejido óseo. Como se esquematiza en la **Figura 2**, están interconectados con las células circundantes formando un sincitio a través de uniones tipo GAP. El mecanismo definitivo mediante el cual los osteoblastos se diferencian hacia este tipo de células no se ha dilucidado por completo en la actualidad.

Los osteocitos retienen la capacidad de los osteoblastos de secretar ciertas proteínas de matriz extracelular, aunque en menores cantidades. Específicamente, regulan la maduración de la matriz que los rodea potenciando el proceso de mineralización. Presentan una producción alta de osteocalcina, la cual está íntimamente relacionada con el proceso de mineralización (Klein-Nulend y Bonewald, 2008).

Los osteocitos se consideran las células mecanotransductoras del hueso. Son altamente sensibles a los cambios de presión y carga aplicada sobre ellas. Su anclaje a moléculas de la ECM es muy importante para convertir las señales biomecánicas externas en respuestas químicas. Se ha demostrado que tanto osteocitos como osteoblastos, se adhieren a superficies de colágeno tipo I, osteopontina, vitronectina, fibronectina y trombospondina. El estrés generado por las fuerzas mecánicas a la que el hueso es sometido, se traduce en el movimiento de fluido a través de las uniones GAP del sincitio que forman. Este flujo permite a los osteocitos adaptar su respuesta para modelar la arquitectura ósea (Lian y Stein, 2006; Marie et al., 2014).

1.4.4 Osteoclastos.

Los osteoclastos son células multinucleadas derivadas de la diferenciación de precursores hematopoyéticos con la capacidad de degradar la matriz ósea mineralizada. Son células de gran tamaño ($\approx 100 \mu\text{m}$) que, en humanos, pueden presentar un número de núcleos variable entre 4 y 10 unidades en células normales. Estas células altamente polarizadas son reclutadas, se adhieren y se activan únicamente ante la presencia de hueso mineralizado. Además, experimentos *in vitro* han demostrado la importancia del contacto célula-célula entre

precursores osteoblásticos y progenitores de osteoclastos para inducir la formación del fenotipo osteoclástico maduro (Takahashi et al., 2008).

1.5 Proceso de formación ósea.

La formación del tejido óseo puede ocurrir a través de dos vías: osificación intramembranosa y osificación endocondral.

1.5.1 Osificación intramembranosa.

Este proceso ocurre a través de la transformación directa de MSC a osteoblastos. Mediante esta vía se generan los huesos planos, como los del cráneo y sus suturas, algunos huesos de la cara y partes de la mandíbula y la clavícula (Karaplis, 2008).

Se tiene mucha menor información acerca de cómo ocurre este proceso con respecto a lo que se sabe sobre la osificación endocondral, la mayoría de ella proveniente del estudio de las suturas craneales de los huesos parietal y frontal. En este proceso básicamente se forma tejido óseo sin que exista previamente un “andamio” cartilaginoso.

El primer evento que ocurre es la condensación de células madre precursoras en la zona de osificación. Una vez que cesa esta condensación, las células sufren un aumento importante de la expresión del gen *Runx-related transcription factor 2 (Runx2)*, el cual es un regulador maestro de la diferenciación osteoblástica y, a su vez, un inhibidor de las vías de diferenciación condrogénica y adipogénica (Takarada et al., 2016). A partir de este evento, se activa la diferenciación de las MSC hacia osteoblastos. Se inicia así la acumulación de colágeno tipo I y el resto de las proteínas no-colágenas de la ECM sobre la que se depositará más tarde la hidroxiapatita de la matriz mineralizada (Karaplis, 2008).

1.5.2 Osificación endocondral.

La osificación endocondral es la vía mediante la que se forman la mayoría de los huesos durante el desarrollo fetal y postnatal, así como el tejido nuevo que se produce durante el crecimiento longitudinal de los huesos largos. Este proceso implica la formación de hueso nuevo sobre tejido cartilaginoso que se ha formado previamente.

Para ello, las MSC se condensan de forma similar a como ocurre para la osificación intramembranosa pero, en este caso, siguen su diferenciación hacia condrocitos. Éstos secretan y modelan la ECM cartilaginosa con sus componentes característicos: colágeno tipo II, agregano, otros proteoglicanos característicos del cartílago y una alta proporción de agua (Karaplis, 2008; Mackie et al., 2008).

En este punto, comienza a ocurrir la degradación progresiva de la matriz cartilaginosa y, en paralelo, los condrocitos presentes se diferencian hacia condrocitos hipertróficos. Éstos

empiezan a producir colágeno tipo X y a dirigir la mineralización de su ECM circundante. Esta sucesión de eventos dispara señales que inducen la invasión de vasos sanguíneos y la llegada de osteoclastos y precursores osteoblásticos. En consecuencia, se establece un centro de osificación primaria en el que, sobre la matriz cartilaginosa en proceso de degradación, los osteoblastos depositarán la matriz ósea sobre la que ocurrirá, en la fases finales, la mineralización (Karaplis, 2008; Mackie et al., 2008).

1.6 Regeneración del tejido óseo: la reparación de fracturas.

En el humano, el hueso tiene, junto con la sangre, la capacidad de regenerarse tras sufrir una lesión, produciendo tejido nuevo sin que se forme una cicatriz de tipo fibroso. De hecho, puede considerarse que la curación de un hueso fracturado es un proceso de regeneración tisular propiamente dicho, puesto que se recapitula la osteogénesis de forma casi idéntica a como ocurre durante el desarrollo óseo.

Uno de los factores más importantes que influye sobre la regeneración de una fractura es el grado de desplazamiento que se genera entre los extremos de la misma, así como el grado de estabilidad mecánica de la zona tras su inmovilización.

Existen lesiones en las que el sitio de la fractura permite el empleo de sistemas de fijación (como placas y tornillos) y compresión inter-fragmentaria (**Figura 4 A**). Como resultado de la intervención, se puede reducir al mínimo el espacio entre los extremos de fractura, generando una fijación rígida. En condiciones como estas, la osificación ocurre de forma directa y se denomina “consolidación primaria”. En este caso, los osteoclastos migran directamente hacia el borde de fractura para iniciar la resorción ósea, seguido de un efecto llamada que origina el inicio de la osificación intramembranosa (tal y como se describe en la sección 1.5.1) (Loi et al., 2016).

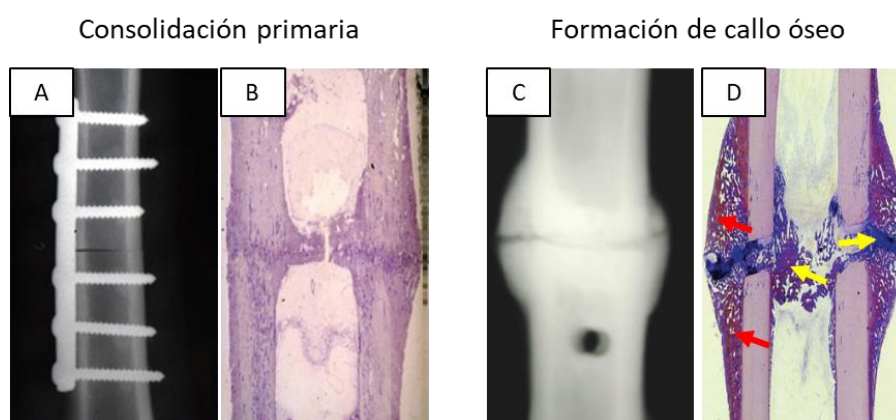


Figura 4. Ejemplos de las vías de osificación de un hueso tras una fractura. En **(A)** se muestra una osteotomía tras la aplicación de una fijación rígida que limita la movilidad entre los bordes de fractura. Retirada la fijación, en **(B)** se evidencia la formación de un puente óseo en la zona de la fractura sin que se haya generado un intermediario cartilaginoso. En **(C)** se muestra una osteotomía similar pero sometida a fijación externa más flexible, que da lugar a la formación de un callo óseo **(D)** en el que se distingue periostio calcificado (flechas rojas) y fibrocartílago (flechas amarillas) en la línea de la osteotomía. Figura tomada de (Claes et al., 2012).

Sin embargo, en la mayoría de los casos, no es posible conseguir la rigidez total, generándose una zona con cierto grado de desplazamiento intermitente entre los extremos de la fractura (**Figura 4 C**). En estos casos se incluyen tanto fracturas que no requieren más que inmovilización, como aquellas con mecanismos complejos de fijación externa o intramedular. En estos escenarios, además de la consolidación primaria inicial, ocurre un proceso de consolidación secundaria o indirecta en el que prima la osificación endocondral (Loi et al., 2016).

El proceso de regeneración ósea tras una fractura puede dividirse en diferentes fases, tal y como se indica de forma esquemática en la **Figura 5**. En cada una de ellas, participan diferentes tipos celulares e intervienen factores de crecimiento, citoquinas y señales provenientes de las proteínas de la ECM. A continuación, se describirá detalladamente cada una de estas fases, siguiendo la clasificación y numeración expuesta en la **Figura 5**.

1.6.1 Hematoma y respuesta inflamatoria aguda.

Se ha descrito que la presencia prolongada de factores inflamatorios en fracturas aumenta la probabilidad de que las mismas deriven en una unión retardada o incluso en una no-únión. Sin embargo, se ha establecido que esta reacción inflamatoria aguda inicial de alrededor de 24 horas es de vital importancia para que el tejido óseo se regenere adecuadamente (Schmidt-Bleek et al., 2015).

En el momento inmediatamente posterior a la fractura hay una respuesta inflamatoria aguda ante el daño. Tras la ruptura de los vasos sanguíneos de la zona, se genera un hematoma en el espacio comprendido entre los bordes de fractura, la zona circundante y el canal medular adyacente como consecuencia de la activación de la cascada de coagulación y de la exposición de las plaquetas al ambiente extravascular. La red de fibrina formada constituye el primer andamio sobre el que se depositarán las células inflamatorias atraídas por las señales químicas generadas por las plaquetas, restos de células necróticas y macrófagos de la zona. Esta estructura transitoria funcionará como andamiaje sobre el cual se formará el calo óseo posteriormente (Marsell y Einhorn, 2011).

Tras esta respuesta inicial, los osteoclastos reabsorben los restos de hueso necrótico de los extremos de fractura y los macrófagos juegan dos papeles fundamentales:

1. Por un lado, van removiendo de forma progresiva la matriz inicial de fibrina formada y las células necróticas por endocitosis.
2. Además, secretan un repertorio de citoquinas y señales quimiotácticas, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), y una serie de interleuquinas, como la IL-1 β e IL-6. Esto inicia el reclutamiento de fibroblastos, MSC y otros osteoprogenitores provenientes de la médula ósea, el periostio y de las paredes vasculares.

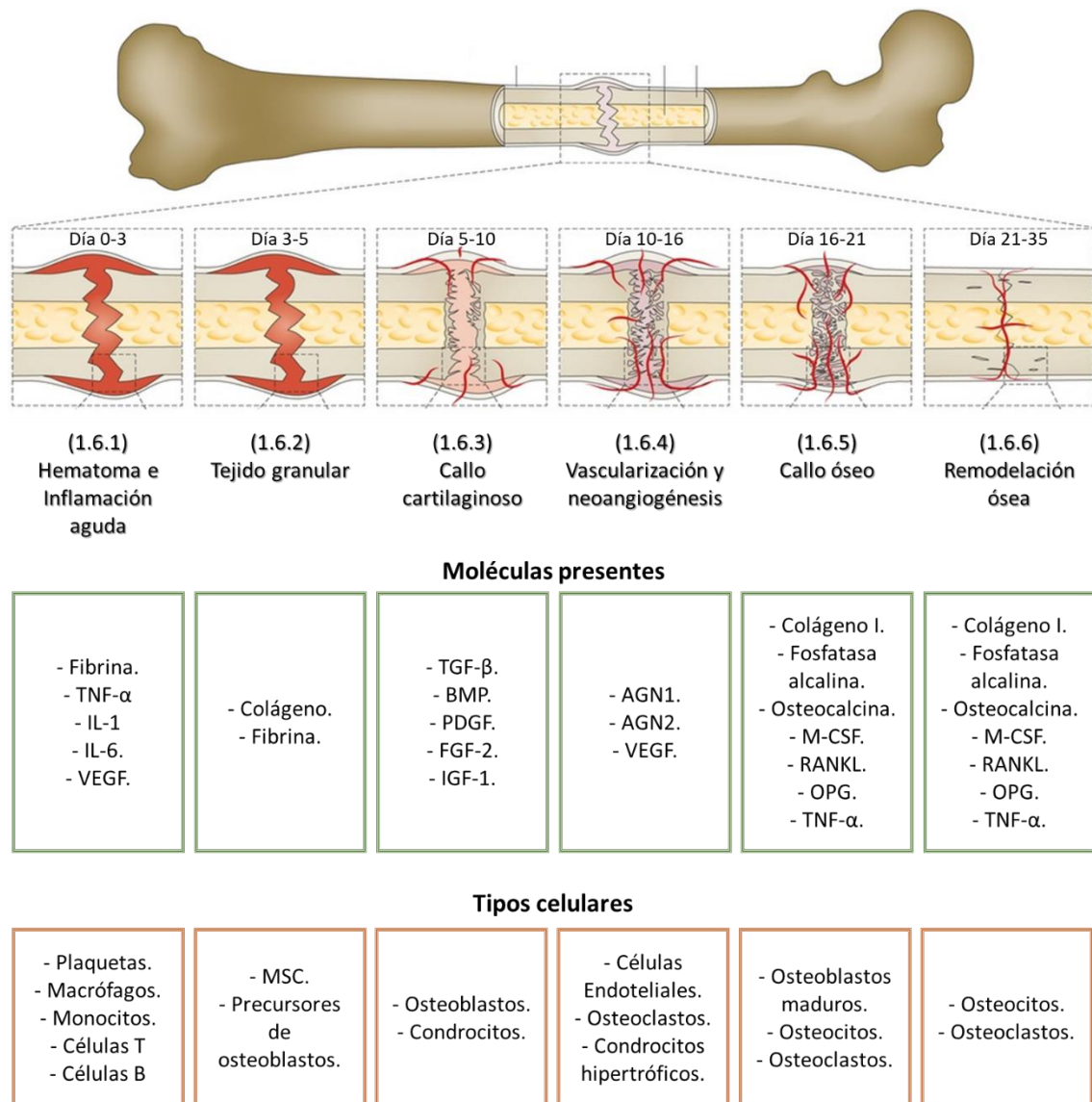


Figura 5. Esquema del proceso de regeneración del tejido óseo tras sufrir una fractura. En los cuadros verdes se mencionan algunas de las moléculas representativas de cada fase y en los cuadros naranja, los tipos celulares más relevantes que intervienen en ella. Cada una de las fases (indicadas con los números entre paréntesis) se explica a continuación de esta figura. Figura modificada a partir de (Einhorn y Gerstenfeld, 2015).

La presencia de estas interleuquinas estimula la angiogénesis de forma directa, así como por la inducción de la producción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Marsell y Einhorn, 2011). Este proceso es de vital importancia, puesto que la ruptura inicial de los vasos sanguíneos como consecuencia de la lesión, interrumpe la irrigación sanguínea normal creando un ambiente hipóxico. La baja disponibilidad de oxígeno es un importante inhibidor del proceso de osificación, por lo que la angiogénesis es un proceso fundamental para la regeneración del hueso afectado.

1.6.2 Formación de tejido granular.

Los fibroblastos, MSC y osteoprogenitores reclutados a la zona de la inflamación aguda, responden ante las citoquinas proinflamatorias presentes proliferando y produciendo ECM. Durante este período, los progenitores proliferan activamente y generan una ECM de colágeno conformando un tejido granuloso de una característica fibrilar e incipientemente vascularizado. Este tejido sustituye paulatinamente a la anterior matriz de fibrina formada en la fase inflamatoria y será la base sobre la cual se generará el callo cartilaginoso posterior (Loi et al., 2016).

1.6.3 Generación del callo cartilaginoso.

En este punto, las MSC proliferativas del tejido granular comienzan a diferenciarse según la zona en la que se encuentren. En la zona más central y alejada de los límites de la fractura, comienza un proceso osificación endocondral. Las MSC de la zona se diferencian por la vía condrogénica en respuesta a las condiciones hipóxicas y a una matriz relativamente débil que permite micromovilidad. Los condroblastos y condrocitos presentes producen una matriz de fibrocartilago que se extiende por todo el espacio de la fractura conectando ambos extremos. La duración de este período es altamente dependiente de las condiciones puntuales de cada fractura e individuo.

Por otro lado, en los bordes distales y proximales de la fractura la osificación ocurre por la vía intramembranosa. En estas zonas hay una mayor estabilidad mecánica y un mejor riego sanguíneo. Es por ello que las MSC y los precursores preosteoblásticos se diferencian directamente a osteoblastos sin que se genere un intermediario cartilaginoso. Estos bordes osificados, conjuntamente con el tejido fibrocartilaginoso formado en la zona más central de la fractura, conforman el callo cartilaginoso.

Este proceso está regulado por muchos factores que interactúan para dirigir ambas vías de diferenciación. Los factores pertenecientes a la superfamilia de factores de crecimiento transformante beta (TGF- β) juegan un papel esencial en la osificación. Específicamente dentro de esta superfamilia, TGF- β 1, - β 2, - β 3 y las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP) son mediadores clave durante las diferentes fases de la osificación. Otros factores como VEGF, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), también participan activamente en este proceso (Loi et al., 2016; Marsell y Einhorn, 2011). El papel de estos factores de crecimiento se desarrollará en la sección 1.7 de esta introducción.

1.6.4 Revascularización y neoangiogénesis.

La vascularización del sitio de fractura es un proceso esencial para la regeneración exitosa del tejido afectado. Es importante puntualizar que el fibrocartilago es predominantemente avascular. Por ende, el siguiente paso del proceso es su vascularización.

Para ello, han de coordinarse dos eventos: la activación de las vías angiogénicas propiamente dichas, pero también las rutas relacionadas con la degradación del cartílago que permiten la invasión de los nuevos vasos sanguíneos.

Está principalmente regulado por dos rutas de señalización: (i) La ruta dependiente de angiopoietina-1 y -2, que se expresan en momentos tempranos del proceso, por lo que su presencia suele asociarse a la inducción de la invasión vascular inicial; (ii) la ruta dependiente de VEGF que es el regulador maestro de la regeneración vascular. Se ha demostrado que tanto osteoblastos como condrocitos hipertróficos producen altos niveles de este factor, lo cual deriva en que el tejido cartilaginoso avascular se convierta en el callo óseo (Marsell y Einhorn, 2011).

1.6.5 Mineralización y resorción del callo cartilaginoso.

En este punto, el callo cartilaginoso es sustituido por un callo óseo endurecido. Los condrocitos proliferativos del callo cartilaginoso derivan en condrocitos hipertróficos que comienzan a calcificar su ECM circundante. En respuesta a ello, se inicia la resorción del cartílago mineralizado orquestada por el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), el ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL), la osteoprotegerina (OPG) y el TNF- α (Marsell y Einhorn, 2011).

En respuesta a todos estos factores, los condrocitos entran en apoptosis y secretan gránulos de calcio acumulados en sus mitocondrias en respuesta al ambiente hipóxico de fases previas. Estos depósitos de calcio inmediatamente precipitan con los iones fosfato presentes y sirven de núcleos de mineralización para la formación de nuevos cristales de apatita. Los osteoblastos locales comienzan depositar ECM y generan un hueso inmaduro a su alrededor que constituirá el callo óseo (Marsell y Einhorn, 2011).

1.6.6 Remodelación ósea.

El callo óseo está constituido por hueso reticular suficientemente endurecido para soportar la carga a la que es sometido. Sin embargo, este tejido aún no mimetiza las características biomecánicas de un hueso normal. Es por ello que se inicia una cascada de señalización que deriva en una segunda fase de resorción. El resultado final es la sustitución del hueso reticular presente por hueso laminar maduro con una cavidad medular central bien definida y con la estructura ordenada en sistemas haversianos (**Figura 2**).

La remodelación ósea es el producto de un delicado balance entre la resorción del callo óseo presente por parte de los osteoclastos y la deposición de la matriz mineral laminar por parte de los osteoblastos y osteocitos. A pesar de que este proceso inicia tan sólo unas semanas después de la lesión, la recuperación del tejido con las características morfológicas, histológicas y funcionales del hueso sano puede tardar años en completarse.

1.7 Rutas de señalización asociadas a la osificación.

Todo el proceso de osificación descrito anteriormente es el resultado de diversas rutas de señalización que interactúan entre sí. Una de las más importantes es la ruta de señalización de BMP/TGF- β . Esta ruta tiene influencia sobre prácticamente todas las fases de la osificación intramembranosa y endocondral. Regula procesos desde el reclutamiento de precursores mesenquimales y su diferenciación, hasta la fase final de generación del hueso maduro y resorción ósea (Hayrapetyan et al., 2015). Dado su papel fundamental durante el proceso de osificación, en el siguiente apartado se describirá en más detalle esta vía de señalización.

1.7.1 Ruta de las BMP/TGF- β .

La ruta de señalización de BMP/TGF- β comprende a un gran grupo de citoquinas pertenecientes a la superfamilia de las TGF- β que, hasta la fecha, incluye 42 miembros divididos entre BMP, TGF- β , activinas y otros subgrupos (Wu et al., 2016). Todos los miembros de esta superfamilia ejercen su acción a través de la interacción con receptores tipo serina/treonina quinasa específicos. Según qué cascada de señalización activen, pueden transmitir su señal a través de dos vías: (i) la vía canónica o dependiente de SMAD y, (ii) la vía no-canónica.

La vía canónica discurre a través de la señalización mediante la fosforilación de proteínas SMAD, las cuales transmiten el mensaje desde el exterior celular hasta el núcleo, regulando la expresión de genes relacionados con la diferenciación, proliferación y la migración celular (**Figura 6**).

Por su parte, la vía no-canónica incluye una gran cantidad de moléculas señalizadoras, entre las que se encuentran las MAP quinastas (MAPK) y la ruta PI3K/AKT/mTOR. Estas rutas tienen influencia sobre la expresión de genes osteogénicos como la fosfatasa alcalina y la osteocalcina y, además, sirven de conexión con otras rutas de señalización activadas por diferentes factores de crecimiento o, incluso, por señales provenientes de la ECM (Wu et al., 2016).

Dentro del subgrupo de TGF- β se encuentran 3 miembros: TGF- β 1, - β 2 y - β 3. Diferentes experimentos *in vivo* generando mutaciones para los genes asociados a estos factores indican que juegan un papel fundamental en el proceso de osificación. Sin embargo, las proteínas TGF- β no tienen la capacidad de inducir la diferenciación de células precursoras hacia el fenotipo osteoblástico *in vitro* (Wu et al., 2016).

A pesar de no presentar actividad osteoinductora, el papel de TGF- β está más relacionado con el equilibrio de las tasas de formación y destrucción de hueso mediante diferentes mecanismos (Wu et al., 2016):

- Las proteínas TGF- β tienen la capacidad de incrementar la disponibilidad de osteoprogenitores mediante la inducción de señales de quimiotaxis y proliferación.
- Regulan la diferenciación de los osteoclastos y la resorción ósea.

- Intervienen de forma directa sobre la diferenciación condrogénica y sobre el mantenimiento de dicho fenotipo, por lo que juegan un papel esencial durante la formación de hueso por la vía endocondral.

Por su parte, muchos de los miembros de la familia de las BMP sí presentan una alta actividad osteoinductora, jugando un papel fundamental durante la osificación. Dentro del grupo de las BMP se pueden encontrar una gran cantidad de miembros que conforman este importante conjunto de factores. En la **Tabla 1** se exponen algunas de las BMP más relevantes que tienen alguna implicación en el proceso de osificación.

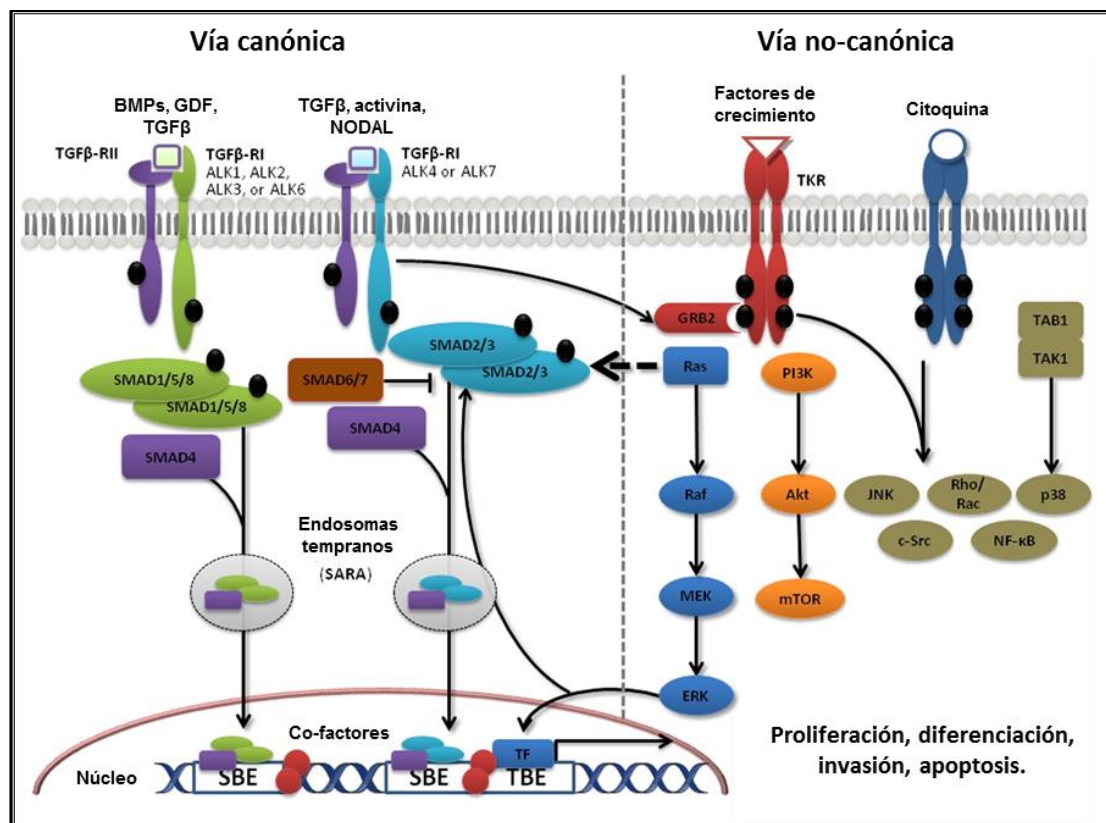


Figura 6. Rutas de señalización de BMP/TGF-β. En la **vía canónica** los diferentes ligandos interactúan con los receptores tipo I o II (TGFβ-RII o TGFβ-RI) los cuales fosforilan a las diferentes SMAD correspondientes. Los complejos formados se traslocan al núcleo vía endosomas donde se acumulan y se unen a secuencias de reconocimiento específico en una gran cantidad de genes induciendo o reprimiendo su expresión. En la **vía no-canónica** o SMAD independiente, las BMP/TGFβ señalizan a través de vías como la de PI3K/AKT o la vía de las MAPK. Mediante esta ruta se transmiten las señales recibidas por la interacción de las células con su matriz circundante vía integrinas, WNT/β-cateninas y otras rutas de señalización. Figura tomada de (Neuzillet et al., 2015).

1.7.2 Otras rutas de señalización que participan en el proceso de osificación.

Además de la ruta de señalización de BMP/TGF-β, otras vías también participan en la regulación del proceso de osificación. Una de las vías más importantes es la señalización del calcio.

Como parte esencial de la matriz ósea mineralizada, su presencia influye directamente sobre todas las fases de la formación ósea. Cuando se activa la expresión de *Runx2* en las fases iniciales de la diferenciación osteoblástica, se inicia la entrada de iones Ca^{2+} dentro de las células a través de canales de calcio ATP-dependientes. El incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} desencadena una cascada de señalización que activa la transcripción de genes mecanosensitivos. En consecuencia, se induce la expresión de varios factores de crecimiento, como IGF-1 y -2, VEGF, TGF- β , BMP-2 y BMP-4; todos estos factores intervienen, directa o indirectamente, en el proceso osteogénico (Hayrapetyan et al., 2015).

BMP	Nombres alternativos	Funciones
BMP-2	BMP-2A; BDA2	Induce la formación de hueso y cartílago; esencial durante la embriogénesis en el proceso de formación ósea.
BMP-3A	Osteogenina; BMP-3	Regula negativamente la densidad ósea; antagoniza la capacidad de ciertas BMP de inducir la diferenciación de osteoprogenitores y la osificación.
BMP-4	BMP-2B	Induce la formación de cartílago y de hueso; actúa sobre la inducción mesodérmica, el desarrollo dental, la formación de extremidades y en la curación de fracturas.
BMP-5	-	Induce la formación de cartílago y hueso.
BMP-6	VGR; VGR-1	Induce la formación de hueso y cartílago; regulador del metabolismo del hierro; fuerte inductor de la diferenciación osteoblástica de MSC (Luu et al., 2007).
BMP-7	OP-1	Induce la formación de hueso y cartílago; juega un papel importante en la regulación del calcio y en la homeostasis ósea.
BMP-8A	OP-2	Posibles funciones similares a BMP-7 (por homología); afecta la activación de osteoclastos y presenta un efecto antiapoptótico sobre los osteoblastos sometidos a tratamiento con corticoides (Kósa et al., 2011).
BMP-9	GDF-2	Potente inhibidor de la angiogénesis; podría estar implicado en el proceso de osificación; regulador de la diferenciación osteogénica de MSC (Luu et al., 2007).
BMP-13	GDF-6	Se requiere durante el desarrollo para la formación normal de huesos y articulaciones en las extremidades, cráneo y esqueleto axial; ejerce su actividad sobre la formación de ligamentos y tendones (Chuen et al., 2004).
BMP-14	GDF-5	Podría estar implicado en la formación de hueso y cartílago.

Tabla 1. Algunas proteínas morfogenéticas de hueso (BMP) que intervienen en el proceso de osificación. Tabla adaptada a partir de (Carreira et al., 2014).

La actividad de otros factores de crecimiento también modula fuertemente la formación de hueso. Por ejemplo, se ha descrito que el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) juega un papel fundamental durante la osificación intramembranosa y endocondral. Este potente mitógeno controla la diferenciación de osteoprogenitores hacia osteoblastos e inhibe su diferenciación hacia osteocitos. Estas características le confieren propiedades de ejercer un fuerte control sobre los diferentes estadios de diferenciación del fenotipo osteoblástico (Hayrapetyan et al., 2015).

Otro ejemplo interesante es el de los factores de crecimiento insulínico (IGF). Estas proteínas, de estructura similar a la insulina, participan en un gran número de procesos anabólicos. Entre ellos, se sabe que están involucradas en la proliferación y diferenciación de los osteoblastos. La familia de IGF está compuesta por dos miembros, el IGF-1 y el IGF-2. Ambas moléculas se expresan en osteoblastos y participan en la estimulación de la diferenciación osteoblástica y en la síntesis de matriz ósea, específicamente en la síntesis de proteínas colágenas y no-colágenas.

A pesar de que se sabe que IGF-1 no es capaz de inducir la diferenciación de MSC hacia osteoblastos de forma autónoma, es una molécula de vital importancia para el crecimiento longitudinal de los huesos y para el mantenimiento de la masa ósea (Hayrapetyan et al., 2015). En secciones posteriores se hablará más detalladamente de este factor.

Tanto la vía de señalización de las SMAD como el resto de las rutas implicadas en el proceso de osificación, modifican la expresión de genes que codifican para una serie de factores de transcripción, citoquinas que participan en la osteogénesis o proteínas de la matriz extracelular ósea. A continuación, se describirán algunos de los genes implicados en el proceso de diferenciación osteoblástica.

1.7.3 Genes implicados en la diferenciación osteogénica.

La activación de todas estas rutas de señalización celular y la interacción de las mismas, forman una intrincada red regulatoria del proceso de formación de hueso. A modo de resumen, se agrupan en la siguiente tabla algunos de los diferentes genes que están implicados en el proceso de diferenciación osteogénica y que son utilizados experimentalmente como genes marcadores del mismo.

Nombre oficial	Símbolo oficial	Nombre común	Descripción general
<i>Runt-related transcription factor 2</i>	<i>Runx2</i>	-	Factor de transcripción considerado regulador maestro de la diferenciación osteogénica. Su transcripción es inducida principalmente a través de las rutas de TGF- β /BMP (canónica y no-canónica) y de FGF. Estimula la expresión de otros genes relacionados con el proceso osteogénico como <i>Alp</i> , <i>Spp1</i> , <i>Ibsp</i> , <i>Col1a1</i> y <i>Bglap</i> . Determina la diferenciación de MSC hacia el fenotipo osteoblástico e inhibe las vías adipogénica y condrogénica.
<i>Sp7 transcription factor 7</i>	<i>Sp7</i>	Ostérix	Factor de transcripción que participa principalmente durante fases más avanzadas de la formación de hueso como la maduración osteoblástica. Contiene dominios específicos para el control de la transcripción de <i>Col1a1</i> y <i>Bglap</i> . Aunque es un gen <i>downstream</i> de <i>Runx2</i> , se puede inducir por vías alternativas independientes de <i>Runx2</i> .
<i>Distal-less homeobox protein 5</i>	<i>Dlx5</i>	-	Factor de transcripción regulado por el factor RUNX2 y que, a su vez, puede regular alguna isoforma del mismo. Interviene en la inducción de la expresión de <i>Sp7</i> , <i>Alp</i> y <i>Bglap</i> de forma RUNX2-independiente. Activa la proliferación de los osteoblastos y, de forma indirecta, la osteoclastogénesis (Samee et al., 2008).
<i>Alkaline phosphatase liver/bone/kidney</i>	<i>Alpl</i>	Fosfatasa alcalina	Es un gen que codifica una enzima presente en varios tejidos pero cuya actividad se utiliza como marcador de diferenciación osteogénica. Su expresión puede comenzar a aumentar desde el día 2 hasta el 14 durante la progresión de la diferenciación osteoblástica, en respuesta a un gran número de señales químicas y mecánicas.

<i>Secreted phosphoprotein 1</i>	<i>Spp1</i>	Osteopontina	Este gen da lugar a la glicofosfoproteína de la matriz ósea osteopontina. Se encuentra en muchos tejidos por lo que no es específico de hueso. Su expresión es estimulada por RUNX2 y se postula que se sobreexpresa también en respuesta a fuerzas mecánicas por vías de señalización mediadas por integrinas.
<i>Collagen type I alpha 1 chain</i>	<i>Col1a1</i>	Colágeno tipo I	Este gen codifica la cadena pro-alfa 1 del colágeno tipo I. Siendo esta la proteína más abundante de la matriz ósea, la expresión del gen que da lugar a ella se emplea como marcador de diferenciación osteoblástica. Su expresión se activa en fases relativamente tempranas de la diferenciación osteogénica en cuanto los osteoblastos inician la producción de matriz extracelular.
<i>Bone gamma-carboxyglutamate protein</i>	<i>Bglap</i>	Osteocalcina	Este gen da lugar a la pre-pro-proteína que, tras su modificación postranscripcional, genera la proteína madura. La osteocalcina se considera específica del fenotipo osteoblástico puesto que no se expresa en otros tejidos. Está asociada al proceso de mineralización por lo que es un marcador tardío de la diferenciación osteoblástica.

Tabla 2. Genes asociados al proceso de diferenciación osteoblástica (Aubin, 2008).

1.8 La regeneración ósea en escenarios desfavorables.

Como se ha descrito en secciones anteriores, el hueso tiene una capacidad intrínseca de regenerarse tras sufrir una lesión. Sin embargo, existen escenarios desfavorables en los que el tejido afectado no se regenera normalmente, por lo que se requiere de intervenciones posteriores para reparar el daño.

Entre estos escenarios desfavorables se encuentran:

1. Fracturas que derivan en no-uniones: son aquellas en las que, por diferentes razones, después de un tiempo largo tras la inmovilización, no se regenera de forma espontánea el tejido óseo afectado.
2. Pérdida masiva de tejido: escenarios en los cuales hay una pérdida masiva de tejido a causa de traumatismos, infecciones o bien como producto de una resección de tejido óseo para retirar un tumor.
3. Artrodesis: en este caso el tejido afectado es un disco intervertebral y las vértebras asociadas. Mediante este procedimiento se induce de forma artificial la osificación de la articulación dañada.

1.8.1 Aspectos clínicos y económicos asociados a los procedimientos ortopédicos.

Las estadísticas clínicas asociadas a los escenarios en los que el hueso no se regenera son muy variables y dependen, en gran medida, de la zona anatómica en la que se encuentren. También es importante tomar en cuenta los criterios que se utilicen para definir desde qué momento se considera que una fractura ha derivado en una no-únión, qué tamaño se considera crítico en una lesión y otros parámetros. En líneas generales se estima que, mundialmente, se realizan más de 2 millones de injertos óseos al año empleando diversas estrategias, cuyo objetivo es intentar dar una solución a los casos en que la regeneración natural del hueso se ve comprometida (Campana et al., 2014).

Si bien es cierto que el nivel de mortalidad asociada a este tipo de afecciones es prácticamente nulo, la morbilidad que generan es muy alta. Además de las consecuencias directas (dolor, posibilidad de desarrollar infecciones y otros), los pacientes que sufren este tipo de lesiones pueden permanecer períodos muy largos de tiempo sometidos a restricción de carga sobre el hueso afectado. Esto les obliga a utilizar muletas para moverse, lo cual deriva en un buen número de casos en dolores en las articulaciones del hombro y la muñeca. En el caso de pacientes obesos o de edad avanzada, el cuadro se complica, puesto que se ven obligados a moverse empleando sillas de ruedas. Adicionalmente, es importante tomar en cuenta que no es posible predecir el tiempo necesario para que el hueso se regenere, no se puede saber si será necesaria una segunda intervención e, incluso, si pudiera derivar en la amputación del miembro afectado. En consecuencia, se somete al paciente a niveles muy altos de incertidumbre que generan importantes cuadros de estrés emocional (Hak et al., 2014).

En una revisión reciente se estimó que los costes directos promedio de un paciente con una fractura que deriva en una no-únión puede oscilar entre 8.000 y 33.000 €, según el sistema de salud que se evalúe. Adicionalmente, se estima que los costes indirectos, que son

bastante más altos, representan un total de entre el 67 y el 79% del coste total del tratamiento de fracturas complicadas de tibia. El sistema de salud europeo cifra estos porcentajes en un nivel aún más alto de entre 82.8–93.3 % (Hak et al., 2014). Sólo en Estados Unidos, 500.000 pacientes reciben injertos óseos anualmente, generando un coste asociado mayor a los 2.100 millones de euros. Se estima que este valor podría duplicarse para el 2020 debido a factores como el aumento de las tasas de natalidad y de la esperanza de vida, con el consecuente envejecimiento de la población en países desarrollados (Amini et al., 2012).

En este tipo de intervenciones quirúrgicas se toman en cuenta todos los factores sistémicos y locales que puedan constituir un riesgo futuro para la regeneración, haciendo especial énfasis en los problemas vasculares. Adicionalmente, en la mayoría de los procedimientos, se realiza la retirada total de cualquier resto y tejido necrótico presente en la zona puesto que está demostrado que mejora significativamente la probabilidad de regeneración normal del hueso. Aun controlando todos estos factores, es prácticamente imposible determinar el riesgo que hay de que el tejido no regenere normalmente (Blokhuys et al., 2013).

La suma de todos estos factores hace que sea de vital importancia la búsqueda de alternativas terapéuticas que permitan mejorar los tiempos de recuperación, la regeneración del tejido afectado de la forma más idónea anatómica y fisiológicamente, así como la reducción de los costes asociados a estos tratamientos.

1.8.2 El injerto de hueso autólogo como procedimiento *gold standard* en medicina ortopédica.

Para el análisis de las alternativas terapéuticas utilizadas en cirugía ortopédica, es importante establecer los siguientes conceptos que se utilizan para definir cualquier material (orgánico o no) y/o sustancia que se emplee en un implante.

Actualmente, la terapia que se considera *gold standard* en cirugía ortopédica para la reparación de defectos del tejido óseo es el autoinjerto. Éste es un procedimiento quirúrgico mediante el cual se retira tejido óseo sano de una localización del paciente y se trasplanta en la zona afectada. El injerto de tejido óseo es el segundo tipo de trasplante que más se realiza a nivel mundial, sólo por detrás de las transfusiones de sangre (Campana et al., 2014).

Los implantes de hueso autólogo se realizan con material que se extrae de huesos “no esenciales”. Principalmente, se elige la cresta iliaca pero también se emplean otros huesos como el peroné, la barbilla, las costillas, partes de la mandíbula e incluso del cráneo (Campana et al., 2014)

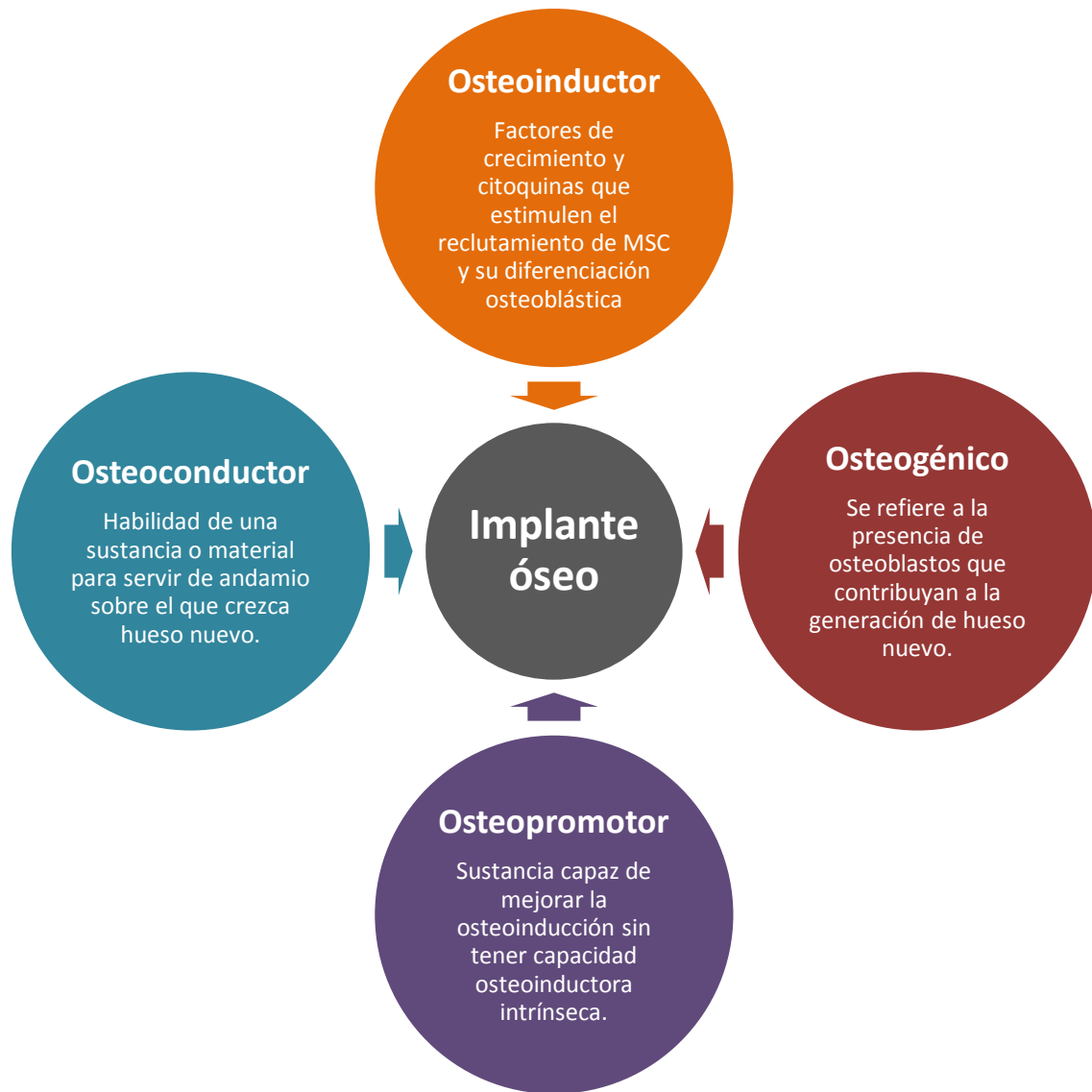


Figura 7. Representación esquemática de las propiedades que puede tener un implante en cuanto a su capacidad de promover la regeneración ósea. Figura basada en (Egol et al., 2015).

Este material se considera osteoconductor, osteoinductor, osteopromotor y osteogénico. En él se reúnen todos los componentes necesarios para la regeneración: hay una gran cantidad de células, tanto precursoras como del fenotipo osteoblástico, que contribuyen a la formación de hueso nuevo, por lo que es **osteogénico**. Además, presenta una gran cantidad de factores **osteoinductores** entre los cuales hay una presencia especialmente alta de BMP y, adicionalmente, lleva consigo ECM ósea que juega un papel fundamental como andamiaje **osteoconductor** y como proveedor de señales celulares **osteopromotoras** esenciales para la osificación. Por otro lado, al ser de origen autólogo, es histocompatible y no-inmunogénico, lo cual reduce al mínimo las probabilidades de inmunoreacciones y transmisión de infecciones. Estas propiedades hacen que el material añadido sea progresivamente reemplazado por hueso nuevo, consiguiendo la regeneración total del tejido afectado (Dimitriou et al., 2011; Egol et al., 2015).

Sin embargo, su origen autólogo también representa su mayor inconveniente, dado que la cantidad de material que puede extraerse puede ser relativamente baja y su extracción implica generar un daño en un hueso sano. Si bien es cierto que la extracción de hueso a partir

de la cresta iliaca se considera un procedimiento relativamente sencillo, están muy bien documentadas una serie de posibles complicaciones derivadas como: infecciones, formación de hematomas y seromas, fracturas, lesiones nerviosas y vasculares, dolor crónico y hernias. También pueden incluirse consecuencias menores como cicatrices antiestéticas y resultados pobres desde el punto de vista cosmético. Una revisión partiendo de 81 estudios retrospectivos de implantes óseos a partir de cresta iliaca concluyó que, de los 6.449 pacientes evaluados, 1.249 presentaron complicaciones en el sitio de retirada del hueso a implantar, lo cual representa una morbilidad de 19,37% (Dimitriou et al., 2011).

Además de estas complicaciones, la cantidad de material que puede obtenerse es limitada. Se ha estimado que de la cresta iliaca posterior, de cuya localización es la que puede extraerse más material, se pueden obtener entre 25 y 88 cm³ de hueso autólogo. Es por ello que son muchos los casos en los que no es posible emplear esta estrategia dado que no se puede rellenar por completo la zona afectada. Este problema es aún mayor en pacientes pediátricos y de avanzada edad en los que la disponibilidad de material es incluso más limitada (Campana et al., 2014; Dimitriou et al., 2011).

En consecuencia, la medicina regenerativa y la ingeniería tisular se mantienen en la búsqueda de alternativas terapéuticas que permitan mejorar los resultados obtenidos con el tratamiento estándar en el que se extrae e implanta hueso autólogo.

1.8.3 Alternativas terapéuticas para facilitar la regeneración ósea en escenarios desfavorables.

1.8.3.1 Aloinjertos.

Un aloinjerto es aquel en el que se trasplanta material óseo que proviene de un paciente a otro. Este tejido puede provenir de hueso que se descarta de intervenciones quirúrgicas, como reemplazos totales de cadera, así como de tejidos derivados de donantes fallecidos, que se procesan y almacenan en un biobanco de hueso. Esto último implica que el hueso colectado debe ser esterilizado con radiación gamma y almacenado. Dicha práctica opera en detrimento de sus propiedades mecánicas y de la integridad de los factores de crecimiento y demás proteínas presentes en el tejido nativo. El resultado es un hueso osteoconductor pero pobremente osteoinductor. Todo esto, aunado a un riesgo muy alto de infecciones, una posibilidad alta de generar una respuesta de rechazo inmune y unos elevados costes de almacenamiento y de procesamiento, hacen que este tipo de injertos no sean una alternativa muy atractiva a los injertos autólogos.

1.8.3.2 Xenoinjertos.

Un xenoinjerto tiene su origen en una especie diferente a la humana como el hueso de origen bovino o porcino. Dado el posible rechazo inmune que pueden inducir, la mayoría de las alternativas que se plantean en este campo pasan por someter el tejido a un tratamiento que

lo deje desprovisto de su componente celular y orgánico, manteniendo intacta la matriz tridimensional con o sin el componente mineral. Por una parte, tienen la gran ventaja de que la fuente de obtención es virtualmente ilimitada, por lo que pueden emplearse piezas completas de tejido que soporten carga mecánica en localizaciones que lo requieren como, por ejemplo, cirugías reconstructivas del pie. Sin embargo, la necesidad de esterilizar el material extensamente genera una disminución dramática de sus propiedades osteoinductoras que juega en contra de la efectividad de este tipo de implantes a la hora de inducir la regeneración del hueso afectado (Shibuya y Jupiter, 2015).

Dentro de esta categoría podría clasificarse el material no óseo derivado de otras especies, como pueden ser los implantes derivados de corales. Básicamente, se trata de la matriz coralina desprovista de todo su componente celular y orgánico lo cual deja una matriz de carbonato cálcico con un intrincado, interconectado y profuso sistema de poros. Si bien es cierto que sólo pueden atribuirse propiedades osteoconductoras a este tipo de material, existe la posibilidad de complementar los mismos empleando moléculas que le provean de propiedades osteoinductoras o incluso de células que le confieran propiedades osteogénicas (Campana et al., 2014).

En la actualidad, existen productos disponibles para su uso en clínica derivados de coral, como el Pro-osteon®, así como otros derivados de bovino como Bio-Oss®, OsteoGraft/N y Endobon®. Sin embargo, más allá de tener cierto nivel de éxito en procedimientos odontológicos, los resultados en medicina ortopédica son contradictorios y, en definitiva, apenas se utilizan en la clínica para este tipo de intervenciones (Campana et al., 2014).

1.8.3.3 Hidroxiapatita (HA) y fosfato tricálcico (TCP).

Como se comentó previamente la HA, que es la forma cristalina del TCP hidratado, es el principal componente mineral de la ECM ósea, por lo que se ha empleado extensamente para rellenar defectos óseos en cirugía ortopédica, maxilofacial y odontológica. Sin embargo, no posee propiedades de osteoinducción ni osteopromoción, por lo que se limita a proveer una matriz con ciertas propiedades osteoconductoras. Las alternativas terapéuticas asociadas a este tipo de material pasan por su modificación mediante procesos químicos que introduzcan grupos funcionales en su estructura, como alginato, estroncio, silicona, carbonatos y magnesio. Estas modificaciones pueden aumentar sus propiedades de osteoconducción y su bioactividad (Campana et al., 2014).

1.8.3.4 Materiales metálicos.

Los materiales metálicos y sus diferentes aleaciones han jugado un papel fundamental en la clínica como biomateriales en cirugía reconstructiva, con especial importancia en la cirugía ortopédica. Dada sus excelentes propiedades mecánicas y su durabilidad se han utilizado para realizar reemplazos totales de las articulaciones de la cadera y la rodilla, fijación de fracturas con tornillos y placas, fusiones espinales, implantes dentales y otros. En este

campo se emplean principalmente aceros inoxidables o aleaciones a base de cobalto o titanio, en una amplia gama de dispositivos.

Específicamente, las aleaciones de titanio son materiales muy utilizados principalmente por su densidad relativamente baja, que los hace particularmente livianos pero, a su vez, por tener unas características fisicoquímicas muy favorables. Este material tiene algunas de las propiedades esenciales para un buen implante metálico: **(i)** es biocompatible (es decir, no es tóxico), **(ii)** resiste bien la corrosión, **(iii)** tiene unas propiedades mecánicas que le permiten soportar la carga, **(iv)** tiene una alta resistencia al desgaste y **(v)** es proclive a la osteointegración (Chen y Thouas, 2015).

En la actualidad, se fabrican aleaciones de titanio que tienen una alta capacidad de osteoconducción y sobre las cuales el tejido óseo crece de forma satisfactoria sin que se forme ningún tipo de cápsula, como ocurre con otros metales como el acero y las aleaciones de cobalto. Sin embargo, no presenta propiedades de osteoinducción ni osteopromoción, por lo que su aplicación futura puede mejorar con estrategias que modifiquen sus propiedades mediante su recubrimiento con otros biomateriales o su funcionalización con moléculas osteoinductoras.

1.8.3.5 Polímeros sintéticos o naturales.

En esta categoría entran todos aquellos materiales, naturales o sintéticos, que pueden formar polímeros. Los de mayor relevancia son aquellos que pueden ser biodegradables puesto que, eventualmente, pueden ser completamente sustituidos por tejido nuevo dando lugar a un proceso de regeneración propiamente dicho.

Los polímeros sintéticos se producen en condiciones estándar, permitiendo controlar de forma muy estricta las propiedades mecánicas, la tensión de rotura, el módulo de elasticidad y la tasa de degradación en condiciones fisiológicas. Además, las técnicas modernas de síntesis permiten el desarrollo de implantes porosos, lo cual es una característica fundamental que favorece enormemente la integración de cualquier biomaterial y su consecuente bioactividad. Esta serie de propiedades los convierte en una alternativa muy interesante de cara al diseño de implantes biomédicos destinados a ser aplicados en medicina regenerativa del hueso (Asti y Gioglio, 2014).

Los polímeros más comunes empleados en ingeniería tisular son los poliésteres lineales como el ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), los copolímeros de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y la policaprolactona (PCL). Estos materiales se presentan en forma de mallas, fibras, esponjas y espumas cuya porosidad favorece la difusión de nutrientes y oxígeno en toda la extensión del implante (Asti y Gioglio, 2014).

A pesar de su buena biocompatibilidad y de que no inducen respuesta inmune alguna en los huéspedes, su actividad biológica es bastante limitada. Muchos de estos materiales presentan superficies esencialmente hidrofóbicas que no favorecen la adhesión celular por lo que, por sí solos, no tienen propiedades osteoconductoras. Por supuesto, tampoco ejercen ningún efecto osteoinductor sobre el nicho en el que se implantan, por lo que su utilidad en estrategias de regeneración ósea implica la funcionalización de los mismos con moléculas que les confieran estas propiedades.

Los polímeros naturales son materiales que, comparativamente, tienen una estructura más débil, haciendo que sus propiedades mecánicas sean más pobres con respecto a los polímeros sintéticos previamente mencionados. Su origen natural también ocasiona que sea más difícil el control de las propiedades del material final formado, por lo que tienen una variabilidad mayor que la observada en los materiales sintéticos.

Sin embargo, muchos de ellos presentan una estructura molecular que contiene un gran número de dominios proteicos típicos de la ECM que disparan diversas cascadas de señalización (vía integrinas y otros receptores) que intervienen en la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Esto les confiere unas propiedades de osteoconducción y osteopromoción muy buenas y, además, les hace materiales óptimos para el mantenimiento celular y para la diferenciación osteogénica.

Dadas estas características, en medicina regenerativa se emplean diferentes polímeros de origen natural para una gran cantidad de aplicaciones biomédicas. Algunos de ellos, se resumen en la **Tabla 3**.

1.9 El sistema colágeno-BMP como alternativa terapéutica en regeneración ósea.

Como se detalló en la sección 1.7.1, la ruta de señalización de BMP/TGF- β constituye una de las vías con mayor influencia sobre el proceso de osificación durante todas sus fases. Específicamente, algunas BMP como la BMP-2, -4, -6, -7 y -9 ejercen un fuerte efecto osteoinductor en diferentes escenarios tanto *in vitro* como *in vivo*. Es por ello que se ha extendido su uso hasta la clínica con el objetivo de intentar dar una solución alternativa a los problemas de regeneración ósea que se han planteado en el desarrollo de secciones previas.

Polímero	Aplicaciones biomédicas
Alginato	Ingeniería de materiales, encapsulación de células, administración controlada de fármacos, técnicas de inseminación artificial.
Alginato/Quitósano	Su mezcla con quitósano le confiere una mejora en sus propiedades biológicas. Uso en ingeniería tisular del cartílago.
Quitósano	Cicatrización, administración controlada de fármacos, regeneración de la piel, diversas aplicaciones de ingeniería tisular.
Quitósano/colágeno	Aplicaciones de piel artificial y de implantes para la regeneración ósea.
Ácido hialurónico	Cicatrización, angiogénesis, regeneración del hueso y el cartílago.
Ácido hialurónico/HA	Diversas aplicaciones en ingeniería tisular del hueso.
Colágeno	Uso como andamiajes para ingeniería tisular del hueso y el cartílago, aplicaciones de piel artificial e ingeniería tisular vascular.
Gelatina	Administración de factores de crecimiento, neovascularización.

Tabla 3. Algunos polímeros naturales biodegradables que se utilizan comúnmente en diferentes aplicaciones biomédicas. Tabla modificada de (Asti y Gioglio, 2014).

Entre todos estos polímeros, uno de los más utilizados en el área de ingeniería tisular del hueso es el colágeno, el cual presenta una serie de características que lo convierten en un material ideal para la osificación cuando se utiliza en conjunto con factores osteoinductores como las BMP. Dado su papel fundamental como terapia alternativa al autoinjerto, se desarrollará en una sección por separado.

A partir del año 2001, tanto la FDA (*Food and Drug Administration, EE.UU*) como la EMA (*European Medicines Agency*) aprobaron el uso en clínica de la BMP-2 o la BMP-7 cargadas sobre materiales de colágeno tipo I de origen bovino para ciertas aplicaciones: **(i)** BMP-2 en una esponja de colágeno en diferentes presentaciones, para su empleo en fusiones intervertebrales, fracturas abiertas de tibia y procedimientos orales y maxilofaciales (INFUSE®, Medtronic) y **(ii)** BMP-7 en un andamio de colágeno particulado para utilizar en fracturas de huesos largos que han derivado en no-uniones (Osigraft®/OP-1 Implant, Stryker), este último producto ya discontinuado para la fecha de este trabajo.

1.9.1 Ventajas del uso del sistema colágeno-BMP para la mejora de la osificación en escenarios desfavorables.

El análisis de la efectividad de estos tratamientos es motivo de debate en la actualidad. Por un lado, existen multitud de pruebas *in vitro* e *in vivo* que apoyan la idea de que la BMP-2 y la -7, aplicadas sobre colágeno como andamio, favorecen la osificación en diversas condiciones experimentales. En cuanto a su efectividad en la clínica, hay más desacuerdo sobre si su empleo es favorable y si representan una alternativa terapéutica al uso de implante de hueso autólogo.

En 2012, Wei y colaboradores publicaron un metaanálisis sobre el empleo de BMP-2 para la mejora de la regeneración de fracturas abiertas de tibia tratadas con fijación intramedular. Se incluyeron 4 estudios con un total de 609 pacientes. De los pacientes tratados mediante terapia convencional, el 27,1 % requirieron intervenciones secundarias mientras que, para el grupo tratado con esponjas de colágeno/rhBMP-2, dicha tasa disminuyó significativamente hasta el 17,5 %. Además, en un 34,3 % de los casos tratados por vías convencionales, no se observó mejora alguna mientras que este valor disminuyó hasta el 21,4 % para el grupo sometido al tratamiento con BMP-2. En otros parámetros como tasa de infecciones, fallo de las fijaciones y nivel de dolor postoperatorio no se encontraron diferencias significativas (Wei et al., 2012).

En cuanto a BMP-7, Friedlaender y colaboradores publicaron en 2001 un estudio clínico en el que se comparó la eficacia de la BMP-7 con respecto al tratamiento con injertos de hueso autólogo en fracturas de tibia que derivaron en no-uniones. En líneas generales, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, teniendo tasas similares de recuperación desde el punto de vista funcional y radiológico. La conclusión del estudio indica que el uso de colágeno embebido en BMP-7 tiene la misma eficacia del implante de hueso autólogo pero sin la desventaja que supone realizar una intervención quirúrgica adicional para obtener el tejido sano a implantar (Friedlaender et al., 2001).

Es también importante resaltar que, más allá de los usos aprobados de productos de colágeno-BMP que existen en el mercado, tanto la BMP-2 como la BMP-7 se utilizan en multitud de pacientes mediante la figura del “uso compasivo”. Se administran en un gran número de casos en diferentes localizaciones en extremidades y en reconstrucciones craneo-faciales. Son muchos los ejemplos en la literatura de casos exitosos en este sentido, aunque establecer comparaciones sea virtualmente imposible dada la variabilidad que hay entre los diferentes estudios.

1.9.2 Desventajas asociadas a la administración de BMP en la clínica.

Si bien es cierto que la administración de BMP representa una alternativa terapéutica al uso del injerto autólogo de hueso, en la actualidad el seguimiento prolongado de casos, así como la acumulación de datos relacionados con el empleo de estas moléculas indican que hay una importante incidencia de eventos adversos en respuesta a su aplicación.

Uno de los ejemplos mejor estudiados está relacionado al empleo de BMP-2 en esponjas de colágeno bovino en cirugías de fusiones intervertebrales. Recientemente, se han cuestionado las conclusiones obtenidas a partir de los datos originales arrojados por los estudios patrocinados por la industria farmacéutica. Para ello, se ha realizado una revisión sistemática de los datos disponibles en la actualidad provenientes de seguimientos de la FDA, publicaciones científicas y datos de diferentes administraciones para determinar la efectividad y la seguridad de su aplicación. El análisis indicó que los eventos adversos asociados a la aplicación de BMP-2 en fusiones vertebrales pueden cifrarse entre un 10 y un 50 % de los casos, según sea la aproximación utilizada (Carragee et al., 2011).

En la **Tabla 4**, se enumeran algunos de los efectos secundarios que pueden atribuirse al implante de BMP-2 en fusiones espinales. De entre todos ellos, los que más alarma han generado recientemente son los casos de inflamación de la columna cervical, dado que es una afección potencialmente letal. En consecuencia, la FDA en 2008 emitió un informe de seguridad alertando sobre los riesgos de la utilización de BMP-2 por uso compasivo, particularmente en localizaciones cervicales, a raíz de la aparición de 38 casos entre 2004 y 2008 de pacientes con complicaciones derivadas. En 2014, la *North American Spine Society* publicó la siguiente directriz para intentar definir el uso apropiado de la BMP-2 diciendo: *“Basándose en las pruebas disponibles, la BMP [-2] está indicada como complemento de la fusión espinal en los casos en que otras alternativas no están disponibles o no es probable que conduzcan a una fusión eficaz”* (James et al., 2016).

A pesar de que las complicaciones que pueden encontrarse son muy variadas, hay un consenso general en que la mayoría (si no todas ellas) son causadas por las altas dosis de factores que se emplean en todas las aproximaciones clínicas planteadas. Para BMP-2, la dosis aprobada por la FDA es de 1,5 mg/mL, que se considera una dosis mínima efectiva. En el estudio original también se probó 0,75 mg/mL pero este tratamiento no tuvo ninguna diferencia significativa con el grupo implantado con hueso autólogo. Esto implica la administración de hasta 12 mg totales de BMP-2 por implante (Govender et al., 2002). Para la BMP-7, se implantaba 1 gramo de colágeno tipo I bovino particulado que contenía un total de 3,5 mg de factor. Como máximo, se aplicaban 2 dosis por lo que podían llegar a administrarse hasta 7 mg de BMP-7 en la zona afectada (Friedlaender et al., 2001).

Estas dosis exceden en varios órdenes de magnitud las concentraciones fisiológicas de BMP. En 1 kilogramo de hueso pulverizado están contenidos alrededor de 2 mg de BMP total, mientras que en sangre se detectan valores que oscilan a niveles de pg/mL, lo cual representa entre 4 y 6 órdenes de magnitud por debajo de las dosis suministradas actualmente (van Baardewijk et al., 2013; Rengachary, 2002). Incluso si se toma en cuenta que en la zona de una fractura la concentración de BMP posiblemente aumente en respuesta al daño, las dosis empleadas en la clínica están muy encima de las concentraciones fisiológicas normales. Dado que estos factores son altamente pleiotrópicos, actúan de forma directa e indirecta sobre otros procesos celulares y su presencia en tan altas dosis puede desencadenar los distintos efectos secundarios nombrados anteriormente.

Otro punto importante que debe destacarse son los costes económicos del empleo de estos factores recombinantes en la clínica. Su producción es un proceso costoso y, al requerirse dosis tan altas, el precio final de cada tratamiento es muy elevado. La relación coste-beneficio de la administración de BMP es muy controvertida puesto que se pueden encontrar autores que plantean escenarios en los que no resulta favorable en comparación con el injerto de hueso autólogo (Garrison et al., 2007; Moatz y Tortolani, 2013) y otros

trabajos en los que se afirma que el uso de BMP disminuye los costes con igual o mayor beneficio que la terapia convencional (Alt et al., 2015; Giorgio Calori et al., 2013; Shweikeh et al., 2016)

En respuesta a esta problemática, el objetivo general de este proyecto es la búsqueda de nuevas estrategias moleculares que permitan mejorar los resultados obtenidos con los tratamientos clásicos basados en colágeno y BMP-2. Se explorarán diferentes estrategias orientadas a disminuir las dosis de factores de crecimiento administradas, pero que mantengan o aumenten el potencial osteoinductor del sistema colágeno-BMP.

Efectos secundarios	Principales complicaciones
Complicaciones inflamatorias	Inflamación de la columna cervical Formación de seromas
Radiculopatías	Compresión de la raíz nerviosa/radiculitis postoperatoria
Hueso ectópico	Formación de hueso ectópico neuroforaminal y en los tejidos blandos Formación de quistes óseos
Activación de osteoclastos y osteolisis	Resorción de hueso vertebral y no-vertebral Hundimiento del implante
Eventos urogenitales	Eyacuación retrógrada Retención en la vejiga
Complicaciones de cicatrización	Hematoma Dehiscencia de la herida Infección

Tabla 4. Efectos secundarios asociados a la administración de rhBMP-2 en fusiones espinales. Tabla tomada de (James et al., 2016).

2 Hipótesis y objetivos generales.

2.1 Hipótesis.

El sistema colágeno-BMP sigue siendo, a día de hoy, la principal alternativa al implante de hueso autólogo en cirugía ortopédica para intentar dar solución a los diferentes escenarios desfavorables en los que el hueso no se regenera normalmente. A pesar de que en la actualidad hay una gran gama de biomateriales disponibles, las esponjas de colágeno bovino siguen representando una alternativa interesante debido a sus propiedades osteoconductoras, su alta biocompatibilidad y su degradabilidad. Además, dado que su uso en clínica humana se encuentra aprobado tanto por la FDA como la EMA, se facilita, en gran medida, la posible traslación de las estrategias diseñadas empleando este tipo de biomaterial.

Actualmente, es conocido que la mayoría de los efectos secundarios que se presentan como consecuencia de las terapias con rhBMP-2, están asociados a las altas dosis que se suministran a los pacientes. Es por ello que la ingeniería de tejidos permanece en la búsqueda activa de estrategias en las que se utilicen diferentes moléculas o factores de crecimiento alternativos que permitan sustituir el uso de rhBMP-2 o, al menos, disminuir las altas concentraciones empleadas en cirugía ortopédica.

La osificación es un proceso multifactorial mediado por señales físicas provenientes de la matriz extracelular, así como de la combinación de una intrincada red de factores de crecimiento y citoquinas que siguen una distribución espacio-temporal finamente regulada. Con la base de este concepto, en esta Tesis Doctoral se exploran diferentes alternativas que, hipotéticamente, podrían mejorar el potencial regenerativo de los implantes diseñados para favorecer la regeneración ósea. El fin último es mimetizar, en el mayor grado posible, un microambiente más similar al encontrado en el hueso que se regenera naturalmente.

En conclusión, la hipótesis general es que se puede mejorar el potencial regenerativo de los biomateriales de colágeno mediante su funcionalización con moléculas alternativas que presenten un potencial regenerativo mayor que el de la BMP-2 o que mejoren su actividad osteoinductora.

2.2 Objetivos generales.

Esta Tesis Doctoral se desarrollará en tres secciones separadas, cada una derivada de los siguientes objetivos generales:

1. Evaluar la capacidad de mejorar el potencial osteogénico del sistema colágeno-BMP-2 mediante el empleo de péptidos diseñados para mimetizar las señales que las células reciben a partir de moléculas estructurales de la matriz extracelular ósea (**Sección A**).
2. Estudiar la combinación de BMP-6 e IGF-1 como alternativa con mayor potencial osteogénico que la BMP-2 (**Sección B**).
3. Caracterizar el efecto que puede ejercer la administración secuencial de la anterior combinación de factores de crecimiento sobre su potencial osteoinductor, en comparación con la administración simultánea de los mismos (**Sección C**).

3 Sección A: Péptidos biomiméticos para la mejora del potencial osteogénico del sistema colágeno-BMP.

3.1 Introducción a la sección A.

El empleo de factores de crecimiento como la BMP-2 en cirugía ortopédica representa en la actualidad una alternativa a las terapias convencionales, dada su alta capacidad osteoinductora y su probada eficacia para inducir la regeneración ósea en distintos escenarios clínicos.

Sin embargo, sus posibles beneficios están ligados a la aplicación de dosis suprafisiológicas muy altas que, dada la naturaleza pleiotrópica de estas citoquinas, pueden desencadenar una serie de efectos secundarios nocivos en tasas relativamente altas. Adicionalmente, el coste de producción de estos factores de crecimiento recombinantes en sistemas heterólogos es muy elevado, haciéndose prohibitivos para pacientes o sistemas de sanidad y poniendo en entredicho la relación coste-beneficio de su aplicación frente a terapias convencionales.

Una alternativa interesante al uso de factores recombinantes es el empleo de péptidos biomiméticos cuyas secuencias se deriven de proteínas de la matriz extracelular, de factores solubles o, incluso, de secuencias sintéticas. Los péptidos son moléculas pequeñas cuyo proceso de síntesis es sencillo y relativamente barato, y que pueden ejercer efectos sobre la adhesión, proliferación y diferenciación celular.

3.1.1 Interacción entre las células y la matriz extracelular.

El comportamiento de las células que conforman un tejido está continuamente siendo influenciado por las señales que provienen del ambiente que las rodea. Este microambiente extracelular es fundamentalmente una red altamente hidratada que alberga tres tipos de señales: **(i)** macromoléculas insolubles hidratadas, **(ii)** macromoléculas solubles y **(iii)** proteínas de superficie de células adyacentes (Lutolf y Hubbell, 2005).

En la **Figura 8** se esquematizan las diferentes vías mediante las que las células reciben señales de su microambiente. La interacción de las diversas rutas de señalización modifica los patrones de expresión génica y, en consecuencia, se modula la adhesión, proliferación, diferenciación, quiescencia, migración o apoptosis de las células en respuesta a las condiciones físico-químicas de su ambiente circundante.

En el ámbito de la ingeniería tisular hay un creciente interés en modular las respuestas celulares mediante señales físicas derivadas de la ECM. El empleo de cultivos celulares en matrices tridimensionales es un buen ejemplo de ello. Aunque todavía son útiles los modelos *in vitro* en dos dimensiones para estudiar los efectos de factores de crecimiento y fármacos, es cada vez mayor la tendencia a implementar cultivos tridimensionales en matrices complejas que mimetizan mejor las condiciones físico-químicas del ambiente fisiológico. En una revisión reciente, se enumeran diferentes experimentos en los que se emplean de forma exitosa cultivos en 3D para estudios de diferenciación, desarrollo de nuevos fármacos, modelos de tumores y cáncer, estudios de la expresión de genes y proteínas, de la estructura del citoesqueleto, estudios sobre apoptosis, modelos sobre la adhesión celular, estudios sobre la movilidad celular y otros. En todos estos ejemplos se mimetiza mejor la respuesta celular en

condiciones fisiológicas, como consecuencia de que se ofrece un entorno de cultivo que también provee señales físicas similares a las de la ECM (Ravi et al., 2015).

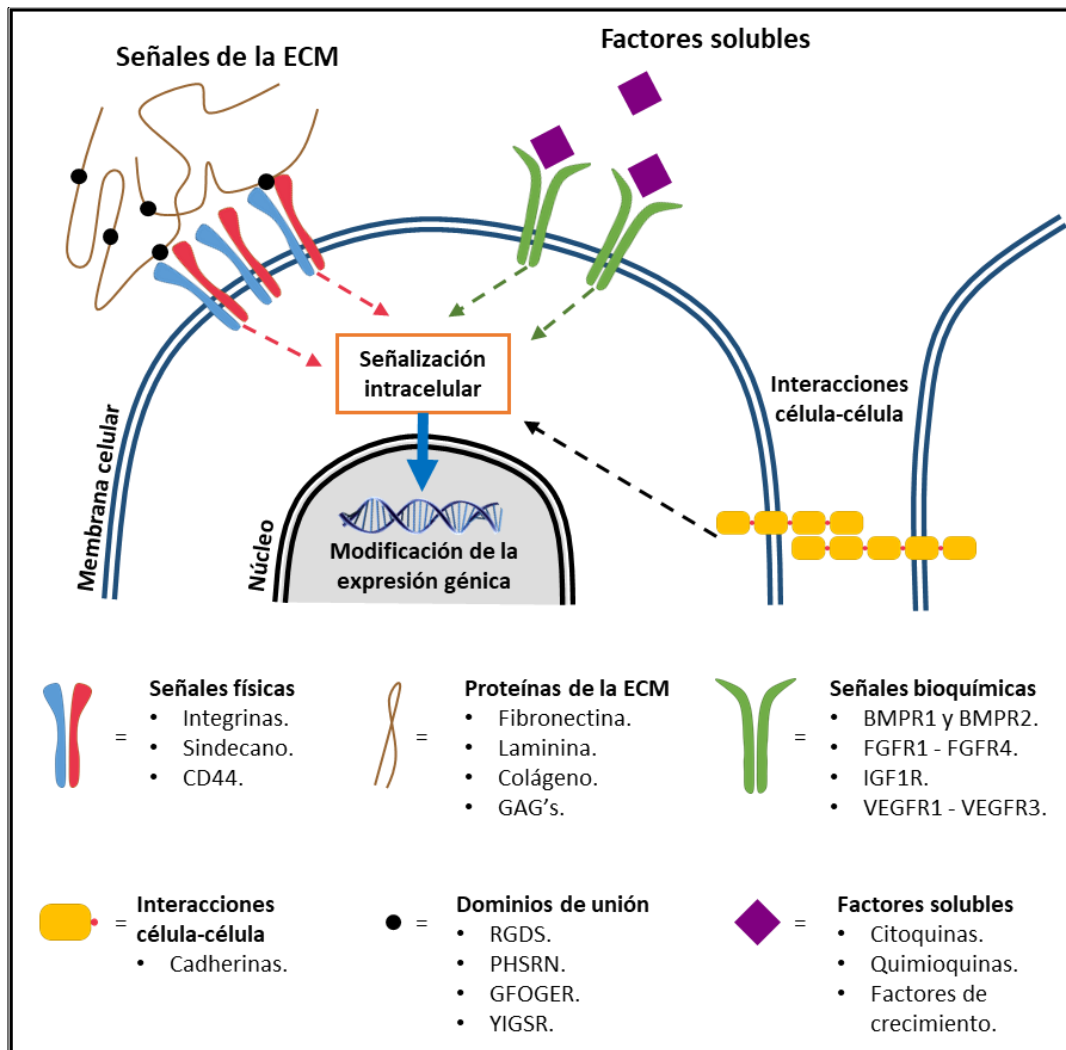


Figura 8. Vías de recepción de señales bioquímicas y físicas desde el exterior celular hacia su interior. Se muestran tres vías mediante las cuales las señales extracelulares se transmiten hacia el interior de la célula. Se reciben **(i)** señales físicas provenientes de la ECM circundante a través de receptores tipo integrina, sindecano o CD44 y su interacción con dominios de unión específicos, **(ii)** señales bioquímicas de factores solubles mediante receptores específicos y **(iii)** señales provenientes de las interacciones célula-célula mediante uniones a través de cadherinas. La recepción de estos estímulos converge en diversas rutas de señalización celular que transducen el mensaje hasta el núcleo, modificando la expresión de genes y, por tanto, la respuesta de la célula a su ambiente. Figura modificada a partir de (Lutolf y Hubbell, 2005).

En ingeniería de tejidos, las señales provenientes de la ECM siempre han jugado un papel fundamental en las diferentes aplicaciones clínicas desarrolladas, más allá de que, históricamente, se haya hecho un mayor énfasis en los factores solubles. Como se ha comentado previamente, el sistema colágeno-BMP se utiliza ampliamente en cirugía ortopédica como sustituto de los autoinjertos óseos. Una parte del éxito de estos biomateriales se debe a la fuerte actividad osteoinductora de las BMP, pero otra parte muy

importante está ligada a las propiedades osteoconductoras de las fibras de colágeno a través de los diferentes dominios de unión presentes en su estructura. Otros biopolímeros como la fibrina, el quitosano o el ácido hialurónico, así como los tejidos decelularizados, presentan propiedades favorables para su uso como matrices implantables, en gran medida, por la presencia de dominios peptídicos específicos que favorecen que las células se adhieran, migren, proliferen o se diferencien sobre ellos (Malafaya et al., 2007).

3.1.2 La utilización de péptidos en ingeniería tisular ósea.

Hace más de tres décadas se describió que la capacidad de la molécula de fibronectina de adherir células podía ser mimetizada por el tetrapéptido L-arginil-glicil-L-aspartil-L-serina (RGDS), la cual es una secuencia perteneciente al dominio de adhesión de ésta y otras proteínas de la matriz extracelular (Pierschbacher y Ruoslahti, 1984). Este descubrimiento abrió una gama de posibilidades en el campo de los biomateriales puesto que, mediante el uso de pequeños péptidos derivados de proteínas naturalmente presentes en los tejidos, se podría intentar mimetizar las señales biológicas que la ECM provee a las células.

Además, el empleo de péptidos presenta algunas ventajas con respecto al uso de proteínas completas como:

1. Su síntesis, en fase sólida o líquida, es un proceso con costes relativamente bajos.
2. Son moléculas menos susceptibles a la degradación.
3. Son menos propensas a generar una respuesta inmune.
4. Dado que sólo incluyen el dominio de interés, pueden presentar una especificidad más alta.
5. Al ser moléculas pequeñas, se pueden funcionalizar materiales con una cantidad de moléculas por unidad de área mayor.

En la actualidad se han identificado un gran número de secuencias peptídicas que mimetizan una infinidad de dominios involucrados en diversos procesos celulares. Nuestro grupo de investigación ha publicado recientemente una revisión en la que se describen los péptidos biomiméticos más importantes con el potencial de ser utilizados en ingeniería tisular de hueso como una alternativa para mejorar los tratamientos convencionales (Visser et al., 2016a).

Este gran grupo de péptidos puede subdividirse en 4 categorías: **(i)** péptidos osteoinductores, **(ii)** péptidos angiogénicos y **(iii)** péptidos antimicrobianos o catelicidinas y **(iv)** péptidos involucrados en la adhesión celular.

Los péptidos osteoinductores, como su nombre indica, son aquellos con capacidad de inducir la formación de hueso. La mayoría de ellos se derivan de dominios activos de las BMP con reconocida actividad osteogénica como BMP-2, -4, -6, -7 y -9. Su utilización permitiría conferir a los diferentes biomateriales propiedades osteoinductoras sin que ello conlleve a los efectos secundarios y a los altos costos derivados del uso de los factores al completo.

Los péptidos angiogénicos, aunque en principio no inciden directamente sobre la diferenciación osteoblástica, pueden promover la neoangiogénesis, la invasión de vasos sanguíneos hacia zonas en hipoxia y la maduración del tejido vascular recién formado. La vascularización es un proceso fundamental para que el callo cartilaginoso, totalmente avascular, se convierta en un callo óseo irrigado (**Figura 5**). Dado que una buena proporción de los fallos en la regeneración del tejido óseo pueden estar relacionados con la pobre irrigación de las zonas afectadas, la inclusión de este tipo de péptidos en el diseño de implantes novedosos es una alternativa que despierta mucho interés.

Las catelicidinas son péptidos que se sintetizan naturalmente en leucocitos como neutrófilos, monocitos, células NK, células T, células B y en células epiteliales de los testículos, la piel, del tracto respiratorio y el tracto intestinal. Suelen producirse en respuesta a procesos infecciosos o inflamatorios y tienen actividad antimicrobiana contra bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas (Zanetti, 2003). Dada la incidencia de infecciones en cirugía ortopédica, su aplicación como agentes antimicrobianos pudiera aumentar las tasas de éxito de los implantes que los incluyan.

Los péptidos involucrados en la adhesión celular son el grupo más extensamente estudiado de péptidos biomiméticos. A pesar de que, en principio, no ejercen ninguna actividad osteoinductora, su señalización mediada por integrinas aporta a las células información sobre la ECM circundante, lo cual influye fuertemente sobre su fenotipo. La posibilidad de diseñar implantes empleando este tipo de péptidos puede ser una estrategia interesante para intentar potenciar la capacidad de promover la osificación, sin que ello implique la utilización de cantidades suprafisiológicas de factores como las BMP. En esta sección, nos concentraremos en el empleo de este tipo de péptidos como alternativa terapéutica en ingeniería tisular ósea.

3.1.3 Empleo de péptidos involucrados en la adhesión celular.

3.1.3.1 Ruta de señalización de las integrinas.

Uno de los más importantes receptores involucrados en la interacción entre las células con su ECM son los receptores tipo integrina. Las integrinas son receptores transmembrana heterodiméricos constituidos por dos subunidades (α y β) unidas de forma no-covalente. Hasta la fecha, se han identificado 18 tipos de subunidades α y 8 subunidades β , que forman 24 heterodímeros diferentes. Generalmente, presentan un largo dominio extracelular, un único dominio hidrofóbico transmembrana y un pequeño dominio citoplasmático (Legate et al., 2009).

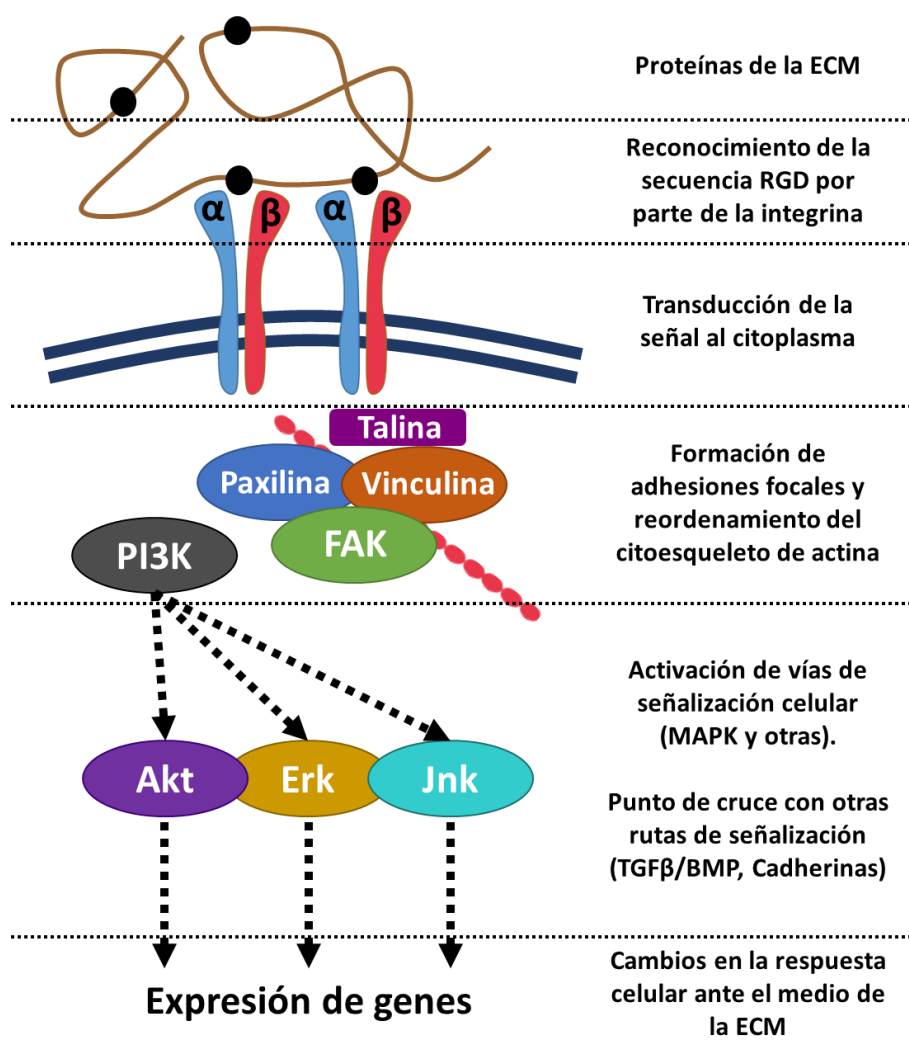


Figura 9. Esquema general de la ruta de señalización a través de receptores integrinas.

Cuando estos receptores interactúan con los dominios de unión de las proteínas de la matriz, se activan y transmiten la señal hacia el interior de la célula. En consecuencia, un gran número de estas adhesiones se acumulan en un punto específico formando una agrupación que, tras su maduración, se convierten en adhesiones focales conectadas fuertemente con el citoesqueleto celular. Este proceso está mediado por un gran grupo de proteínas que forman un complejo que regula los reordenamientos de la arquitectura del citoesqueleto. Adicionalmente, otros mediadores como la fosfatidil-inositol 3-fosfato quinasa (PI3K) activa vías anabólicas de la familia de las MAPK que modifican la expresión génica y, en consecuencia, el fenotipo celular (**Figura 9**) (Legate et al., 2009).

3.1.3.2 Señalización por integrinas en el fenotipo osteoblástico.

En las células osteoblásticas se expresan varios receptores tipo integrina, siendo el más abundante de ellos la $\alpha_5\beta_1$. Esta integrina tiene una alta afinidad por la fibronectina, que está naturalmente presente en la ECM del hueso, aunque su presencia parece estar limitada a huesos en estadio inmaduro. Por ello, es posible que su función esté más ligada a los procesos

de osificación durante el desarrollo y a la reparación del tejido afectado tras una lesión que a los estadios más tardíos, como el mantenimiento y la remodelación (Helfrich et al., 2008).

Se ha demostrado que la interacción ligando- $\alpha_5\beta_1$ integrina es necesaria para la supervivencia de los osteoblastos, mientras que el bloqueo del receptor deriva en su apoptosis (Globus et al., 1998). Además de la fibronectina, otras proteínas de la ECM como la osteopontina, la sialoproteína de hueso y la vitronectina, interactúan a través de este tipo de receptor y juegan un papel fundamental en la señalización sobre osteoblastos y osteoclastos durante el proceso de osificación y resorción ósea.

Debido a estas características y a la capacidad que tienen las moléculas de la ECM de modular el fenotipo celular, se ha utilizado la fibronectina para recubrir materiales que tienen propiedades físico-químicas favorables para la osificación pero que presentan una baja capacidad de albergar células osteoblásticas en ellos. En modelos *in vitro* se ha demostrado que el recubrimiento de fibronectina en materiales como hidroxiapatita (Deligianni et al., 2006; Schönmeier et al., 2008), titanio (Felgueiras et al., 2015; Osathanon et al., 2006; Rapuano et al., 2012) o ácido poli-L-láctico PLLA (Hindie et al., 2011), induce mejoras en la adhesión celular y en la diferenciación osteoblástica. En modelos *in vivo* también se han empleado recubrimientos de fibronectina para mejorar la integración de piezas de acero inoxidable para cirugía ortopédica (Agarwal et al., 2015) y para implantes dentales de titanio (Chang et al., 2016).

Basándose en todas estas propiedades adhesivas y en la influencia que puede tener sobre la diferenciación osteoblástica y, asumiendo que gran parte de estas propiedades están directamente mediadas por la presencia del triplete de residuos RGD en la molécula de fibronectina, se han empleado péptidos que contienen esta secuencia para intentar mimetizar estas acciones sin que ello implique el uso de la molécula de fibronectina al completo.

3.1.3.3 Uso de péptidos que contienen la secuencia RGD en ingeniería tisular ósea.

Algunas de las aplicaciones más interesantes relacionadas con el empleo de péptidos que contienen la secuencia RGD han sido aquellas en las que se ha utilizado para conferir propiedades osteoconductoras a biomateriales sintéticos o a implantes metálicos que inherentemente no lo son.

Materiales que, a pesar de ser biocompatibles, no son un sustrato muy adecuado para la adhesión celular, como el tereftalato de polietileno (PET, un plástico empleado comúnmente en la industria alimentaria), se han modificado químicamente añadiendo, mediante enlaces covalentes, péptidos que contienen la secuencia RGD para intentar mimetizar las señales provenientes de la ECM. Con esta modificación se ha conseguido una mayor adhesión de preosteoblastos de ratón (MC3T3-E1) que, adicionalmente, forman una cantidad mayor de adhesiones focales. Además, el número de adhesiones focales es dependiente de la densidad de péptido por unidad de área (Chollet et al., 2009).

En otros estudios se han detectado no sólo efectos del triplete RGD sobre la adhesión celular, sino también influencia sobre la diferenciación osteoblástica. MSC encapsuladas en hidrogeles de polietilenglicol diacrilato (PEGDA), presentaron un aumento de la actividad FA y de la presencia de osteocalcina de forma dosis-dependiente a la presencia de RGD

covalentemente incorporado a los hidrogeles (Yang et al., 2005). En otro estudio realizado con titanio recubierto de PEG sobre el que se unieron covalentemente péptidos RGD, los preosteoblastos de ratón adheridos sobre la superficie no mostraron cambios en la actividad FA, pero sí niveles más altos de calcificación en respuesta a la superficie funcionalizada (Oya et al., 2009).

Otros trabajos demuestran cómo la densidad de péptido presente en una superficie determina, en gran medida, el efecto que la funcionalización pueda tener sobre las células que entren en contacto con ella. Experimentos realizados con fibroblastos de ratón cultivados sobre gradientes de RGD unido covalentemente a superficies de metacrilato, han demostrado que existe una estrecha relación entre la densidad de péptido y la adhesión y expansión de las células sobre la superficie (Lagunas et al., 2012). En otro experimento con MSC humanas cultivadas en hidrogeles de carboxibetaína, con concentraciones bajas de RGD (5 μ M) las células retienen el fenotipo indiferenciado. Sin embargo, si la concentración de RGD se eleva (5 mM) aumenta de forma significativa la expresión de marcadores de diferenciación osteoblástica y la cantidad de calcio (Chien et al., 2014).

Los efectos de la densidad de RGD sobre una superficie pueden suponer que, en un cultivo de MSC tratado con medio osteogénico, haya una mayor proporción de células osteoblásticas únicamente en respuesta al aumento de la distancia de los ligandos de RGD de 37 a 87 nm entre ellos. De hecho, si el mismo cultivo se somete a una co-inducción osteogénica y adipogénica simultáneamente, la ruta osteogénica se ve favorecida en las condiciones con mayor espaciado entre los ligando de RGD (Wang et al., 2013b).

Todos estos datos demuestran la fuerte influencia que puede ejercer la funcionalización de biomateriales con péptidos de RGD sobre la adhesión celular, pero también sobre la diferenciación osteoblástica.

3.1.3.4 *Uso de péptidos que contienen la secuencia PHSRN para la mejora de la acción de los péptidos RGD.*

La secuencia RGD juega un papel fundamental en la unión que se forma entre las moléculas de fibronectina de la ECM y las células a través de los receptores tipo integrina en sus membranas. Sin embargo, se han descrito otras secuencias que se encuentran en los dominios adhesivos de la fibronectina que también participan en esta unión.

En un estudio en el que se clonó el dominio de unión al completo, se demostró que existe una región del mismo que actúa de forma sinérgica con la región adhesiva que contiene el péptido RGD. Según este estudio, esta secuencia no presenta una capacidad inherente de adherir células, pero incrementa significativamente la capacidad adhesiva de la secuencia de RGD. Mediante técnicas de mutagénesis dirigida se determinó que la secuencia responsable de dicha actividad sinérgica es el pentapéptido prolina-histidina-serina-arginina-asparagina (PHSRN) (Aota et al., 1994).

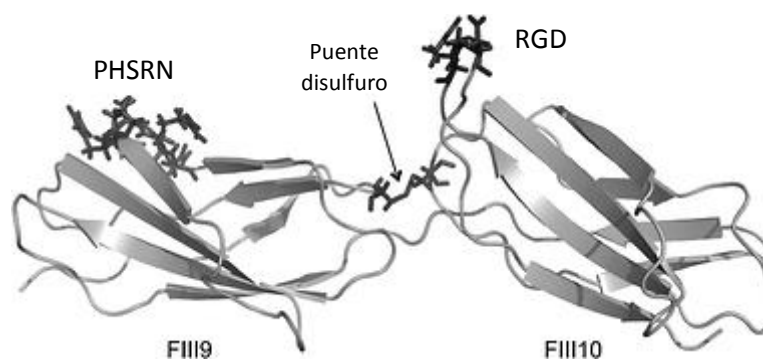


Figura 10. Disposición espacial de las secuencias que contienen RGD y PHSRN en la molécula de fibronectina. Se muestran los dos dominios proteicos que contienen la secuencia adhesiva RGD (FIII 10) y la secuencia sinérgica PHSRN (FIII 9), ambos unidos a través de un puente disulfuro. Figura tomada de (Kreiner et al., 2009).

A partir de este punto, se han realizado diversos estudios utilizando este péptido (PHSRN) para intentar aumentar las propiedades adhesivas de la secuencia RGD. Se ha demostrado que fibroblastos y células endoteliales se adhieren y extienden mejor en superficies funcionalizadas simultáneamente con péptidos que contienen las secuencias RGD y PHSRN separadas por un espaciador. En ambos estudios, se sugiere la importancia de la presencia del espaciador entre ambas secuencias para que estos péptidos mimeticen, de la forma más fidedigna posible, la disposición espacial nativa que tienen en la fibronectina. También se postuló que el péptido PHSRN no presenta actividad por separado y que los péptidos que contienen tanto RGD como PHSRN tienen un efecto mayor que los que únicamente contienen la secuencia RGD (Hojo et al., 2001; Ochsenhirt et al., 2006).

En estudios más recientes se ha determinado que la mezcla de estos dos péptidos también puede ejercer influencia sobre el proceso de diferenciación osteoblástica. Preosteoblastos cultivados sobre superficies de titanio en las que se han co-inmovilizado péptidos de RGD y péptidos de PHSRN, proliferan más y responden mejor a la inducción osteogénica que las células cultivadas sobre las superficies únicamente con RGD (Chen et al., 2013).

Este mismo efecto se ha observado sobre MSC cultivadas sobre matrices extracelulares artificiales que contienen tanto RGD como PHSRN. En este caso, únicamente el control de la nanotopografía y la presentación de ambos péptidos de forma simultánea es capaz de dirigir la diferenciación de las MSC hacia el linaje osteoblástico, sin que haya mediación de ningún factor osteoinductor. En este estudio se evidenció el aumento de la expresión de genes como la osteopontina y la osteocalcina, el incremento de la actividad fosfatasa alcalina y de la mineralización de la matriz, todo ello mediado por la presencia de RGD y PHSRN en la superficie de cultivo (Wang et al., 2013a).

Este conjunto de evidencias indica que la inclusión de péptidos que contengan la secuencia PHSRN, puede ser una interesante alternativa para potenciar los efectos que puede ejercer el RGD sobre la adhesión, expansión, proliferación y diferenciación celular, específicamente, favoreciendo la vía de diferenciación osteoblástica. De esta manera, sería posible mimetizar, lo más fielmente posible, las señales provenientes de la ECM con el objetivo

de mejorar el potencial terapéutico de los biomateriales utilizados en ingeniería tisular ósea, con una consecuente disminución de las dosis de factores de crecimiento empleadas.

3.1.4 Empleo de dominios de unión como alternativa a las uniones covalentes entre los péptidos biomiméticos y el colágeno.

En la inmensa mayoría de los estudios en los que se emplean péptidos biomiméticos para funcionalizar materiales, la unión entre los oligopéptidos y la superficie se realiza mediante enlaces covalentes. De esta manera, está asegurado el anclaje de los péptidos a la superficie, lo cual es de vital importancia para la señalización por la vía de las integrinas.

Una alternativa interesante para evitar la utilización de agentes químicos, puede ser la inclusión en los péptidos de secuencias con afinidad por la molécula de colágeno (que denominaremos con las siglas CBD, que hace referencia al término *collagen binding domain*). Los CBD son secuencias derivadas de proteínas con reconocida afinidad por el colágeno tipo I, como puede ser el factor de von Willebrand (Romijn et al., 2003) o la collagenasa de *Clostridium histolyticum* (Toyoshima et al., 2001). De esta forma, se pueden adherir los péptidos a los biomateriales de colágeno de forma directa y sin ningún protocolo de modificación química, simplemente añadiendo una solución que contenga el péptido al que se ha incluido el CBD, sobre el biomaterial de colágeno y permitiendo su interacción.

Existen precedentes a esta aproximación en el ámbito de las proteínas recombinantes. Algunas proteínas que pueden tener interés terapéutico, se han producido introduciendo en su estructura este tipo de dominios para conferirle la capacidad de unirse al colágeno. La inclusión de este dominio ha sido realizada previamente, por nuestro grupo de investigación y por otros, para producir proteínas recombinantes como TGF- β (Andrades et al., 1999; Tuan et al., 1996), FGF-2 (Andrades et al., 2001^a) y BMP-2 (Visser et al., 2009). En todos estos casos, la adición de estos oligopéptidos ha aumentado significativamente la afinidad de los factores recombinantes a esponjas de colágeno, sin que pudiera detectarse ninguna disminución de su actividad.

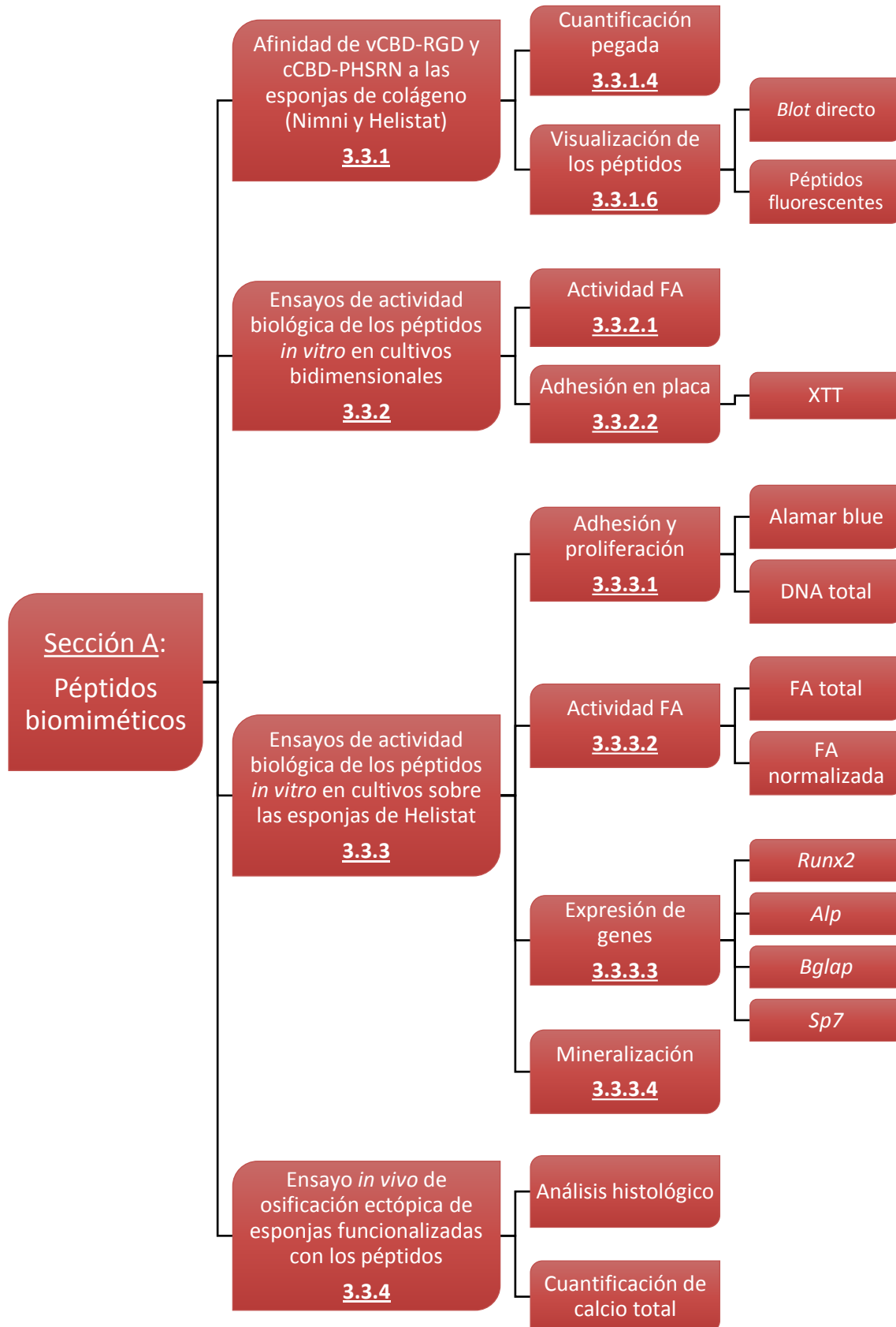
Basado en estos resultados, en trabajos previos en nuestro grupo de investigación, se diseñó un péptido biomimético incluyendo el dominio de unión a colágeno derivado del factor de von Willebrand (vCBD), unido a un péptido que contiene la secuencia adhesiva RGD. Este péptido presentó una elevada y estable afinidad por esponjas de colágeno tipo I. Adicionalmente, el vCBD-RGD demostró capacidad de inducir la diferenciación osteogénica de MSC y preosteoblastos *in vitro* y sólo las esponjas funcionalizadas con el péptido mostraron signos de osificación *in vivo* en presencia de cantidades subfuncionales de BMP-2 (Visser et al., 2014).

3.2 Objetivos específicos de la sección A.

1. Diseñar un péptido biomimético que contenga la secuencia sinérgica “PHSRN” y un dominio de unión al colágeno derivado de la colagenasa de *Clostridium histolyticum* (cCBD), que permita su co-funcionalización simultánea con el péptido vCBD-RGD.
2. Determinar la afinidad de vCBD-RGD y cCBD-PHSRN por esponjas de colágeno, tanto cargados por separado como simultáneamente.
3. Estudiar la capacidad de vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN para ejercer efectos sobre la adhesión y diferenciación osteogénica de células en cultivos bidimensionales.
4. Caracterizar los efectos de la funcionalización de las esponjas de colágeno con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN sobre la adhesión, proliferación y diferenciación osteogénica *in vitro* de células sembradas sobre ellas.
5. Establecer si la co-funcionalización de las esponjas de colágeno con vCBD-RGD y cCBD-PHSRN mejora la formación de hueso mediada por rhBMP-2 *in vivo*.

3.3 Materiales y métodos (Sección A).

Representación esquemática de la metodología de la presente sección



3.3.1 Caracterización de la pegada de vCBD-RGD y cCBD-PHSRN a las esponjas de colágeno.

3.3.1.1 Obtención de los discos de colágeno.

Todos los experimentos, tanto *in vitro* como *in vivo*, en los que se emplearon esponjas de colágeno se llevaron a cabo con la esponja comercial Helistat® (Integra LifeSciences Corporation). Este producto, aprobado para su uso en clínica por la FDA, se sintetiza a partir de tendón de Aquiles de bovino, con el cual se fabrica una esponja hemostática utilizada durante procedimientos quirúrgicos para controlar hemorragias. En la fase inicial del trabajo, esta esponja comercial fue comparada con una esponja de colágeno proveniente de piel de bovino, provista gentilmente por el Dr. M.E. Nimni (Patente de EE. UU 5374539), con la que se ha trabajado previamente en el seno de nuestro grupo de investigación. De aquí en adelante, nos referiremos a esta esponja como “esponja de Nimni”.

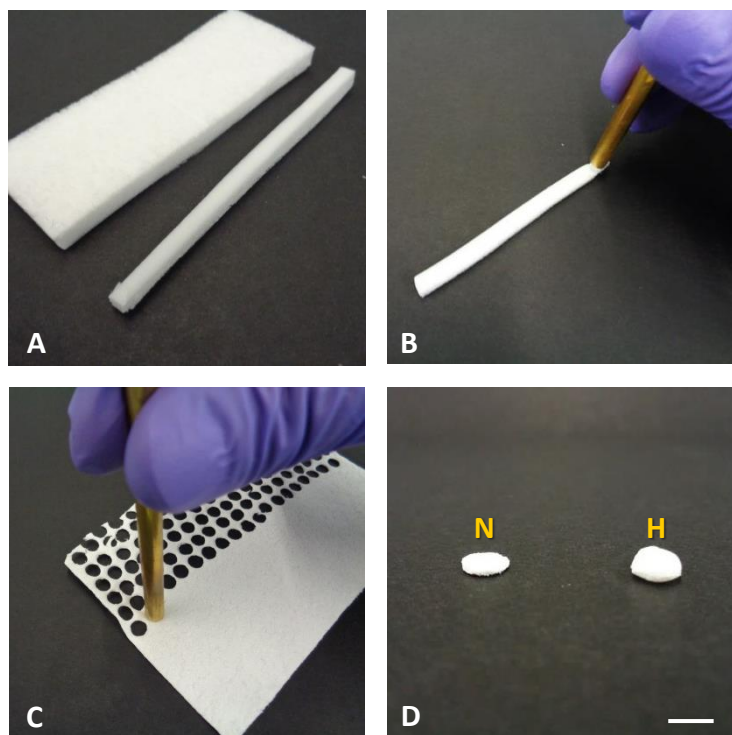


Figura 11. Proceso de obtención de las esponjas de colágeno. En la figura se muestra el proceso de corte de las esponjas de Helistat (A y B) y de las esponjas de Nimni C. A partir de las láminas de Helistat se cortaron cintas transversales (A), de las cuales se obtuvieron discos con un sacabocados (B). Las esponjas de Nimni se cortaron con el mismo sacabocados, directamente sobre las láminas en la que viene presentada (C). En (D) se muestra un plano lateral de ambas esponjas (N = esponja de Nimni; H = Helistat). Barra de escala = 5 mm.

Para el Helistat, a partir de su presentación en láminas de 7,5 cm x 10 cm x 5 mm, se confeccionaron cintas transversales de aproximadamente 2,5 mm de espesor a partir de las cuales se hicieron discos de 5 mm de diámetro, se pesaron y utilizaron únicamente aquellos de entre 0,9 y 1,1 mg de peso. La esponja de Nimni fue cortada en discos de 5 mm de diámetro por 1 mm de espesor (peso $\approx$ 0,8 mg), directamente de las láminas en las que viene presentada empleando un sacabocados.

3.3.1.2 Diseño de péptidos biomiméticos.

En este trabajo se utilizaron dos péptidos biomiméticos purificados por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (pureza > 95%) y liofilizados para su envío por la casa comercial JPT. Tras su llegada al laboratorio, se resuspendieron en agua milliQ en condiciones de esterilidad a una concentración de 2 mg/mL y se almacenaron en alicuotados a -80 °C hasta su uso.

Los dos péptidos incluyen una secuencia con afinidad para unión al colágeno y otra secuencia con actividad biológica determinada, unidas por un espaciador de glicinas. Adicionalmente, se modificaron ambos extremos para hacerlos menos reactivos y limitar su degradación. El extremo N-terminal se encargó acetilado y el carboxi-terminal, amidado.

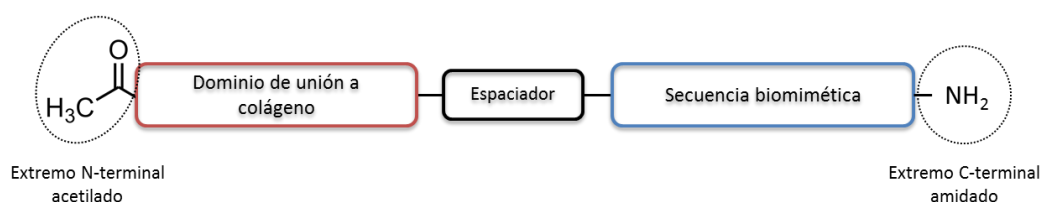


Figura 12. Esquema general del diseño de los péptidos biomiméticos. Se incluye un dominio de unión a colágeno (en rojo). Además, puede estar presente un espaciador de glicinas (en negro) y la secuencia biomimética con potencial actividad biológica (en azul). Adicionalmente, se presentan los extremos amino- y carboxi-terminal acetilado y amidado, respectivamente, para disminuir su reactividad y, por tanto, proteger los péptidos de la degradación.

El primero de ellos es el vCBD-RGD (**WREPSFMALSGRGDS**) descrito previamente en nuestro grupo (Visser et al., 2014). Está formado por la secuencia de unión a colágeno derivada del factor de Von Willebrand (en rojo) y una secuencia que contiene el tripéptido arginina-glicina-ácido aspártico (RGD, en azul), separadas por una glicina (en negro).

El segundo es el cCBD-PHSRN (**TKKTLRTGGGGGPHSRN**) que presenta un dominio de unión a colágeno diferente derivado de la secuencia de la colagenasa de *Clostridium histolyticum* (En rojo) (Zhao et al., 2007). A su vez, el péptido contiene la secuencia PHSRN la cual se ha descrito que tiene una actividad sinérgica con la de RGD (en azul). En este caso, ambos dominios están separados por un espaciador de 6 glicinas (en negro).

3.3.1.3 Estimación de la superficie total de las esponjas por adsorción de nitrógeno.

La superficie total de ambas esponjas se estimó mediante el método Brunauer-Emmett-Teller (Método BET) (Brunauer et al., 1938). Esta técnica permite analizar las propiedades texturales basándose en la interacción que tiene lugar entre el gas (adsorbato) y el sólido que se quiere caracterizar (adsorbente). Para ello, se realizaron isotermas de adsorción y desorción de nitrógeno a 77 K de cuyos datos se dedujo la superficie en centímetros cuadrados por gramo de material analizado. Las mediciones y el cálculo de las superficies se realizaron en la sección de Análisis de Sólidos Porosos de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Málaga.

3.3.1.4 Cuantificación de la cantidad de péptido retenido tras lavados.

Para determinar la cantidad de péptido que es capaz de retener cada esponja de colágeno, se realizaron ensayos de pegada para cada péptido por separado, tanto para las esponjas de Helistat como para las de Nimni. Para ello, se cargaron 1, 2 o 5 μg de vCBD-RGD o cCBD-PHSRN contenidos en 10 μL de agua por esponja, se dejaron secar al aire durante 30 minutos y se procedió a hacer 8 lavados secuenciales con 10 μL de PBS. En cada lavado, se añadió el PBS sobre la esponja y se volvieron a recuperar los 10 μL utilizando la punta de la micropipeta para ejercer presión suavemente sobre la esponja y desplazar el líquido en su totalidad. Los lavados obtenidos se guardaron en tubos limpios en frío y la cantidad de péptido liberado en cada uno de ellos se cuantificó por espectrofotometría a 205 nm empleando un Nanodrop 2000C. El procedimiento detallado para este ensayo se describe en el anexo 8.1.1.

3.3.1.5 Biotinilación de vCBD-RGD y cCBD-PHSRN.

Habiendo cuantificado la cantidad de péptido retenida en las esponjas tras los lavados sucesivos, se procedió a marcar ambos péptidos con biotina. De esta manera, fue posible su detección posterior por bioluminiscencia directamente sobre las esponjas, para confirmar visualmente y de forma directa, los resultados derivados de los ensayos cuantitativos.

Para ello, los péptidos fueron biotinilados y posteriormente sometidos a cromatografía de exclusión molecular para obtener fracciones purificadas de los mismos (que de aquí en adelante se distinguirán como vCBD-RGD-**B** y cCBD-PHSRN-**B**).

Para biotinar ambos péptidos, se utilizó un kit comercial siguiendo las instrucciones del fabricante (*EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation Kit*; Pierce). Los péptidos biotinilados fueron purificados utilizando una columna de desalado de poliacrilamida (*Polyacrylamide Desalting Columns*, 1,8K MWCO, Pierce). Para determinar en cuáles de las fracciones recogidas se recuperó el péptido biotinilado, se midió la relación mol:mol de biotina:péptido utilizando un kit basado en HABA (ácido 4'-hidroxiazobenceno 2'-carboxílico) (*Biotin Quantitation Kit*; Pierce).

Para estimar la cantidad de péptido total, se empleó un kit de BCA (*BCA Protein Assay Kit*, Pierce) y se eligieron aquellas fracciones en las que la relación molar fuera aproximadamente la esperada para cada péptido. Todo el protocolo de biotinilación, purificación, medición de péptido total y estimación de la proporción biotina:péptido se realizó siguiendo el protocolo indicado en los anexos 8.1.2, 8.1.3, 8.1.4 y 8.1.5.

3.3.1.6 Ensayo de retención de péptido por blot y microscopía de fluorescencia.

Estos ensayos se realizaron de forma análoga a los experimentos de pegada cuantitativos (apartado 3.3.1.4) pero empleando los péptidos biotinilados.

En primer término, se cargaron sobre las esponjas los péptidos por separado, tanto biotinilados como sin marcar:

- 2 µg de vCBD-RGD-**B**
- 2 µg de vCBD-RGD
- 2 µg de cCBD-PHSRN-**B**
- 2 µg de cCBD-PHSRN

Habiendo confirmado que ambos se retenían tras los lavados y que los péptidos sin marcar no generaron ninguna señal de fondo, se realizó la carga simultánea de ambos péptidos para intentar determinar, de forma cualitativa, si había una evidente interferencia entre ambos. Para ello, se probaron las siguientes condiciones:

- 2 µg vCBD-RGD-**B** + 2 µg cCBD-PHSRN
- 2 µg vCBD-RGD-**B**
- 2 µg cCBD-PHSRN-**B** + 2 µg vCBD-RGD
- 2 µg cCBD-PHSRN-**B**

Tras la carga, se siguió el mismo protocolo que el empleado en los ensayos de pegada (anexo 8.1.1). Ya lavadas, las esponjas se incubaron directamente con estreptavidina-HRP y se lavaron extensamente con tampón fosfato salino + 1% Tween 20 (PBST) para, a continuación, revelar la señal por quimioluminiscencia. El protocolo al detalle se describe en el anexo 8.1.6.

Posteriormente, se mandó sintetizar el vCBD-RGD marcado con fluoresceína (vCBD-RGD-FITC) y el cCBD-PHSRN con rodamina (cCBD-PHSRN-TMR) para poder observar la colocalización de los mismos. Las esponjas se cargaron con 2 µg de cada péptido marcado de forma análoga a lo anteriormente descrito, se procedió a lavarlas con el procedimiento estándar y se visualizaron y fotografiaron directamente en un estereoscopio de fluorescencia.

Para la determinación de la estabilidad del péptido a largo plazo, se dejaron lavando las esponjas en abundante PBS que se fue cambiando cada 3 días, y se fotografiaron en las mismas condiciones de exposición iniciales a los días 0, 3, 7 y 14 de lavado.

3.3.2 Ensayos de actividad biológica de los péptidos *in vitro* en cultivos bidimensionales.

Para demostrar la posible actividad de los péptidos se realizaron diferentes ensayos *in vitro*. La información detallada sobre los tipos celulares empleados y su mantenimiento en cultivo, se puede encontrar en los anexos 8.2.1 y 8.2.2.

3.3.2.1 Actividad fosfatasa alcalina en respuesta a la adición de péptidos en solución.

Para evaluar el efecto de la adición de vCBD-RGD y cCBD-PHSRN en solución al medio de cultivo, se realizaron cultivos de MC3T3-E1 en placas de 96 pocillos con 8 réplicas por cada condición. Para ello, se sembraron 20.000 células/cm² que se dejaron adherir durante 3 horas en medio completo. Posteriormente, se realizó una preincubación de 1 hora con medio de

diferenciación con la misma composición que el medio completo, pero con un contenido reducido del 10 al 2% de FBS. Tras la preincubación, se añadieron medios de cultivo con combinaciones de 0; 0,25; 1; 4 y 16 μM de vCBD-RGD y/o de cCBD-PHSRN disueltos en el medio de diferenciación. A los 3, 7, 10 y 14 días se realizó el protocolo de medición de la actividad fosfatasa alcalina total de los cultivos, tal y como se especifica en el anexo 8.2.9.

3.3.2.2 Medición de la adhesión celular sobre placas recubiertas de colágeno y funcionalizadas con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN.

La capacidad de los péptidos de modificar la adhesión de las células a colágeno, se determinó tanto en cultivos en 2D como sobre las esponjas.

Los cultivos en monocapa se llevaron a cabo sobre placas de cultivo de 96 pocillos que se recubrieron de colágeno tipo I bovino siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se preparó una solución de colágeno en 0,01 M HCl a una concentración final de 16 $\mu\text{g/mL}$, de la cual se añadieron 100 μL por pocillo, para una cantidad total de colágeno de 1,6 μg por pocillo (5 $\mu\text{g/cm}^2$).

Tras dos horas de incubación en condiciones estándar de cultivo, los pocillos se lavaron con PBS para retirar los restos de colágeno y ácido remanentes y se procedió a la funcionalización con ambos péptidos. Para ello se siguió el siguiente esquema de gradientes cruzados:

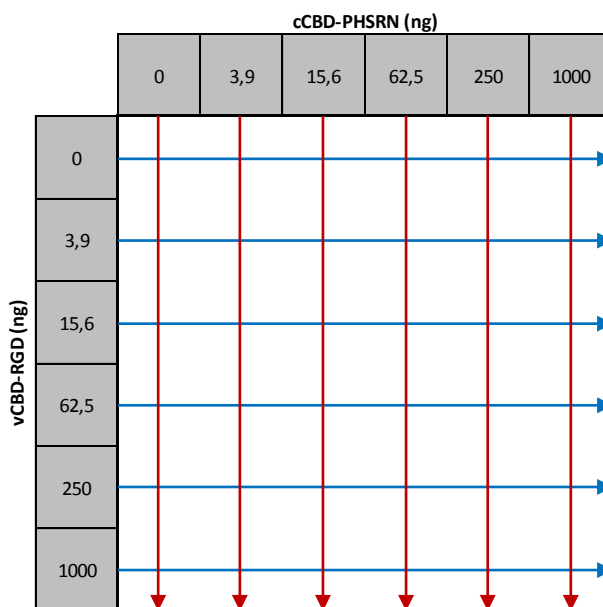


Figura 13. Esquema de gradientes cruzados para funcionalizar placas recubiertas de colágeno. Se muestra un gradiente de cantidades totales de cCBD-PHSRN (columnas) y vCBD-RGD (filas) que generan 36 combinaciones diferentes de mezclas de ambos péptidos.

A cada pocillo se añadió la mezcla de 50 μL de la solución con cCBD-PHSRN + 50 μL de la solución con vCBD-RGD correspondiente según el esquema de la figura anterior. Con esto se consiguieron 36 combinaciones diferentes de ambos péptidos. Para cada una de ellas, se realizaron 6 réplicas.

Los péptidos se dejaron interactuar con la superficie de colágeno durante 30 minutos a 37 °C. Para retirar la fracción de péptidos que no se hubieran adherido tras la incubación, los pocillos se lavaron con PBS y se añadió a cada uno 100 µL de suspensión celular con 20.000 células MC3T3-E1 en medio completo.

Las células se dejaron adherir durante un período de 30 minutos en condiciones estándar de cultivo, tiempo tras el cual se aspiraron las suspensiones con las células remanentes que no se hubieran adherido, se realizó un lavado con PBS de 5 minutos con agitación suave y, finalmente, se añadió medio completo para incubar durante toda la noche. Al día siguiente, se realizó la estimación de número de células mediante ensayo metabólico de XTT, indicado en el anexo 8.2.5.

3.3.3 Ensayos de actividad biológica de los péptidos *in vitro* en cultivos sobre las esponjas de Helistat.

Estos ensayos se realizaron siguiendo el siguiente esquema experimental:

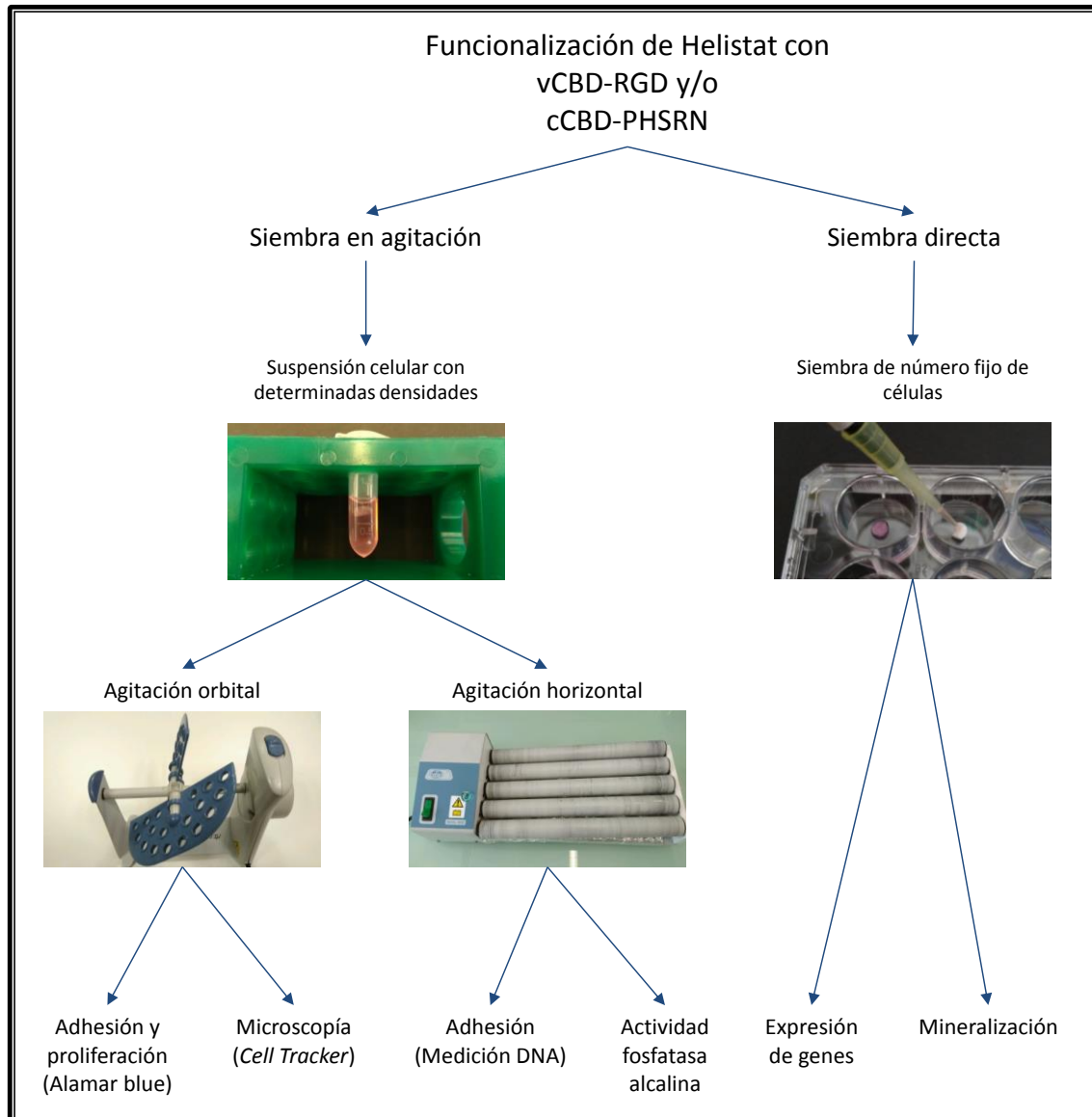


Figura 14. Protocolo esquematizado de los ensayos de actividad biológica *in vitro* de células sembradas mediante diferentes metodologías sobre Helistat funcionalizada con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN.

3.3.3.1 Adhesión y proliferación celular sobre Helistat funcionalizado con vCBD-RGD y cCBD-PHSRN.

Las esponjas se funcionalizaron con ambos péptidos por separado o con la mezcla de los dos. Para ello, se añadieron 10 µg de vCBD-RGD y/o 10 µg de cCBD-PHSRN sobre las esponjas, se incubaron al aire durante 30 minutos dentro de una cabina de seguridad biológica y se lavaron en 1 mL de PBS durante 5 minutos con agitación suave. En cada uno de estos

experimentos, salvo que se indique lo contrario, se incluyeron 8 réplicas de las siguientes 4 condiciones:

- **C-:** Sólo se añadieron 20 μL de agua milliQ estéril.
- **RGD:** Adición de 20 μL de una solución de vCBD-RGD 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en agua (10 μg totales de péptido).
- **PHSRN:** Adición de 20 μL de una solución de cCBD-PHSRN 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en agua (10 μg totales de péptido).
- **RGD+PHSRN:** Adición de 20 μL de una solución de vCBD-RGD 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y cCBD-PHSRN 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en agua (10 μg totales de cada de péptido).

Sobre las esponjas funcionalizadas, se sembraron células MC3T3-E1 o rBMSC mediante 2 métodos diferentes:

- **Cultivo directo:** Siembra de un número de células determinado resuspendidas en 20 μL de medio completo, los cuales se añadieron directamente sobre las esponjas (anexo 8.2.3.1).
- **Cultivo en suspensión:** Siembra de un número determinado de células resuspendidas en 1 mL de medio completo. En este caso, las esponjas se introdujeron en la suspensión y se cultivaron en agitación durante 3-4 horas. La agitación fue:
 - Orbital: Agitador que generó un vaivén continuo de la suspensión a lo largo de todo el tubo (anexo 8.2.3.2).
 - Horizontal: Agitador de rodillos que ejerció una suave agitación en la que la suspensión se mantuvo en movimiento, pero permaneciendo en el fondo del tubo (anexo 8.2.3.3).

Para los cultivos en agitación, se realizaron pruebas preliminares sembrando cantidades crecientes de células con el objetivo de determinar la eficiencia de siembra y la cantidad máxima permitida por el sistema.

Una vez transcurrido el tiempo indicado para permitir la adhesión mediante cualquiera de los tres métodos antes mencionados, se lavaron las esponjas para retirar el excedente de células que no se hubieran adherido, se sometieron al protocolo de lisis a partir de células sembradas en esponjas (anexo 8.2.7) y se estimó indirectamente la cantidad total de células mediante la medición del DNA total de doble cadena con el kit *Quant-iT PicoGreen* (Thermo Fisher Scientific) (anexo 8.2.8). Las cantidades resultantes se expresaron en términos de DNA total, aunque se emplearan como un indicador del número de células en las muestras.

Para determinar la proliferación de MC3T3-E1 y de las rBMSC sembradas sobre las esponjas, se realizó el mismo protocolo de adhesión en agitación orbital indicado previamente. Sobre estas esponjas, se realizó un ensayo metabólico Alamar blue a los días 0, 1, 3 y 7 para estimar el número de células interpolando sobre medidas obtenidas de cultivos con cantidades de células conocidas a modo de recta patrón de células (anexo 8.2.6).

En determinados experimentos de adhesión, se incluyeron réplicas de cada condición destinadas a la observación por microscopía de las células adheridas. Para ello, al momento de observación, las esponjas cultivadas se trataron con la tinción vital *Cell Tracker Green* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo el protocolo del anexo 8.2.4. Las esponjas con las células ya teñidas

de verde fluorescente se observaron y registraron fotográficamente en un estereoscopio de fluorescencia.

3.3.3.2 Actividad fosfatasa alcalina de células adheridas a esponjas funcionalizadas con vCBD-RGD y cCBD-PHSRN.

Con el objetivo de determinar el efecto de los péptidos ya adheridos en la esponja sobre la diferenciación de las células hacia el fenotipo osteoblástico, se llevó a cabo el mismo protocolo de cultivo en agitación horizontal antes mencionado para testar la adhesión. Las esponjas con las células ya adheridas se mantuvieron en medio completo durante 24 horas. Al día siguiente, se les añadió medio de diferenciación suplementado con 50 µg/mL de ácido ascórbico y 50 ng/mL de rhBMP-2 y se mantuvieron en cultivo durante 14 días, realizando 2 cambios de medio a la semana. Al día 14 se sometieron al protocolo de lisis a partir de células sembradas en esponjas (anexo 8.2.7). Sobre los lisados, se midió la actividad FA total (anexo 8.2.9).

3.3.3.3 Análisis de la expresión de genes marcadores de osteogénesis de células adheridas a esponjas funcionalizadas con vCBD-RGD y cCBD-PHSRN.

Para realizar el análisis de la expresión de genes marcadores de osteogénesis se cultivaron esponjas siguiendo el protocolo de siembra directa sobre esponjas funcionalizadas con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN (anexo 8.2.3.1).

Para este experimento, se dispusieron 9 esponjas por cada condición (C-, RGD, PHSRN y RGD+PHSRN). Al día siguiente, se añadió medio de diferenciación suplementado con 50 µg/mL de ácido ascórbico y/o 50 ng/mL de rhBMP-2, transcurridos 7 días de cultivo, se extrajo el RNA total con el kit *RNeasy MiniKit* (Qiagen), siguiendo el protocolo indicado en el anexo 8.2.11. Dado que las cantidades de RNA obtenidas a partir de una esponja sembrada con este número de células es relativamente bajo, se juntaron 3 esponjas por extracción por lo que se generaron 3 réplicas experimentales de cada condición. Las cantidades totales de RNA aislado se estimaron mediante espectrofotometría en gota empleando un Nanodrop.

En base a estas mediciones, se retrotranscribieron 500 ng de RNA total de cada muestra con el kit *Prime Script RT master mix* (Takara), siguiendo las instrucciones del fabricante. Adicionalmente, se incluyó un “control –RT” al que se añadió una de las muestras al azar, pero no se incluyó la *master mix* en la mezcla.

De entre los diferentes genes marcadores del proceso osteogénico reportados en la literatura, se eligieron 3 de ellos: “*Runt-related transcription factor 2*” (*Runx2*), gen de la fosfatasa alcalina (*Alp* siglas del inglés “*alkaline phosphatase*”) y osteocalcina (*Bglap* por su nombre oficial “*Bone gamma-carboxyglutamate protein*”). Para rata, se añadió un cuarto gen: osterix (cuyo símbolo oficial es *Sp7* del nombre en inglés “*secreted phosphoprotein 7*”).

Los genes de ratón se indicarán de aquí adelante anteponiendo la letra “m” (derivada de *mouse*) al nombre del gen y la letra “r” (de *rat*) para los de rata. Adicionalmente, se

eligieron los dos genes de referencia *Gapdh* (gen de la “*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*”) y *Hprt* (gen de la “*Hypoxanthine- guanine phosphoribosyltransferase*”).

Todas las secuencias de los oligonucleótidos se diseñaron empleando el software online *Primer Blast* exceptuando el par correspondiente a *mGapdh* que se tomó de un trabajo anterior (Shen et al., 2013). A modo de confirmación, también se revisaron en el software libre *Oligo Explorer* 1.4 (GeneLink).

En todos los casos, excepto para *Bglap* de ambas especies, las secuencias hibridan con una unión intrón-exón. Esto se hizo para limitar la amplificación de posibles restos de DNA genómico remanente tras el aislamiento de RNA. Para *Bglap* no fue posible puesto que el gen es muy corto y no se consiguieron oligonucleótidos dentro de estas regiones que satisficieran los parámetros termodinámicos ideales que se establecieron. Todos los oligonucleótidos se diseñaron de modo tal que las temperaturas de fusión fueran aproximadamente de 60 °C con la finalidad de poder realizar la amplificación de varios genes de forma simultánea en la misma placa.

Con cantidades teóricas de cDNA idénticas para cada muestra analizada, se realizaron las PCR siguiendo el método de cuantificación relativa detallado en el anexo 8.2.12.

3.3.3.4 Mineralización de MC3T3-E1 sobre esponjas funcionalizadas con vCBD-RGD y cCBD-PHSRN.

Los ensayos de mineralización *in vitro* tienen como requerimiento que se parta de un cultivo confluyente antes de iniciar la inducción osteogénica. Para ello, se procedió a realizar la siembra directa de un número elevado de células MC3T3-E1 sobre las esponjas previamente funcionalizadas con los péptidos, de tal manera de asegurar la confluencia de las mismas. Basándonos en experimentos previos, se decidió partir de 100.000 células por esponja, sembradas con el método de siembra directa sobre esponjas funcionalizadas detallado en el anexo 8.2.3.1.

Una vez adheridas las células, se dejaron en medio completo durante 2 días para permitir que se asentara el cultivo y, a partir de ese momento, se inició la inducción en medio osteogénico, compuesto por medio completo suplementado con 50 µg/mL de ácido ascórbico y 10 mM de β-glicerofosfato. Se mantuvieron durante 21 días en este medio que se renovó cada 3-4 días. Para los controles positivos, se incluyeron esponjas tratadas de forma idéntica a las “control negativo”, pero cuyo medio se suplementó con BMP-6 a una concentración final de 200 ng/mL. Finalizado el período de inducción, las esponjas se sometieron al protocolo de tinción con rojo de alizarina, que genera una tinción rojo brillante en aquellos cultivos en los que hay deposición de fosfato cálcico en la matriz extracelular. Además, se realizó la extracción del colorante para realizar una cuantificación de la mineralización para cada condición (anexo 8.2.10).

3.3.4 Ensayo *in vivo* de osificación ectópica de esponjas funcionalizadas con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN.

La actividad biológica *in vivo* de las esponjas funcionalizadas con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN se comprobó mediante un ensayo de formación de hueso ectópico en ratas. Los detalles del procedimiento quirúrgico se explican en el anexo 8.3.1.

Preparación de los implantes: Los implantes se prepararon de forma análoga al procedimiento indicado en la sección de adhesión y proliferación (anexo 8.2.3). Se dispusieron 12 réplicas de cada una de las condiciones (C-, RGD, PHSRN y RGD+PHSRN). Tras 45 minutos de secado, se añadió a cada una de las esponjas 1 µg de rhBMP-2 diluido en 4 mM HCl + 0,1% BSA y se dejó secar durante otros 45 minutos al aire en una cabina de seguridad biológica. Este procedimiento está basado en el protocolo previo descrito por el grupo pero realizado, en este caso, sobre las esponjas de Helistat (Visser et al., 2014).

Se implantaron 4 esponjas por animal incluyendo 1 réplica de cada tratamiento por rata. Las esponjas con los distintos tratamientos se dispusieron de tal modo que los tratamientos fueran rotando de un animal a otro con el fin de evitar cualquier posible influencia de la localización de los implantes sobre el proceso de osificación. Transcurridos 21 días, los animales se sacrificaron por inhalación de CO₂ y se extrajeron los implantes. Se destinaron 7 réplicas de cada tratamiento para medición de calcio total siguiendo el protocolo del anexo 8.3.3.

Las restantes 5 réplicas se destinaron al análisis histológico, siguiendo un protocolo estándar de fijación, descalcificación, inclusión y corte. Las muestras se sometieron a una tinción de hematoxilina-eosina para evaluar las características histológicas de cada uno de los implantes. El detalle del procesamiento y tinción de las muestras se expone en el anexo 0.

3.4 Resultados (Sección A).

3.4.1 Propiedades de los dominios de unión a colágeno.

El diseño de ambos péptidos se realizó con el objetivo final de poder añadirlos de forma simultánea a la misma esponja. Es por esto que se decidió utilizar dos dominios de unión a colágeno diferentes para ambos, partiendo de la hipótesis que podrían presentar sitios de unión distintos entre sí lo cual tendría como consecuencia que no hubiera interferencia entre ellos. Como paso previo a esto, se probó la afinidad de estos dos péptidos en las dos esponjas de colágeno disponibles: Esponjas de Nimni y Helistat.

3.4.1.1 Pegada de vCBD-RGD a esponjas de Nimni y Helistat.

A pesar de que en trabajos anteriores se obtuvieron resultados satisfactorios con la esponja de Nimni, se decidió comprobar la capacidad de Helistat puesto que es un producto comercializado y aprobado por la FDA para el uso en clínica, lo cual facilita su posible aplicación y su adquisición.

La pegada del péptido vCBD-RGD a la esponja de Nimni fue testada previamente por nuestro grupo en un trabajo de investigación anterior (Visser et al., 2014).

En la **Figura 15** se evidencia cómo el péptido vCBD-RGD también tuvo afinidad por la esponja de Helistat. En todos los casos, se observó un patrón de retención similar. Para las esponjas cargadas con 1.000 y 2.000 ng de péptido, la mayoría del péptido que no se retuvo en la esponja, se liberó en los primeros 20 μL de lavado (**Figura 15 D y E**). Para las esponjas cargadas con 5.000 ng, ocurrió lo mismo pero se siguió liberando péptido hasta los 40 μL de lavado (**Figura 15 C**).

En cuanto a la eficiencia de la pegada de forma comparativa entre ambas esponjas, se tomó en cuenta el área superficial de las mismas como un valor para relativizar la cantidad de moléculas de péptido que se adhirieron a la superficie. Para ello, se realizó la estimación de la superficie de ambos materiales mediante isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno. Las esponjas de Nimni presentaron una superficie promedio de 85,74 cm^2 por esponja mientras que el valor para Helistat fue de 51,91 cm^2 .

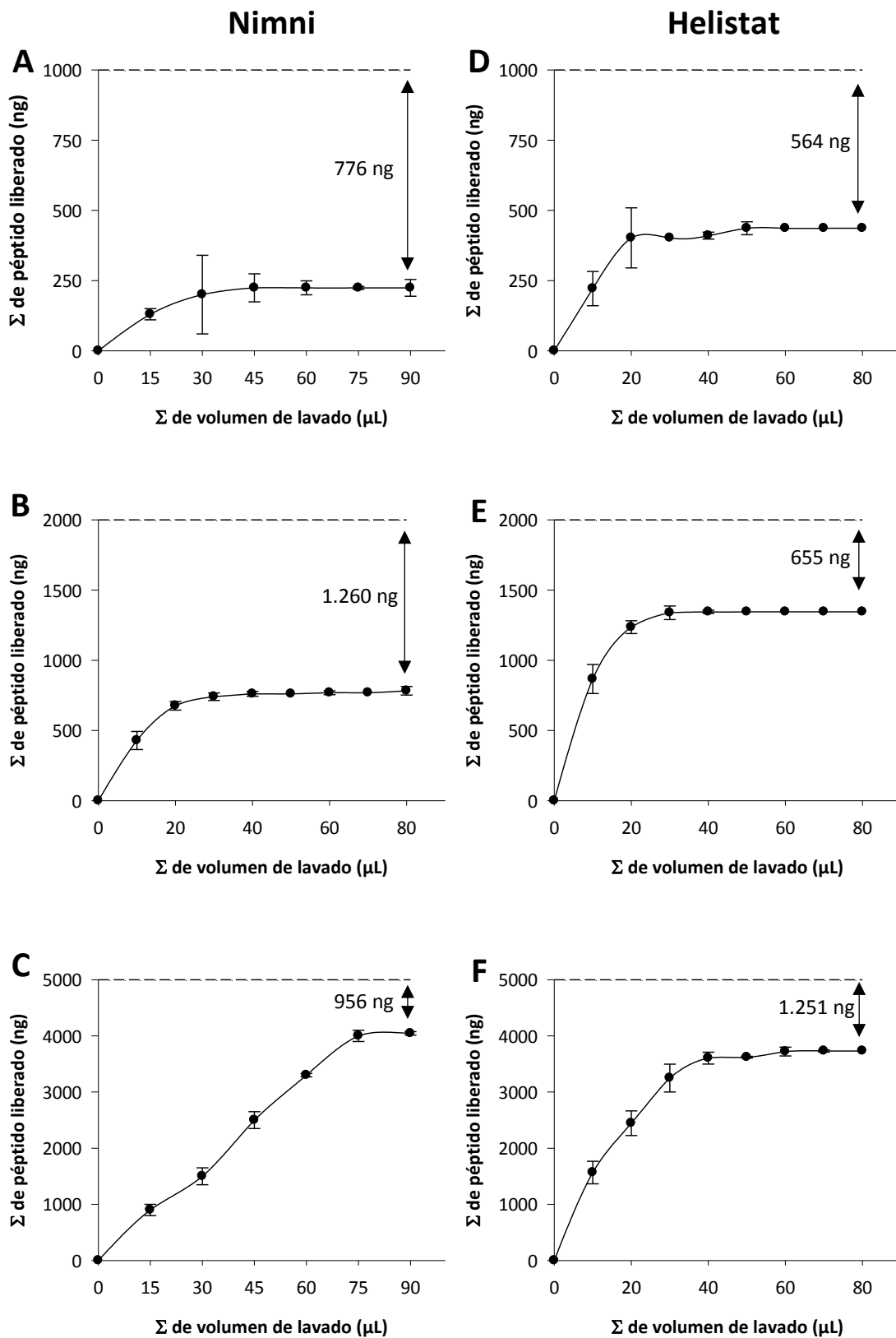


Figura 15. Ensayo de pegada de vCBD-RGD a las esponjas de Nimni (**A**, **B** y **C**) y Helistat (**D**, **E** y **F**), cargadas con 1.000 ng (**A** y **D**), 2.000 ng (**B** y **E**) y 5.000 ng (**C** y **F**) de vCBD-RGD de partida. Se indican los valores de péptido retenido tras 80 μL de lavado total excepto en las gráficas **A** y **C** que se tomaron de un trabajo previo en el que los lavados fueron de 15 μL cada uno, por lo que los valores de péptido retenido se muestran tras 90 μL de lavado total. Datos tomados de (Visser et al., 2014).

vCBD-RGD inicial (ng)	vCBD-RGD retenido (ng)		Densidad de vCBD-RGD (pmol/cm ²)	
	Nimni	Helistat	Nimni	Helistat
1.000	776	564	5,34	6,41
2.000	1.260	655	8,66	7,44
5.000	956	1.251	6,57	14,21

Tabla 5. Comparativa de la eficiencia de pegada de vCBD-RGD en las esponjas de colágeno. Se muestran las cantidades de vCBD-RGD retenidas para ambas esponjas en ng totales y la densidad relativa en pmol/cm².

Exceptuando el valor de 8,66 pmol/cm² obtenido para la condición 2.000 ng /Nimni, las densidades de péptido fueron más altas conforme se partió de una cantidad de péptido mayor y fueron superiores para la esponja de Helistat que para la de Nimni. Para las esponjas cargadas con 5.000 ng de partida, se obtuvo una funcionalización 2,2 veces mayor de la superficie de Helistat que la de Nimni.

3.4.1.2 Pegada de vCBD-PHSRN a esponjas de Nimni y Helistat.

Para el péptido cCBD-PHSRN se observaron patrones de liberación similares a los de vCBD-RGD, una liberación inicial en la que se pierde la mayoría del péptido que no estaba interactuando con la esponja y una posterior estabilización del péptido retenido. Con esto se demostró que el nuevo péptido cCBD-PHSRN también interactuó de forma estable con el colágeno de ambas esponjas.

Para este péptido y su dominio de unión, se observó que se retuvieron cantidades más elevadas de cCBD-PHSRN a las esponjas de Helistat que a las del Nimni, para ambas condiciones probadas (**Figura 16**). En cuanto a la densidad de péptido, la esponja de Helistat presentó valores más elevados que la de Nimni, especialmente patente para la condición de 2 µg, en los que este valor se triplica entre una esponja y la otra (4,43 vs 13,62 pmol/cm²) (**Tabla 6**). Para ambas esponjas, se obtuvieron valores máximos en torno a 1.200 ng totales de péptido cuando se cargaron 5 µg iniciales de cCBD-PHSRN.

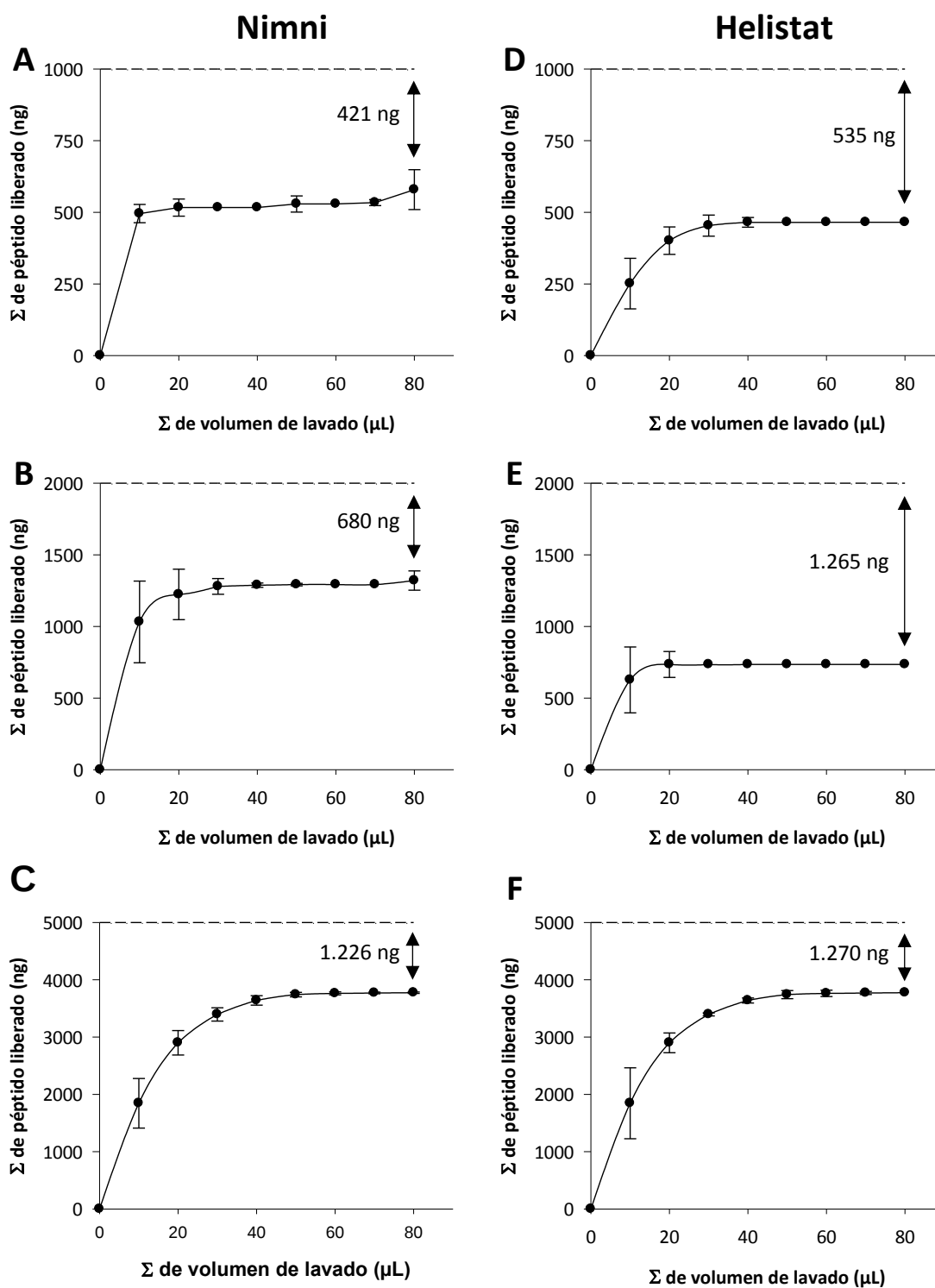


Figura 16. Ensayo de pegada de cCBD-PHSRN a las esponjas de Nimni (A, B y C) y Helistat (D, E y F). Esponjas cargadas con 1.000 ng (A y D), 2.000 ng (B y E) y 5.000 ng (C y F) de cCBD-PHSRN de partida. Se indican los valores de péptido retenido tras 80 μL de lavado total.

cCBD-PHSRN inicial (ng)	cCBD-PHSRN retenido (ng)		Densidad de cCBD-PHSRN (pmol/cm ²)	
	Nimni	Helistat	Nimni	Helistat
1.000	421	535	2,74	5,76
2.000	680	1.265	4,43	13,62
5.000	1.226	1.270	7,99	13,68

Tabla 6. Comparativa de la eficiencia de pegada de cCBD-PHSRN en las esponjas de colágeno. Se muestran las cantidades de cCBD-PHSRN retenidas para ambas esponjas en ng totales y la densidad relativa en pmol/cm².

Los resultados en conjunto indicaron que se consiguió adherir un número mayor tanto de vCBD-RGD como cCBD-PHSRN por unidad de área, a la esponja de Helistat para todas las condiciones testadas. Además, en ningún caso ni condición se consiguieron densidades superiores a los 14,21 pmol/cm², aun cuando se aumentara la cantidad inicial de péptido.

Tomando en cuenta la mayor eficiencia de pegada de Helistat la mayor facilidad para su adquisición dado que es un producto comercializado, a partir de este punto se trabajó exclusivamente con Helistat como biomaterial.

3.4.1.3 Visualización de vCBD-RGD y cCBD-PHSRN en Helistat por blot.

Para este ensayo se emplearon los mismos péptidos pero previamente sometidos al protocolo de biotilación (anexo 8.1.3). Ya biotinilados, los péptidos se purificaron por cromatografía de exclusión molecular (anexo 8.1.4) y se estimó la cantidad de biotinas por molécula de péptido obtenidas (anexos 8.1.2 y 8.1.5).

El resultado del proceso arrojó que se enlazaron en promedio, 0,71 moléculas de biotina por molécula de vCBD-RGD mientras que para cCBD-PHSRN el resultado fue de 1,3. Este resultado guarda relación con la cantidad de aminas libres a las cuales se podía enlazar la biotina. Mientras que el vCBD-RGD sólo dispone del grupo amino terminal (Acetil-WREPSFMALSGRGDS-NH₂), el cCBD-PHSRN presenta 2 lisinas en cuyas cadenas laterales hay un grupo amino reactivo para la biotina (Acetil-TKKTLRTGGGGGGPHSRN-NH₂).

Para comprobar de forma directa la retención de ambos péptidos sobre las esponjas, éstas se cargaron con 2 µg de cada péptido biotinilado (vCBD-RGD-B o cCBD-PHSRN-B), se lavaron extensamente y se revelaron por *blot* directo sobre las esponjas.

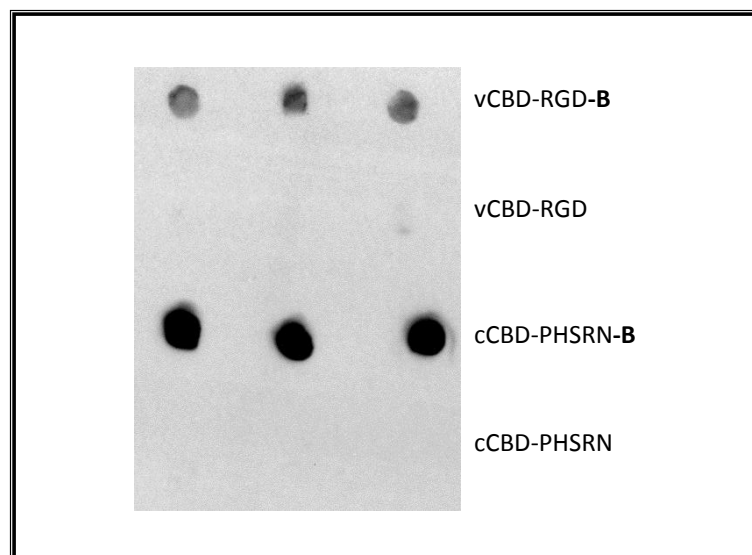


Figura 17. Detección por *blot* de vCBD-RGD o cCBD-PHSRN retenido en Helistat tras lavados sucesivos en PBS. En cada fila se observan 3 réplicas de esponjas de Helistat cargadas con 2 μ g de cada péptido biotinilado y sin biotinilar.

Con este ensayo se confirmó visualmente la presencia de péptido tras los lavados en PBS (**Figura 17**). La ausencia de señal en las esponjas cargadas con los péptidos sin biotina, permitió confirmar que las señales observadas no son de carácter inespecífico. Por otro lado, hubo señales de mayor intensidad para cCBD-PHSRN con respecto a las generadas por las esponjas con vCBD-RGD, pero, dada la naturaleza de la técnica y los diferentes niveles de biotinilado de ambos péptidos, es difícil hacer comparaciones entre ambas moléculas en cuanto a cantidad retenida.

Sabiendo que ambos péptidos interactuaban de forma estable con la esponja por separado, se procedió a verificar si al cargar los péptidos juntos se observaba retención de los mismos. Para ello, se cargaron esponjas con mezclas de los péptidos biotinilados y sin biotinilar, así como con los péptidos biotinilados por separado.

El análisis visual (**Figura 18**) indicó que los péptidos biotinilados generaron señales sin diferencias evidentes tanto por separado (calles 2 y 4) como en presencia del otro péptido sin biotinilar (calles 1 y 3). Esto constituye un indicio de que la retención de un péptido no se modifica en presencia del otro.

3.4.1.4 Determinación de la estabilidad a largo plazo y colocación de vCBD-RGD y cCBD-PHSRN.

La imposibilidad de distinguir ambos péptidos marcados de manera simultánea sobre la misma esponja en los ensayos por *blot* con péptidos biotinilados, nos llevó a realizar los siguientes experimentos con péptidos marcados con moléculas fluorescentes. Se mandó a sintetizar el vCBD-RGD marcado con fluoresceína (vCBD-RGD-FITC) así como el cCBD-PHSRN con rodamina (cCBD-PHSRN-TMR).

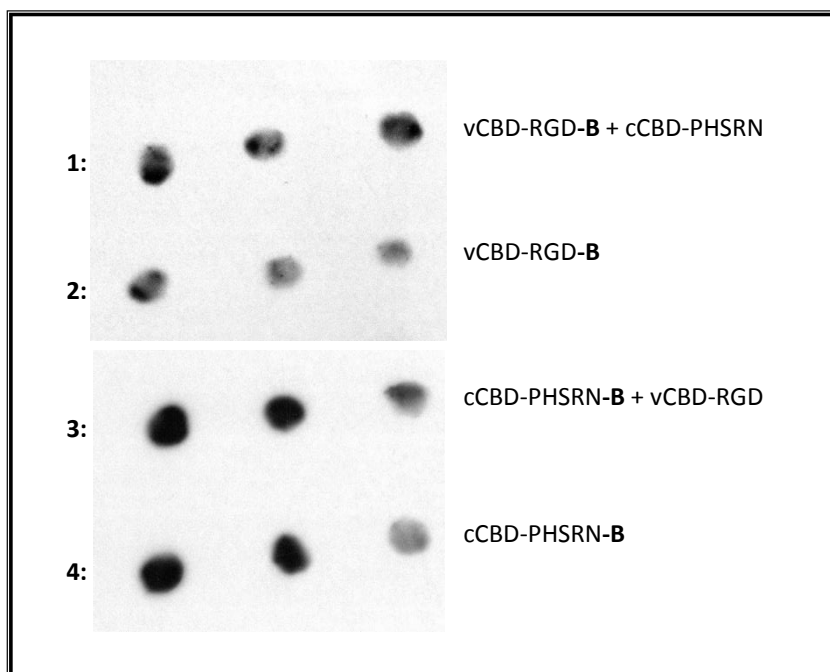


Figura 18. *Blot* de esponjas cargadas con mezclas de 2 µg de vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN con y sin biotinilar tras ser lavadas extensamente con PBS. Cada fila presenta 3 réplicas idénticas de cada una de las condiciones.

Se cargaron esponjas con 2 µg de cada péptido marcado por separado y mezclados sobre la misma esponja. Después de lavarlas de forma idéntica a la llevada a cabo antes del revelado por *blot* del experimento anterior, se fotografiaron en un estereoscopio de fluorescencia con los filtros del canal verde (para el RGD) y los del canal rojo (para el PHSRN).

Dado que dichas esponjas no fueron sometidas a ningún tratamiento para la detección de los péptidos sobre la misma, se pudo extender el lavado por 3, 7 y 14 días en PBS, que se cambió cada 4 días. En cada uno de estos tiempos, se fotografiaron en las mismas condiciones de exposición que el día 0 tras los lavados iniciales.

En la **Figura 19** se observa cómo ambos péptidos se retienen tras los lavados iniciales (T0) tanto cuando se cargan por separado (**Figura 19 A y B**) como cuando ambos se cargan sobre la misma esponja (**Figura 19 C**). Aunque no se realizó una cuantificación de la señal, se constata la presencia de los péptidos tanto por separado como cuando se añaden de forma conjunta, sin que haya diferencias evidentes en la intensidad de las señales. En todas las condiciones, los péptidos se mantuvieron visibles en las esponjas durante todo el período, lo cual es una demostración de la estabilidad de la unión entre ambas moléculas y el colágeno.

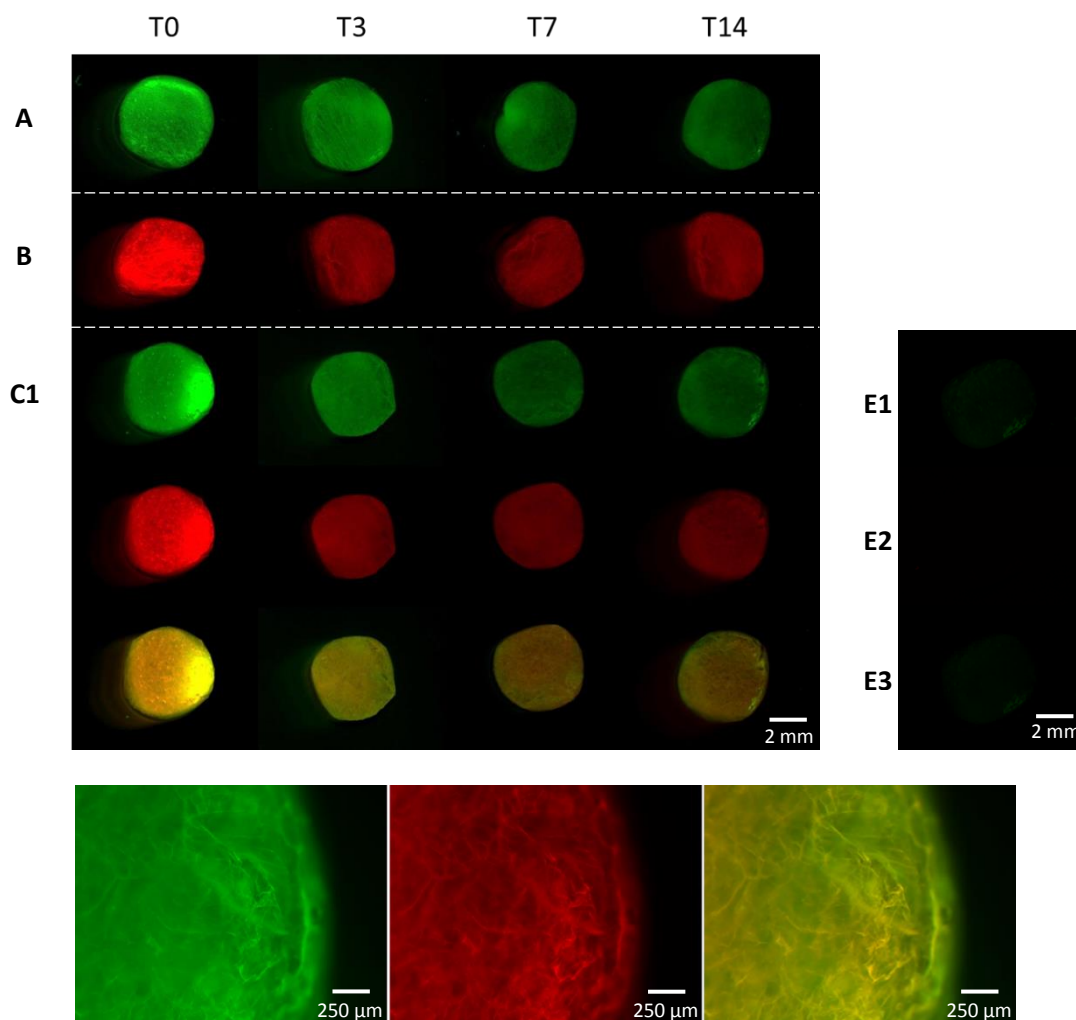


Figura 19. Registro fotográfico de retención de vCBD-RGD-FITC y/o cCBD-PHSRN-TMR de forma simultánea en Helistat. Se observan esponjas cargadas con **(A)** 2 μ g vCBD-RGD-FITC, **(B)** 2 μ g de cCBD-PHSRN-TMR y con **(C)** la mezcla de 2 μ g de cada uno de los péptidos. Se muestran fotografías correspondientes a los 0, 3, 7 y 14 días de lavado en PBS, en los canales verde **(A y C1)**, rojo **(B y C2)** y la mezcla de ambos **(C3)**. En **(D)** un detalle de la colocalización de ambos péptidos sobre una misma esponja a día 0. En **(E)** se muestran esponjas control negativo que se cargaron con PBS y se fotografiaron el día 0 en los canales verde **(E1)**, rojo **(E2)** y la mezcla de ambos canales **(E3)**.

3.4.2 Actividad de los dominios biomiméticos en cultivos convencionales.

3.4.2.1 Medición de la actividad fosfatasa alcalina en respuesta a vCBD-RGD y cCBD-PHSRN disueltos en el medio de cultivo.

Este experimento se realizó con el objetivo de determinar si los dominios biomiméticos tanto del vCBD-RGD como del cCBD-PHSRN tenían alguna influencia sobre la actividad FA de los preosteoblastos de ratón MC3T3-E1. Previamente, el péptido vCBD-RGD se había probado en nuestro grupo realizando una aproximación similar (Visser et al., 2014).

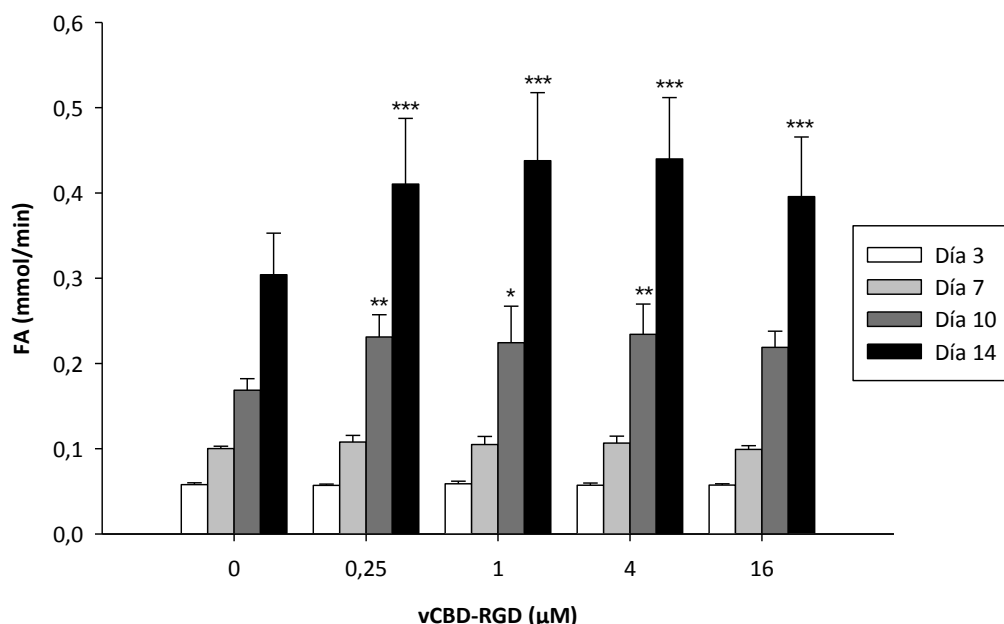


Figura 20. Actividad FA de MC3T3-E1 en respuesta a la adición de vCBD-RGD solubilizado en el medio. Se muestra la actividad FA de las células tratadas durante 3, 7, 10 y 14 días con vCBD-RGD a 0, 0,25, 1, 4 y 16 μM . (*) $p \leq 0,05$ (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$ indican diferencias significativas (ANOVA de una vía) con respecto a "0 μM " dentro del mismo día.

Para esta tesis doctoral, este experimento se reprodujo ampliando las condiciones tanto de concentración probadas previamente, como los días a los que se midió dicha actividad. En este caso, se evidenciaron aumentos significativos de la actividad FA en respuesta a vCBD-RGD para todas las concentraciones testadas, en las medidas únicamente de los días 10 y 14 (**Figura 20**).

Habiendo confirmado la respuesta a vCBD-RGD, se realizó un experimento similar en el que se probaron diferentes mezclas de vCBD-RGD con cCBD-PHSRN. Para acotar el número de variables a medir y basándonos en el experimento anterior, se decidió realizar la prueba únicamente con las mediciones a los 14 días y probando sólo las dos concentraciones intermedias de vCBD-RGD testadas: 1 y 4 μM .

En líneas generales se evidenció que tanto cCBD-PHSRN como vCBD-RGD por separado fueron capaces de inducir un aumento significativo de la actividad FA (**Figura 21**). Sin embargo, la adición de cCBD-PHSRN a aquellos pocillos con la concentración más alta de vCBD-RGD (4 μM) generó una disminución significativa de dicha actividad. Para estas condiciones, la mezcla de 1 μM de vCBD-RGD + 4 μM de cCBD-PHSRN generó el mayor aumento en la actividad FA de todo el experimento siendo significativamente mayor que sus condiciones controles con ambos péptidos por separado.

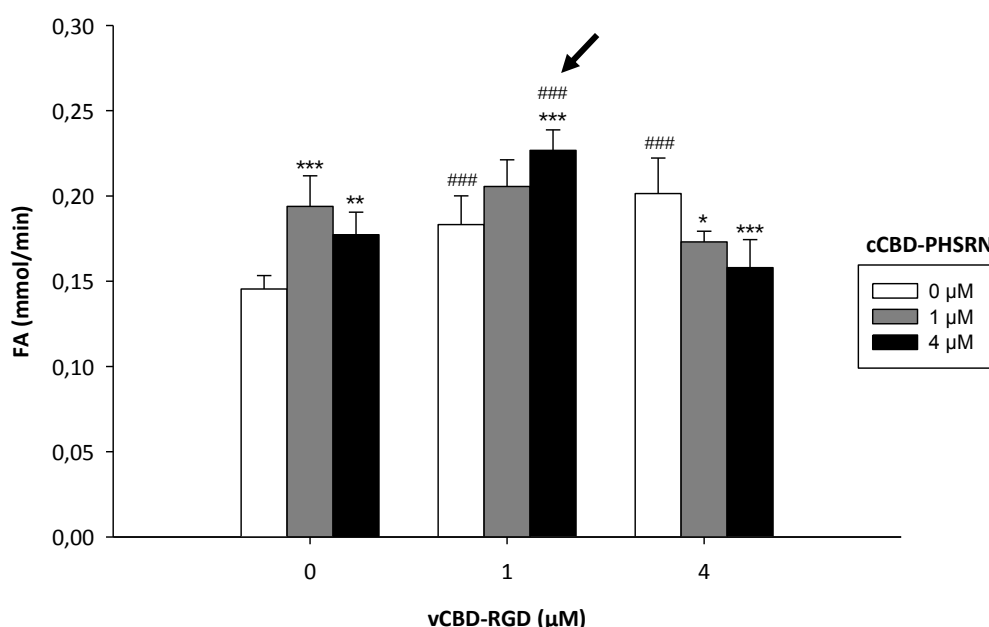


Figura 21. Actividad FA de MC3T3-E1 en respuesta a la adición de diferentes mezclas vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN solubilizado en el medio de cultivo. Se muestra la actividad FA de las células tratadas durante 14 días con las diferentes mezclas de ambos péptidos. Cada grupo de barras corresponde a una concentración de vCBD-RGD mientras que cada color de barra representa una concentración de cCBD-PHSRN. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías para determinar las interacciones entre ambos factores. (*) $p \leq 0.05$; (**) $p \leq 0.01$; (***) $p \leq 0.001$ indican diferencias significativas dentro de cada grupo de barras (debidas a PHSRN). (#) $p \leq 0.05$; (##) $p \leq 0.01$; (###) $p \leq 0.001$ denota diferencias significativas dentro de cada color (en respuesta a RGD). La flecha resalta la mezcla de péptidos 1 μM RGD + 4 μM de PHSRN.

3.4.2.2 Adhesión de MC3T3-E1 a superficies recubiertas con colágeno y funcionalizadas con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN.

Habiendo demostrado la funcionalidad tanto de los dominios de unión a colágeno como los dominios biomiméticos en solución, se realizó un experimento en el que se testó si los dominios biomiméticos (RGD y PHSRN) permanecían activos cuando los péptidos se presentaban adheridos al colágeno mediante sus dominios de unión.

Con esta finalidad, se realizó un experimento de adhesión sobre placas recubiertas de colágeno tipo I bovino y funcionalizadas con diferentes proporciones de ambos péptidos.

La observación al microscopio de estos cultivos evidenció una adhesión y extensión de las células casi total sobre la superficie tras tan solo 20 minutos de incubación, proceso que sobre el plástico puede tardar entre 2 y 3 horas. Aun cuando se registraron niveles de adhesión altos en los controles negativos, en el mapa de calor se observa cómo diferentes combinaciones de ambos péptidos ejercieron efectos sobre la adhesión celular.

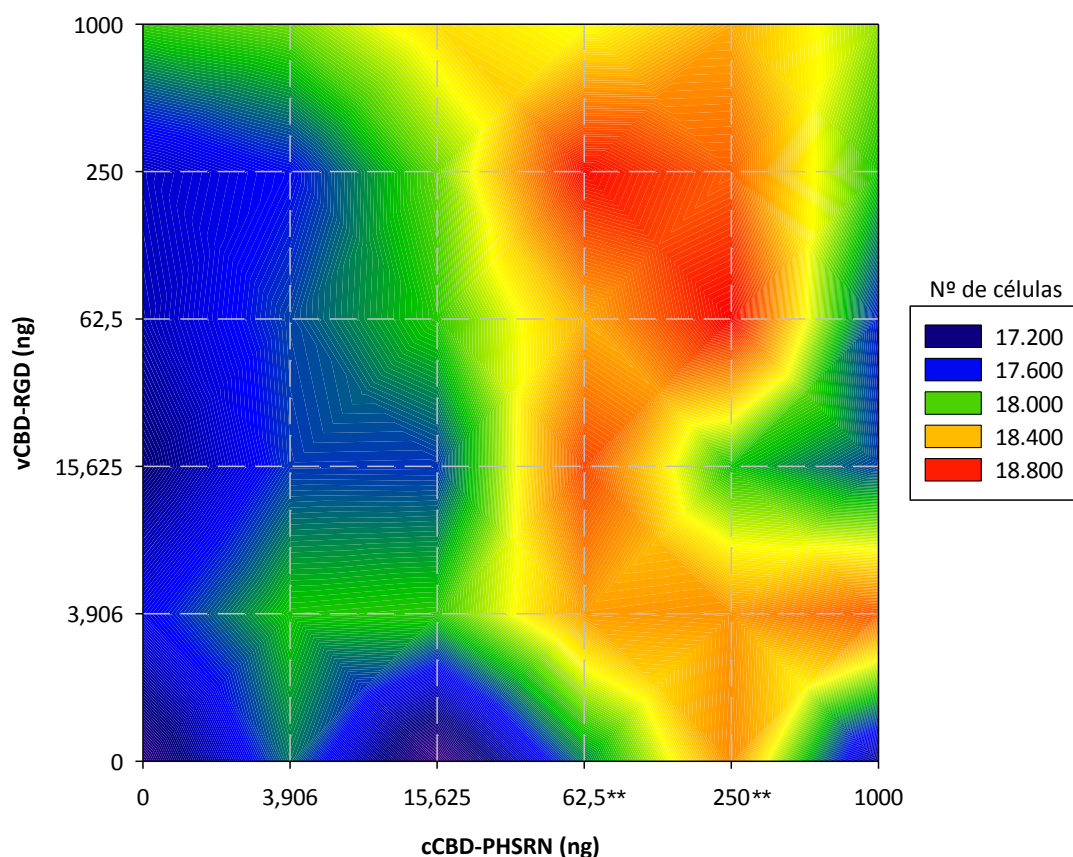


Figura 22. Adhesión de MC3T3-E1 a superficies de colágeno funcionalizadas con gradientes de mezclas de vCBD-RGD y cCBD-PHSRN. Se muestra un “mapa de calor” en el que cada intersección corresponde al promedio de 6 réplicas de las MC3T3-E1 adheridas en respuesta a la presencia de los péptidos. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante ANOVA de dos vías con ambos péptidos como factores para la comparación. (**) $p \leq 0.01$ Diferencia significativa de toda la columna con respecto a la columna “0 PHSRN”.

El análisis de los factores de forma independiente arrojó que las condiciones en las que se añadieron 62,5 y 250 ng de cCBD-PHSRN resultaron en una adhesión celular significativamente mayor que su tratamiento control sin PHSRN (columnas vs. columnas). En estas condiciones, la adición de vCBD-RGD no generó diferencias significativas en la adhesión, a pesar de que se observa un patrón de tendencia en el que a mayor cantidad de RGD, mayor adhesión celular.

El análisis de las interacciones (**Figura 22**; observando cada intersección), no generó diferencias que, para este número de réplicas ($n=6$), resultaran significativas dada la alta variabilidad de los valores promedio (desviaciones estándar no mostradas). Sin embargo, el patrón generado sirvió como un indicio inicial para comprobar que ambos péptidos interactuando con el colágeno, ejercieron un efecto sobre la adhesión celular y que distintas combinaciones de ambas moléculas indujeron niveles de adhesión mayores que ambos péptidos por separado.

3.4.3 Caracterización de la funcionalización de Helistat con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN.

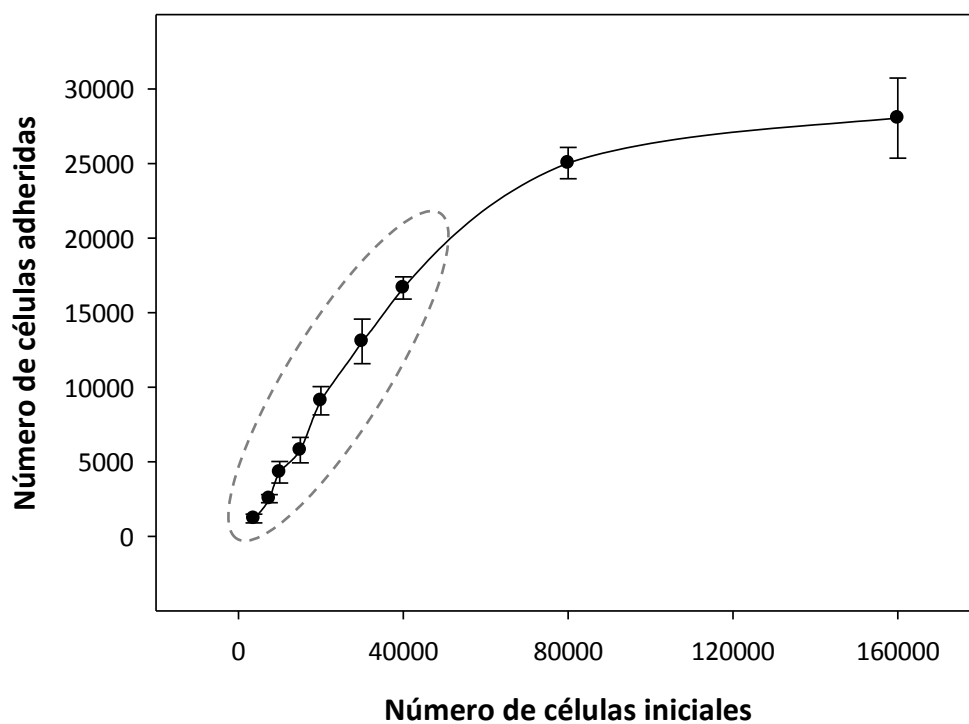
Habiendo comprobado que ambos péptidos tienen afinidad por el Helistat, que en soluble inducen cambios en la actividad FA de las células en cultivo y que cuando se adhieren a superficies recubiertas de colágeno modifican la adhesión celular; se procedió a caracterizar las esponjas funcionalizadas con experimentos de adhesión y diferenciación *in vitro*, así como mediante ensayos de formación de hueso ectópico *in vivo*.

3.4.3.1 Optimización de la siembra de MC3T3-E1 sobre Helistat.

Para poder determinar el efecto de la funcionalización de las esponjas de colágeno con los péptidos sobre la adhesión de las células al biomaterial, se determinó previamente el intervalo comprendido entre un número mínimo de células que pudieran detectarse y un número máximo que no saturara la superficie. Por ello, hubo que realizar experimentos para dilucidar el número de células óptimo a usar en experimentos posteriores.

Esto se llevó a cabo empleando suspensiones de 1 mL de medio completo con cantidades crecientes de células en las que se sumergieron las esponjas de Helistat para determinar qué número de las mismas se adherían al colágeno.

Tras 3 horas de incubación en agitación, se estimó la cantidad de células adheridas a las esponjas mediante el ensayo metabólico de Alamar Blue (**Figura 23**). Esta medición indicó que las MC3T3-E1 se adhirieron satisfactoriamente a la esponja Helistat. Empleando suspensiones de entre 3.750 y 40.000 células, se obtuvo una adhesión proporcional al número de células de partida, teniendo un máximo de eficiencia de en torno al 40% entre 10.000 y 40.000 células. Para las suspensiones de 80.000 y 160.000 células, se alcanzó una saturación en la que, aunque se adhirieron un número mayor de células totales, el porcentaje disminuyó de forma significativa.



Nº células inicial	Nº células adheridas	% de células adheridas
3.750	1.191	31,8
7.500	2.523	33,6
10.000	4.298	43,0
15.000	5.781	38,5
20.000	9.096	45,5
30.000	13.075	43,6
40.000	16.658	41,6
80.000	25.038	31,3
160.000	28.055	17,5

Figura 23. Adhesión de MC3T3-E1 a Helistat mediante cultivo en agitación orbital. Se observan los valores promedio de número de células adheridas a las esponjas calculados de forma indirecta mediante el ensayo metabólico Alamar Blue. En el eje X se detallan las cantidades crecientes de células iniciales en la suspensión. En la tabla se presentan los valores de células iniciales, de células adheridas totales y en términos porcentuales. La elipse indica la zona en la que se mantiene la proporcionalidad entre el número de células iniciales y finales.

3.4.3.2 Adhesión y proliferación de MC3T3-E1 sobre Helistat funcionalizada con vCBD-RGD.

Conociendo los datos mostrados en el apartado anterior, se llevó a cabo un primer experimento empleando el mismo protocolo de cultivo en agitación partiendo de la suspensión con mayor eficiencia de adhesión: 20.000 células/mL. En este caso, se incluyeron esponjas que se funcionalizaron con una cantidad saturante de vCBD-RGD (10 µg). Antes de sumergirlas en la suspensión celular, estas esponjas se lavaron con PBS para retirar el péptido excedente, no unido al colágeno.

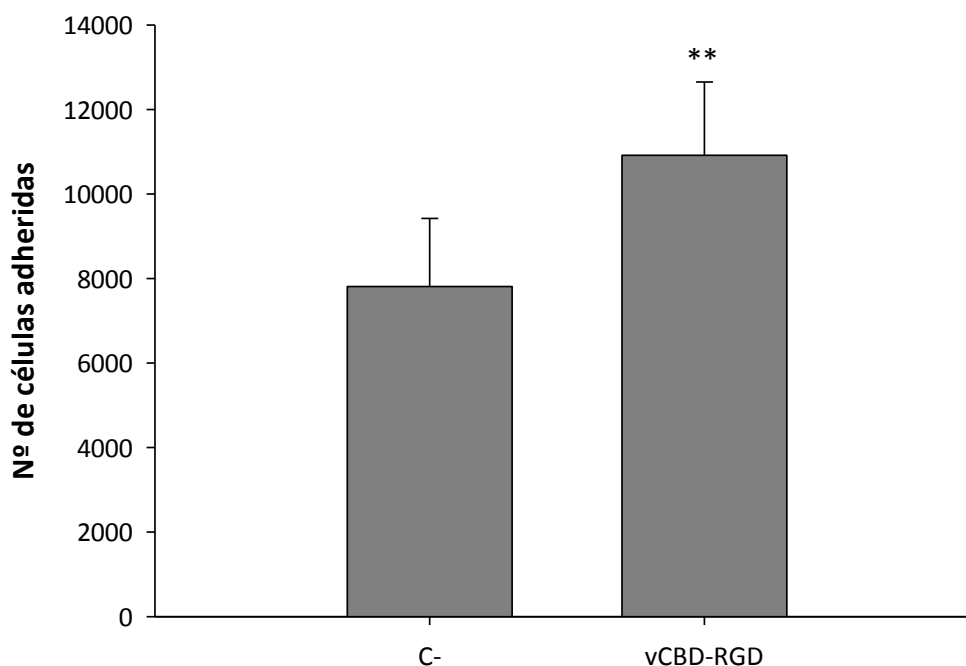


Figura 24. Adhesión de MC3T3-E1 a Helistat funcionalizado con vCBD-RGD. Se representan los valores promedio de las células adheridas partiendo de suspensiones celulares con 20.000 cél/mL. (**) $p \leq 0,01$ Diferencia significativa con respecto al C-.

La adición de vCBD-RGD a las esponjas generó un aumento significativo en la adhesión de células a la misma ($p \leq 0,01$). Estas esponjas tuvieron, en promedio, 3.106 células más, lo que representa un aumento del 39,8% con respecto al C- (**Figura 24**).

Dado que la resazurina no afecta de forma significativa a la proliferación de las células, las mismas se mantuvieron en cultivo y se repitieron las medidas a los días 1, 3 y 7 para realizar una curva de crecimiento. El perfil obtenido fue el siguiente:

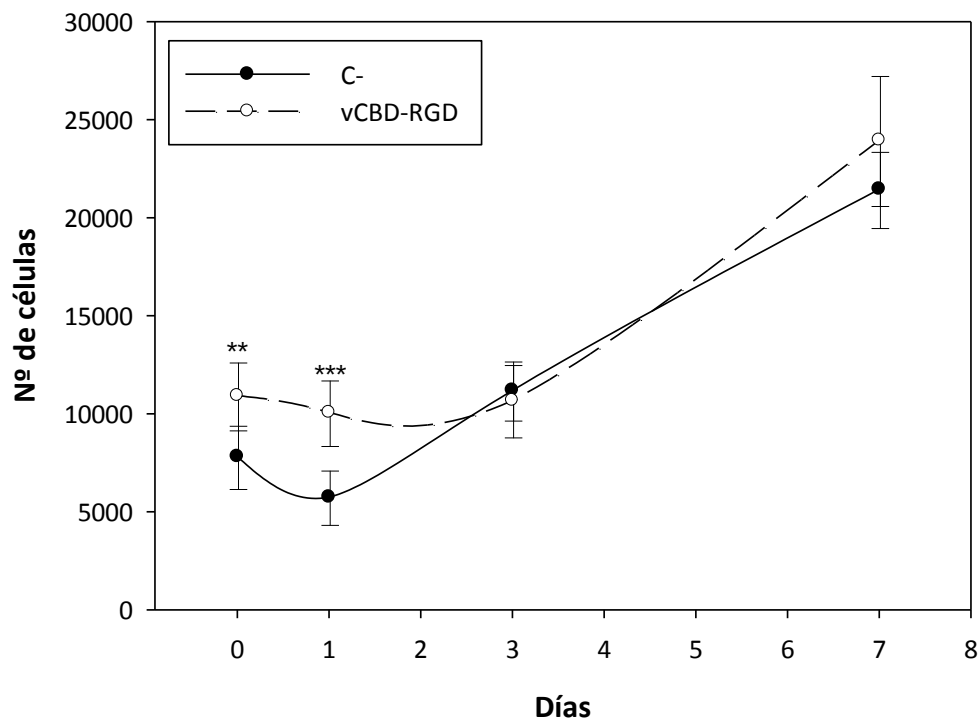


Figura 25. Curva de proliferación de MC3T3-E1 sembradas en suspensión sobre Helistat funcionalizado con vCBD-RGD. Se representan los valores promedio en número de células medidos a los 0, 1, 3 y 7 días. (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$ Diferencia significativa con respecto al control negativo del mismo día.

Las células fueron capaces de proliferar sobre la esponja, duplicando su número entre el día de siembra y el día 7 en cultivo. En ambos tratamientos se mantuvo la diferencia en el número de células las primeras 24 horas pero, a partir del tercer día, la cantidad de células se igualó entre ambas condiciones. Se demostró que la esponja es un sustrato favorable para la proliferación de las células y que la presencia del péptido vCBD-RGD modifica la adhesión pero no la proliferación de los preosteoblastos de ratón.

Para comprobar la distribución y morfología de las células cultivadas sobre las esponjas, se eligieron réplicas, tanto de esponjas funcionalizadas con vCBD-RGD como esponjas control negativo, correspondientes al momento inmediatamente posterior a la siembra en agitación (Día 0), como esponjas que se dejaron en cultivo en condiciones estándar durante 21 días para determinar su viabilidad tras un período de cultivo prolongado.

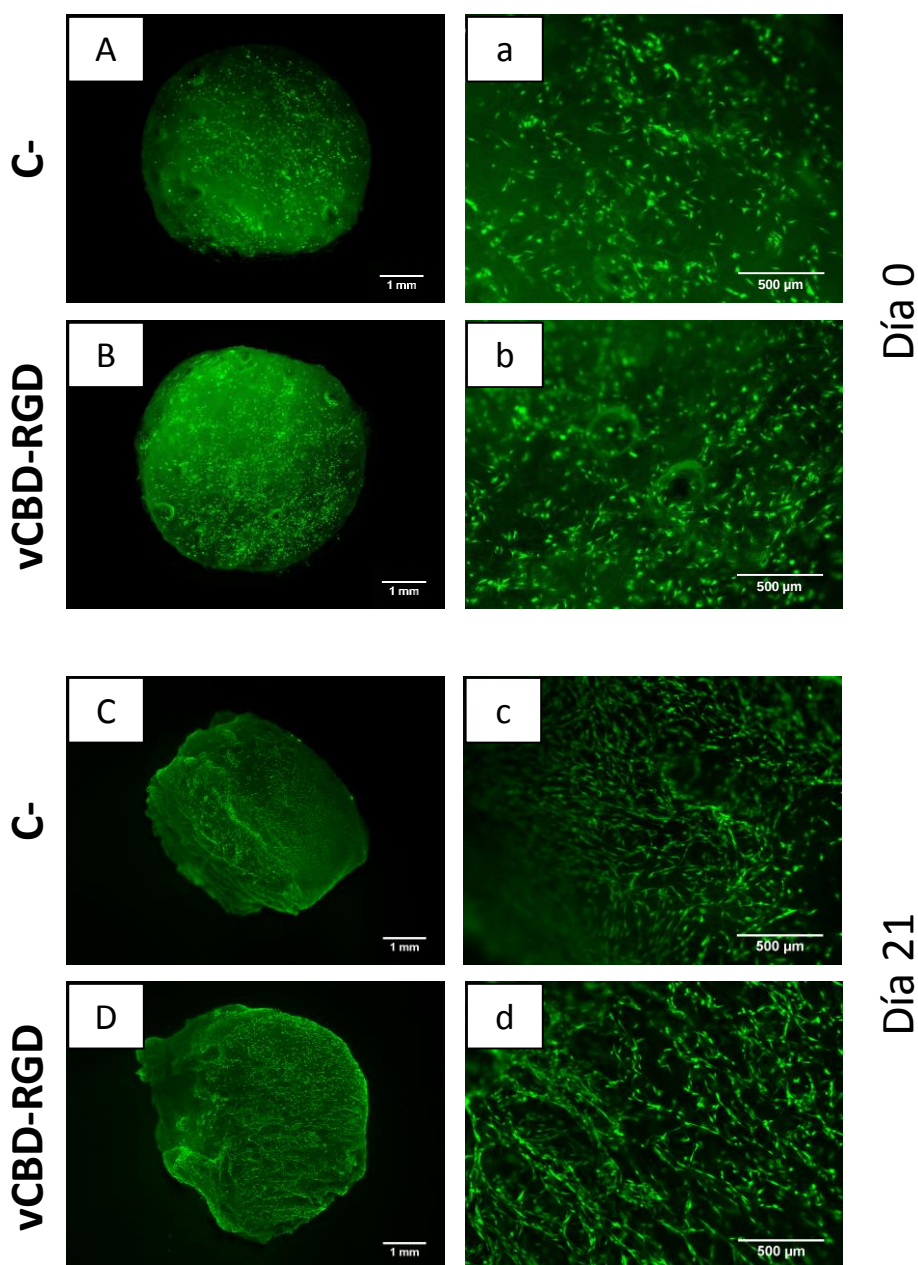


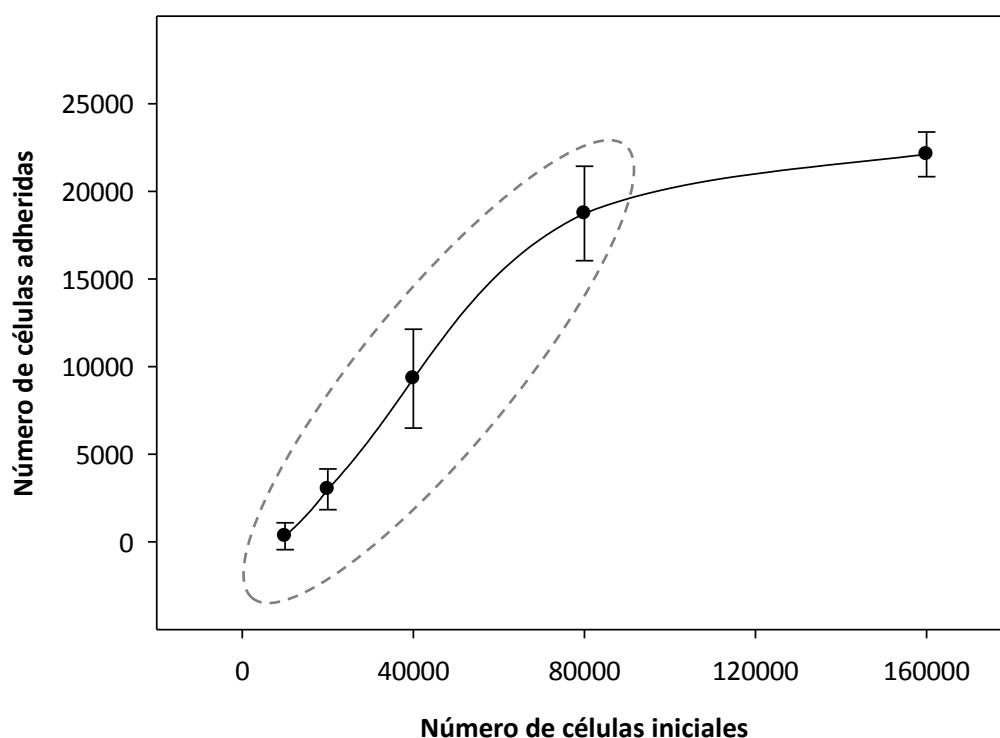
Figura 26. Observación en un estereoscopio de fluorescencia de MC3T3-E1 sembradas en agitación orbital sobre Helistat funcionalizado con vCBD-RGD teñidas con *Cell Tracker Green*. Se observan las células teñidas los días 0 y 21 tras la siembra sobre esponjas de Helistat funcionalizadas con vCBD-RGD (**B y D**) y esponjas control negativo sin péptido (**A y C**). En minúscula se denotan micrografías correspondientes a un mayor aumento.

En la **Figura 26** se observan ejemplos de las esponjas sembradas con la técnica del cultivo en agitación orbital los días 0 y 21 de cultivo. En ningún caso fue posible detectar diferencias entre las células sembradas en presencia de vCBD-RGD y las esponjas sin funcionalizar. Para ambos tratamientos, se evidenció una distribución más o menos homogénea de las células en el material que, tras las tres horas de cultivo, ya presentaron una morfología normal y se pudieron distinguir prolongaciones celulares. Tras 21 días, el cultivo se mantuvo viable y las células colonizaron completamente tanto la superficie del material como zonas más hacia el interior del mismo. También fue posible distinguir cierto nivel de

degradación de la esponja en la que se crearon cavidades importantes así como una pérdida de volumen de material con respecto al inicio del cultivo bastante patente.

3.4.3.3 Optimización de la siembra de rBMSC sobre Helistat.

El experimento se repitió de forma análoga para las rBMSC. Para ello, se realizó el cultivo en suspensión con cantidades crecientes de células y la curva de adhesión correspondiente.



Nº células inicial	Nº células adheridas	% de células adheridas
10.000	326	3,3
20.000	3.004	15,0
40.000	9.314	23,3
80.000	18.737	23,4
160.000	22.113	13,8

Figura 27. Adhesión de rBMSC a Helistat mediante cultivo en agitación orbital. Se observan los valores promedio de número de células adheridas a las esponjas calculados de forma indirecta mediante el ensayo metabólico Alamar Blue. En el eje X se detallan las cantidades crecientes de células iniciales en la suspensión. En la tabla se presentan los valores de células iniciales, de células adheridas totales y en términos porcentuales. La elipse indica la zona en la que se mantiene la proporcionalidad entre el número de células iniciales y finales.

Se observaron porcentajes de adhesión menores para este tipo celular, teniendo un máximo de eficiencia en torno al 23% para aquellas esponjas cultivadas en suspensiones de entre 40.000 y 80.000 células de partida. Igual que se observó para las MC3T3-E1, el aumento del número de células de partida a 160.000 no se tradujo en un incremento proporcional del número de células final adherido. Es importante también destacar la variabilidad observada para este experimento, que fue mucho más elevada que la registrada en los valores promedio de las esponjas sembradas con MC3T3-E1.

3.4.3.4 Adhesión y proliferación de rBMSC sobre Helistat funcionalizada con vCBD-RGD.

Empleando el método descrito en el apartado 3.3.3.1, se utilizaron esponjas funcionalizadas con 10 μg de vCBD-RGD y posteriormente lavadas con PBS, que fueron sembradas por inmersión en una suspensión de rBMSC a 40.000 células/mL.

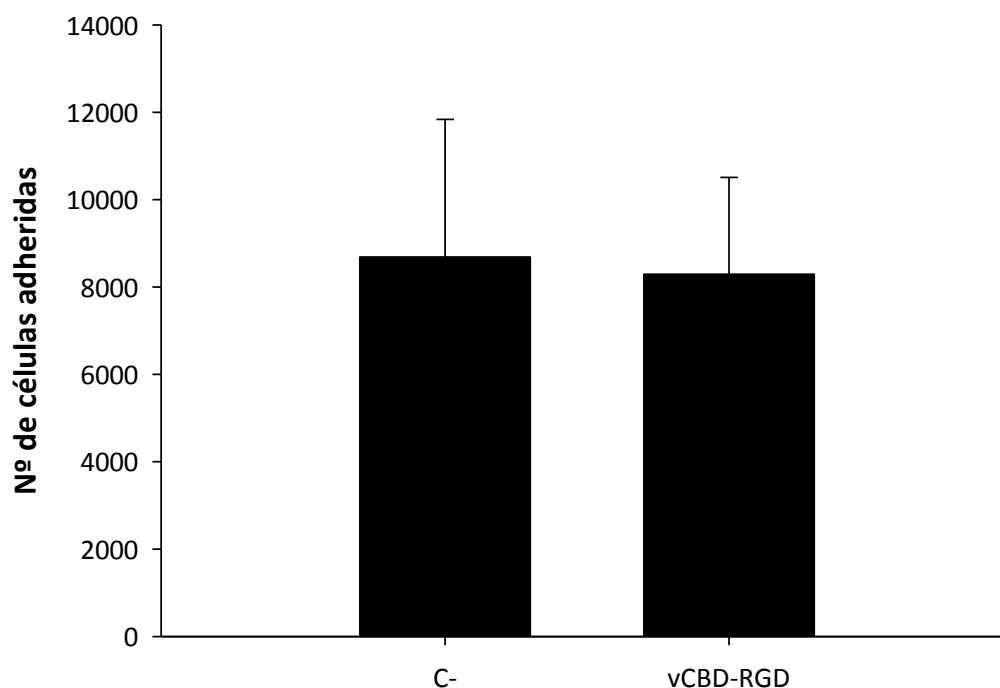


Figura 28. Adhesión de rBMSC a Helistat funcionalizado con vCBD-RGD. Se representan los valores promedio de las células adheridas partiendo de suspensiones celulares con 40.000 células/mL.

Para este tipo celular, no se detectó un aumento en la adhesión sobre el material en respuesta a la funcionalización con vCBD-RGD. Igual que para las MC3T3-E1, se realizaron medidas sobre las mismas esponjas a los días 1, 3 y 7 de cultivo.

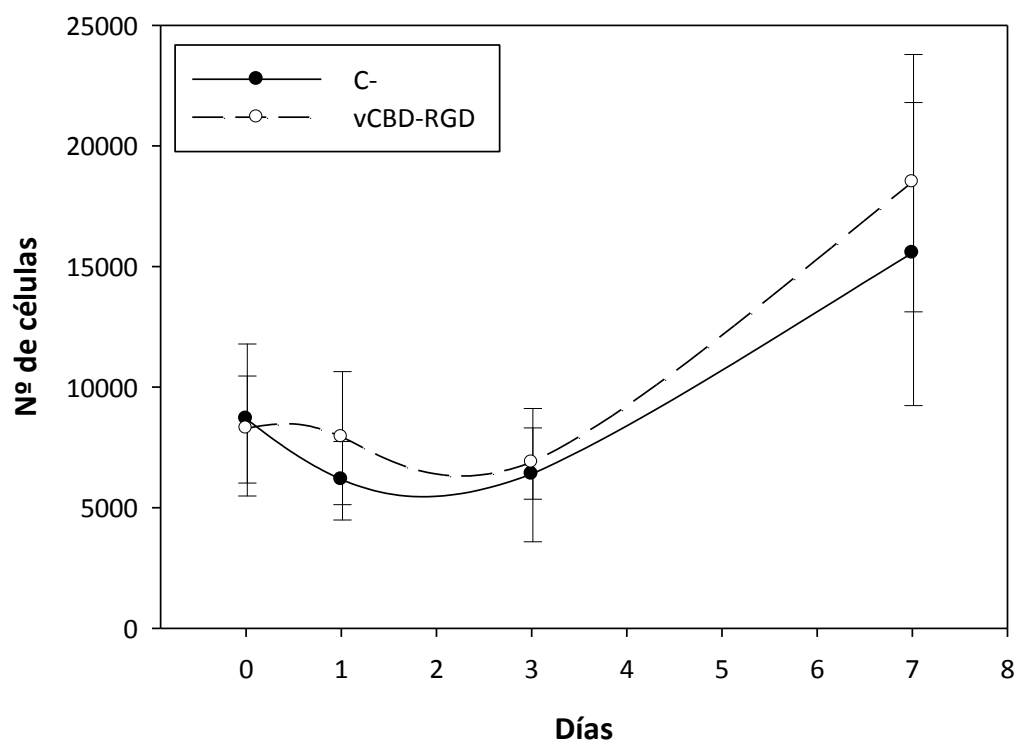


Figura 29. Curva de proliferación de rBMSC sembradas en suspensión sobre Helistat funcionalizado con vCBD-RGD. Se representan los valores promedio en número de células medidos a los 0, 1, 3 y 7 días.

Los datos indican que las células proliferaron sobre las esponjas, pasando de aproximadamente 8.500 células al inicio del período, a entre 15.000 y 18.000 células al término de los 7 días. Para este tipo celular, se evidenciaron niveles de variabilidad especialmente altos, teniendo valores que, en términos porcentuales, alcanzaron a representar hasta el 43% de la media, como ocurre con el control negativo al día 3.

3.4.3.5 Adhesión de células a Helistat funcionalizado (agitación horizontal).

A pesar de los altos valores de variabilidad, se realizaron experimentos de adhesión con ambos tipos celulares pero incluyendo esponjas funcionalizadas con cCBD-PHSRN y su mezcla con vCBD-RGD. Los resultados obtenidos presentaron el mismo problema de variabilidad así como una baja reproducibilidad de un experimento al siguiente (resultados no mostrados).

Debido a ello, se diseñó un protocolo con condiciones de adhesión menos restrictivas y se cambió la metodología de estimación del número de células del ensayo metabólico con Alamar Blue, a la estimación de DNA total mediante el kit de *PicoGreen*, que presenta una sensibilidad más alta y, por tanto, una resolución mayor. En este caso, los valores obtenidos se expresaron en términos de DNA total. La adhesión se realizó en un agitador horizontal de

rodillos que somete a las esponjas a un movimiento más armónico y suave a través de la suspensión celular.

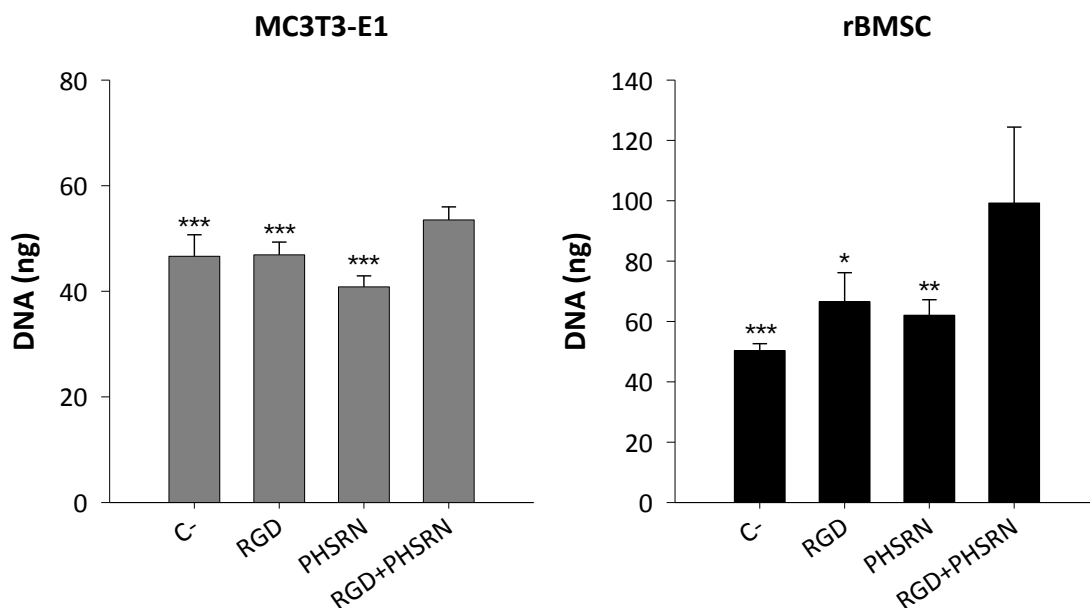


Figura 30. Adhesión de células sobre Helistat funcionalizado con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN. Se representa el promedio de la medición de DNA total como indicador directo de la cantidad de células adheridas sobre las esponjas funcionalizadas, sembradas en suspensión con agitación horizontal. (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$ (***) $p \leq 0,001$; diferencia significativa con respecto a las muestras RGD+PHSRN.

Para ambos tipos celulares, se obtuvieron valores de DNA total con variabilidades menores a los observados con la metodología de siembra anterior, así como una reproducibilidad mucho más alta entre experimentos.

La funcionalización de las esponjas con la mezcla de vCBD-RGD + cCBD-PHSRN, generó un aumento significativo en la adhesión de ambos tipos celulares con respecto al resto de las condiciones testadas. Para las MC3T3-E1, en las esponjas funcionalizadas con la mezcla de ambos péptidos, se adhirieron un 15% más de células que a las esponjas control. En este caso, el RGD solo no indujo aumentos en la adhesión de MC3T3-E1 como los que se observaron cuando se cultivaron en agitación orbital (**Figura 30**).

Para las rBMSC se observó el mismo efecto pero con un aumento de la adhesión en respuesta a la funcionalización con la mezcla de péptidos más elevado. Para este tipo celular, el incremento se cifró en un 82% con respecto al control negativo. La administración de los péptidos por separado no modificó de forma significativa la adhesión de este tipo celular (**Figura 30**).

3.4.3.6 Expresión de genes marcadores de diferenciación osteoblástica.

Como primer paso para comprobar si la funcionalización de las esponjas de Helistat con los péptidos ejercía algún efecto sobre la diferenciación de las células *in vitro*, se realizó un cultivo de MC3T3-E1 sobre esponjas funcionalizadas. Tras 7 días de cultivo en medio completo, se midió la expresión génica de *mAlp* y *mBglap*, ambos marcadores de la diferenciación osteogénica. Las muestras se compararon contra esponjas control positivo que se cultivaron en medio suplementado con 100 ng/mL de rhBMP-2 para asegurar la diferenciación celular en estas condiciones.

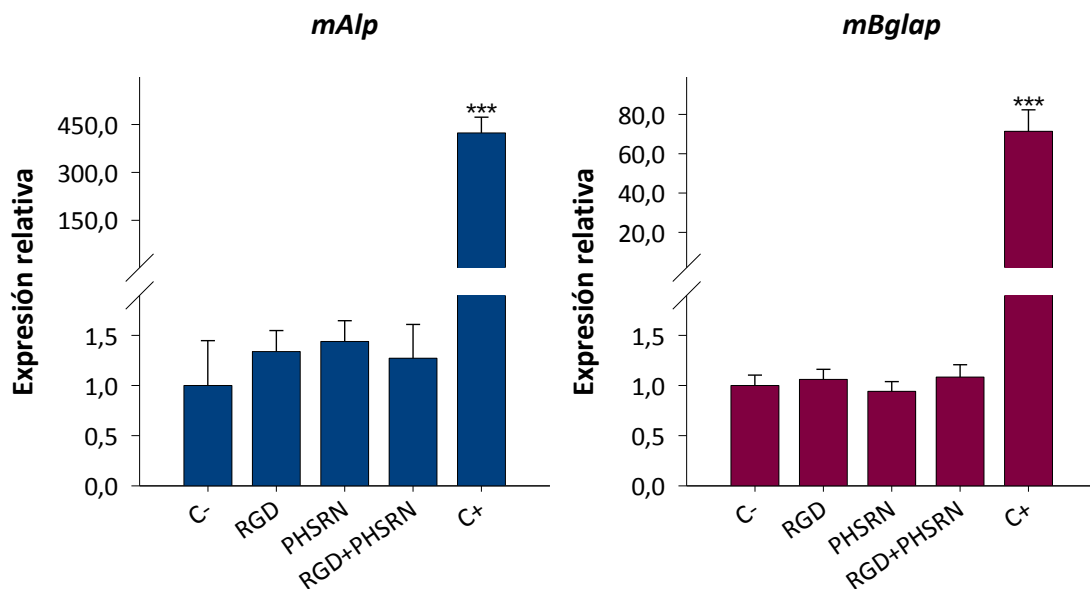


Figura 31. Medición de la expresión de genes marcadores de osteogénesis en respuesta a los péptidos biomiméticos. Se muestra la medición de la expresión relativa de *mAlp* y *mBglap* normalizada contra el gen de referencia *mHprt*. Las barras corresponden a la expresión relativa promedio con respecto a las muestras C- de cada día. Se añadieron controles positivos (C+) con esponjas sin funcionalizar cultivadas en medio suplementado con 100 ng/mL de rhBMP-2. (***) $p \leq 0.001$ Diferencia significativa contra el C-.

En las condiciones testadas, la funcionalización de las esponjas con los péptidos no modificó significativamente la expresión de los genes *mAlp* ni *mBglap*. El tratamiento con rhBMP-2, incrementó fuertemente la expresión de ambos genes, lo cual demostró que las células cultivadas sobre las esponjas tienen la capacidad de continuar su diferenciación osteoblástica (**Figura 31**).

3.4.3.7 Actividad fosfatasa alcalina.

De forma similar, se estudió la actividad FA de MC3T3-E1 sembradas sobre las esponjas funcionalizadas con la mezcla de vCBD-RGD y cCBD-PHSRN (apartado 3.3.3.2). Dado que la actividad FA de las células en respuesta a la mezcla de ambos péptidos disueltos en el medio de cultivo fue positiva a los 14 días de inducción (**Figura 21**), en este experimento se llevó a

cabo la medición a este tiempo. Se realizó el lisado celular y, sobre el mismo, se estimó la actividad FA, la cantidad de DNA total y la actividad FA normalizada.

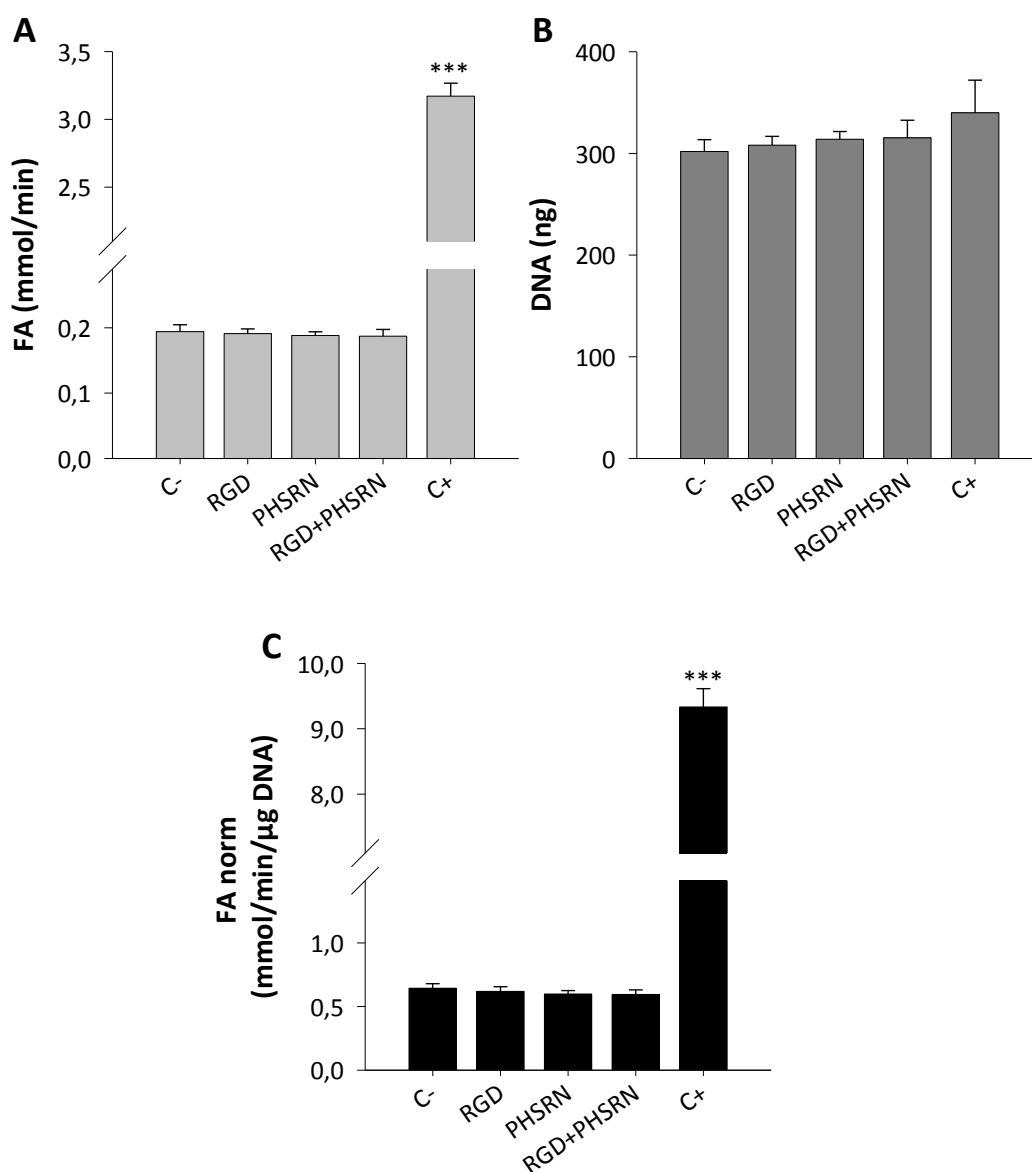


Figura 32. Actividad FA de MC3T3-E1 sembradas en Helistat funcionalizado con vCBD-RGD y/ cCBD-PHSRN. Se muestran los valores promedio de actividad FA total **(A)**, DNA total **(B)** y la FA normalizada contra el DNA **(C)** de los diferentes tratamientos tras 14 días de cultivo en medio completo. Se añadieron controles positivos (C+) con esponjas sin funcionalizar cultivadas en medio suplementado con 100 ng/mL de rhBMP-2. (***) $p \leq 0.001$ Diferencia significativa contra el resto de las condiciones.

En la figura anterior se evidencia que la funcionalización de Helistat con ambos péptidos por separado o combinados, no tuvo influencia sobre la actividad FA de las MC3T3-E1 sembradas sobre las esponjas. Dicha actividad permanece en niveles prácticamente nulos en todas las condiciones ($\approx 0,2$ mmol/min). Es importante destacar que esponjas sembradas en paralelo que se cultivaron en medio suplementado con rhBMP-2 a modo de control positivo,

presentaron valores de aproximadamente 3 mmol/min de actividad promedio, lo cual es una indicación de la capacidad de diferenciación de estas células en el sistema empleado (**Figura 32 A**). Tampoco se observaron cambios en el DNA total y, por tanto, tampoco hubo diferencias en cuanto a actividad FA normalizada (**Figura 32 B y C**, respectivamente).

3.4.4 Diferenciación de células sembradas sobre Helistat funcionalizado con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN en presencia de medio suplementado con rhBMP-2.

3.4.4.1 Curva de actividad de MC3T3-E1 sembradas sobre Helistat en respuesta a rhBMP-2.

Sabiendo que cuando se realiza el cultivo de las esponjas en medio completo no se observa ningún aumento de la actividad FA, se decidió realizar el experimento manteniendo las esponjas en medio suplementado con rhBMP-2 que utilizamos de manera habitual como control positivo. De este modo, se intentó detectar si los péptidos, a pesar de no disparar el proceso osteogénico de forma independiente, podrían tener la capacidad de mejorar el mismo en condiciones osteoinductoras.

Para ello, previamente se realizó una curva de actividad FA de células sembradas sobre Helistat, cultivadas en medio suplementado con concentraciones crecientes de rhBMP-2. Esto se llevó a cabo para optimizar la concentración de rhBMP-2 en el medio en la cual las células sembradas en este sistema tuvieran una actividad detectable pero que, a su vez, aún estuviera lejana a la saturación.

A partir de esta curva, se deduce que la actividad FA se mantuvo inalterada e indetectable para las concentraciones entre 0 y 25 ng/mL de rhBMP-2. A partir de 50 ng/mL se registra el primer aumento significativo de actividad la cual sigue incrementándose de forma directamente proporcional a la concentración de la rhBMP-2 sin alcanzar la saturación (**Figura 33**).

A partir de este resultado, los cultivos sobre las esponjas funcionalizadas, se llevaron a cabo en medio completo suplementado con 50 ng/mL de rhBMP-2.

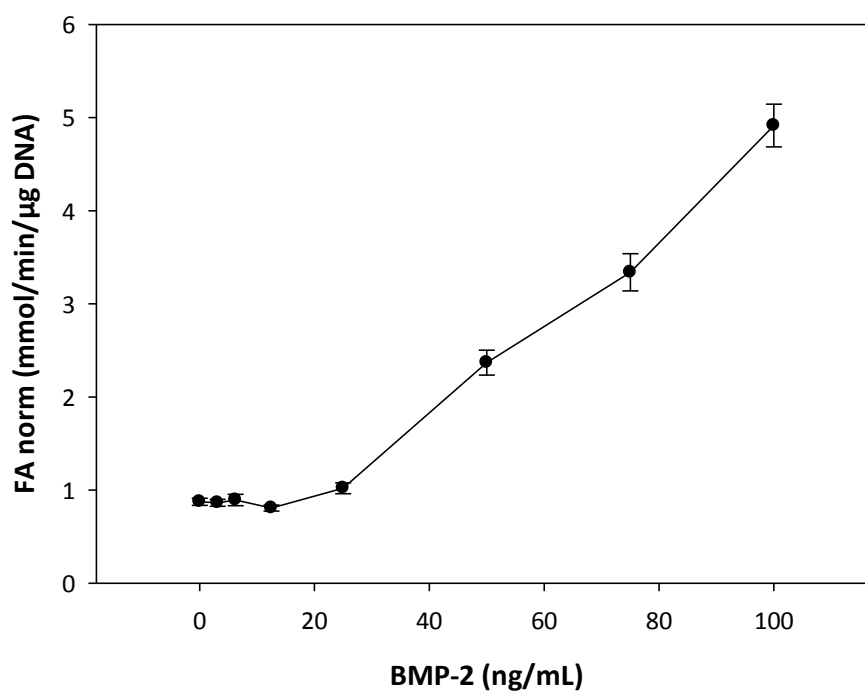


Figura 33. Curva de actividad FA de MC3T3-E1 sembradas sobre Helistat. Se muestra la actividad FA normalizada de las MC3T3-E1 sembradas sobre las esponjas cultivadas en medio suplementado con cantidades crecientes de BMP-2.

3.4.4.2 Expresión de genes marcadores de diferenciación osteoblástica.

En primer lugar, se realizó un experimento en el que se sembraron directamente 50.000 MC3T3-E1 o rBMSC sobre esponjas funcionalizadas únicamente con 10 μg de vCBD-RGD para determinar su efecto en ausencia y presencia de rhBMP-2. A los 7 días, se midió la expresión de los genes *Alp* y *Bglap* para ambos tipos celulares. En el caso de las rBMSC, también se incluyó la medición del gen de la *Sp7*.

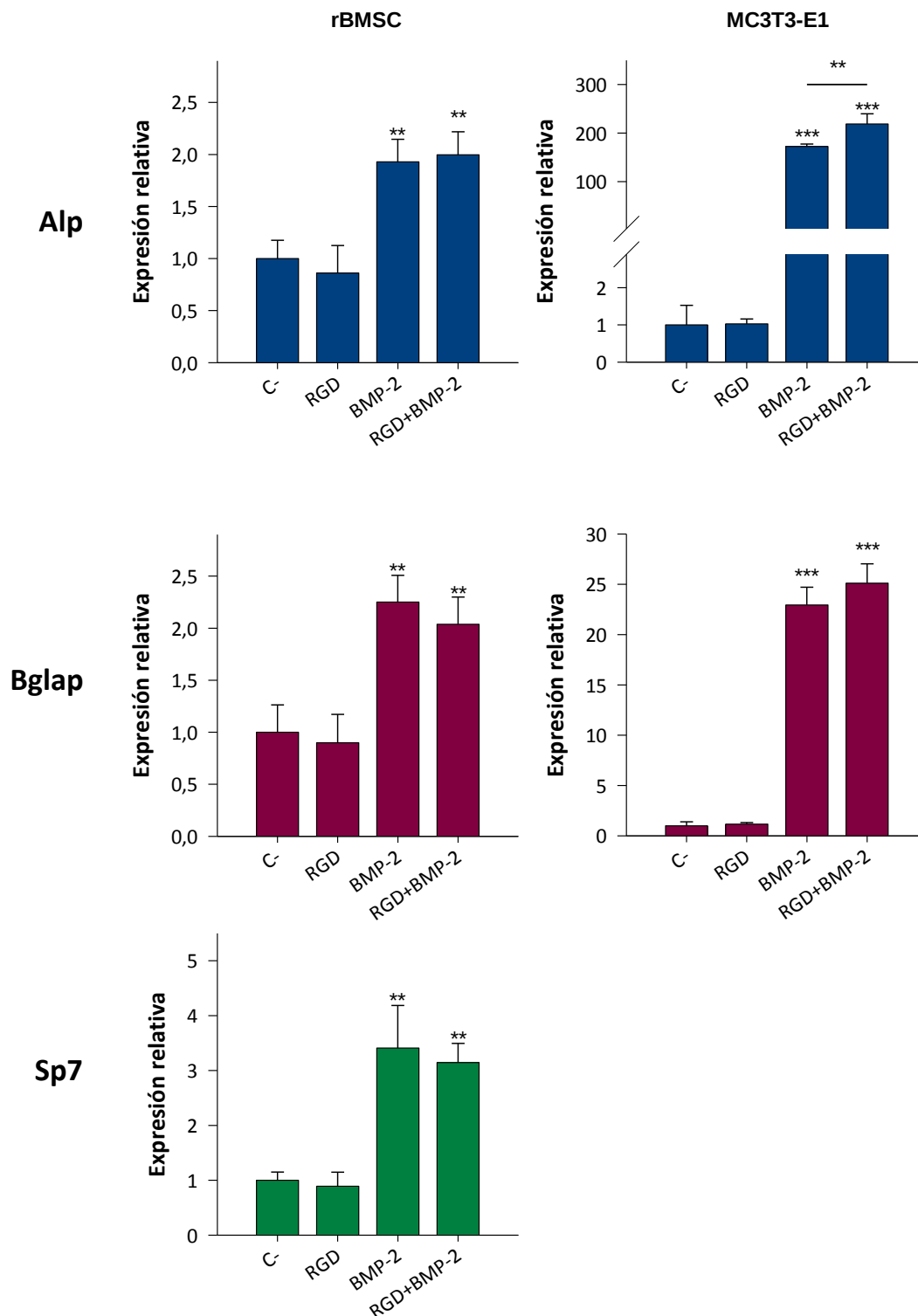


Figura 34. Expresión de genes marcadores de osteogénesis en respuesta a la funcionalización de vCBD-RGD en presencia de 50 ng/mL de rhBMP-2. Se muestra la expresión relativa de cada tratamiento con respecto a la condición C- y normalizado contra *rGapdh* (los genes de rata) y contra *mHprt* (los de ratón). (**) $p \leq 0,01$ (***) $p \leq 0,001$; diferencia significativa con respecto al C-, o entre las muestras que se indican expresamente unidas con una línea.

En el caso de las rBMSC, en ninguna de las condiciones testadas la funcionalización con vCBD-RGD generó un aumento significativo en la expresión de los genes marcadores de diferenciación osteoblástica. Sin embargo, para las MC3T3-E1 se registró un aumento significativo de la expresión de *mAlp* en respuesta a la funcionalización con vCBD-RGD en las esponjas cultivadas en presencia de BMP-2 (**Figura 34**).

3.4.4.3 Actividad fosfatasa alcalina.

También se midió la actividad FA total y normalizada a los días 7 y 14 sobre rBMSC y MC3T3-E1. Ambos tipos celulares se sembraron sobre las esponjas funcionalizadas con las diferentes mezclas de péptidos. En una visión general, se evidenció el fuerte incremento de los valores de actividad FA en respuesta a la adición de rhBMP-2, si se compara con los observados en la **Figura 32**. También es importante destacar la magnitud de los valores. Si bien la actividad FA total de las MC3T3-E1 fue mucho más elevada que la de las rBMSC, el número de células preosteoblásticas fue también más alto dada la mayor tasa de proliferación de estas células con respecto a las rBMSC. En consecuencia, se observó cómo la actividad FA normalizada de las rBMSC fue mucho más elevada que la de las MC3T3-E1 en términos generales.

Observando exclusivamente las MC3T3-E1, la funcionalización con RGD+PHSRN generó un aumento significativo de la actividad FA, tanto total como normalizada, a los 14 días de cultivo (**Figura 35 A y C**). En ningún caso, los péptidos por separado presentaron dicho efecto. Sorpresivamente, el tratamiento RGD+PHSRN tuvo el comportamiento inverso a día 7, disminuyendo ligera, pero significativamente, la actividad FA normalizada en estos cultivos (**Figura 35 C**, barras grises).

Para las rBMSC, el aumento significativo de la actividad FA total se observó para ambos días de medición (**Figura 35 D**). Es también destacable que la actividad enzimática no aumentó apenas entre los días 7 y 14, a pesar de que el número de células prácticamente se duplicó entre las dos medidas (**Figura 35 E**). En consecuencia, la actividad FA normalizada disminuyó significativamente del día 7 al 14 (**Figura 35 F**). Por último, también la funcionalización con cCBD-PHSRN indujo un aumento significativo de la FA total al día 14 de cultivo en las esponjas (**Figura 35 D**).

En líneas generales, la influencia de la funcionalización con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN tuvo una influencia moderada sobre la actividad FA de ambos tipos celulares. Únicamente modificó ligeramente la FA en aquellas condiciones en las que se mezclaron ambos péptidos, especialmente a tiempos largos de incubación.

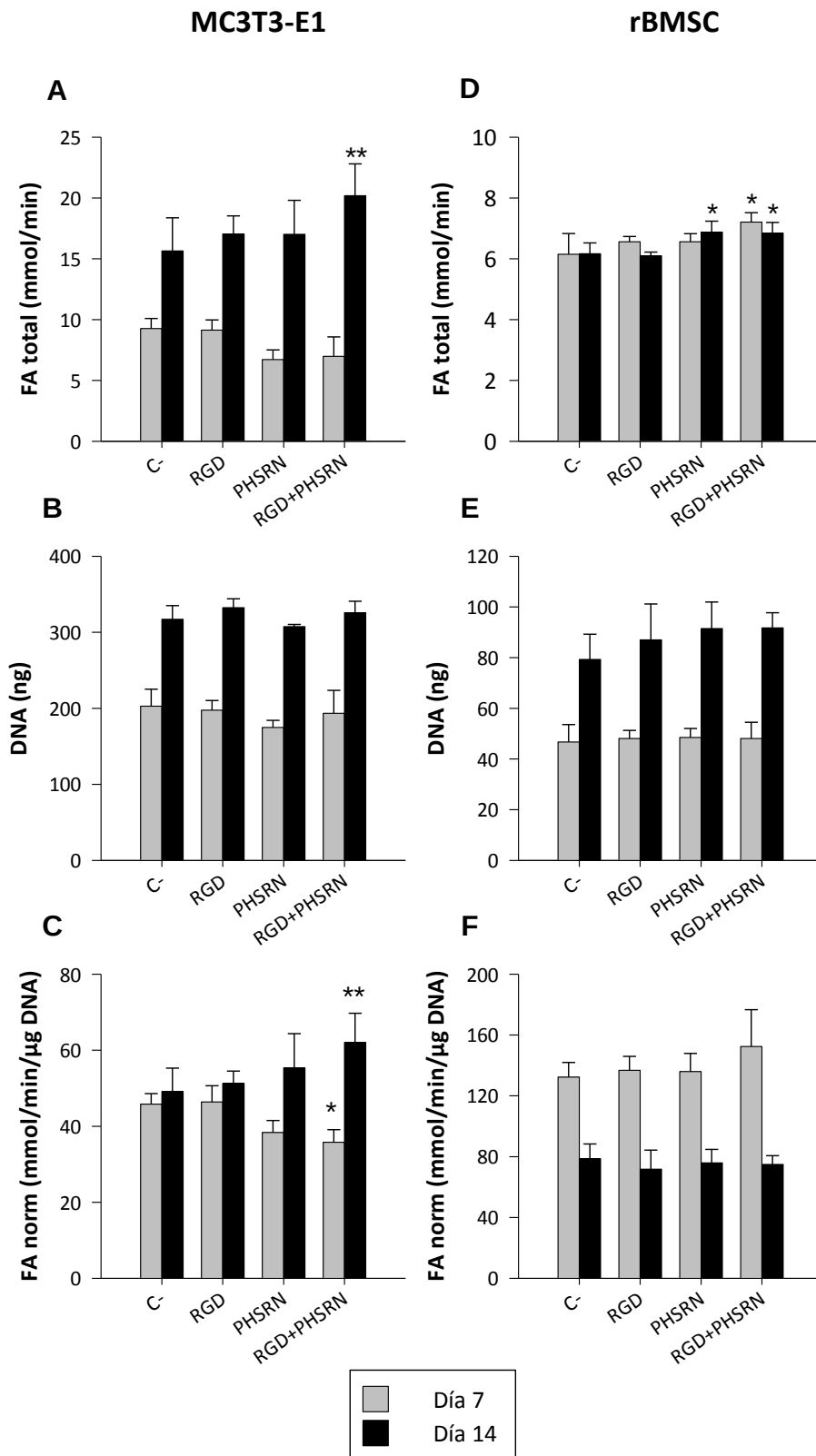


Figura 35. Actividad FA total y normalizada de MC3T3-E1 y rBMSC sembradas en esponjas funcionalizadas con vCBD-RGD y/ cCBD-PHSRN y cultivadas en medio suplementado con 50 ng/mL de rhBMP-2. Se muestran los valores promedio de actividad FA total (**A y D**), DNA total (**B y E**) y la actividad FA normalizada contra el DNA (**C y F**) de MC3T3-E1 y rBMSC a los 7 (en barras grises) y 14 días (barras negras). (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; diferencia significativa (ANOVA de dos vías) con respecto al C- del mismo día.

3.4.4.4 Mineralización.

Para este experimento, la funcionalización con los péptidos se realizó con el método convencional hasta ahora llevado a cabo, mientras que las células se sembraron directamente sobre las esponjas para asegurar que el cultivo partiera de una condición de confluencia. Para ello, se añadieron 100.000 células totales a las esponjas funcionalizadas con los péptidos y se dejaron proliferar durante 48 horas antes de comenzar con la inducción.

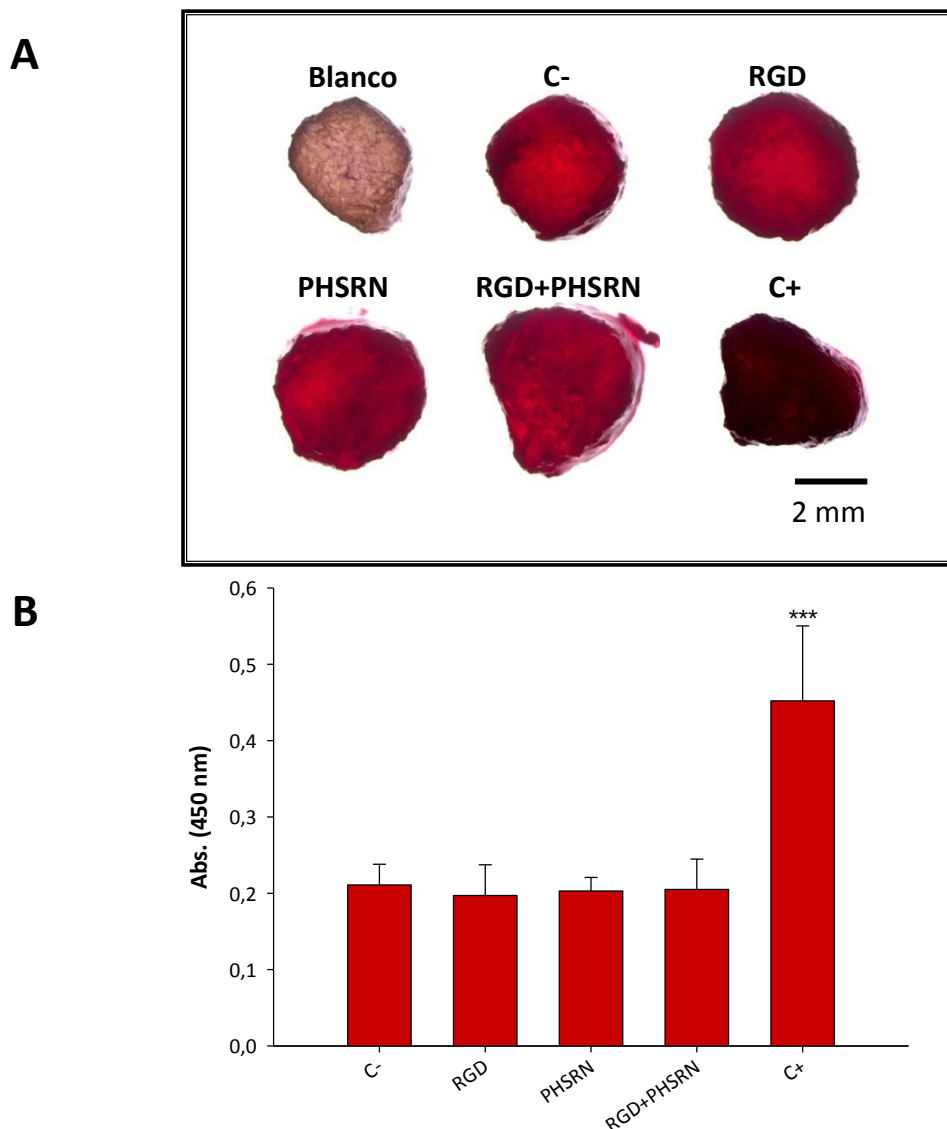


Figura 36. Tinción con rojo de alizarina de esponjas funcionalizadas con los péptidos biomiméticos. Se muestra en **(A)** ejemplos representativos de MC3T3-E1 sembradas sobre Helistat funcionalizado con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN y cultivadas durante 24 días en medio osteoinductor y sometidas a la tinción de rojo alizarina. Se incluye una esponja sembrada en medio no osteoinductor como ejemplo de una tinción negativa (blanco), así como un control positivo sembrado en medio suplementado con 200 ng/mL de rhBMP-6. En **(B)** se muestra el resultado de la cuantificación del colorante extraído de cada una de las condiciones (n=6). (***) $p \leq 0.001$; diferencia significativa (ANOVA de una vía) con respecto al control negativo.

El cultivo se realizó en medio osteoinductor, durante 24 días y se incluyeron esponjas cultivadas en este mismo medio, pero suplementado con 200 ng/mL de rhBMP-6 a modo de control positivo. Experimentos previos similares demostraron que esta condición genera esponjas fuertemente mineralizadas.

En la **Figura 36 A**, se observa que en todas las condiciones hubo mineralización evidenciada por la fuerte acumulación de matriz teñida de rojo en las esponjas. Tanto la observación directa como la extracción del colorante y su cuantificación mediante espectrofotometría, revelaron que únicamente hubo un aumento significativo de la mineralización en las esponjas que se cultivaron en presencia de rhBMP-6 (**Figura 36 B**). En ningún caso, la adición de los péptidos tuvo ningún efecto, negativo o positivo, sobre la mineralización de los preosteoblastos sobre las esponjas.

3.4.5 Actividad biológica *in vivo* de la funcionalización de Helistat con vCBD-RGD y/ cCBD-PHSRN.

A pesar de los resultados poco concluyentes obtenidos hasta este momento en los ensayos *in vitro* mostrados, se decidió llevar a cabo un experimento de osificación ectópica para comprobar si, en un ambiente fisiológico, la adición de los péptidos biomiméticos a las esponjas inducía alguna mejora en la formación de hueso mediada por BMP-2.

Para este ensayo se implantaron esponjas cargadas con las mezclas de péptidos ya testadas para los experimentos *in vitro* anteriores. Una vez funcionalizadas con los diferentes tratamientos, se añadió 1 µg de BMP-2 a cada esponja y se implantaron en los animales como se describe en la sección de materiales y métodos 0.

Los implantes retirados tras 21 días se analizaron con dos metodologías: histología y medición de calcio total.

3.4.5.1 Análisis histológico.

El análisis histológico arrojó resultados variables en cuanto a la formación de hueso ectópico en los implantes. En las condiciones testadas en este ensayo, no se pudo establecer una relación entre la osificación de las muestras y la funcionalización de las esponjas con los péptidos. Para todos los tratamientos (C-, RGD, PHSRN y RGD + PHSRN), hubo muestras en las que no se evidenciaron signos de osificación y muestras en las que hubo una formación de hueso evidente.

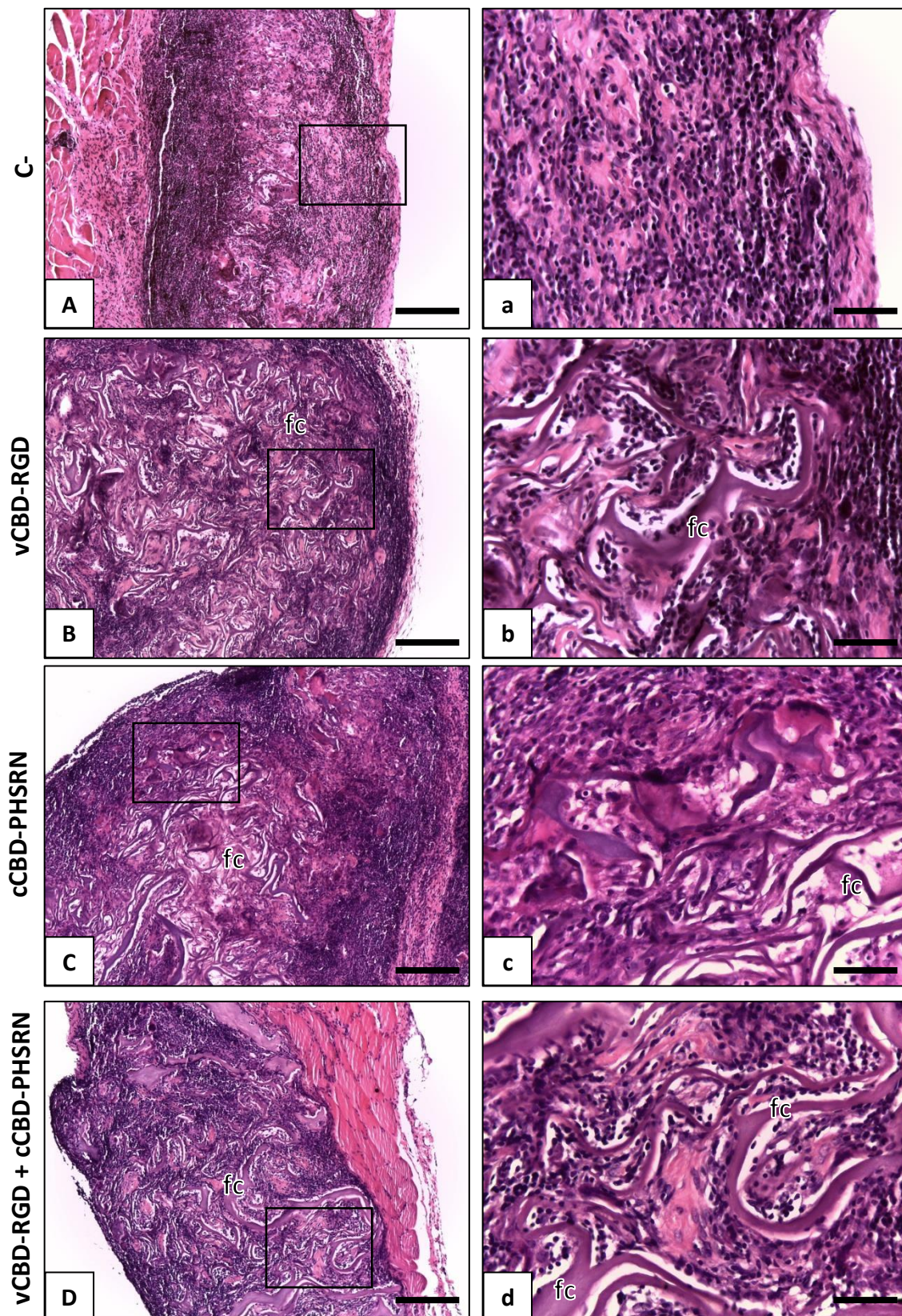


Figura 37. Análisis histológico de la osificación ectópica *in vivo* de las esponjas funcionalizadas con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN. Se muestran implantes representativos de cada tratamiento en los que hubo signos claros de osificación. **(A)** control negativo, **(B)** vCBD-RGD, **(C)** cCBD-PHSRN, **(D)** vCBD-RGD + cCBD-PHSRN. Las imágenes a, b, c, y d corresponden a los detalles encuadrados en las imágenes A, B, C y D, respectivamente. **fc**: restos de fibras de colágeno; **t**: trabécula; **flechas**: osteocitos. Tinción de hematoxilina-eosina. Barras de escala = 200 μ m en A-D; 50 μ m en a-d.

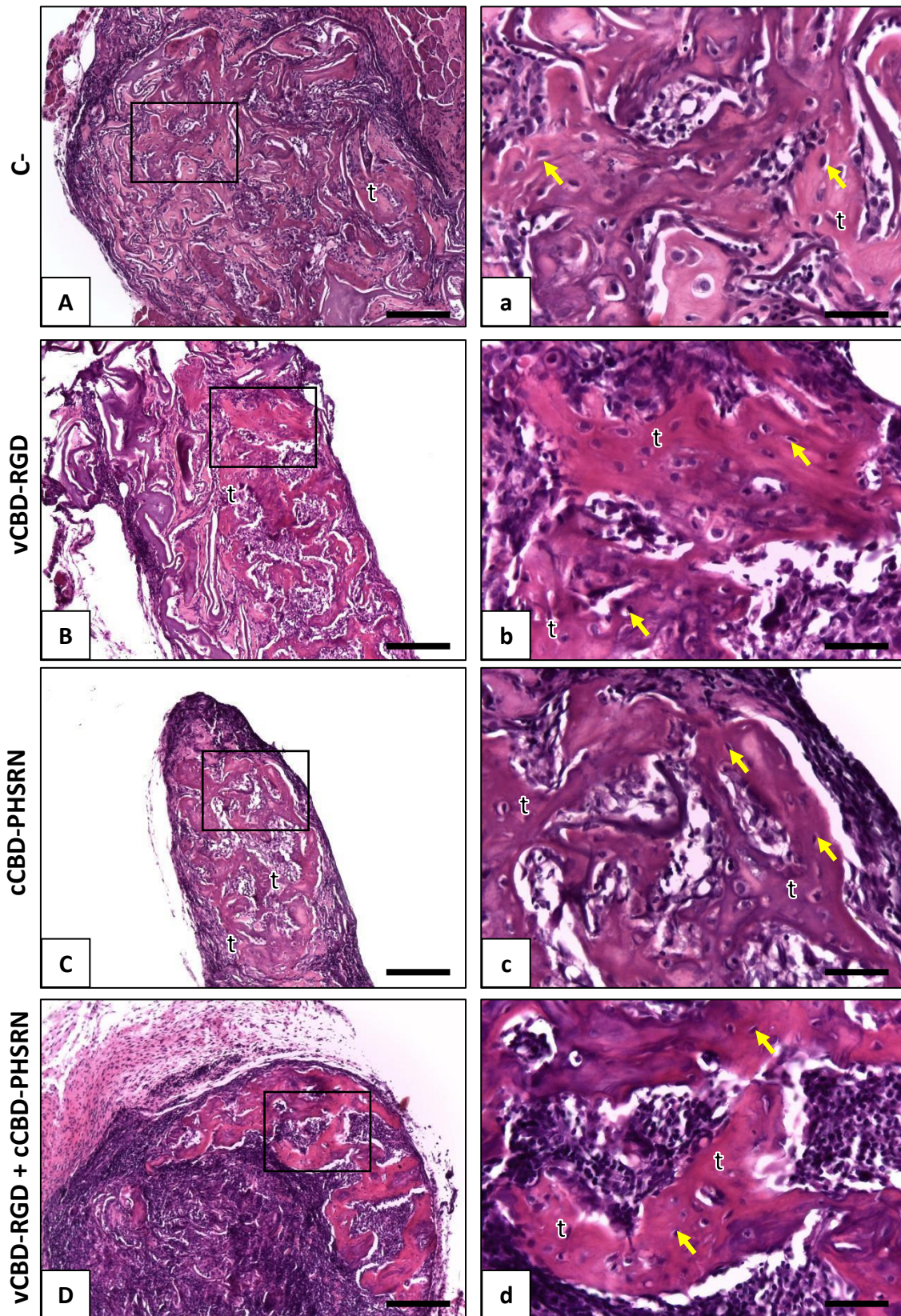


Figura 38. Análisis histológico de la osificación ectópica *in vivo* de las esponjas funcionalizadas con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN. Se muestran implantes representativos de cada tratamiento en los que hubo signos claros de osificación. **(A)** control negativo, **(B)** vCBD-RGD, **(C)** cCBD-PHSRN, **(D)** vCBD-RGD + cCBD-PHSRN. Las imágenes a, b, c, y d corresponden a los detalles encuadrados en las imágenes A, B, C y D, respectivamente. **fc:** restos de fibras de colágeno; **t:** trabécula; **flechas:** osteocitos. Tinción de hematoxilina-eosina. Barras de escala = 200 μ m en **A-D**; 50 μ m en **a-d**.

En la **Figura 37** se expone una representación de muestras de cada uno de los tratamientos en los que no hubo ningún signo de osificación. Se observaron esponjas muy infiltradas de células en las que únicamente se evidenció la formación de un tejido fibrótico con una matriz celular poco definida. En estos implantes se observó un patrón de distribución en el que, en algunos casos, hay una acumulación de células mayor hacia el exterior del implante con un centro más laxo y con mayor presencia de restos de las fibras de colágeno remanentes del material.

Por otro lado, en la **Figura 38** se exponen ejemplos de implantes de cada tratamiento en los que sí se observó tejido óseo maduro con una gran cantidad de osteocitos embebidos en una matriz ósea mineralizada. Se evidenciaron osteoides con bordes bien definidos que pueden distribuirse a lo largo de todo el implante (**Figura 38 A y B**) o estar circunscritos a una zona específica del mismo (**Figura 38 C y D**).

3.4.5.2 Medición de calcio total.

Los resultados de la medición de calcio total presentaron variabilidades muy altas, generada, básicamente, por la variabilidad entre individuos. No hubo diferencias significativas en cuanto a acumulación de calcio por implante asociada a la funcionalización de las esponjas con los péptidos.

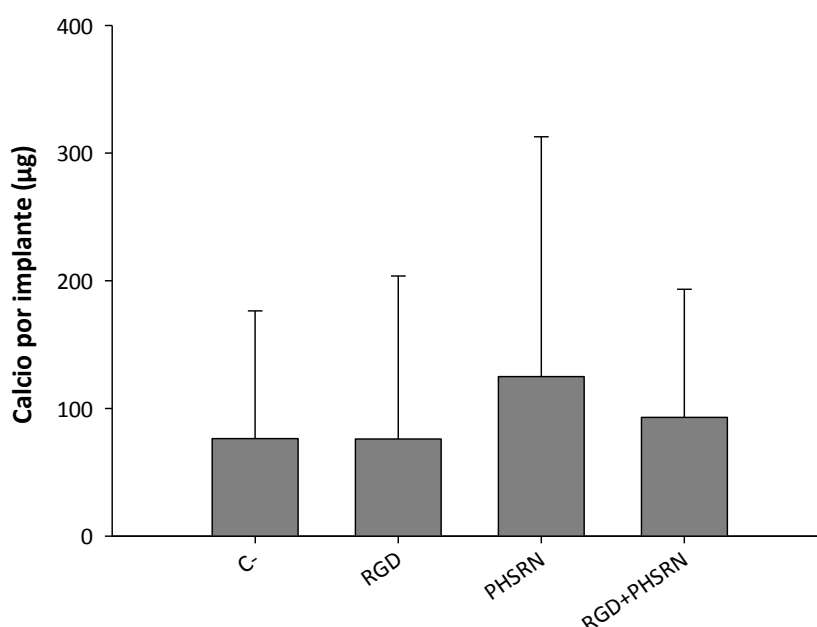


Figura 39. Contenido de calcio de las esponjas funcionalizadas con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN tras 3 semanas de su implantación. Se muestran los valores promedio de la cantidad de calcio total por esponja para cada tratamiento.

Los resultados de este ensayo confirman lo observado en el análisis histológico, puesto que, para cada tratamiento, se tuvieron implantes con niveles de acumulación de calcio elevados y réplicas de los mismos en los que hubo niveles de mineralización por debajo del límite de detección de la técnica empleada.

4 Sección B: Combinación de factores de crecimiento alternativos a BMP-2 para la mejora del sistema colágeno-BMP: BMP-6 e IGF-1.

4.1 Introducción a la sección B.

A día de hoy, tanto la FDA como la EMA tienen aprobado el empleo de BMP-2 y de BMP-7 en determinados procedimientos de cirugía ortopédica como principal alternativa al uso del injerto de hueso autólogo, para intentar mejorar la regeneración del hueso afectado. Sin embargo, como ya se ha comentado en secciones anteriores, se han registrado tasas relativamente altas de efectos secundarios nocivos en determinados escenarios terapéuticos, a causa de las altas dosis de BMP que se suministran en los productos disponibles en el mercado.

En la sección A se ha desarrollado la importancia que tienen las señales provenientes de la ECM en el proceso de osificación, en un intento de mimetizar, lo más fielmente posible, el microambiente natural característico del tejido óseo.

Otra posibilidad para incrementar la similitud de los implantes con el ambiente natural de un hueso que se regenera normalmente, es la inclusión de mezclas de diferentes factores de crecimiento. La regeneración ósea tras una fractura es un proceso multifactorial en el que suceden una serie de eventos controlados por un gran número de señales moleculares. Éstos regulan los procesos de inflamación inicial, la formación del callo cartilaginoso, su vascularización, la formación del callo óseo y la remodelación ósea final.

Dentro de estos factores de crecimiento, las BMP juegan un papel esencial durante prácticamente todas las fases del proceso. En la clínica, se utiliza de forma rutinaria la BMP-2 por su alto potencial osteoinductor, mientras que la BMP-7 se encuentra actualmente fuera del mercado por razones comerciales. Sin embargo, otros miembros de la familia de las BMP presentan actividad osteogénica y ejercen influencia sobre distintas fases del proceso, como la formación de cartílago, la diferenciación osteoblástica, la activación de osteoclastos, la regulación del calcio y otros (**Tabla 1**).

De entre todas las BMP que se conocen, tanto trabajos previos realizados en nuestro grupo de investigación como los realizados por otros grupos, han demostrado que la proteína BMP-6 puede tener un potencial osteogénico más alto que BMP-2 tanto *in vitro* como *in vivo* (Mizrahi et al., 2013; Visser et al., 2012, 2016b; Vukicevic y Grgurevic, 2009). Sobre la base de estos resultados previos, se desarrollará la siguiente sección de este trabajo.

4.1.1 Uso de factores de crecimiento alternativos a las BMP-2 o -7: la BMP-6.

4.1.1.1 Estructura general de la BMP-6.

La BMP-6 se aisló por primera vez a partir de una librería de cDNA de ratón y se le asignó el nombre de Vgr-1 (derivado de la denominación en inglés *Vg related-1*) por su analogía con el gen Vg de *Xenopus sp* (Lyons, Pelton y Hogan, 1989). Posteriormente, fueron aislados los homólogos de origen bovino y humano y se les asignó el nombre de BMP-6 (Celeste et al., 1990).

La BMP-6 pertenece a la superfamilia de las TGF- β y, a su vez, está comprendida dentro de la familia de las BMP. El estudio filogenético de las secuencias indica que la BMP-6 tiene un alto porcentaje de homología a otras proteínas, como BMP-5, -7 y -8, mientras que está menos relacionada con otras BMP como la BMP-2 y la -4 (Ducy y Karsenty, 2000).

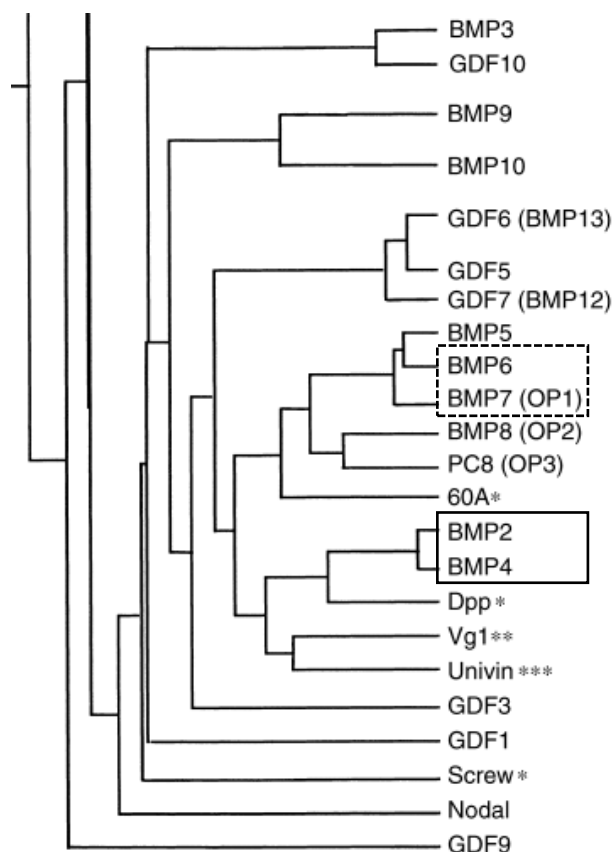


Figura 40. Relación filogenética entre algunos miembros de la familia de las BMP. Homología calculada a partir de las secuencias aminoacídicas de los dominios de unión a ligando de cada proteína. La longitud de las líneas horizontales es proporcional a la distancia genética entre las secuencias que unen. Las secuencias se derivan de *Drosophila* sp. (*), *Xenopus* sp (**), de erizo de mar (***) y de humano (sin marca). Imagen tomada de (Ducy y Karsenty, 2000). El recuadro con línea discontinua destaca el grupo al que pertenece la BMP-6, mientras que el recuadro con línea continua engloba al grupo al que pertenece la BMP-2.

La estructura de las BMP determina directamente su afinidad por los diferentes receptores disponibles, los cuales se clasifican de la siguiente manera:

Tipo I		Tipo II	
Nombre	Nombre alternativo	Nombre	Nombre alternativo
TSR-I	ALK1	BMPR-II	-
ActR-I	ALK2	ActR-II	-
BMPR-IA	ALK3	ActR-IIb	-
ActR-Ib	ALK4		
BMPR-IB	ALK6		

Tabla 7. Receptores de BMP. Se muestran los nombres comunes y nombres alternativos asignados a los receptores de tipo I y de tipo II que interactúan con las diferentes BMP. Modificado de (Mueller y Nickel, 2012).

La señalización de las BMP requiere la interacción simultánea con, al menos, un receptor tipo I y un receptor tipo II. Se ha demostrado que cada BMP se une con afinidades diferentes a los diversos receptores tipo I y tipo II, lo cual determina las rutas de señalización que se activan como consecuencia de esta interacción. Además, la expresión de los receptores de BMP varía ampliamente entre tipos celulares y estadios de diferenciación, por lo que la diversidad de respuestas ante las señales ejercidas por las BMP es muy amplia (Nohe et al., 2004).

De hecho, a pesar de tener un porcentaje de homología del 87% con BMP-7, BMP-6 tiene una afinidad por el receptor tipo I BMPR-IA veinte veces mayor que BMP-7, siendo éste un buen ejemplo de la alta especificidad que existe entre las BMP y sus receptores (Vukicevic y Grgurevic, 2009).

En el caso de BMP-6, se ha demostrado que fosforila fuertemente a la Smad5 mientras que ejerce una influencia menor sobre la Smad1 y prácticamente no actúa sobre la Smad8, que permanece constitutivamente fosforilada (Ebisawa et al., 1999). Otras BMP presentan patrones de activación de Smad diferentes que derivan en una actividad distinta para cada una de ellas.

4.1.1.2 Actividad biológica de la BMP-6.

La proteína BMP-6 es una de las BMP que, junto con la -2, -4, -7 y -9, juega un papel destacado durante la diferenciación osteogénica y, en consecuencia, a lo largo del proceso de osificación (Luu et al., 2007). Durante el desarrollo embrionario, se expresa principalmente en el cartílago hipertrófico. A pesar de su contribución durante la osteogénesis, ratones transgénicos deficientes para el gen de *Bmp-6* son viables, fértiles, y no presentan defectos notables en ningún órgano, más allá de un desarrollo tardío del esternón. Dado que BMP-6 y BMP-2 se coexpresan durante buena parte del proceso de formación ósea, se planteó la hipótesis de que la presencia de BMP-2 pueda compensar la ausencia de BMP-6 (Chen et al., 2004).

Como la gran mayoría de las BMP, BMP-6 es un factor pleiotrópico que ejerce su efecto sobre diferentes procesos celulares. Un buen ejemplo de ello es la influencia que tiene

sobre la hemostasis del hierro en el organismo. La expresión del gen de *Bmp-6* está directamente regulada por los niveles de hierro disponibles. Adicionalmente, la presencia de la proteína BMP-6 estimula la expresión de hepcidina, que es una hormona peptídica producida en el hígado, la cual ejerce funciones de regulador central del metabolismo del hierro. La disrupción del gen de *Bmp-6* deriva en la reducción de la producción de hepcidina, con una consecuente acumulación rápida y masiva de hierro en el hígado. Esta función no es redundante en otras BMP puesto que, a pesar de su alta homología con BMP-5, -7 y -8, ninguna de estas tiene influencia sobre este mecanismo (Meynard et al., 2009).

La BMP-6 también interviene de forma activa sobre el proceso de regeneración ósea tras una fractura. Los patrones temporales de expresión génica de catorce BMP se han estudiado a partir de tejido obtenido de fracturas de tibia en ratones, durante un período de 28 días de seguimiento. A partir de este análisis, se determinó que el gen de *Bmp-2* tiene un pico máximo de expresión en el día 1 tras la lesión. Sin embargo, se detectó una expresión constitutiva del gen de *Bmp-6* entre los días 3 y 21 tras la fractura, por lo se presume que interviene durante diversas fases del proceso (Cho et al., 2002).

4.1.1.3 Potencial osteogénico de BMP-6.

La capacidad de la BMP-6 de inducir la diferenciación osteogénica de células indiferenciadas se ha demostrado empleando modelos *in vitro*. En un estudio realizado con células pluripotentes (C3H10T1/2), células mioblásticas (C2C12) y osteoblastos (TE-85), transfectados con genes de diferentes BMP, se demostró que la inclusión de los genes BMP-6 o BMP-9 genera células con una respuesta osteogénica más potente que la observada en las células transfectadas con el gen de BMP-2, especialmente en los tipos celulares más indiferenciados. La transfección con los genes de BMP-4 y BMP-7, ejerce un efecto osteogénico, aunque significativamente más débil (Cheng et al., 2003). Estos resultados demuestran claramente el potencial osteogénico de BMP-6 y su influencia sobre tipos celulares de diferentes estadios de maduración.

En otro estudio se demostró la capacidad de los mioblastos C2C12 transfectados con el gen de *Bmp-6* de formar tejido óseo *in vivo*. Así, cuando fueron inyectadas en el cuádriceps de ratones inmunodeprimidos, estas células indujeron la formación de hueso ortotópico, detectable tanto radiológicamente como histológicamente (Kang et al., 2004).

Más adelante, se comprobó que la administración exógena de BMP-6 sobre cultivos de MSC humanas también induce fuertemente su diferenciación osteogénica. Estas células se trataron con BMP-2, -4, -6 y 7, y los resultados indicaron que BMP-6 fue el osteoinductor más consistente y potente de todos los antes mencionados. La adición de BMP-6 indujo el aumento de la expresión de varios genes marcadores de osteogénesis, la producción de proteínas de la ECM características del hueso y la mineralización de la matriz secretada por las células (Friedman et al., 2006).

Todas estas características convierten a la proteína BMP-6 en una posible alternativa al uso de BMP-2 en estrategias clínicas orientadas a mejorar la regeneración ósea. Dado su alto potencial osteoinductor, se podría obtener una mejor y más rápida regeneración del tejido óseo que la observada en respuesta a BMP-2, utilizando dosis más bajas que limiten los

posibles efectos secundarios asociados a su administración y disminuyan los altos costes derivados del empleo de estos factores de crecimiento recombinantes en la clínica.

4.1.2 Uso de factores de crecimiento alternativos a la BMP-2 o BMP-7: Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1).

Durante el proceso de osificación interviene una amplia gama de factores de crecimiento y citoquinas que, aunque no presentan actividad osteoinductora, regulan procesos tales como la fase inflamatoria inicial, el reclutamiento de los precursores mesenquimales, el crecimiento celular, la angiogénesis o la resorción ósea (**Figura 5**).

Dado que la osificación es un proceso multifactorial, una de las posibilidades que se contemplan en el diseño de estrategias de ingeniería tisular para mejorar la regeneración del hueso afectado, es la inclusión de otros factores de crecimiento que puedan potenciar la actividad osteoinductora de las BMP.

El empleo de mezclas de factores de crecimiento para incrementar el potencial osteoinductor de las BMP es una interesante alternativa que se ha venido explorando en los últimos años. Generalmente, la aproximación implica el uso de una BMP con potencial osteoinductor mezclada con algún factor de crecimiento que potencie de forma directa dicha actividad o que participe en otro proceso fisiológico que favorezca la osificación.

Factores de crecimiento como el FGF-2 han sido utilizados para potenciar la actividad osteoinductora *in vivo* de BMP-2 (Charles et al., 2015) y de BMP-6 (Visser et al., 2012). En el primer caso, el efecto se atribuye a la capacidad de inducir la proliferación celular del FGF-2 mientras que en el segundo estudio, el análisis de las muestras *in vivo* permite deducir que las dosis empleadas de FGF-2 mejoran la regeneración ósea potenciando la angiogénesis en la zona (Visser et al., 2012).

Otros factores, como PDGF-BB, también mejoran los efectos osteoinductores de la BMP-2. En un estudio se cultivaron células osteoblásticas sobre superficies de titanio en las que se coinmovilizaron PDGF-BB y BMP-2. La presencia de ambos factores generó aumentos en el crecimiento celular y en diferentes marcadores de diferenciación osteogénica en comparación con las células cultivadas sobre superficies en las que únicamente se inmovilizó la BMP-2 (Kim et al., 2015). En otro estudio similar realizado sobre preosteoblastos de ratón, el PDGF-BB potenció la inducción osteogénica mediada por BMP-6 (Demirtaş et al., 2015).

Resultados similares se han obtenido para mezclas de BMP-2 con el factor EGF. El tratamiento con la combinación de estos dos factores aceleró significativamente la regeneración del hueso en un modelo de defecto óseo en calvaria de ratón, con respecto al tratamiento en el que únicamente se suministró BMP-2 (Lee et al., 2015).

Otro de los factores de crecimiento que se ha puesto a prueba para intentar mejorar el potencial osteoinductor de las BMP es el IGF-1. Trabajos previos han demostrado que este factor puede potenciar el efecto osteoinductor de BMP-7 (Yeh et al., 1997), BMP-2 (Doorn et al., 2013) y BMP-9 (Chen et al., 2016).

Dado el potencial que tiene el IGF-1 de mejorar la osteoinducción mediada por otras BMP, aunado al fuerte poder osteoinductor que presenta la BMP-6, en este trabajo se

explorará la mezcla entre estos dos factores como una alternativa a las terapias clásicas para mejorar la osificación.

4.1.2.1 Características generales de IGF-1.

El IGF-1 y el IGF-2 fueron identificados por Salmon y Daughaday en 1957. Inicialmente, se les dio el nombre de “*sulphation factors*” por su capacidad para incorporar grupos sulfato en el cartílago de rata. Más adelante, se describió que estas sustancias estaban bajo el control de los efectos de la hormona de crecimiento y se les asignó el nombre de somatomedinas (Daughaday et al., 1972). Ya en 1976, Rinderknecht y Humbel aislaron 2 sustancias activas a partir del suero humano y las nombraron “*insulin-like growth factor 1 y 2*” por su semejanza estructural a la insulina (Rinderknecht y Humbel, 1976).

Debido a su pequeño tamaño, el IGF-1 es considerado un péptido, constituido por 70 aminoácidos, con una masa molecular de aproximadamente 7.649 Da. Tal y como ocurre con la insulina, está formado por dos cadenas (A y B) conectadas por un puente disulfuro. De hecho, como una prueba de su alta homología estructural con la insulina, se ha demostrado que tiene la habilidad de unirse, con baja afinidad, a los receptores de insulina (Laron, 2001).

La señalización de IGF-1 ocurre mayoritariamente a través del receptor de IGF tipo 1 (IGF1R) (**Figura 41**). Este receptor está formado por un heterotetrámero compuesto de dos subunidades α extracelulares que interactúan con el IGF-1, y dos subunidades β con actividad tirosina quinasa que activan, principalmente, dos rutas de señalización (Laron, 2001). Por un lado, el receptor se autofosforila, lo cual genera complejos en los que se unen las proteínas IRS1/IRS2 que, a su vez, activan la ruta de señalización de fosfatidil inositol trifosfato (PIP₃). Este hecho da lugar a la señalización de mTOR/AKT, que desencadena procesos anabólicos tales como la síntesis de proteínas, el crecimiento celular, el aumento de las tasas de conversión de glucosa en glucógeno y la inhibición de la apoptosis. Además, también se activa la ruta de RAS/MAPK la cual deriva en un aumento significativo de la proliferación celular (Zha y Lackner, 2010).

La señalización a través de estas rutas ejerce su influencia sobre una gran cantidad de procesos fisiológicos, siendo la formación de hueso uno de los procesos sobre los que el IGF-1 tiene un efecto más significativo. En el siguiente apartado se describirá con más detalle la influencia de IGF-1 sobre la osificación, sobre los diferentes tipos celulares que intervienen en dicho proceso, así como su capacidad de potenciar el efecto osteoinductor de las BMP.

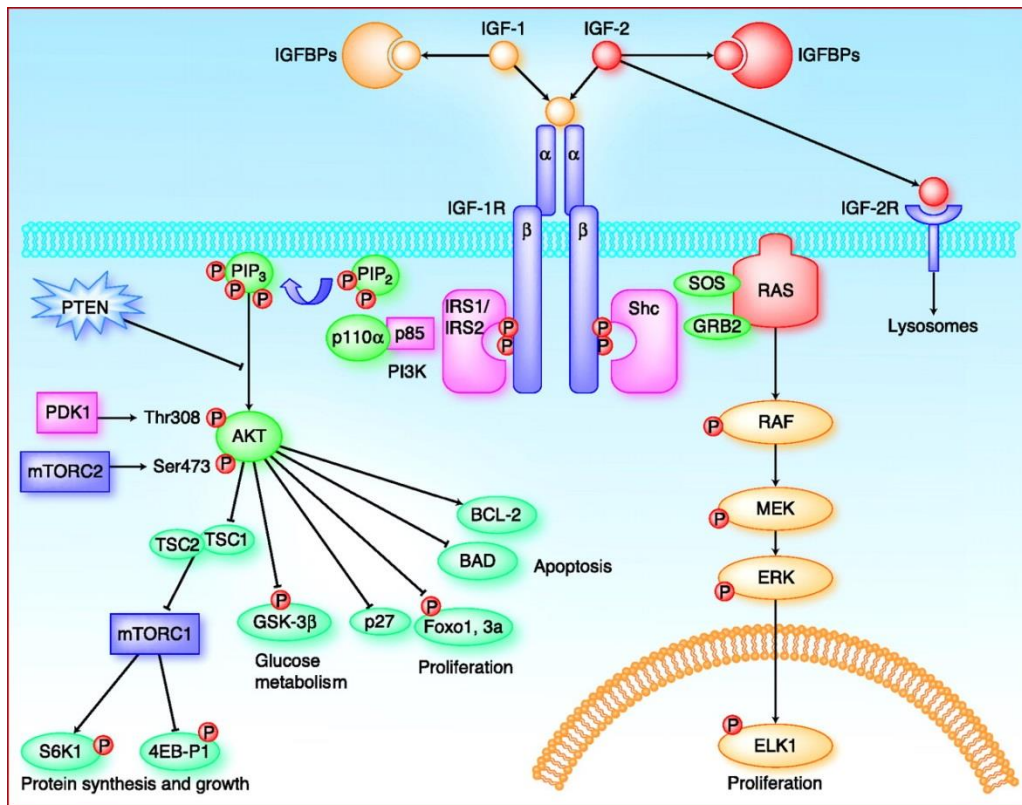


Figura 41. Representación esquemática de la vía de señalización de IGF-1 (Zha y Lackner, 2010).

4.1.2.2 Influencia directa del IGF-1 sobre el proceso de osificación.

La producción de IGF-1 en el organismo ocurre principalmente en el hígado, en respuesta a la secreción de la hormona de crecimiento (HC). Sin embargo, se ha demostrado que el IGF-1 se produce en prácticamente todos los tejidos, por lo que también ejerce un papel fundamental por las vías autocrina y paracrina. Dado que el eje HC-IGF-1 es un regulador directo del crecimiento de los organismos, su acción está fuertemente relacionada con el alargamiento de los huesos y, por tanto, con la estimulación del proceso de osificación (Yakar et al., 2002).

En una revisión realizada por Yakar y colaboradores (2010) se exponen diferentes estudios realizados en modelos animales con mutaciones en los genes de *Igf-1* o de su receptor *Igf1r*. En líneas generales, se puede observar que la interrupción del gen deriva en la disminución del tamaño del animal, especialmente patente en la longitud de los huesos largos. Sin embargo, los efectos de esta disrupción no se circunscriben únicamente al crecimiento de los huesos, sino que se observan también en la densidad mineral ósea, tanto del hueso cortical como del trabecular (Yakar et al., 2010). Este hecho demuestra que el IGF-1 no actúa únicamente como un factor endocrino, sino que ejerce una importante actividad como factor de crecimiento de forma local en los tejidos.

De hecho, en trabajos más recientes, se ha estudiado de manera específica la acción de IGF-1 sobre el hueso mediante el bloqueo de la actividad de IGF-1/IGF-1R en células óseas de ratones transgénicos. La mutación condicional del gen de *Igf-1* en células que expresan

colágeno tipo I (entre las que se encuentran las células óseas), genera una letalidad al nacimiento de entre un 40 y un 50 %, lo cual es similar a lo observado en ratones con disrupción total del gen. A pesar de que la mutación condicional no generó una disminución de los niveles de IGF-1 en sangre, tuvo como consecuencia la reducción del peso corporal, de la densidad mineral ósea y de la función osteoblástica en general. Este conjunto de resultados demuestra la influencia que IGF-1 ejerce sobre la osificación, de forma independiente a su señalización endocrina (Govoni et al., 2007).

En un trabajo con una aproximación similar, se estudió el efecto de la mutación condicional del gen de *Igf-1* en células osteoblásticas sobre la transducción de estímulos mecánicos en la osificación. Ratones normales sometidos a carga mecánica alta presentaron aumentos significativos en diversos indicadores de crecimiento esquelético medidos por técnicas de histomorfometría, tales como el área total de los huesos largos, el contenido mineral total, la densidad ósea, el número de trabéculas, el grosor trabecular y el grosor del hueso cortical. Sin embargo, los ratones cuyas células óseas expresaban la versión mutada de *Igf-1*, no presentaron respuesta alguna ante la estimulación mecánica. Este estudio establece una relación directa entre la señalización paracrina y autocrina de IGF-1 sobre células óseas. También se define el papel fundamental de IGF-1 en la transducción de señales mecánicas en el hueso que está directamente relacionada con las propiedades mecanosensitivas que presentan los osteocitos maduros (Kesavan et al., 2011).

4.1.2.3 Acción de IGF-1 sobre los diferentes tipos celulares implicados en la osificación.

A nivel celular, se ha demostrado que IGF-1 puede ejercer su actividad sobre los principales tipos celulares que intervienen durante la osificación, como son MSC, condrocitos, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos.

Se ha observado que el tratamiento con IGF-1 exógeno sobre MSC de pulpa dental aumenta, por la vía de mTOR (**Figura 41**), la expresión de genes marcadores de osteogénesis como *Runx2*, *Bglap* (osteocalcina), *Sp7* (ostérix) y *Col1a1* (Feng et al., 2014). En otro trabajo, MSC humanas transfectadas con el gen de *Igf-1* presentaron un aumento significativo de la expresión de *Col1a1*, *Alp* y *Runx2* en condiciones de cultivo en las que no se incluyó ningún factor osteoinductor (Koch et al., 2005). En ambos casos, se puso de manifiesto una relación directa entre la actividad de IGF-1 y el aumento en la expresión de genes que orientan a las MSC hacia el linaje osteoblástico.

En el caso de los osteoblastos se ha establecido que IGF-1 puede promover su proliferación *in vitro*, así como mejorar su diferenciación y su capacidad de mineralización cuando se cultivan en medio osteogénico (Zhang et al., 2012). IGF-1 también regula la hipertrofia y mineralización de los condrocitos durante la osificación endocondral. En ratones transgénicos con mutaciones dirigidas en las que sus condrocitos carecen de la expresión del receptor de IGF-1 (IGFR1), se observó un retraso en la hipertrofia de los condrocitos en la placa de crecimiento y una fuerte disminución de la mineralización, fundamentalmente asociada a la merma en la expresión del factor de transcripción ostérix (Heilig et al., 2016).

También se ha demostrado que la diferenciación osteoclástica está influenciada por la acción de IGF-1. Aunque hay menos datos disponibles sobre los mecanismos que controlan

este proceso, existen varias evidencias *in vitro* de que IGF-1 tiene influencia sobre el número de osteoclastos y su función. Ratones transgénicos que no expresan IGF-1, presentan números más bajos de osteoclastos y una expresión de marcadores de osteoclastogénesis (RANKL, RANK y M-CSF) disminuida (Wang et al., 2006).

En resumen, el IGF-1 ejerce una fuerte influencia sobre el proceso de osificación puesto que:

1. Tiene actividad sobre, prácticamente, todos los tipos celulares que intervienen durante el proceso de osificación.
2. Regula diferentes fases del proceso, como la diferenciación de MSC hacia el linaje osteogénico, la hipertrofia y mineralización de los condrocitos durante la osificación endocondral, la maduración osteoblástica, la mineralización y la osteoclastogénesis.
3. Ejerce efectos potenciadores de la proliferación y de la producción de matriz extracelular de los osteoblastos.
4. Interviene en la regulación de la transducción de señales físicas provenientes de la ECM mediante mecanismos relacionados con la señalización por integrinas.

Todas estas propiedades hacen de IGF-1 una molécula con potencial terapéutico para su uso en aproximaciones de ingeniería tisular diseñadas para mejorar la regeneración ósea. Dado que, inherentemente, no es un factor osteoinductor, el empleo de IGF-1 se presenta como una alternativa viable para potenciar el efecto de otras moléculas que sí tengan esta propiedad. En este trabajo, se explorará el posible efecto aditivo o sinérgico que pudiera presentar IGF-1 para mejorar el potencial osteogénico de las BMP.

4.1.3 Uso de IGF-1 en combinación con BMP para la mejora de la osificación.

En 1997, Yeh y colaboradores demostraron que la adición simultánea de BMP-7 e IGF-1 sobre células óseas derivadas de calvaria de rata, aumentó significativamente la proliferación celular, la actividad FA y la formación de nódulos de mineralización *in vitro* (Yeh et al., 1997).

Posteriormente, se ha observado que el IGF-1 también tiene la capacidad de aumentar el potencial osteogénico de BMP-2. En este estudio se utilizaron cultivos de una línea comercial de células madre mesenquimales (C3H10T1/2), que se trataron con BMP-2, IGF-1 o la mezcla de BMP-2 e IGF-1, realizando diferentes combinaciones de ambos factores. De entre todas las combinaciones que se pusieron a prueba, se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a actividad FA y mineralización, en aquellas células tratadas con determinadas mezclas de BMP-2 con IGF-1 (Raiche y Puleo, 2004).

En otro estudio posterior se cultivaron células mesenquimales de ligamento periodontal sobre hidrogeles formulados para contener micropartículas de gelatina diseñadas para liberar, de forma controlada, BMP-2 y/o IGF-1. Las células cultivadas sobre los materiales que contenían micropartículas de ambos factores presentaron aumentos significativos en la cantidad de células, la actividad FA, el contenido total de osteocalcina, osteopontina y una cantidad de calcio total superior. En casi todos los casos, los valores obtenidos fueron superiores a los observados para los materiales que sólo contenían BMP-2 o IGF-1 por

separado, quedando demostrada la capacidad de IGF-1 de incrementar el potencial osteogénico de la BMP-2 (Chen et al., 2009).

Más recientemente, también se ha puesto de manifiesto que IGF-1 es capaz de incrementar la actividad osteoinductora de BMP-9. En este trabajo se transfectaron células C3H10T1/2 con los genes de *Bmp-9* y/o *Igf-1*. Las células transfectadas con ambos genes simultáneamente presentaron un aumento significativo de marcadores de diferenciación osteogénica *in vitro* así como una capacidad más alta de generar hueso ectópico *in vivo* con respecto a las células sólo transfectadas con el gen de *Bmp-9* (Chen et al., 2016).

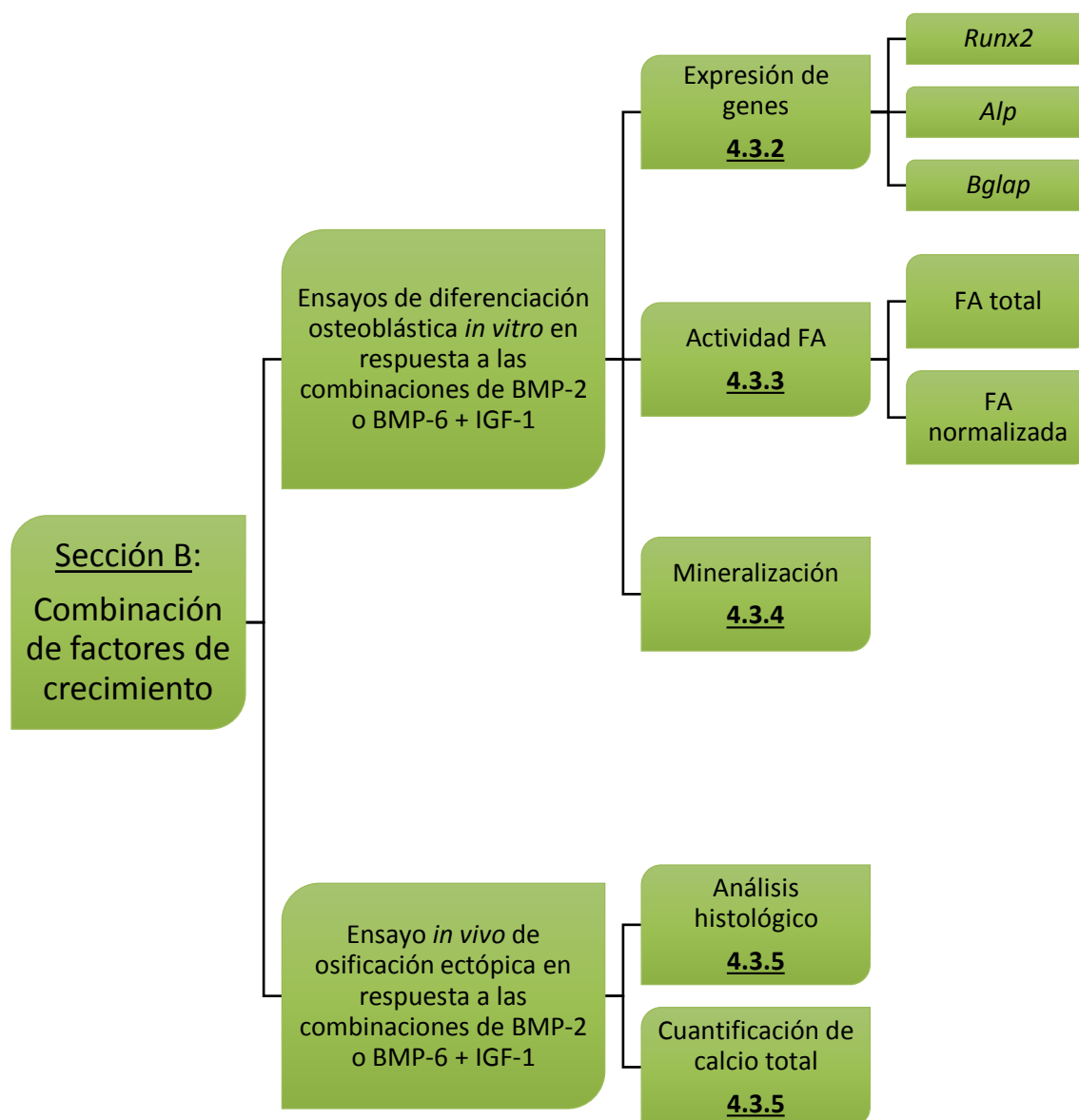
Dados estos antecedentes en los que se ha demostrado que IGF-1 es capaz de mejorar la capacidad osteoinductora de otras BMP, en este trabajo exploraremos si este factor es capaz de inducir mejoras sobre la capacidad de BMP-6 de influir positivamente sobre la formación de hueso y si esta mezcla puede representar una alternativa más eficiente que la mezcla de IGF-1 con BMP-2, que ya se ha probado previamente.

4.2 Objetivos específicos de la sección B.

1. Determinar la capacidad de IGF-1 para mejorar el potencial de BMP-6 de inducir la diferenciación osteoblástica de células precursoras *in vitro*.
2. Establecer si la combinación de BMP-6 con IGF-1 puede aumentar o mejorar la formación de hueso en un modelo de osificación ectópica en esponjas de colágeno en comparación con la BMP-6 sola.
3. Comparar el potencial osteogénico de la combinación de BMP-6 con IGF-1 con respecto a los efectos de la combinación de BMP-2 con IGF-1, tanto *in vitro* como *in vivo*.

4.3 Materiales y métodos (Sección B).

Representación esquemática de la metodología de la presente sección



4.3.1 Tratamiento de las MC3T3-E1 con BMP-2 o BMP-6 mezclado con IGF-1 (BMP + IGF-1).

Con el objetivo de comprobar el efecto de mezclar IGF-1 tanto con BMP-6 como con BMP-2 sobre el proceso de diferenciación osteoblástica, se establecieron concentraciones determinadas de cada factor basadas tanto en la propia experiencia previa en trabajos con BMP-2 y BMP-6 (Visser et al., 2016b) como en una revisión bibliográfica sobre el empleo de IGF-1 en osteogénesis (Celil y Campbell, 2005; Wang et al., 2012).

Dado que BMP-2 y BMP-6 tienen masas moleculares diferentes, se trabajó con ambas proteínas realizando los cálculos en unidades molares con el objetivo de llevar a cabo los tratamientos con el mismo número de moléculas y poder hacer comparaciones de forma directa. Las células fueron tratadas con medio de diferenciación suplementado con 6 nM de BMP-2 o 6 nM de BMP-6 (≈ 200 ng/mL) y con 15 nM de IGF-1 (100 ng/mL). Siguiendo las instrucciones del fabricante, ambas BMP se disolvieron en una solución de 4 mM HCl + 0,1% de BSA (Sol. BMP) mientras que el IGF-1 se reconstituyó en PBS.

A partir de este punto, los tratamientos se identificarán de la siguiente manera:

- **C-:** Medio de diferenciación.
- **IGF-1:** Medio de diferenciación + IGF-1 (15 nM).
- **BMP-2:** Medio de diferenciación + BMP-2 (6 nM).
- **BMP-6:** Medio de diferenciación + BMP-6 (6 nM).
- **BMP-2 + IGF-1:** Medio de diferenciación + BMP-2 (6 nM) + IGF-1 (15 nM).
- **BMP-6 + IGF-1:** Medio de diferenciación + BMP-6 (6 nM) + IGF-1 (15 nM).

Durante todo el período de inducción, los medios de cultivo se cambiaron cada 3-4 días por medio fresco suplementado con los diferentes factores y sus combinaciones.

Para los ensayos de mineralización *in vitro*, se sustituyó el medio de diferenciación por medio osteogénico (10% FBS, 10 mM β -glicerofosfato y 50 μ g/mL ácido ascórbico).

4.3.2 Medición de la expresión de genes marcadores de osteogénesis en respuesta al tratamiento con BMP + IGF-1.

Para estudiar la expresión de genes marcadores de osteogénesis en respuesta a BMP-2 o BMP-6 mezclada con IGF-1, se cultivaron 25.000 células/cm² en placas de 24 pocillos en medio completo, se dejaron adherir durante 3 horas en condiciones estándar de cultivo y se incubaron durante 1 hora en medio de diferenciación para, posteriormente, iniciar la inducción añadiendo los medios correspondientes suplementados con los factores anteriormente mencionados. Se incluyeron 3 réplicas experimentales por condición y tiempo experimental, para cada uno de los tratamientos estudiados.

La inducción se llevó a cabo durante 1, 3, 7 y 14 días. En cada uno de estos puntos, se realizó el aislamiento de RNA a partir de los cultivos y su retrotranscripción siguiendo el protocolo del anexo 8.2.11.

La qPCR se realizó siguiendo el diseño experimental expuesto en el anexo 8.2.12. A partir de los cDNA sintetizados, los genes marcadores de osteogénesis se analizaron de la siguiente forma:

- Al considerarse un marcador de expresión temprana, para el gen *mRunx2* se evaluaron inicialmente los RNA correspondientes a las muestras de los días 1 y 3 aunque, a raíz de los resultados obtenidos, se analizaron también las muestras del día 7.
- *mAlp* con los cDNA correspondientes a las muestras inducidas durante 3 y 7 días.
- *mBglap* con los cDNA correspondientes a las muestras inducidas durante 7 y 14 días.
- En todos los casos, se realizó la normalización contra el gen de referencia *mHprt*.

4.3.3 Estudio de la actividad fosfatasa alcalina en respuesta a BMP + IGF-1.

Para este ensayo se cultivaron 25.000 células/cm² en placas de 96 pocillos en medio completo, se dejaron adherir durante 3 horas en condiciones estándar de cultivo y se incubaron durante 1 hora en medio de diferenciación para, posteriormente, iniciar la inducción añadiendo los medios correspondientes suplementados con los factores anteriormente mencionados. En este caso, se sembraron 8 réplicas por condición en dos placas separadas: una para la medición a los 3 días de tratamiento y otra para la medición a los 7 días.

En los días correspondientes, los pocillos se sometieron a los protocolos de lisis, medición de actividad FA y medición de DNA total (anexos 8.2.7, 8.2.9 y 8.2.8, respectivamente). A partir de estas medidas se calculó también la actividad FA normalizada contra DNA.

4.3.4 Ensayo de mineralización *in vitro* sobre cultivos de MC3T3-E1 en respuesta a BMP + IGF-1.

Para este experimento se duplicó la densidad celular, sembrando 50.000 células/cm² en medio completo sobre una placa de 24 pocillos, se incubaron durante 24 horas en condiciones estándar de cultivo y se inició el tratamiento siguiendo el protocolo de inducción con las diferentes combinaciones de factores durante 21 días.

Transcurrido este período, los cultivos se fijaron y tiñeron con rojo alizarina para evidenciar la formación de nódulos de mineralización tal y como se detalla en el anexo 8.2.10.

Tras el registro fotográfico de los resultados, se procedió a la extracción del colorante para la estimación cuantitativa de los niveles de mineralización en respuesta a cada tratamiento.

4.3.5 Ensayo *in vivo* de osificación ectópica de esponjas cargadas con BMP + IGF-1.

La actividad biológica *in vivo* de las esponjas cargadas con BMP-2 o BMP-6 + IGF-1 se comprobó mediante un ensayo de formación de hueso ectópico en ratas. Los detalles del procedimiento quirúrgico se explican en el anexo 8.3.1.

Preparación de los implantes: Las esponjas se cargaron con cantidades previamente probadas para ambas BMP (10 pmol totales por esponja) (Visser et al., 2016b). La cantidad de IGF-1 se decidió manteniendo la proporción BMP:IGF-1 que dio mejores resultados en los ensayos *in vitro*, que fue de 2,5 moléculas de IGF-1 por molécula de BMP (25 pmol de IGF-1). Al igual que para los cultivos, se trabajó en cantidades molares para que fueran válidas las comparaciones entre ambas proteínas.

Para este ensayo *in vivo* se probaron las siguientes condiciones:

Muestra	1ª carga	1ª incubación	2ª carga	2ª incubación
C-	10 µL de Sol. BMPs	30 minutos de secado al aire	10 µL PBS	30 minutos de secado al aire
IGF-1	10 µL de Sol. BMPs		10 µL con 25 pmol de IGF-1	
BMP-2	10 µL con 10 pmol de BMP-2		10 µL de PBS	
BMP-6	10 µL con 10 pmol de BMP-6		10 µL de PBS	
BMP-2 + IGF-1	10 µL con 10 pmol de BMP-2		10 µL con 25 pmol de IGF-1	
BMP-6 + IGF-1	10 µL con 10 pmol de BMP-6		10 µL con 25 pmol de IGF-1	

Tabla 8. Esquema de tratamientos cargados sobre Helistat para su implante en el modelo *in vivo*.

De cada uno de estos 6 tratamientos se realizaron 10 réplicas, implantando 4 esponjas por rata. Los implantes se distribuyeron de forma aleatorizada, pero cumpliendo la condición de no repetir tratamientos en un mismo animal. Tras 21 días, seis (6) réplicas por tratamiento se destinaron a la medición de calcio total (anexo 8.3.3) y cuatro (4) de las mismas para análisis histológico mediante tinción general de hematoxilina-eosina (anexo 0).

4.4 Resultados (Sección B).

4.4.1 Ensayos de diferenciación osteogénica *in vitro*.

4.4.1.1 qPCR.

Para el gen *mRunx2* se registró un aumento significativo de la expresión a los 7 días de tratamiento en respuesta tanto a BMP-2 como a BMP-6. Sin embargo, la adición de IGF-1 aumentó, aunque no de forma estadísticamente significativa, estos valores.

Tanto para *mAlp* como para *mBglap* se observó un patrón de expresión similar (**Figura 42 B y C**). Para los tiempos en los que se realizaron las medidas, las células tratadas con BMP mostraron incrementos de la expresión de ambos genes de 2 órdenes de magnitud por encima de las células no tratadas. En este caso, la adición de IGF-1 combinada con BMP (BMP-2 + IGF-1 y BMP-6 + IGF-1) sí potenció este efecto, observándose un incremento significativo en comparación con las condiciones homólogas en las que no se incluyó IGF-1 (BMP-2 y BMP-6, respectivamente).

En ningún caso ni condición, IGF-1 por sí sólo modificó significativamente la expresión de los genes estudiados ni se detectaron diferencias entre BMP-2 y BMP-6 en su administración por separado o mezcladas con IGF-1.

4.4.1.2 Actividad fosfatasa alcalina.

Sobre cultivos de MC3T3-E1 similares a los utilizados para la cuantificación de la expresión génica, se estimó la actividad FA total, el DNA total de cada muestra y, con esto, se calculó la actividad FA normalizada.

En la **Figura 43 A** se evidencia cómo la actividad FA total aumentó significativamente en respuesta al tratamiento con ambas BMP y que, al igual que se observó para los genes marcadores de osteogénesis, la adición de IGF-1 potenció esta actividad aumentando significativamente la respuesta celular. Adicionalmente, se observó que, a los 7 días de tratamiento, este efecto sinérgico fue más potente cuando el IGF-1 se mezcló con BMP-6 que en su mezcla con BMP-2.

En cuanto a la proliferación celular (**Figura 43 B**), se pudo constatar que todos los factores empleados por separado (BMP-2, BMP-6 e IGF-1) indujeron aumentos significativos en el número de células promedio. Sin embargo, fue en la mezcla de factores donde se observaron los mayores valores en cuanto a número de células se refiere.

El efecto sinérgico de mezclar IGF-1 tanto con BMP-2 como con BMP-6 también se observó en la actividad FA normalizada contra el DNA, específicamente a día 7 (**Figura 43 C**). Esto implica que, célula a célula, la actividad FA también fue superior en aquellos cultivos tratados con la combinación de factores. También para esta medición, la actividad inductora de BMP-6 fue mayor que la de BMP-2, tanto por separado como en la combinación con IGF-1.

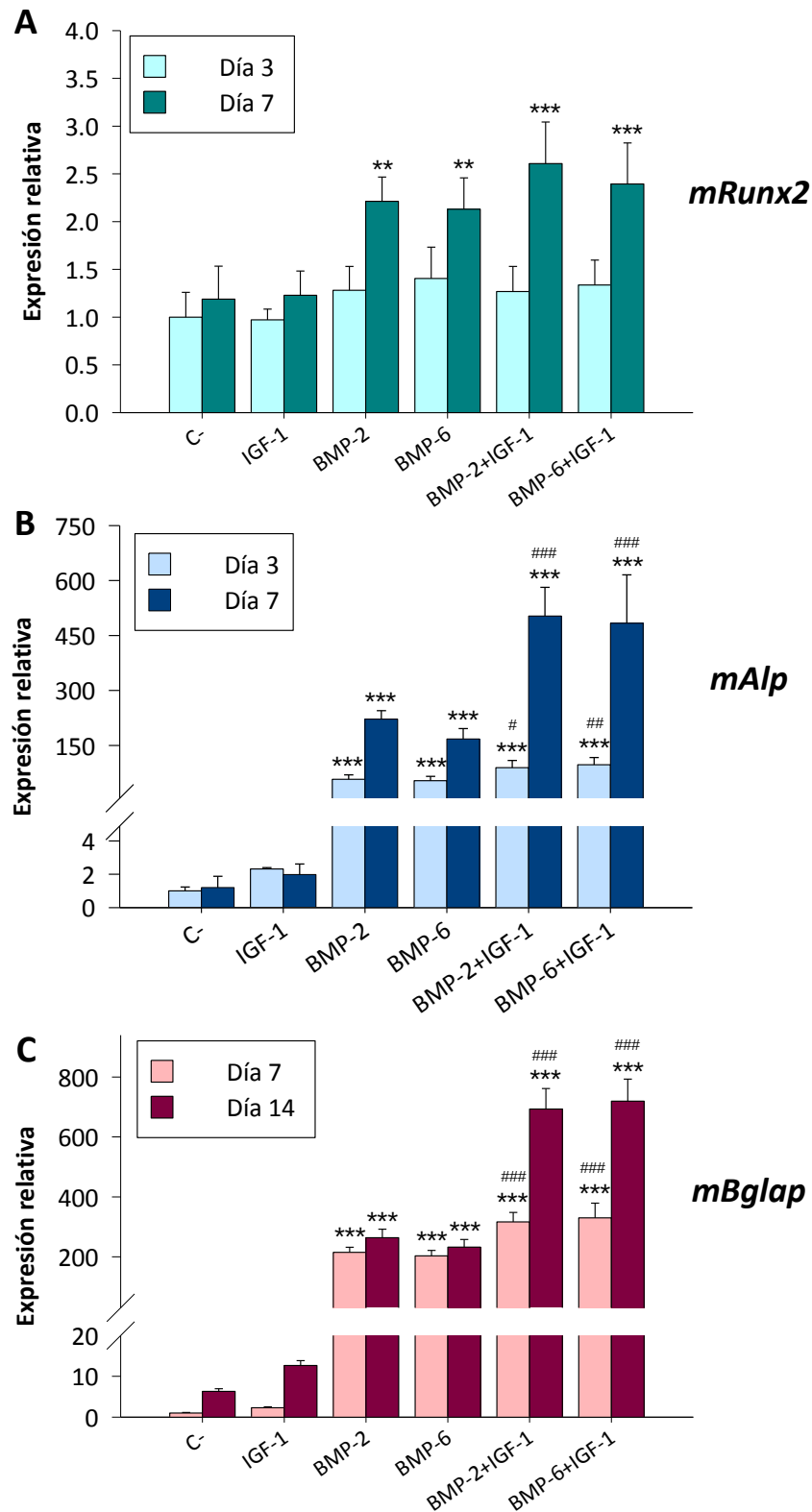


Figura 42. Expresión de genes marcadores de diferenciación osteogénica en respuesta a los tratamientos con BMP + IGF-1. Cuantificación relativa de la expresión de **(A)** *mRunx2*, **(B)** *mAlp* y **(C)** *mBglap* normalizada contra el gen de referencia *mHprt*. Se muestra la expresión relativa promedio con respecto a las muestras C- de cada día. (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$ Diferencia significativa contra el C- del mismo día. (#) $p \leq 0,05$; (##) $p \leq 0,01$; (###) $p \leq 0,001$ Diferencia significativa con respecto a la condición homóloga pero sin IGF-1 (BMP-2 o -6 contra BMP-2+IGF-1 o BMP-6+IGF-1, respectivamente).

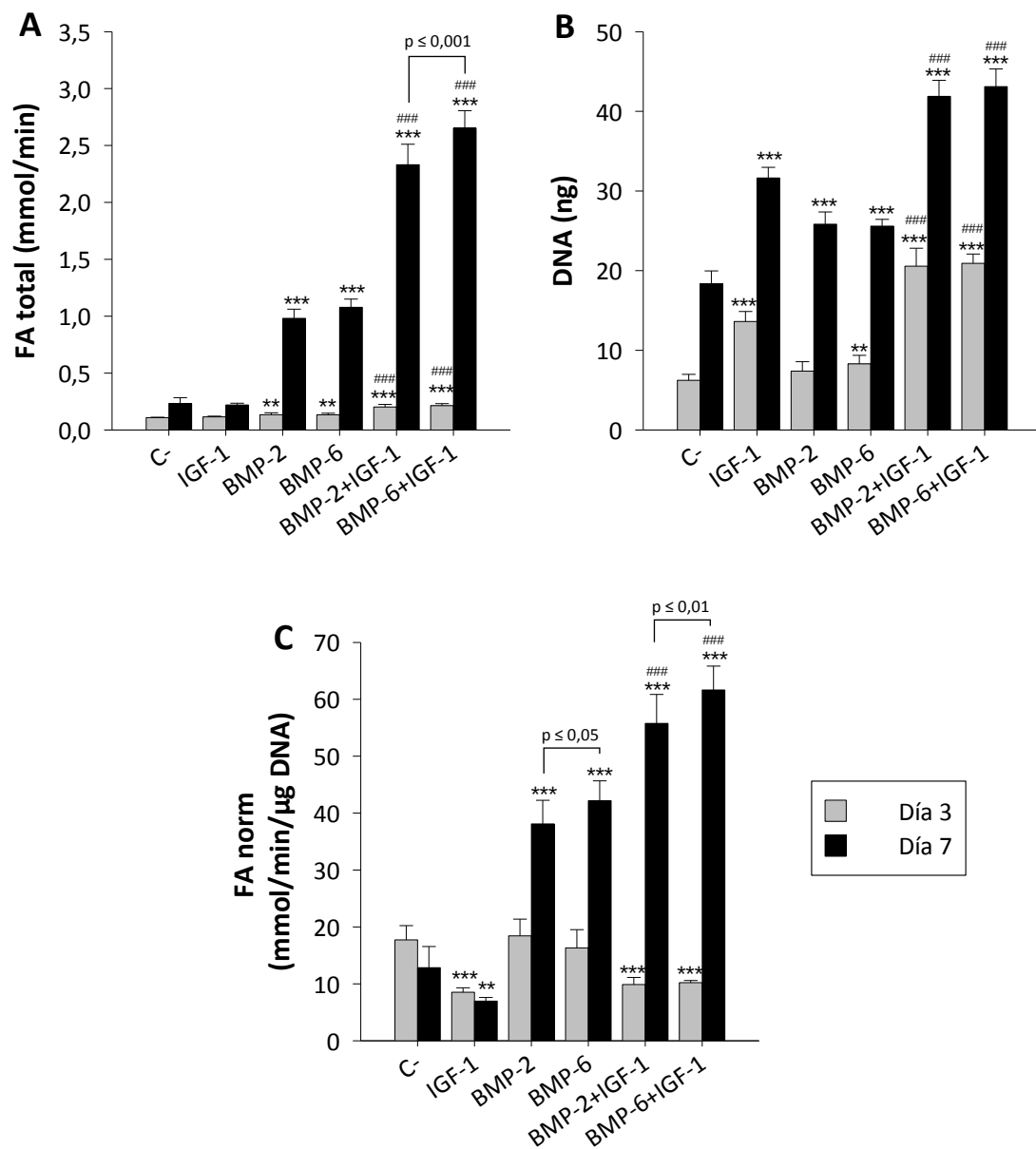


Figura 43. Actividad FA total, DNA total y actividad FA normalizada de MC3T3-E1 en respuesta a los tratamientos con BMP + IGF-1. Se muestran los valores promedio de **(A)** actividad FA total, **(B)** DNA total y **(C)** la actividad FA normalizada contra el DNA de MC3T3-E1 tratadas con las diferentes combinaciones de BMP + IGF-1 a los 3 y 7 días de cultivo. (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$ Diferencia significativa contra el control negativo del mismo día. (###) $p \leq 0,001$ Diferencia significativa con respecto a la condición homóloga de BMP pero sin IGF-1. Otras diferencias se indican con su p -valor resultante uniendo las correspondientes barras con un conector.

4.4.1.3 Ensayo de mineralización *in vitro*.

Para este ensayo, cultivos confluentes de células MC3T3-E1 se trataron con las mezclas de BMP-2 o BMP-6 y/o IGF-1 en medio osteogénico durante 21 días. Tras este período, se sometieron a la tinción de rojo de alizarina para revelar la matriz mineralizada presente en los cultivos.

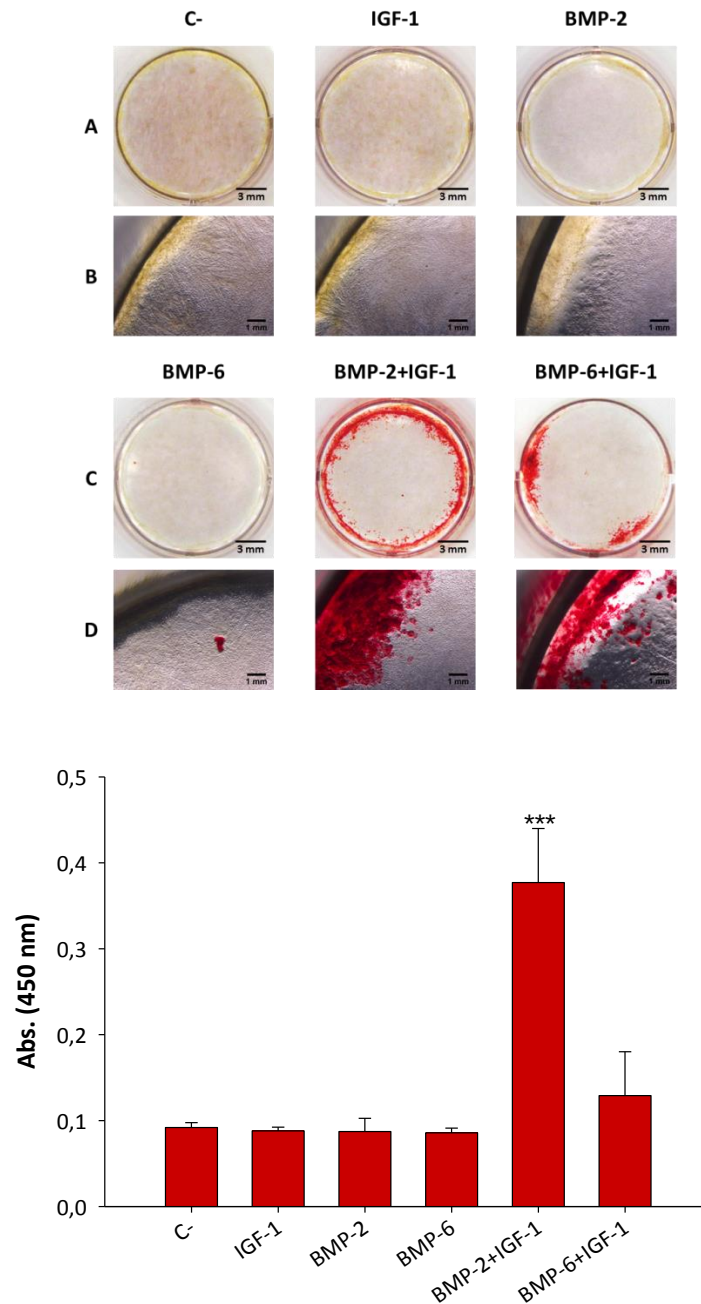


Figura 44. Ensayo de mineralización *in vitro* en respuesta al tratamiento con BMP + IGF-1. En la figura se muestran cultivos representativos de cada condición tras la tinción con rojo de alizarina. Se observan planos generales de los pocillos (**A y C**) y fotografías a mayor aumento (**B y D**) tomadas con un estereoscopio. La gráfica representa los valores promedio de la cuantificación del colorante extraído para cada condición. (***) $p \leq 0.001$ Diferencia significativa en comparación con la condición control negativo.

Tras la tinción, y obviando algunos depósitos minerales aislados y muy pequeños en algunos cultivos tratados con BMP-6, únicamente se evidenció matriz mineralizada en los cultivos tratados con la mezcla de factores, tanto BMP-2 + IGF-1 como con BMP-6 + IGF-1. En la imagen ampliada captada en el estereoscopio, se pueden observar claros nódulos de mineralización fuertemente teñidos de rojo brillante (**Figura 44**).

Sin embargo, tras la extracción del colorante y su cuantificación por espectrofotometría, sólo se detectaron diferencias significativas con respecto al control negativo en los cultivos sometidos al tratamiento con BMP-2 + IGF-1.

4.4.2 Ensayos de osificación ectópica *in vivo*.

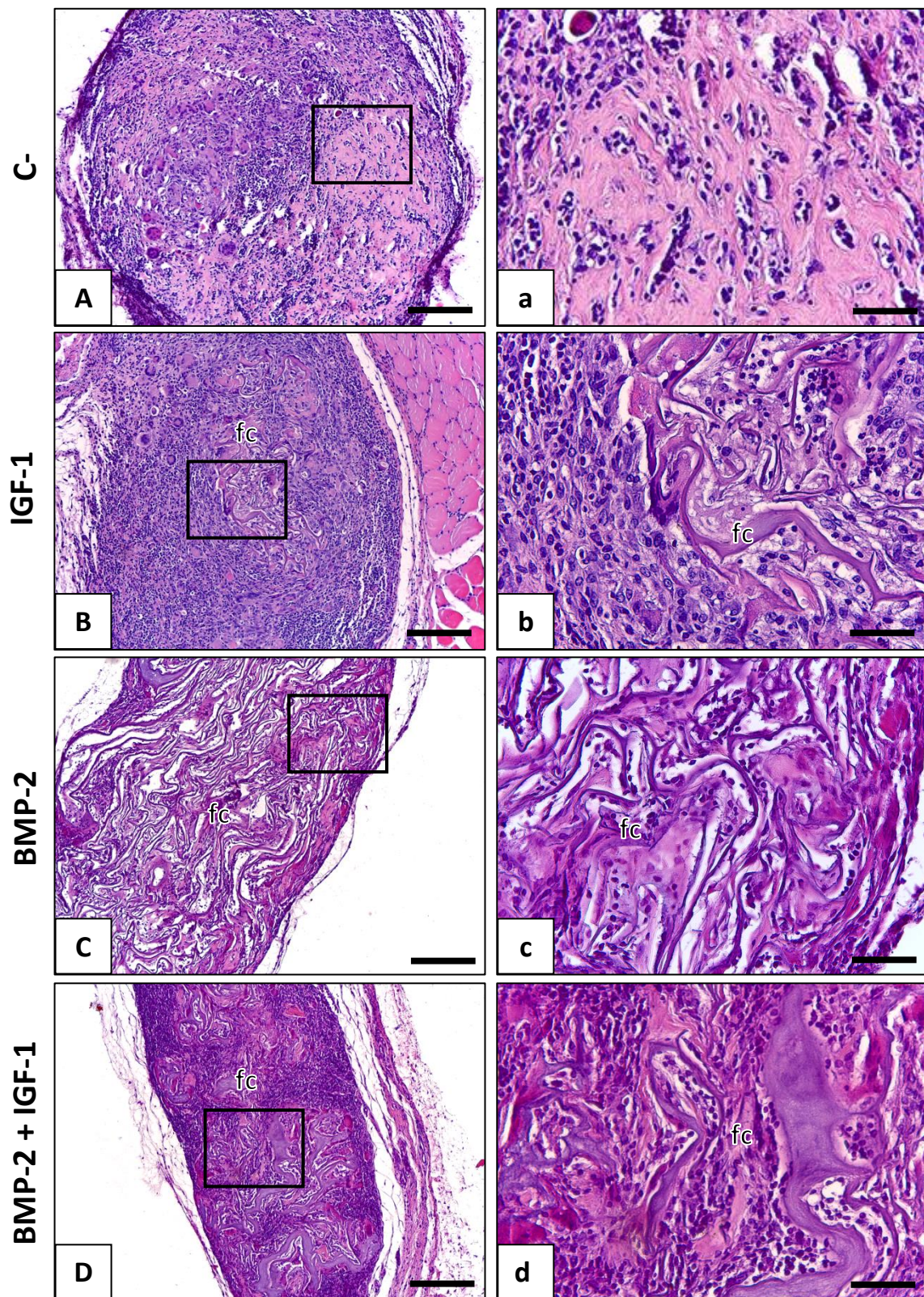
Para este ensayo se realizó un protocolo homólogo al descrito para los experimentos *in vivo* llevados a cabo con las esponjas funcionalizadas con los péptidos biomiméticos. En este caso, las esponjas se cargaron con las diferentes combinaciones de BMP-2 o -6 (10 pmol por esponja) y/o IGF-1 (25 pmol por esponja).

Transcurridos 21 días, los implantes se retiraron y se analizó tanto su histología como la cantidad de calcio total. Se recuperaron un 76,8 % de los implantes, en los cuales se evidenció, como rasgo general, una reducción de tamaño significativa con respecto a su estado inicial. En las restantes 23,2% de las localizaciones, los implantes se reabsorbieron por completo y no se encontró ningún vestigio del material original. En ningún caso, se observaron signos de encapsulación, rechazo inmune o inflamación evidentes.

4.4.2.1 Análisis histológico.

El análisis histológico reveló que no hubo signos de osificación en los implantes tratados con IGF-1, BMP-2 y BMP-2 + IGF-1 (**Figura 45** B, C y D), observándose características muy similares a las de las esponjas control negativo (**Figura 45** A).

En líneas generales, los implantes aparecieron muy infiltrados de células, distribuidas de forma homogénea por toda la extensión de los mismos. En estas esponjas se formó un tejido más o menos fibrótico con una matriz extracelular indefinida y algunos restos de las fibras de colágeno originales.



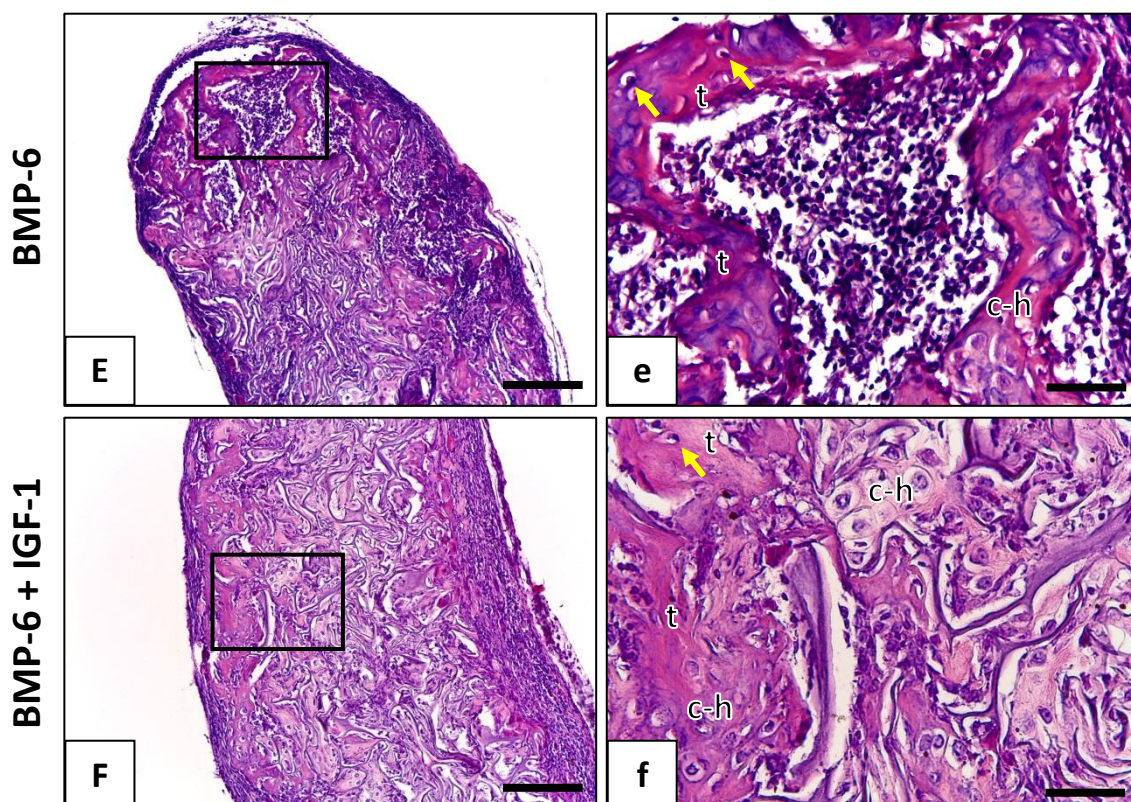


Figura 45. Análisis histológico de la osificación ectópica *in vivo* de las esponjas cargadas con los tratamientos de BMP y/o IGF-1. Implantes (A) control negativo, (B) cargados con IGF-1, (C) BMP-2, (D) BMP-2 + IGF-1; (E) BMP-6 y (F) BMP-6 + IGF-1. Las imágenes a, b, c, d, e y f corresponden a los detalles encuadrados en las imágenes A, B, C, D, E y F, respectivamente. **fc**: restos de fibras de colágeno; **t**: trabécula; **c-h**: zona de transición cartílago-hueso; **flechas**: osteocitos. Tinción de hematoxilina-eosina. Barras de escala = 200 µm en A-F; 50 µm en a-f.

Por otro lado, los implantes cargados con BMP-6 o BMP-6 + IGF-1 (**Figura 45. E y F**), presentaron claros signos de formación de hueso. Se observaron zonas con diferentes estadios de maduración en el proceso de osificación: áreas con alta presencia de condrocitos hipertróficos, zonas con transiciones cartílago-hueso y lugares en los que se presenta hueso trabecular maduro muy bien delimitado, con osteocitos embebidos en una densa matriz mineralizada. La distribución de estas diferentes áreas sigue el patrón de osteogénesis centrípeta común en este modelo, teniendo una mayor presencia de hueso en la periferia y de cartílago hacia el centro del implante.

El estudio histológico no permitió identificar diferencias entre los tratamientos de BMP-6 y BMP-6 + IGF-1, que presentaron características muy similares entre sí.

4.4.2.2 Estimación de calcio total en los implantes.

Las esponjas asignadas para la medición del calcio total por implante, se sometieron a la extracción con HCl y, a partir de los extractos generados, se estimaron los valores promedio de calcio total. De todos los tratamientos aplicados, únicamente los implantes correspondientes a BMP-6 y BMP-6 + IGF-1 generaron lecturas dentro del intervalo de sensibilidad del método.

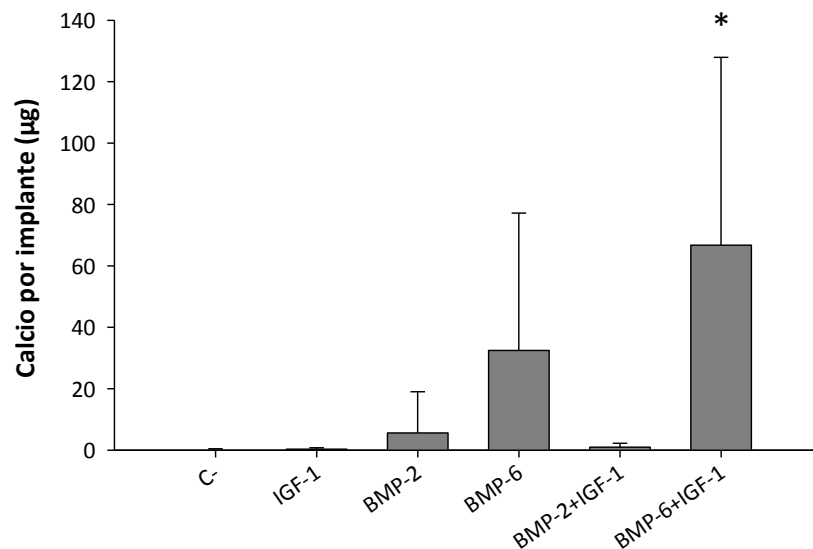


Figura 46. Contenido de calcio de las esponjas cargadas con BMP y/o IGF-1 tras 3 semanas de su implantación. Se muestran los valores promedio de la cantidad de calcio total por tratamiento. (*) $p \leq 0,05$ diferencia significativa en comparación con la condición control negativo.

A pesar de ello, únicamente las esponjas tratadas con BMP-6 + IGF-1 tuvieron valores de calcio significativamente superiores a los controles negativos, siendo esto un indicador de que en estas esponjas se generó una mayor cantidad de hueso o, en su defecto, hueso con un estado de madurez más avanzado (**Figura 46**).

5 Sección C: Liberación controlada de factores de crecimiento alternativos a BMP-2 como estrategia para incrementar su potencial osteogénico.

5.1 Introducción a la sección C.

Como se ha descrito en secciones anteriores, la osificación es un proceso multifactorial mediado por señales químicas provenientes de factores de crecimiento y citoquinas, así como por señales físicas que las células reciben a partir de las moléculas estructurales que conforman la matriz extracelular. La forma en que estas señales se distribuyen espacialmente en el sitio de la fractura, así como el momento en el que ejercen su actividad, tiene una fuerte influencia sobre el éxito del proceso regenerativo.

El uso de BMP-2 cargada sobre biomateriales de colágeno bovino es, hasta la fecha, la principal alternativa en medicina ortopédica al empleo de hueso autólogo para promover la regeneración ósea en escenarios desfavorables. Ya se ha discutido en secciones previas que las altas dosis empleadas de este factor tienen como consecuencia la aparición de efectos secundarios nocivos en respuesta a su aplicación.

Una de las posibles razones por las que es necesario aplicar cantidades tan altas de BMP para poder inducir un proceso de regeneración significativo, puede estar asociada a la capacidad relativamente baja que tiene el colágeno de retener la BMP que se deposita sobre él. Algunos estudios *in vivo* en los que se han implantado esponjas de colágeno cargadas con BMP-2 a la que se ha añadido marcas fluorescentes o radioactivas para permitir su seguimiento, demuestran que más de la mitad de la proteína cargada inicialmente se libera en los primeros dos días tras el implante (Boerckel et al., 2011; Geiger et al., 2003). Esta fuerte liberación inicial induce un aumento en la concentración local muy grande, pero de una duración muy corta, por lo que no mimetiza el proceso natural de regeneración en el que las células producen, de forma continuada, cantidades relativamente bajas de estos factores durante toda la osificación.

Esta señal inicial puede ser suficiente para que las células residentes inicien la osificación de manera que, una vez que se ha difundido y degradado gran parte de la BMP añadida en el implante, el proceso continúe de forma autónoma. Sin embargo, se ha demostrado que el incremento de la retención de la BMP-2 en el colágeno mediante diversas estrategias, puede aumentar significativamente su potencial osteogénico, observando mejores resultados en cuanto a regeneración ósea se refiere (Boerckel et al., 2011; Uludag et al., 2001; Visser et al., 2009). Este hecho es una demostración de que ejercer control sobre la liberación de los factores que se incluyen en los implantes, puede ser de una gran importancia para aumentar su potencial regenerativo, disminuyendo las dosis a suministrar y, por tanto, los costes asociados y los posibles efectos secundarios derivados.

En esta sección del trabajo se abordará el tema de la liberación controlada de factores osteoinductores y osteopromotores como estrategia para aumentar la eficacia de los implantes en ingeniería tisular ósea.

5.1.1 Distribución temporal de los factores de crecimiento que regulan la osificación.

La regeneración ósea tras una lesión transcurre a través de una serie de fases sucesivas que están controladas por los factores de crecimiento y citoquinas que las células residentes van produciendo a lo largo del proceso (referirse a **Figura 5**).

En la **Figura 47** se muestran, de forma esquematizada, los diferentes patrones de expresión temporal de los mRNA que dan lugar a algunos de los factores que intervienen durante el proceso de osificación.

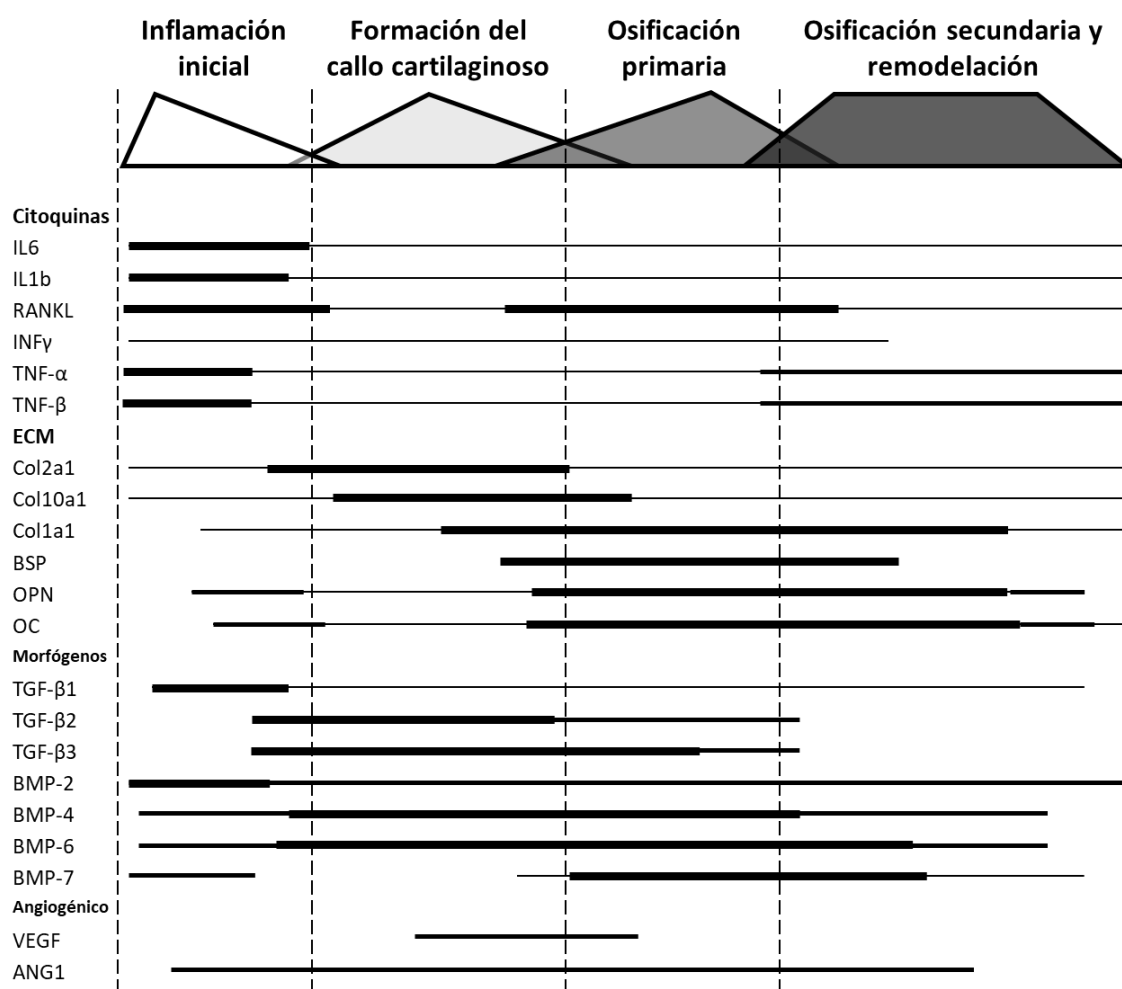


Figura 47. Esquema de la expresión temporal de algunos de los factores que intervienen en el proceso de osificación. Las formas geométricas denotan la intensidad en la actividad de los diferentes procesos que suceden durante cada una de las fases. Las líneas indican el patrón de expresión del mRNA asociado a cada uno de los factores que se enumeran en la lista. Se utilizan 3 grosores de línea para destacar la intensidad relativa de la expresión de cada gen. Figura tomada de (Gerstenfeld et al., 2003).

A partir de la **Figura 47** se puede deducir la relación directa que existe entre la expresión de los diferentes factores y proteínas de la matriz extracelular, y los procesos que éstos regulan. Por ejemplo, la expresión de citoquinas proinflamatorias tiene su pico de

expresión predominantemente en la fase inflamatoria, al inicio de la osificación. Por su parte, la expresión de los colágenos es secuencial: primero se expresa el colágeno tipo II (característico del cartílago), luego el colágeno tipo X (muy presente en el cartílago hipertrófico) y por último hay una expresión continuada de colágeno tipo I (el más abundante en el hueso).

En cuanto a las BMP, se registra una fuerte expresión de BMP-2 en la fase inicial tras la fractura, que permanece expresada durante el resto de la osificación, pero con una intensidad menor. Sin embargo, otras BMP, como la -4 o la -6, tienen un pico de expresión más tardío, apareciendo hacia el inicio de la formación del callo cartilaginoso y extendiéndose por un largo período que alcanza la fase de osificación secundaria. Para BMP-7, se detecta su expresión en la fase inflamatoria, pero su punto máximo está circunscrito a la de osificación primaria y a las fases iniciales de la osificación secundaria, por lo que se puede deducir que no interviene durante la formación del callo cartilaginoso (Gerstenfeld et al., 2003).

Este delicado balance entre la distribución temporal de los factores que intervienen en la osificación y su actividad, tiene consecuencias directas sobre la regeneración normal del hueso. En modelos animales de fracturas que derivan en una unión tardía, se ha puesto de manifiesto que el tejido que se genera pasa por las diferentes fases de la regeneración ósea, pero éstas suceden de forma tardía y, por tanto, inadecuada. Se observa una presencia más prolongada del hematoma inicial que deriva en una osificación endocondral retardada, la cual termina generando un hueso que no recapitula, anatómica ni fisiológicamente, al hueso sano (Peters et al., 2010).

Es por ello que, en la actualidad, hay un creciente interés de la ingeniería tisular por explorar biomateriales o sistemas mediante los que se pueda controlar la liberación de los factores exógenos cargados sobre ellos. Esto permitiría maximizar su eficiencia terapéutica, minimizando a su vez, los costes y los efectos secundarios derivados. Además, este tipo de estrategias permite la administración simultánea o secuencial de mezclas de factores de crecimiento que, como se ha demostrado en la sección 2 de este trabajo, pueden potenciar fuertemente el proceso osteogénico en comparación con la administración simple de factores osteoinductores como las BMP.

5.1.2 Modelos de administración controlada de factores de crecimiento en ingeniería tisular ósea.

En el campo de la ingeniería tisular ósea, se emplea una gran cantidad de biomateriales, naturales y sintéticos, para servir de andamios sobre los cuales se pueda formar tejido óseo nuevo en la zona afectada. La mayoría de estos biomateriales no presentan una actividad osteoinductora intrínseca, sino que, con frecuencia, tienen propiedades osteoconductoras que los hacen atractivos para ser utilizados en medicina regenerativa del hueso. En el apartado 4.1.2 se describió que materiales como la hidroxiapatita, el titanio o el colágeno, podían tener un potencial osteogénico más elevado cuando la BMP es administrada sobre ellos en combinación con factores de crecimiento como el FGF-2, EGF, PDGF-BB o IGF-1.

Basándose en esta aproximación, existe una gran cantidad de estrategias orientadas a controlar la liberación de estas moléculas que tienen como objetivo intentar mimetizar, no

sólo la disponibilidad de las señales osteoinductoras y osteopromotoras, sino su distribución temporal durante la osificación. Para ello, se han desarrollado diferentes sistemas que permiten modular la capacidad de los materiales de retener y liberar los factores de crecimiento.

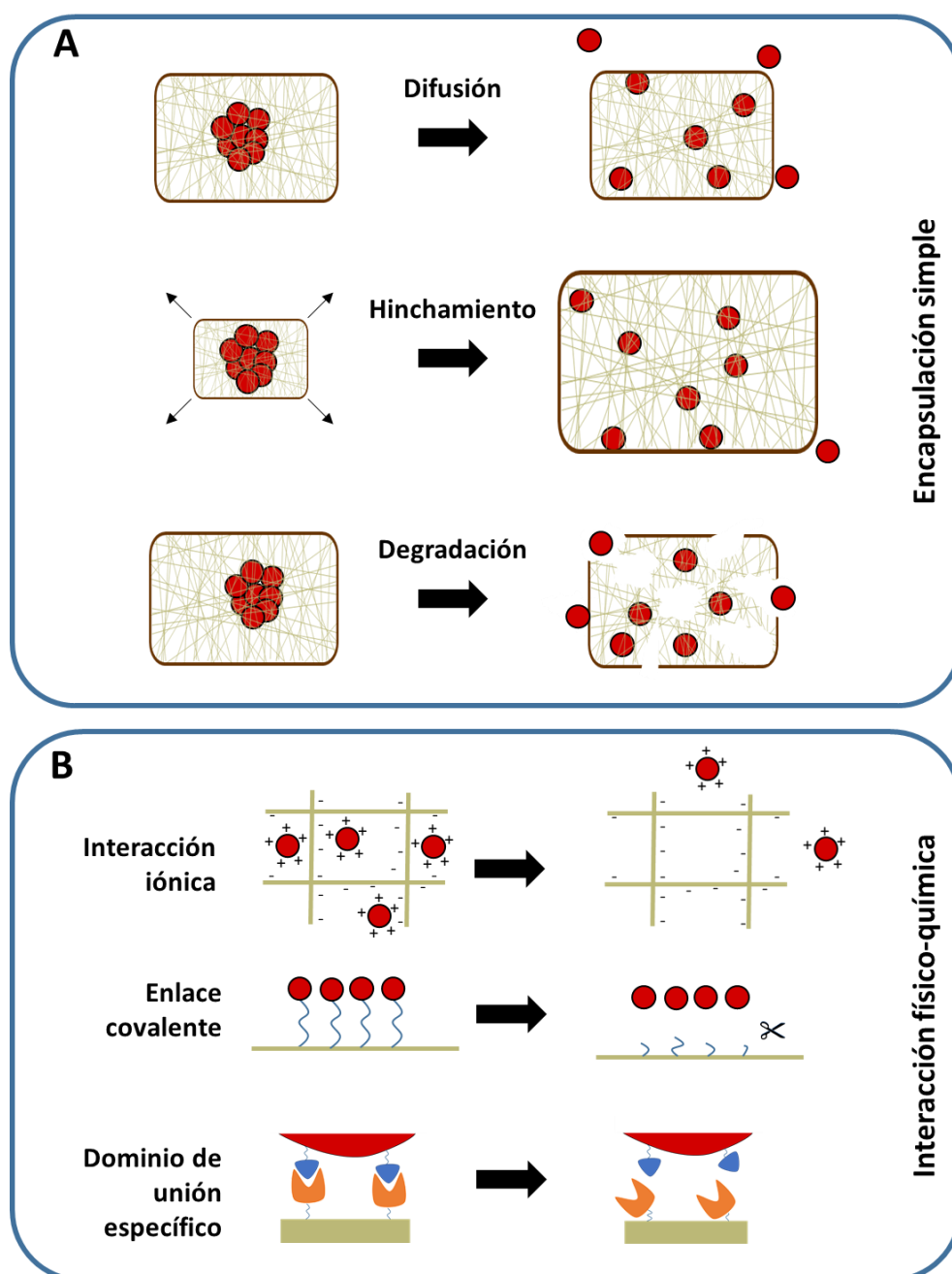


Figura 48. Representación esquemática de las diferentes metodologías para retener un factor de crecimiento sobre un material y sus formas de liberación posterior. En **(A)** se muestran los diferentes modos de liberación de un factor de crecimiento encapsulado de forma simple en un hidrogel. En **(B)** se esquematizan estrategias en las que se modifica la carga iónica del material o del factor, se induce la formación de enlaces covalentes o se introducen dominios de unión específicos en el material o en el factor para que interactúen de forma estable. Figura basada parcialmente en el trabajo de (Mehta et al., 2012).

Una de ellas es la encapsulación pasiva del factor de crecimiento en una matriz polimérica después de su gelificación o solidificación (**Figura 48 A**). Con este sistema, se obtiene una rápida liberación inicial de las moléculas que están en contacto superficial con la matriz y, posteriormente, una liberación más suave y sostenida en el tiempo de las moléculas restantes. La duración de este período varía ampliamente en función de la cantidad inicial del factor que se encapsula y el mecanismo mediante el cual los diferentes biomateriales liberan los factores (Mehta et al., 2012).

En muchos casos, los factores de crecimiento difunden libremente a través de la matriz polimérica a una velocidad dependiente del tamaño de poro y de las características del material utilizado. Si el material inicial es un hidrogel que se ha desecado previamente, su rehidratación con una solución que contenga el factor de crecimiento, en general, permite una incorporación de una mayor cantidad total de esta molécula. En otros casos, el factor de crecimiento no es capaz de difundir a través de la matriz que se ha formado a su alrededor, por lo que su liberación está directamente asociada a las tasas de degradación del material. Este último mecanismo permite tener una liberación más lenta y, por tanto, un suministro más prolongado del factor (**Figura 48 A**).

Otra de las posibles alternativas es la formación de uniones químicas entre los materiales y los factores de crecimiento (**Figura 48 B**), siendo una de las maneras más sencillas la modificación de la carga superficial del biomaterial. Por ejemplo, los hidrogeles de gelatina, que se utilizan comúnmente en gran cantidad de aplicaciones biomédicas, tienen una capacidad de retención de BMP-2 mucho más alta si se sintetizan con gelatina básica que con gelatina ácida (Yamamoto et al., 2001). En un estudio comparativo se demostró que, a pH fisiológico, la albúmina de suero bovino (punto isoeléctrico (pI) $\approx 5,8$) se libera más rápidamente que el VEGF (pI $\approx 8,5$) y, este último, más rápido que BMP-2 (pI $\approx 8,5-9,2$) cuando se añaden sobre geles de ácido hialurónico cargados negativamente. Este hecho demuestra una relación directa entre la carga neta de las proteínas y su retención por parte de las superficies a través de interacciones electroestáticas (Patterson et al., 2010).

Existe la posibilidad de adherir de forma covalente los factores de crecimiento a los diferentes biomateriales. Muchas proteínas, como EGF, BMP, VEGF, FGF, IGF-1 o TGF- β 1 han sido modificadas con este fin. Sin embargo, el procesamiento químico que implica este tipo de protocolo puede ocasionar la desnaturalización proteica y, por tanto, la pérdida de su actividad. El éxito de este tipo de aproximación es altamente dependiente de la proteína que se quiera enlazar y del material que se utilice, por lo que es una estrategia que puede ser efectiva sólo para ciertas proteínas y biomateriales (King y Krebsbach, 2012).

También es posible modificar los factores de crecimiento o los biomateriales para que contengan dominios de unión que medien la interacción entre ambos. Por ejemplo, la inclusión de heparina en hidrogeles y otros materiales, aumenta significativamente la capacidad de éstos de enlazar BMP-2, a través de la interacción con el dominio de unión a heparina presente en las BMP (Chung et al., 2007; Ruppert et al., 1996).

Por último, se ha explorado la posibilidad de modificar, mediante tecnología del DNA recombinante, la estructura del factor de crecimiento para añadirle dominios de unión específicos con afinidad a algunos biomateriales. Proteínas como TGF- β 1 (Andrades et al., 1999; Tuan et al., 1996), bFGF (Andrades et al., 2001b), BMP-2 (Chen et al., 2007; Visser et al., 2009), PDGF (Lin et al., 2006) o VEGF (Zhang et al., 2009) han sido modificadas para incorporar dominios de unión al colágeno. A otros factores, como VEGF, IGF-1, FGF o EGF se han

incorporado dominios de unión que aumenten su afinidad por colágeno, fibrina, por las células a través de la interacción con integrinas e, incluso, dominios de unión a superficies inorgánicas como el titanio (Arrabal et al., 2013; Tada et al., 2012).

Esta gran cantidad de estrategias permiten ejercer control sobre la carga y posterior liberación de los factores de crecimiento empleados para mejorar el potencial regenerativo de los implantes en ingeniería tisular ósea. En el siguiente apartado se citarán diferentes ejemplos en los que la modulación de los patrones temporales de su administración mejora significativamente el potencial osteogénico de los factores osteoinductores *in vitro*, así como su potencial regenerativo *in vivo*.

5.1.3 Influencia de la administración controlada de factores de crecimiento sobre el proceso de osificación.

En la actualidad, se pueden encontrar diferentes ejemplos de estrategias en las que el control de la liberación de los factores de crecimiento cargados sobre biomateriales genera una mejora sustancial en el potencial regenerativo de los mismos.

En un estudio realizado por Solorio y colaboradores en 2010, se produjeron microesferas de gelatina con diferentes grados de entrecruzamiento cargadas con BMP-2. Estas microesferas se pusieron en contacto con cultivos de hMSC y, tras 14 días de tratamiento, se demostró que aquellas con un grado mayor de entrecruzamiento, cuya liberación de BMP-2 era más lenta y prolongada, tuvieron un efecto significativamente mayor sobre la diferenciación osteogénica de las hMSC (Solorio et al., 2010). Este experimento pone de manifiesto que, partiendo de las mismas dosis, la administración continua de bajas cantidades de BMP-2 puede tener un efecto más potente que la adición directa de grandes cantidades del factor al inicio del tratamiento. Siguiendo esta misma racional, algunos trabajos han puesto de manifiesto que la administración continua y secuencial de mezclas de factores de crecimiento puede mejorar significativamente el potencial osteogénico de la BMP-2.

5.1.3.1 Administración controlada de factores de crecimiento en modelos de diferenciación osteogénica in vitro.

Experimentos *in vitro* realizados sobre MSC han demostrado que el orden en que se aplican las combinaciones de factores, y la duración de dichos estímulos, tiene efectos significativos sobre la diferenciación osteogénica. En un trabajo en el que se estudiaron diferentes combinaciones de FGF-2 y BMP-2 (**Tabla 9**), se demostró que la secuencia de adición de los factores tiene efectos importantes sobre la diferenciación osteogénica de estas células.

Días	1-3	4-6	7-9	10-12
Grupo A	-	-	-	-
Grupo B	BMP-2	BMP-2	BMP-2	BMP-2
Grupo C	FGF-2	BMP-2	BMP-2	BMP-2
Grupo D	FGF-2	FGF-2	BMP-2	BMP-2
Grupo E	FGF-2	FGF-2	FGF-2	BMP-2
Grupo F	FGF-2	FGF-2	FGF-2	FGF-2

Tabla 9. Secuencia de tratamientos de FGF-2 y BMP-2 sobre cultivos de MSC. Los factores fueron añadidos a los cultivos celulares en las ventanas de tiempo especificadas en la cabecera de la tabla, configurándose así cinco grupos experimentales. Tabla tomada de (Maegawa et al., 2007).

El tratamiento perteneciente al grupo D, en el que se estimulan las células previamente con FGF-2 durante seis días y, posteriormente con BMP-2 durante otros seis días (**Tabla 9**), indujo aumentos significativos en la actividad FA, la mineralización *in vitro* y, especialmente, en la producción de osteocalcina con respecto al resto de las combinaciones testadas (Maegawa et al., 2007).

Por su parte, en un experimento similar, Raiche y Puleo demostraron que el efecto osteoinductor de BMP-2 sobre MSC era fuertemente potenciado por la adición posterior de IGF-1. La administración secuencial demostró ser siempre más potente en aquellas combinaciones en las que primero se liberaba BMP-2 seguida de una liberación de IGF-1 (Raiche y Puleo, 2004). Más recientemente, Kim y colaboradores, replicaron un efecto similar sobre células preosteoblásticas, empleando materiales de quitosano con microesferas de gelatina que liberaban BMP-2 y, de forma más tardía, IGF-1 (Kim et al., 2012).

En todos los ejemplos anteriores se demuestra que la coadministración secuencial de factores de crecimiento tiene el potencial de mejorar las propiedades osteoinductoras de las BMP, jugando un papel esencial la secuencia mediante la cual se realiza dicha administración. El suministro de estas moléculas en el momento y orden inadecuado puede disminuir o, incluso, inhibir completamente el efecto osteogénico deseado.

5.1.3.2 Potencial regenerativo de biomateriales que liberan de forma controlada combinaciones de factores de crecimiento.

En sistemas *in vivo*, también se ha comprobado la eficacia de la administración controlada de combinaciones de moléculas bioactivas. En el ambiente fisiológico, la utilización de recubrimientos poliméricos y estrategias de encapsulación tienen la ventaja añadida de que, además de funcionar como sistemas de control de la liberación, proveen de protección a las moléculas empleadas ante el microambiente con un pH acidificado y una alta presencia de proteasas (King y Krebsbach, 2012).

Diferentes biomateriales diseñados para liberar secuencialmente factores de crecimiento, han sido puestos a prueba en modelos *in vivo*, obteniendo resultados significativos en la mejora de la regeneración ósea. En un estudio reciente, se comprobó el efecto de la liberación secuencial de BMP-2 y -7. Para ello se sometió a membranas de

colágeno a un proceso químico para introducir moléculas de heparina en su estructura. Una vez heparinizadas, se inmovilizó sobre ellas la BMP-7 y, antes de implantarse en un defecto óseo en calvaria de rata, se añadió la BMP-2 la cual sólo se adsorbió sobre la superficie. Con este sistema se consiguió una fuerte liberación inicial de BMP-2 durante las primeras 30 horas y una progresiva liberación de BMP-7 durante los siguientes 28 días. Las ratas implantadas con el sistema de liberación dual, presentaron una formación de hueso nuevo mayor que las que se implantaron únicamente con BMP-2 y muy superior a las que sólo recibieron BMP-7 (Jo et al., 2015).

En otro trabajo se evaluó la posible mejora de la regeneración ósea mediante la incorporación de VEGF en un sistema que libera BMP-2. Para ello, se desarrolló un biomaterial diseñado para liberar de forma rápida el VEGF y, posteriormente, liberar la BMP-2 de forma lenta y prolongada, tal y como se esquematiza en la siguiente figura.

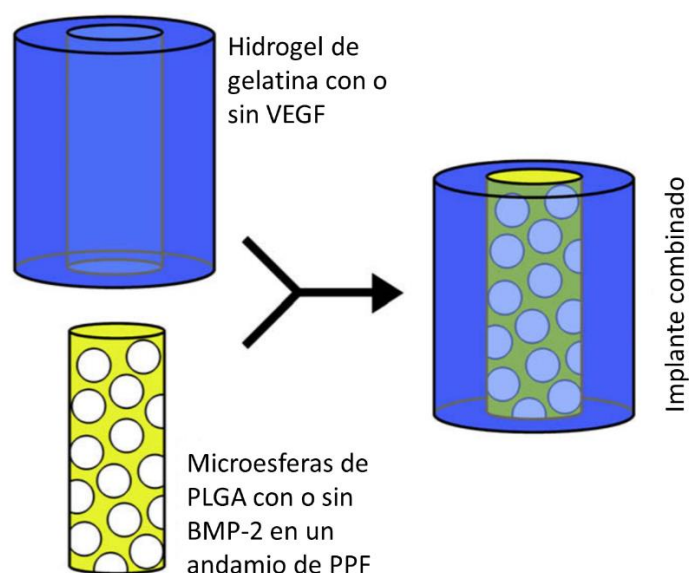


Figura 49. Representación esquemática de un biomaterial diseñado para liberar de forma secuencial VEGF y BMP-2. En el esquema se muestra el diseño del material con un centro del polímero sintético biodegradable poli(propileno fumarato) con microesferas de PLGA cargadas con BMP-2 (cilindro amarillo). Por otro lado, se forma alrededor un hidrogel de gelatina cargado con VEGF. Esquema tomado de (Kempen et al., 2009).

El potencial osteogénico de estos materiales sintetizados siguiendo el esquema de la **Figura 49**, se comprobó en modelos de osificación tanto ectópica como ortotópica en ratas. Los patrones de liberación dilucidados mediante marcaje radioactivo de ambas moléculas, demostró una fuerte liberación inicial de VEGF durante los primeros tres días y una liberación sostenida de BMP-2 a lo largo de los 56 días del experimento. Los implantes ectópicos cargados con ambos factores presentaron niveles de formación de hueso nuevo mayores que los que sólo liberaron BMP-2 y una vascularización más alta. Aunque para los implantes ortotópicos dicha diferencia no fue significativa, el modelo es un buen ejemplo de los posibles efectos beneficiosos de la liberación secuencial VEGF seguida de BMP-2 (Kempen et al., 2009).

Otro factor que se ha empleado para potenciar la capacidad osteoinductora de BMP-2 es el FGF-2. Para ello, se cargaron ambos factores sobre un biomaterial de colágeno/hidroxiapatita embebido en un hidrogel de PEG (Col/HA/PEG). Este material retiene preferentemente la BMP-2, que presenta afinidad natural por la HA, mientras que libera de forma más rápida el FGF-2. Las diferentes combinaciones de ambos factores cargadas sobre este sistema, se implantaron en un defecto crítico en calvaria de ratones jóvenes y de edad avanzada. En los ratones jóvenes, tanto el tratamiento con sólo BMP-2 como el de BMP-2/FGF-2 presentaron tasas similares de regeneración ósea. Sin embargo, en ratones de edad avanzada se evidenciaron tasas ligeramente superiores de formación de hueso nuevo en respuesta al tratamiento BMP-2/FGF-2 y un aumento, tanto en la cantidad de ratones en los que se evidenció un cierre total del defecto, como en la proporción de hueso formado en el centro del implante con respecto a la periferia (Charles et al., 2015).

Este tipo de estudios ilustran los posibles beneficios del diseño de implantes biomédicos que controlen la secuencia y duración de la liberación de moléculas que promuevan la osificación.

Dado el potencial demostrado del IGF-1 de mejorar las propiedades osteoinductoras de la BMP-6, tanto *in vitro* como *in vivo*, que se expuso en la sección anterior de este trabajo, en la presente sección se pretende explorar si la administración secuencial de estos dos factores puede mejorar los resultados obtenidos con la administración simultánea. Además, se propondrán posibles modificaciones de las esponjas de colágeno que permitan modificar los patrones temporales de liberación de los factores cargados sobre este material.

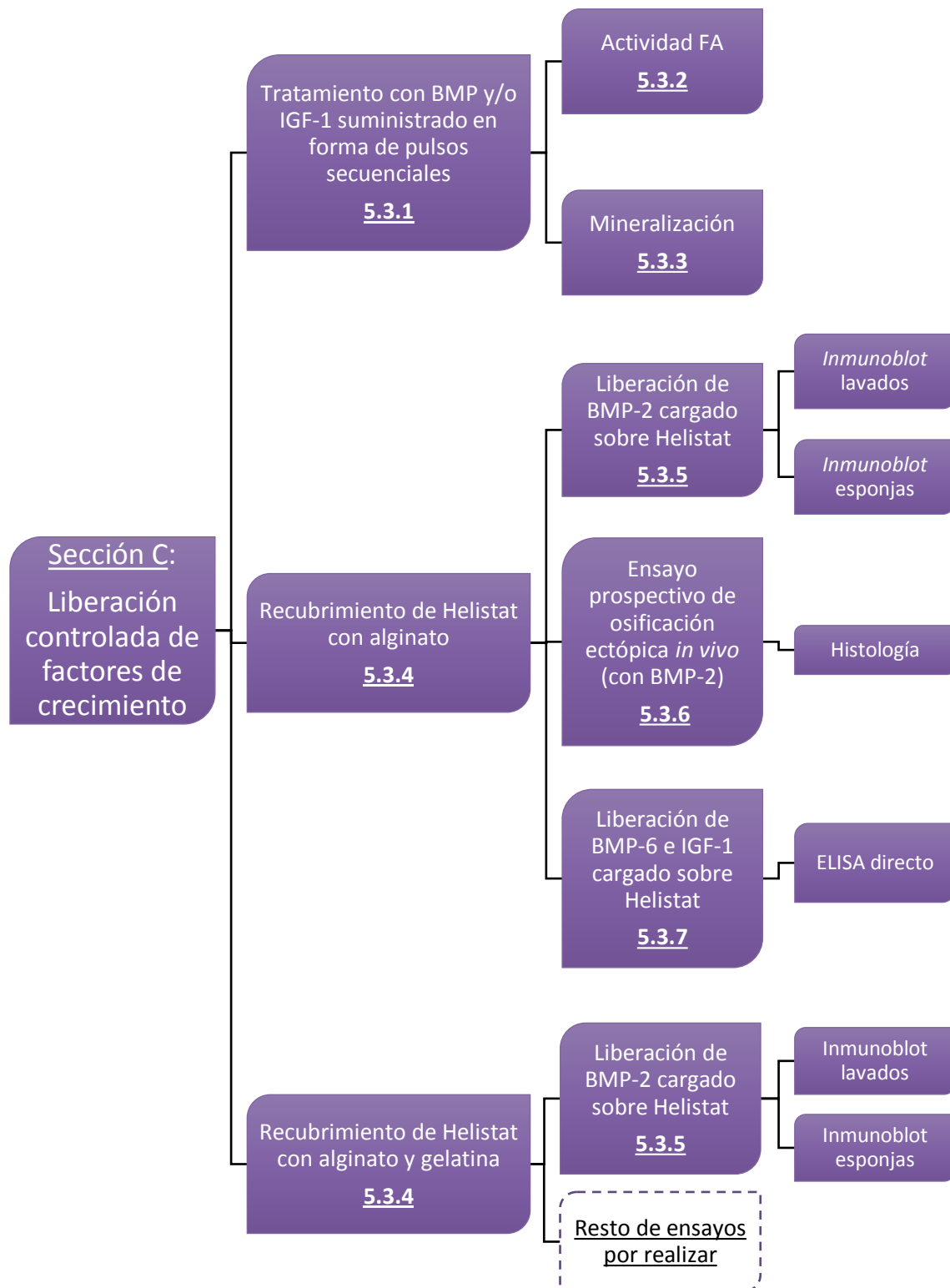
No obstante, debido a la limitación de tiempo para el desarrollo del presente proyecto de tesis doctoral, esta sección no ha sido concluida por lo que los resultados que aquí se presentarán representan la parte preliminar de una línea de investigación actualmente en desarrollo.

5.2 Objetivos específicos de la sección C.

1. Determinar si la administración secuencial de BMP-6 y/o IGF-1 puede mejorar el potencial de diferenciación osteoblástica de la combinación de estos dos factores administrados de forma simultánea *in vitro*.
2. Explorar diferentes recubrimientos de las esponjas de colágeno con polímeros naturales para modular la cinética de liberación de estos factores de crecimiento cargados sobre los materiales.

5.3 Materiales y métodos (Sección C).

Representación esquemática de la metodología de la presente sección



5.3.1 Tratamiento con BMP y/o IGF-1 suministrado en forma de pulsos secuenciales.

El siguiente sistema de tratamientos se implementó con el objetivo de comprobar si la administración secuencial de los factores previamente descritos en la sección 2 de este trabajo, modificaba su efecto sobre la diferenciación osteoblástica de las MC3T3-E1 *in vitro*. Para ello, se estableció el siguiente esquema general de tratamientos:

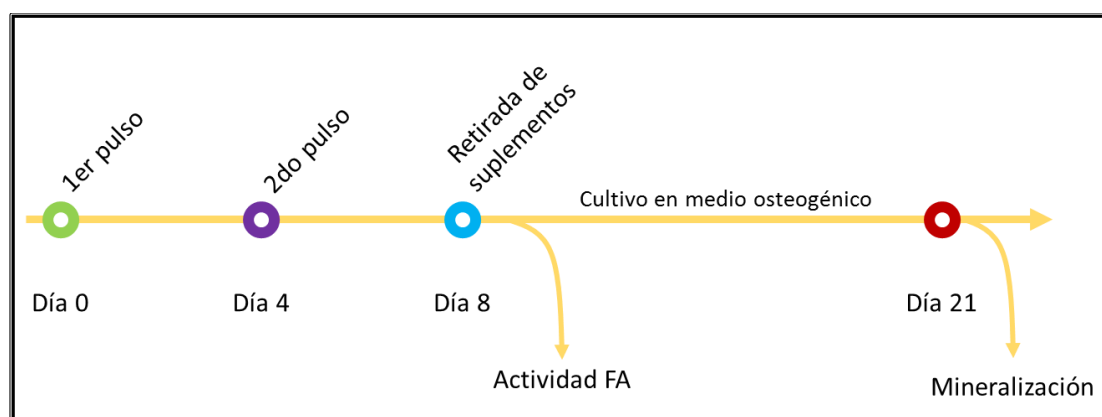


Figura 50. Esquema de inducción para los experimentos *in vitro* para testar el efecto sobre la diferenciación osteoblástica de la administración secuencial de BMP-2, BMP-6 y/o IGF-1.

Siguiendo este esquema de inducción general, se realizaron combinaciones de tratamientos empleando pulsos de medio suplementado con las mismas concentraciones de trabajo probadas en la sección 2 (6 nM de BMP-2 o BMP-6; 15 nM IGF-1), pero suministradas tal y como se describe en la **Figura 50**.

5.3.2 Actividad fosfatasa alcalina.

Para este experimento, se sembraron 20.000 células/cm² en placas de 96 pocillos en medio completo, con un total de 8 réplicas por tratamiento. Las células se dejaron adherir durante 3 horas, se sustituyó el medio por medio de diferenciación y se incubó durante 1 hora más. Posteriormente, se inició la inducción en la que se añadió el medio de diferenciación suplementado con los factores tal y como se describe en la **Tabla 10**, en la columna "1er pulso". Tras 4 días en cultivo, los medios se retiraron y se añadieron los medios suplementados correspondientes al "2do pulso". En el octavo día de cultivo se procedió a la medición de la actividad FA total siguiendo el protocolo descrito en el anexo 8.2.9.

Tratamiento	1er pulso	2do pulso
C-	-	-
I	IGF-1	-
B2	BMP-2	-
B6	BMP-6	-
B2 + I	BMP-2 + IGF-1	-
B6 + I	BMP-6 + IGF-1	-
B2 --> I	BMP-2	IGF-1
B6 --> I	BMP-6	IGF-1
I --> B2	IGF-1	BMP-2
I --> B6	IGF-1	BMP-6

Tabla 10. Pulsos de BMP y/o IGF-1 aplicados sobre los cultivos de MC3T3-E1. En la primera columna se muestran los nombres asignados para cada tratamiento, que corresponden a los suplementos aplicados en el primer pulso al día 0 de cultivo y en la segunda columna los correspondientes al segundo pulso en el día 4. **IGF-1:** 15 nM; **BMP-2 o -6:** 6 nM.

5.3.3 Mineralización *in vitro*.

Se evaluó la capacidad de las MC3T3-E1 de producir matriz extracelular mineralizada en respuesta a los diferentes pulsos de BMP y/o IGF-1. Para ello, se sembraron 50.000 células/cm² en placas de 24 pocillos en medio completo y se incubaron en condiciones estándar de cultivo. Transcurridas 48 horas, se inició el período de tratamiento siguiendo el esquema de inducción (**Figura 50**) añadiendo los diferentes tratamientos indicados en la **Tabla 10** disueltos en medio osteogénico (sin dexametasona).

Tras 21 días de tratamiento, los cultivos se fijaron y se realizó la tinción con rojo alizarina para evidenciar la formación de matriz extracelular mineralizada. Tras el registro fotográfico de los resultados, se procedió a la extracción del colorante para la estimación cuantitativa de los niveles de mineralización en respuesta a cada tratamiento (protocolo detallado en el anexo 8.2.10).

5.3.4 Recubrimiento de Helistat con alginato y/o gelatina.

Estos experimentos se realizaron con el objetivo de desarrollar un protocolo mediante el cual recubrir las esponjas de colágeno con polímeros naturales como el alginato y/o la gelatina con la finalidad de modificar los patrones de liberación de los factores cargados sobre las mismas.

Para ello, se prepararon soluciones de recubrimiento con diferentes concentraciones de alginato y gelatina, tal y como se indica en la siguiente tabla:

Nombre	Concentración final de Alginato (% p/v)	Concentración final de Gelatina (% p/v)
A2/G0	2	0
A1,5/G1,5	1,5	1,5
A1,5/G0	1,5	0
A1/G3	1	3
A0,5/G4,5	0,5	4,5
A0,5/G3	0,5	3
A0,5/G1,5	0,5	1,5
A0,5/G0	0,5	0

Tabla 11. Esponjas recubiertas con diferentes mezclas de alginato y gelatina. Se muestran las concentraciones finales de las soluciones de recubrimiento probadas y los nombres asignados para cada tipo de esponja.

En términos generales, el procedimiento llevado a cabo consistió en embeber las esponjas de Helistat con las diferentes soluciones de alginato y/o gelatina (**Tabla 11**) e iniciar la polimerización sumergiendo las esponjas en una solución fría de cloruro cálcico (CaCl_2) 0,2 M durante 20 minutos. Posteriormente, se lavaron 3 veces con solución salina para retirar el calcio remanente, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se sometieron a liofilización durante 18 horas.

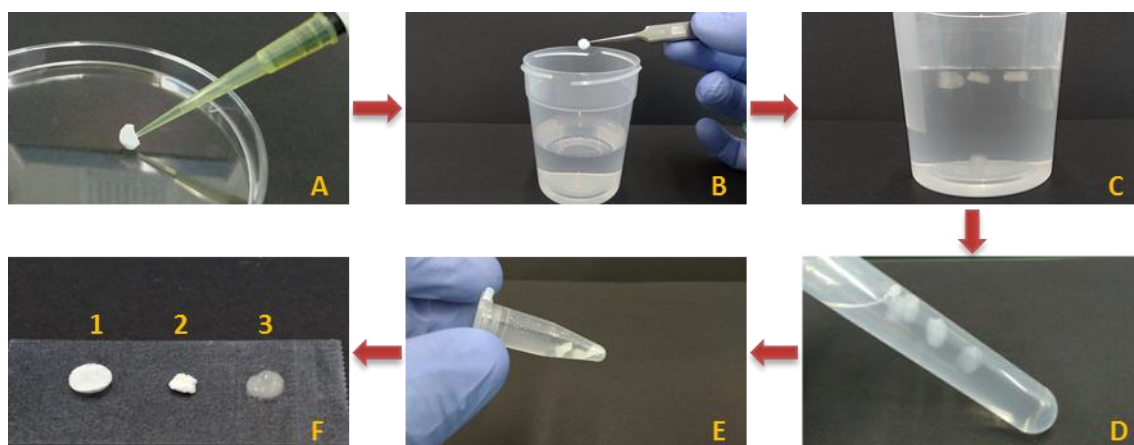


Figura 51. Esquema en imágenes del proceso de recubrimiento con alginato y/o gelatina de las esponjas de Helistat. **(A)** Carga de 20 μL de solución de recubrimiento, **(B)** inmersión en solución de CaCl_2 , **(C)** incubación en frío durante 20 minutos, **(D)** lavado en solución salina y **(E)** transferencia a tubos de 1,5 mL agujereados para congelado rápido en nitrógeno líquido y liofilización durante 18 horas. En **(F)** se muestran los diferentes estados de la esponja durante el proceso: **(1)** Helistat, **(2)** Helistat recubierto liofilizado, **(3)** Helistat recubierto y liofilizado tras su rehidratación.

En aquellos casos en los que se realizaron experimentos cargando dos factores sobre la misma esponja, se probaron condiciones en las que se añadió uno de los factores a la esponja

sin recubrir, se realizó el recubrimiento y, tras la liofilización, se añadió el segundo factor. Todo el procedimiento de recubrimiento en detalle se describe en el anexo 8.1.7.

5.3.5 Detección de la liberación de BMP-2 cargado sobre Helistat recubierto con alginato y gelatina por *immunoblot*.

Para comprobar el posible efecto que tenía el recubrimiento de Helistat con alginato y gelatina sobre los patrones de liberación de un factor cargado sobre las esponjas, se llevaron a cabo experimentos empleando la BMP-2 como factor para probar este modelo, basándonos en la experiencia previa que tenemos en el grupo trabajando con la carga de esta proteína sobre las esponjas de colágeno.

En primer término, se eligieron esponjas recubiertas únicamente de alginato en una concentración alta (A2/G0) y otra baja (A0,5/G0). Tras el resultado de esta primera prueba, se realizó un segundo experimento en el que se estudió la liberación de las esponjas cuyo recubrimiento incluyera gelatina en proporciones baja (A1,5/G1,5) y alta (A0,5/G4,5).

En ambos casos, el protocolo llevado a cabo fue similar:

1. Se tomaron las esponjas de cada condición a probar. Por norma general, se utilizó una esponja control y dos réplicas cargadas con BMP-2 por tipo de esponja.
2. Sobre la esponja liofilizada, se cargó 1 µg de BMP-2 contenido en 10 µL de solución o 10 µL de solución salina en los controles negativos.
3. Se dejaron secar al aire durante 15 minutos.
4. Se transfirieron a tubos de 2 mL precargados con 120 µL de solución salina y se lavaron en agitación a temperatura ambiente durante diferentes períodos de tiempo comprendidos entre 15 minutos y 24 horas según el ensayo.
5. En cada uno de estos tiempos sucesivos de lavado, se retiraron 100 µL de cada tubo, se almacenaron en tubos limpios a -20 °C y se añadieron 100 µL de solución salina fresca al tubo con la esponja en lavado.
6. Tras almacenar los lavados de todas las esponjas evaluadas, se realizó una extracción final añadiendo 100 µL de una solución de citrato sódico (6% p/v) con la que se incubó durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Esta solución desestabiliza la estructura de los hidrogeles de alginato y permite solubilizarlo por completo. Este paso se realizó como extracción final de la BMP-2 remanente tras los lavados que estuviera asociada o retenida por el alginato.
7. Con los lavados y el extracto final de citrato, se llevó a cabo el protocolo de *immunoblot* detallado en el anexo 8.1.8 para detectar la presencia de BMP-2 liberada.
8. Con las esponjas, se realizó el protocolo de *immunoblot* sobre esponjas descrito en el anexo 8.1.9 para observar la BMP-2 retenida en las esponjas tras los lavados y la extracción con citrato sódico.

5.3.6 Ensayo prospectivo de osificación ectópica *in vivo* de Helistat recubierto de alginato (A2/G0) cargado con BMP-2.

Este pequeño experimento se realizó para determinar si, ante un ambiente con una capacidad más alta de degradar el recubrimiento de alginato de las esponjas, la BMP-2 cargada sobre ellas ejercía el efecto biológico registrado en otras condiciones.

Para ello, se prepararon únicamente 2 condiciones diferentes a implantar:

- **Esponjas BMP-2:** Cinco (5) esponjas A2/G0 tras su liofilización cargadas con 1 µg de rhBMP-2 contenidos en 10 µL de 4 mM HCl + 0,1% BSA.
- **Esponjas C-:** Tres (3) esponjas A2/G0 tras su liofilización cargadas únicamente con 10 µL de 4 mM HCl + 0,1% BSA.

Las esponjas cargadas se dejaron secar durante 20 minutos al aire en una cabina de seguridad biológica. Los 8 implantes se distribuyeron al azar en las 4 localizaciones de 2 animales y se procedió a su implantación tal y como se describe en el anexo 8.3.1.

Trascurridos 21 días, todos los implantes se destinaron al análisis histológico, siguiendo un protocolo estándar de fijación, descalcificación, inclusión y corte. Las muestras se sometieron a una tinción de hematoxilina-eosina para evaluar sus características histológicas generales. El procesamiento y tinción de las muestras se expone detalladamente en el anexo 0.

5.3.7 Ensayo cuantitativo de liberación de BMP-6 e IGF-1 cargado sobre esponjas recubiertas de alginato y/o gelatina por ELISA directo.

Este grupo de experimentos se realizó con la finalidad de cuantificar la cantidad de BMP-6 e IGF-1 liberada a partir de esponjas de Helistat recubiertas con las diferentes combinaciones de alginato y gelatina previamente mencionadas.

Para ello, se realizaron ensayos preliminares para determinar las condiciones óptimas de incubación de los antígenos, concentraciones de anticuerpos primarios y secundarios, tiempos y condiciones de incubación de dichos anticuerpos, así como los tiempos de revelado. A partir de estos ensayos, se dilucidaron los intervalos de sensibilidad de los ELISA para BMP-6 e IGF-1 en los que se podía hacer una interpolación con un alto nivel de confianza. El protocolo resultante de esta optimización se describe en detalle en el anexo 8.1.10.

Para los experimentos de liberación, se realizaron las pruebas sobre esponjas cargadas con 530 ng de IGF-1 + 1000 ng de BMP-6 de la siguiente forma:

1. Recubrimiento de esponjas y carga de factores:
 - a. **Esponjas tipo H+A:** Carga del IGF-1 antes del paso de recubrimiento (previo al paso A; **Figura 51**). Tras la liofilización, se cargó sobre la misma la BMP-6, se dejó secar 20 minutos al aire y se procedió al lavado.
 - b. **Esponjas tipo H:** Helistat sin recubrimiento sobre el que se cargó el IGF-1 directamente, se dejó secar durante 20 minutos, se cargó la BMP-6, se secó durante otros 20 minutos al aire y se procedió al lavado.

2. Para el protocolo de lavado, cada una de las esponjas se transfirió a un tubo de 2 mL con tapón de rosca cargado con 250 μ L de PBS que se sometió a agitación a temperatura ambiente.
3. Se realizaron lavados durante 1, 2, 4, 8, 24, 72 y 168 horas (7 días). En cada uno de estos tiempos, se recolectaron los 250 μ L de cada tubo, se transfirieron a tubos limpios para almacenar a -20 °C hasta su medición y se completó con 250 μ L de PBS fresco el tubo con la esponja para proseguir con el lavado.
4. En placas por separado, se cuantificó por ELISA a partir de muestras de cada lavado la cantidad de BMP-6 e IGF-1 liberada durante todo el período, interpolando sobre los valores resultantes de curvas patrón realizadas con soluciones de concentración conocida para ambos factores.

5.4 Resultados (Sección C).

5.4.1 Actividad fosfatasa alcalina en respuesta a pulsos secuenciales de BMP y/o IGF-1.

Los cultivos de MC3T3-E1 fueron sometidos al tratamiento con las diferentes combinaciones de BMP y/o IGF-1 siguiendo el esquema de pulsos indicado en la sección 0. Tras los 8 días de tratamiento, se realizó la medición de la actividad FA total.

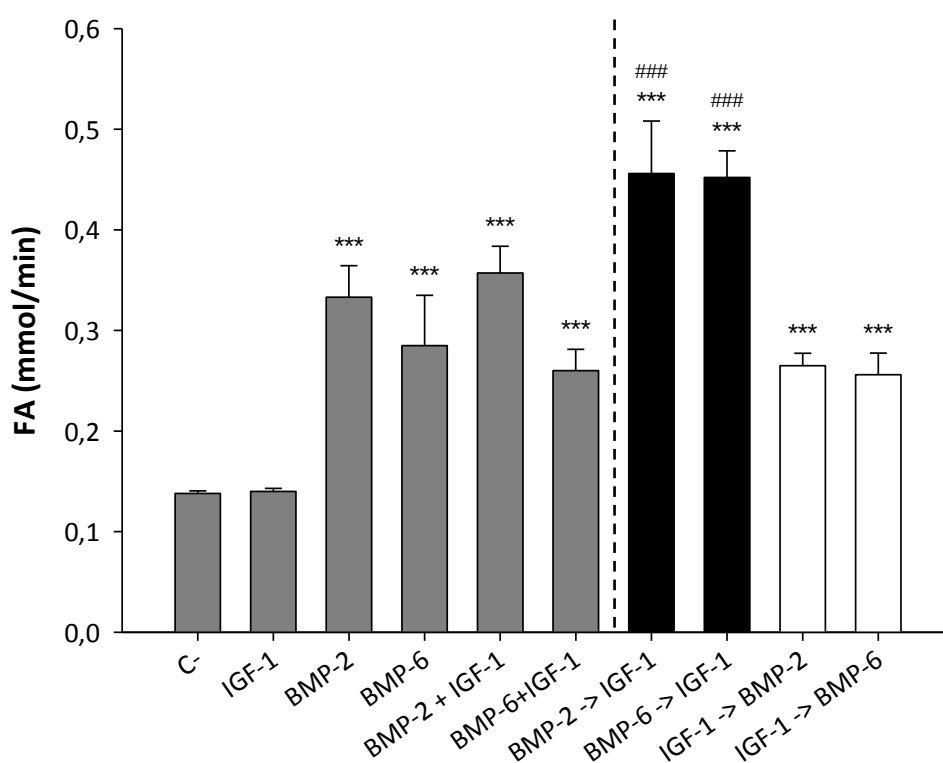


Figura 52. Actividad FA total de MC3T3-E1 sometidas al tratamiento con pulsos secuenciales de BMP y/o IGF-1. Se muestra la actividad FA total promedio tras los 8 días de tratamiento con los diferentes pulsos indicados en la sección 0. En gris, las barras correspondientes a los tratamientos con un solo pulso a día 0. Las barras en negro corresponden a los tratamientos que recibieron los pulsos de forma secuencial (BMP el día 0 e IGF-1 el día 4). En blanco, las barras correspondientes a la administración secuencial en el orden inverso. (*) $p \leq 0,001$ Diferencia significativa contra el control negativo (C-). (##) $p \leq 0,001$ Diferencia significativa en comparación con el resto de condiciones (excepto con la otra condición también marcada con #).

En la **Figura 52**, se observa una actividad FA significativamente mayor con respecto al control negativo en respuesta al pulso de 4 días tanto de BMP-2 como de BMP-6 y sus mezclas con IGF-1 (barras grises). Sin embargo, la adición de IGF-1 no actuó de forma sinérgica con ninguna de las BMP tal y como se observara en los experimentos presentados en la sección 2

en los que se administró la mezcla de ambos factores de forma continua durante todo el período de tratamiento (**Figura 43**).

No obstante, la administración secuencial de estos factores en los que se realizó un pulso de 4 días de BMP y un segundo pulso con IGF-1 (barras negras) sí generó un aumento significativo de la FA total, registrando valores mayores que el resto de los tratamientos. En aquellas condiciones en las que se invirtió el orden (barras blancas), este efecto sinérgico se perdió y las células tuvieron una respuesta similar al resto de las condiciones con BMP.

5.4.2 Ensayo de mineralización *in vitro* en respuesta a la administración de pulsos secuenciales de BMP y/o IGF-1.

Este experimento se realizó de forma homóloga al anterior pero llevando a cabo las modificaciones necesarias para el ensayo de mineralización: partir de un cultivo confluyente y emplear medio suplementado con ascorbato y β -glicerofosfato. Siguiendo el esquema de inducción en pulsos secuenciales, transcurridos 21 días tras el inicio del tratamiento, se realizó la tinción con rojo de alizarina y la correspondiente extracción del colorante para su posterior cuantificación. El resultado obtenido fue el siguiente:

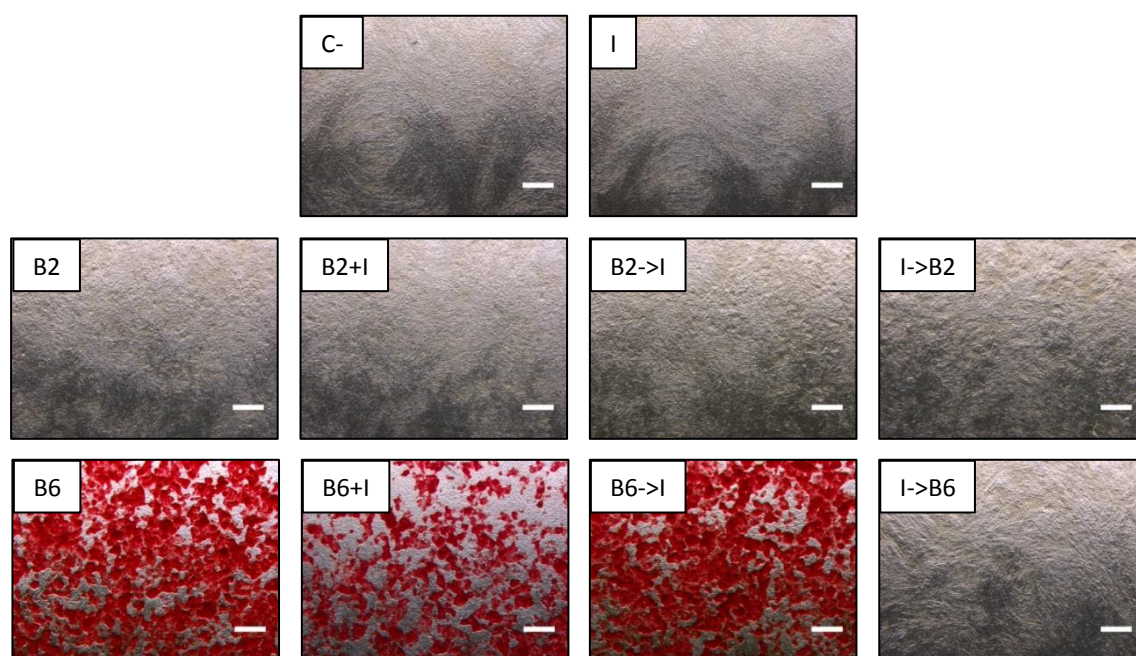


Figura 53. Tinción con rojo de alizarina de MC3T3-E1 tras 21 días de tratamiento con pulsos secuenciales de BMP y/o IGF-1. En la figura se observan los diferentes tratamientos con IGF-1 (**I**), BMP-2 (**B2**) y BMP-6 (**B6**). El signo (+) indica el suministro conjunto de ambos factores en el primer pulso mientras que (->) denota la administración secuencial de los mismos a los días 0 y 4 respectivamente. Barra de escala = 1 mm.

En la **Figura 53** se puede evidenciar que ninguno de los pulsos de BMP-2 por separado, mezclado con IGF-1 o administrado de forma secuencial, indujo la formación de matriz mineralizada (fila 2), teniendo el cultivo una apariencia muy similar a las condiciones C- e IGF-1 (fila 1).

Sin embargo, tanto el pulso de 4 días con BMP-6 como con la mezcla BMP-6+IGF-1 indujeron la síntesis de matriz mineralizada, evidenciada por la fuerte tinción rojo brillante de los nódulos de mineralización formados. En el caso de la administración secuencial de estos dos factores, únicamente la secuencia BMP-6 seguido de IGF-1 indujo la mineralización mientras que las células tratadas con la secuencia a la inversa no presentaron ninguna evidencia de acumulación de mineral en su matriz (fila 3).

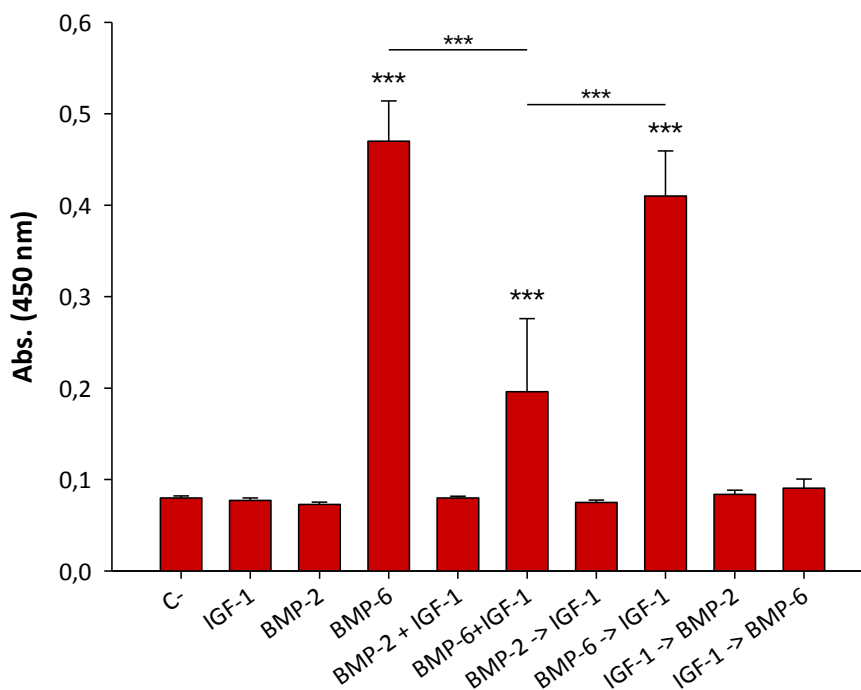


Figura 54. Cuantificación del colorante extraído a partir de los cultivos sometidos a la tinción con rojo de alizarina. Se observa el promedio de la absorbancia a 450 nm para cada tratamiento. (*) $p \leq 0,001$ Diferencia significativa contra el control negativo (C-) o entre los 2 tratamientos unidos por el segmento de recta.

La cuantificación de los extractos generados fue congruente con lo observado en la **Figura 53** para la actividad FA, indicando que todos los tratamientos en los que se suministró un pulso de BMP-6 a día 0 (BMP-6, BMP-6 + IGF-1 y BMP-6 -> IGF-1) presentaron valores significativamente mayores que el control negativo. Además, se determinó que la adición de IGF-1 mezclado con BMP-6 en el primer pulso disminuyó significativamente la mineralización si se compara con la condición donde sólo se suplementó con BMP-6. Cuando, por el contrario, la administración se realizó de forma secuencial, se recuperaron los niveles de mineralización obtenidos con la condición de sólo BMP-6.

5.4.3 Caracterización de la liberación de BMP-2 cargada sobre esponjas recubiertas de alginato.

Dados los resultados obtenidos en los experimentos de administración secuencial de los factores de crecimientos antes citados, se procedió a emplear recubrimientos con alginato

sobre las esponjas de Helistat para determinar si ello tenía efectos sobre los patrones de liberación de los factores cuando las esponjas se sometían a un proceso de lavado. Se eligió este polímero natural por su disponibilidad, facilidad de manejo y porque se emplea de manera rutinaria para la formación de hidrogeles diseñados para la liberación de fármacos, la encapsulación de células y otras aplicaciones clínicas muy variadas.

El objetivo final de esta serie de experimentos fue diseñar una estrategia sencilla mediante la cual controlar la liberación de BMP-6 e IGF-1. El procedimiento planteado fue cargar el IGF-1 sobre el Helistat, realizar el recubrimiento polimérico para retrasar su liberación y finalmente cargar la BMP-6 sobre la esponja recubierta. Con esta metodología se pretende conseguir una liberación inicial de la BMP-6 cargada sobre el recubrimiento y, conforme éste se fuera degradando, la liberación más tardía y progresiva del IGF-1.

Inicialmente, se realizaron los lavados progresivos con PBS. Sin embargo, el calcio utilizado para inducir la polimerización del alginato formó un precipitado con el fosfato presente en el tampón PBS. Este precipitado y los restos de alginato que en este tampón se degrada más rápidamente, hicieron imposible la transferencia de los lavados y extractos a la membrana de nitrocelulosa con la que se realizaron los *blot* por lo que tuvo que emplearse solución salina (NaCl 0,9%) para realizarlos. Es importante tomar este hecho en consideración para realizar el análisis de los resultados de los experimentos de liberación.

5.4.3.1 Estimación de la liberación de BMP-2 por inmunoblot a partir de esponjas recubiertas con alginato.

Como prueba inicial empleamos la BMP-2 como modelo basándonos en la experiencia previa que se tiene en el grupo de investigación en cuanto a la interacción de este factor con otras esponjas de colágeno en estudios previos realizados. Experimentos anteriores han permitido inferir que las esponjas de colágeno tiene una capacidad relativamente baja de retener BMP-2. El objetivo de estos ensayos fue determinar el patrón de liberación de la BMP-2 cargada sobre el recubrimiento polimérico para con ello tener una idea preliminar del posible comportamiento de la BMP-6 en este sistema.

En este ensayo se realizó el recubrimiento de las esponjas de Helistat con algunas de las condiciones que sólo contenían alginato (**Tabla 11**). Sobre las mismas, se cargó 1 µg de BMP-2 y se sometieron a lavados sucesivos con solución salina (NaCl 0,9%). Los lavados se almacenaron y, posteriormente, se cargaron en una membrana de nitrocelulosa para su detección por *inmunoblot*. Adicionalmente, se realizó el *blot* directo sobre las esponjas para visualizar la BMP-2 remanente tras los lavados y la extracción con citrato sódico.

Inicialmente, se probaron esponjas recubiertas únicamente con alginato a dos concentraciones (A2/G0 y A0,5/G0).

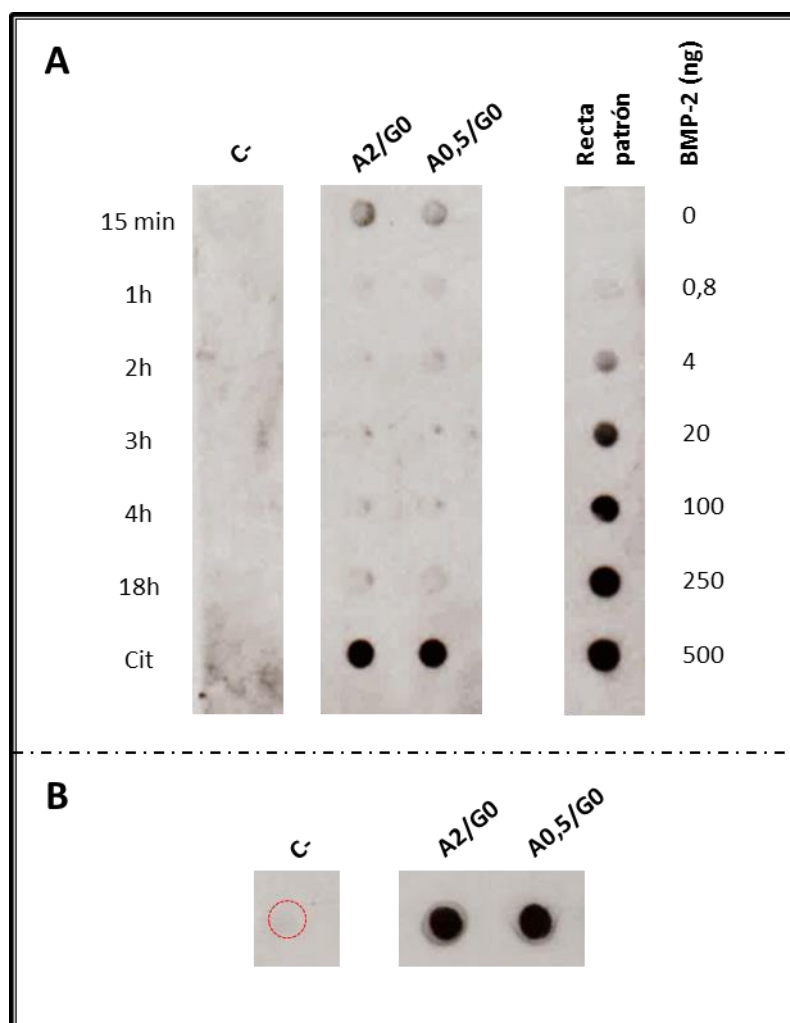


Figura 55. Liberación de BMP-2 cargada sobre Helistat recubierto con alginato. En **(A)** se muestra el *immunoblot* de los lavados realizados a los diferentes tiempos, así como para la extracción final con citrato (Cit) para las 2 condiciones probadas. Se muestra también una esponja A2/G0 en la que no se cargó BMP-2 como control negativo (C-). A la derecha, se incluye una recta patrón generada con cantidades conocidas de BMP-2 cargada directamente sobre la misma membrana. En **(B)** se muestra el *immunoblot* realizado directamente sobre las esponjas tras los lavados.

En la **Figura 55 A**, se observa que en las dos condiciones probadas, hubo una liberación inicial de BMP-2 en el primer lavado de 15 minutos realizado. Sin embargo, si bien es cierto que mediante esta técnica es difícil dar un carácter cuantitativo a las señales obtenidas, se puede afirmar que esta liberación disminuyó de forma importante a niveles, al menos, inferiores a 4 ng totales por lavado si se compara con la recta patrón.

En ambos casos se observó una cantidad mucho mayor de BMP-2 en el extracto realizado con citrato lo cual es un indicador de que, aun después de los lavados, se mantuvo retenida en el recubrimiento una proporción alta de la BMP-2 inicialmente cargada.

Por su parte y en contra de lo esperado, en la **Figura 55 B** se evidencia una importante retención de BMP-2 en las esponjas de Helistat ya desprovistas del recubrimiento, con señales en ambas condiciones y sin apenas señal detectable para las esponjas control negativo.

5.4.3.2 Ensayo prospectivo de osificación ectópica in vivo de Helistat recubierto de alginato cargado con BMP-2.

Para descartar que la retención de la BMP-2 en las esponjas recubiertas de alginato se debiera a que la solución salina empleada para los lavados no fuera capaz de degradar el recubrimiento de alginato, planteamos un experimento prospectivo en el cual se implantaron esponjas A2/G0, análogas a las empleadas en el *immunoblot* anterior (sección 5.4.3.1), siguiendo el protocolo de ensayo de osificación ectópica descrito en secciones previas. Se incluyeron esponjas control negativo en las que no se añadió ningún factor y esponjas cargadas con 1 μ g de rhBMP-2 sobre la esponja ya liofilizada.

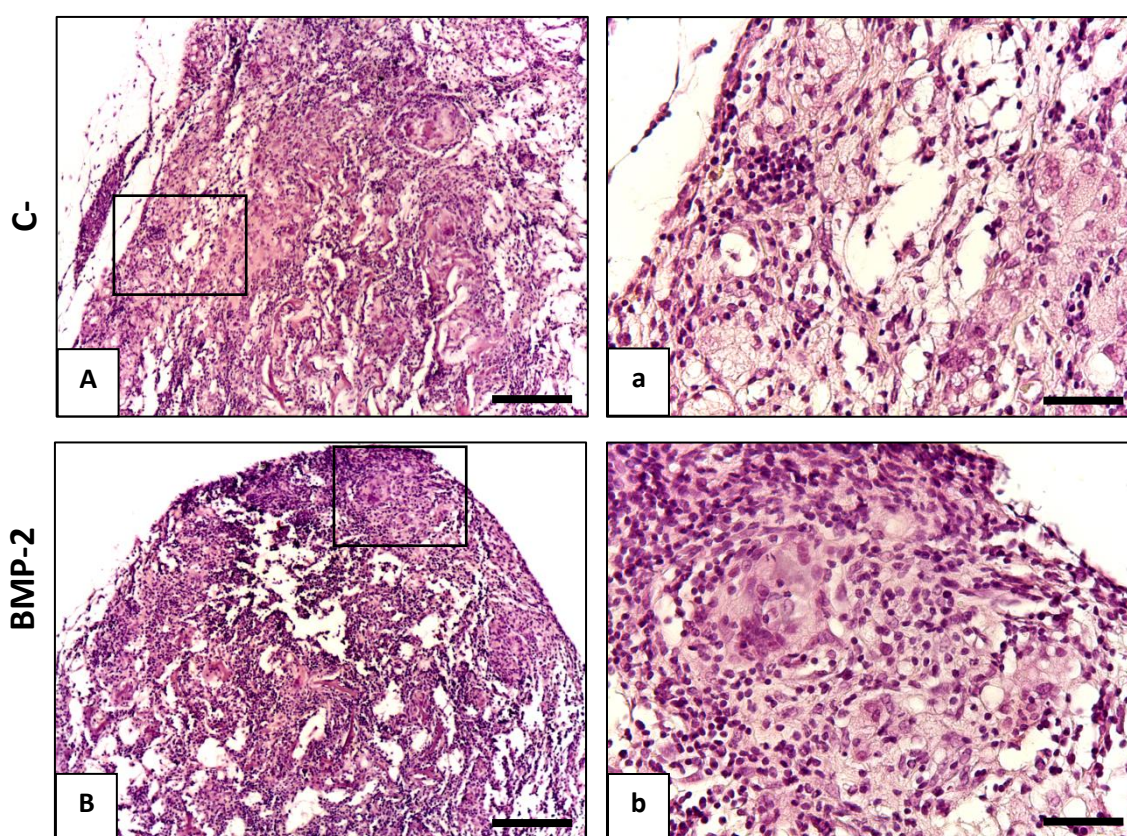


Figura 56. Análisis histológico de esponjas de Helistat recubiertas de alginato (A2/G0) cargadas con 1 μ g de BMP-2. Implantes **(A)** control negativo, **(B)** cargados con 1 μ g de rhBMP-2. En minúscula se denotan micrografías a mayor aumento correspondientes a la zona inscrita en el recuadro de la foto contigua. Tinción de hematoxilina-eosina. Barras de escala = 200 μ m en **A** y **B**; 50 μ m en **a** y **b**.

En la **Figura 56** se muestran micrografías de implantes representativos de las dos condiciones probadas. Como puede observarse, no hubo signos de osificación en los implantes analizados en respuesta a la adición de BMP-2 sobre las esponjas recubiertas. En ambos casos se evidenciaron implantes altamente infiltrados de células formando un tejido fibrótico más o menos compacto y presente incluso en la parte más interna del implante. No hubo ningún signo de encapsulación ni de inflamación evidente. Además, se observaron pocos restos de las

fibras de colágeno remanentes de la esponja, así como ninguna señal evidente de presencia del alginato.

5.4.4 Caracterización de la liberación de BMP-2 cargada sobre esponjas recubiertas de alginato y gelatina.

Los experimentos de la sección anterior indicaron que, en contra de lo que se esperaba, la BMP-2 se quedó retenida en el Helistat recubierto de alginato *in vitro* y que, en el ensayo *in vivo*, no hubo evidencias de osificación ectópica típicas de las esponjas cargadas con esta cantidad de BMP-2 (como pudieron observarse en la **Figura 38** de la sección A). Es por ello que se planteó la posibilidad de incluir en la mezcla de recubrimiento otro polímero natural como lo es la gelatina, el cual presenta una degradabilidad más alta que el alginato. Con esto, se intentaría aumentar la liberación de la BMP-2 cargada sobre la esponja recubierta y limitar su posible interacción con las fibras de colágeno I de la esponja.

Para ello, se realizó un ensayo de liberación de BMP-2 y detección de la cantidad liberada por *immunoblot* homólogo al de la sección 5.4.3.1. En este caso, se emplearon esponjas recubiertas con mezclas de alginato y gelatina. Se probaron las mezclas A0,5/G4,5 y A1,5/G1,5 (**Tabla 11**).

En la **Figura 57 A** se observa que, como consecuencia de la inclusión de gelatina en la mezcla de recubrimiento, hubo una liberación progresiva de BMP-2. Para la combinación A1,5/G1,5 se registraron señales a lo largo de todo el período de lavado mientras que para A0,5/G4,5 la liberación disminuyó entre las 8 y 24 horas (inscritas en el recuadro).

En este caso, las señales correspondientes a los extractos con citrato sódico fueron más bajas que para el *blot* anterior (**Figura 55**). Por ello, se asume que el hecho de incluir la gelatina en la mezcla facilitó la liberación de BMP-2 durante los lavados y, por tanto, la cantidad remanente en el extracto de citrato fue menor. A pesar de ello, se siguió observando una retención de BMP-2 relativamente alta en los *immunoblot* realizados directamente sobre las esponjas (**Figura 57 B**).

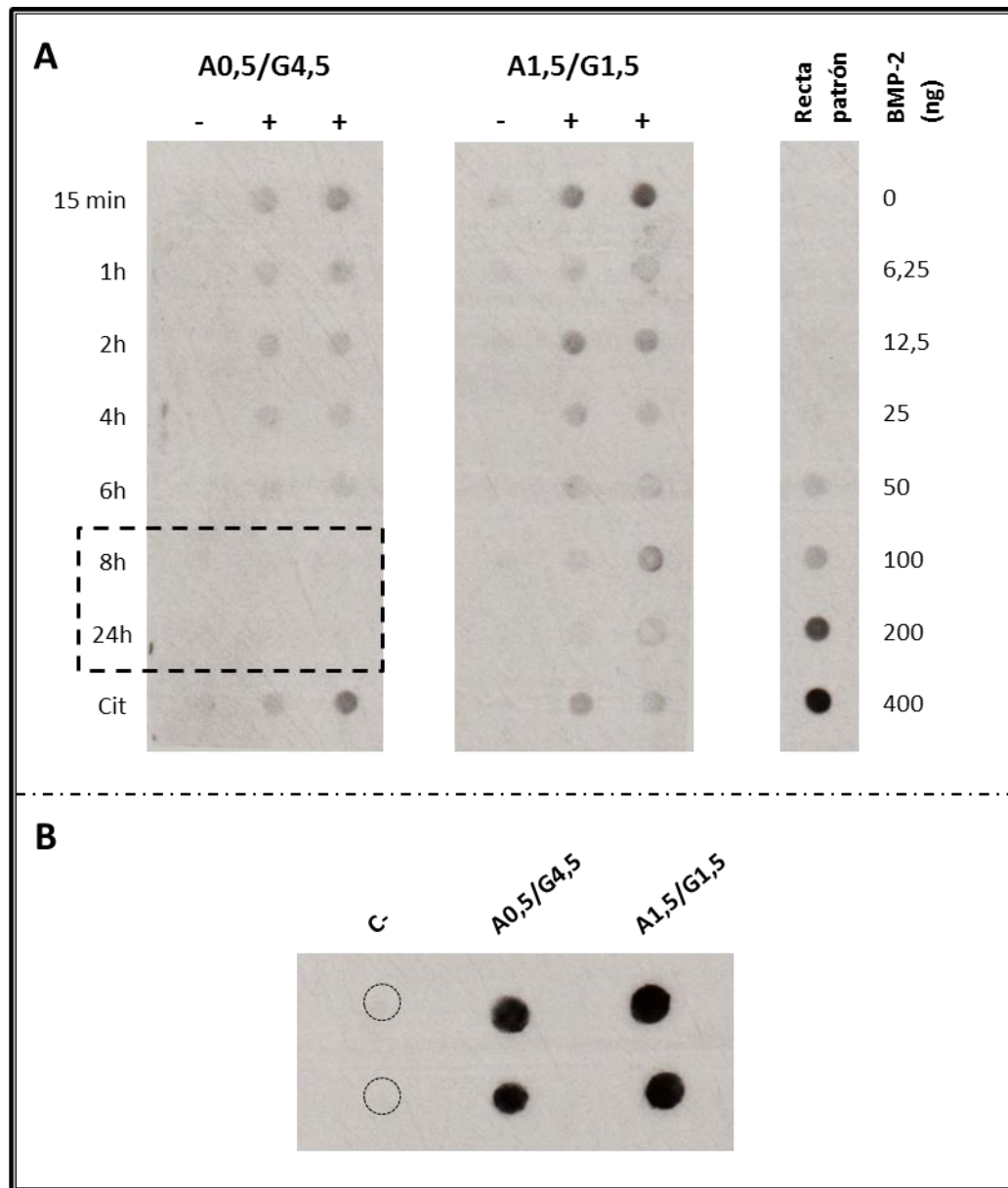


Figura 57. Liberación de BMP-2 cargada sobre Helistat recubierto con alginato y gelatina. En **(A)** se muestra el *immunoblot* de los lavados a los diferentes tiempos y para la extracción final con citrato (Cit) para las 2 condiciones probadas. En este caso, se incluye una esponja sin BMP-2 (-) y 2 réplicas de esponjas cargadas con BMP-2 (+) para cada condición. A la derecha, una recta patrón generada con cantidades conocidas de BMP-2 cargada directamente sobre la misma membrana. En el recuadro se destacan los lavados en los que ya no se registró liberación de BMP-2. En **(B)** se muestra el *immunoblot* realizado directamente sobre las esponjas con 2 réplicas por condición.

5.4.5 Cuantificación de la liberación de BMP-6 e IGF-1 cargado sobre Helistat recubierto de alginato mediante ELISA.

Teniendo una idea preliminar tras los *inmunoblots* anteriores, se procedió directamente a realizar pruebas con esponjas recubiertas con los polímeros naturales cargadas con BMP-6 e IGF-1 y realizando la detección por ELISA para dar carácter cuantitativo al ensayo. En este caso, los lavados pudieron hacerse con PBS puesto que la técnica sí permitió utilizar los extractos a pesar de la presencia de restos insolubles en ellos.

En primer lugar, se realizó una serie de experimentos previos que permitieron determinar las concentraciones óptimas para cada anticuerpo primario y su correspondiente secundario, el intervalo de concentración de antígeno que podíamos detectar empleando nuestro sistema de ELISA directo y otros parámetros como tiempos y temperaturas de incubación, tiempos de revelado y otros.

Como primera condición, empezamos probando esponjas recubiertas únicamente de alginato (A1,5/G0) para corroborar si se repetía la retención evidenciada para la BMP-2 y para poder cuantificar estas liberaciones. Tal y como se detalla en la sección 5.3.7, se cargaron 530 ng de IGF-1 sobre el Helistat, que fue posteriormente recubierto con el alginato y liofilizado. A continuación, se cargaron 1.000 ng de BMP-6 sobre las esponjas y se procedió a realizar los lavados progresivos (esponjas H+A). Esta condición se comparó con Helistat sin recubrir con ambos factores cargados directamente sobre el biomaterial (esponjas H).

Los resultados indicaron que, tal y como se observó en los *inmunoblots* previos realizados con BMP-2 sobre Helistat recubierto de alginato (H+A), el sistema retuvo una importante cantidad de la proteína cargada. En la **Figura 58 A** se evidencia como, para las esponjas con alginato, tras 7 días de lavado y el tratamiento con citrato sódico, sólo se detectaron un total de 344 ng de los 1.000 ng totales de BMP-6 que se cargaron al inicio del período, todo esto a pesar de que el PBS presentó una capacidad de degradación del material visiblemente mayor que la solución salina.

Sin embargo, la comparación con respecto a la condición de Helistat sin recubrir (H) demostró que de hecho, tuvo una capacidad de retención aún más alta puesto que sólo se detectaron 157 ng totales de BMP-6 durante todo el período que, en su mayoría, se liberaron durante las primeras 8 horas de lavado. Esto indica que, si bien es cierto que en ambos casos se retuvo un gran porcentaje de proteína en el sistema, el recubrimiento de alginato pareció favorecer el aumento de la liberación de BMP-6 en las condiciones de este experimento. Además, el recubrimiento de alginato tuvo como consecuencia una liberación más prolongada y sostenida puesto que siguió detectándose liberación de BMP-6 entre los lavados a 1, 3 y 7 días.

Para IGF-1 (**Figura 58 B**) también hubo una liberación muy baja de la proteína inicial cargada teniendo valores totales de sólo 68 y 25 ng para H y H+A respectivamente, de los 530 ng iniciales. En este caso, el comportamiento fue inverso a lo ocurrido con la BMP-6 dado que el recubrimiento con alginato disminuyó la cantidad de IGF-1 liberada si se compara con la esponja sin recubrir.

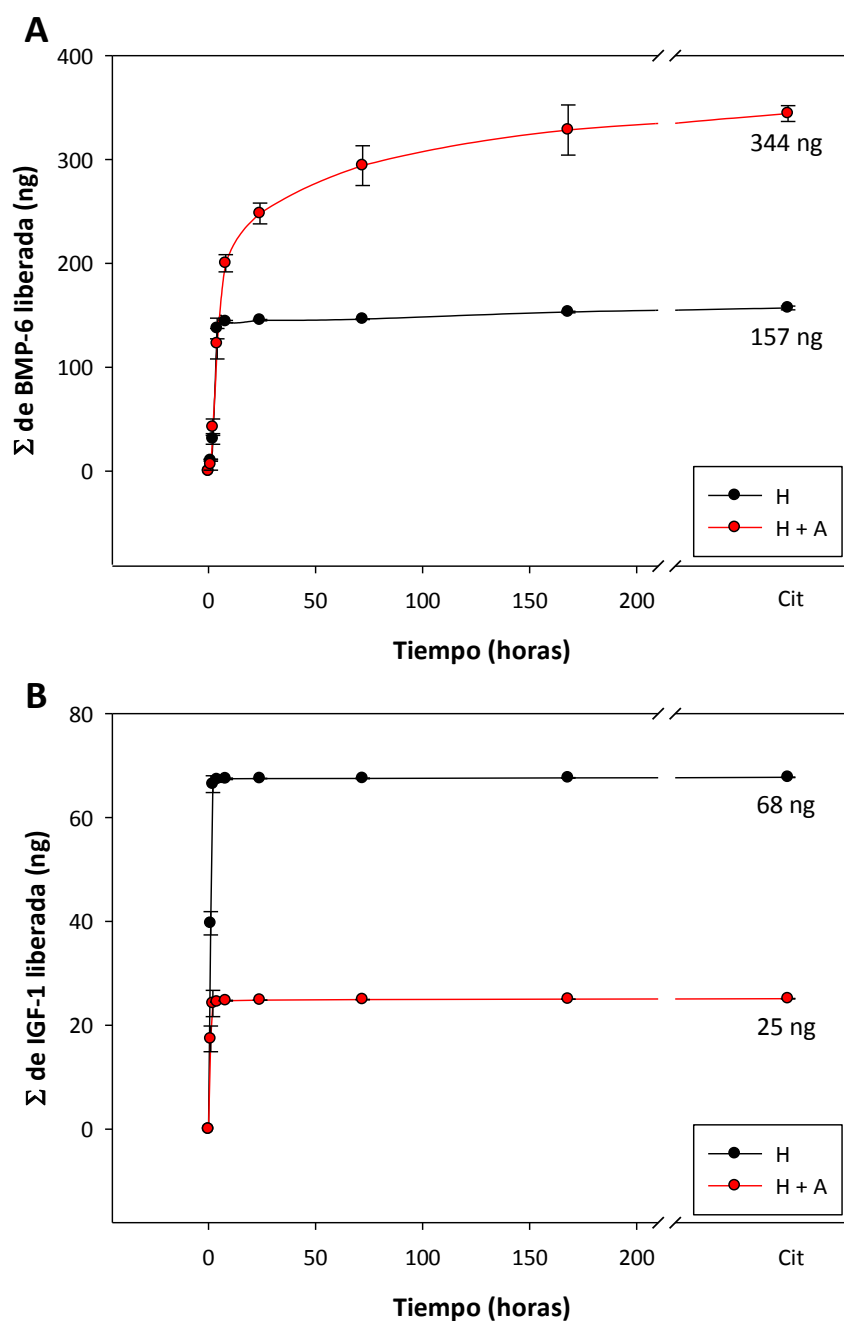


Figura 58. Cuantificación por ELISA de BMP-6 e IGF-1 liberado a partir de Helistat recubierto de alginato. Se muestran los valores promedio de la sumatoria de BMP-6 (A) e IGF-1 (B) liberado durante los sucesivos lavados realizados sobre esponjas de Helistat y esponjas de Helistat recubiertas con alginato al 2%. El último punto corresponde a la extracción final realizada con citrato sódico (Cit). Los números bajo cada curva indican la cantidad total de factor liberada durante todo el proceso.

6 Discusión.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han explorado diferentes estrategias orientadas a la mejora del sistema colágeno-BMP como principal alternativa a la utilización de injertos de hueso autólogo para la regeneración de hueso. En todos los casos, el objetivo principal es la disminución de las dosis de BMP utilizadas que, como ya se ha comentado en secciones anteriores, representa la principal desventaja de la administración de estos factores de crecimiento en la clínica.

Con este objetivo, se han mostrado diferentes estrategias que tienen el potencial de aumentar la capacidad regenerativa del sistema colágeno-BMP, modificando distintos aspectos de gran relevancia sobre la osificación. Básicamente, se han intentado explorar tres vías:

1. La funcionalización de las esponjas de colágeno mediante el empleo de péptidos biomiméticos que aportaran señales físicas similares a las que genera la matriz extracelular naturalmente.
2. La mezcla de factores de crecimiento que incrementaran el potencial osteoinductor de las BMP.
3. La administración secuencial de dichas mezclas de factores para incrementar su eficacia.

6.1 Péptidos biomiméticos.

6.1.1 vCBD-RGD y cCBD-PHSRN se unen de forma estable a Helistat y se alcanzan densidades de péptido por unidad de área superiores que para la esponja de Nimni.

Esta tesis doctoral parte de la experiencia previa en el grupo de investigación con las esponjas de Nimni funcionalizadas con el péptido vCBD-RGD. En ese trabajo, se demostró que la interacción del péptido con el material de colágeno era estable, que el mismo potenciaba ligeramente la diferenciación osteogénica *in vitro* tanto de MSC como de preosteoblastos de ratón y que la funcionalización de las esponjas de Nimni mejoraba el potencial osteoinductor de BMP-2 en un modelo de formación de hueso ectópico en ratas (Visser et al., 2014).

Con el objetivo de intentar mejorar los resultados obtenidos con el péptido de vCBD-RGD, se decidió incluir un segundo péptido que contuviera la secuencia sinérgica “PHSRN”. Este pentapéptido está presente en el dominio de adhesión celular de la fibronectina y actúa de forma sinérgica con la secuencia RGD mejorando su capacidad adhesiva, así como su potencial de influir positivamente sobre el proceso osteogénico (Hojo et al., 2001; Ochsenhirt et al., 2006). Es por ello que se planteó co-funcionalizar las esponjas con ambos péptidos, en un intento de mimetizar, lo más fielmente posible, las señales físicas que las células reciben a partir de la matriz a la que se adhieren o, en nuestro caso, al colágeno provisto de ambas moléculas.

Para ello, se diseñó el péptido PHSRN con un dominio de unión, diferente al empleado para el vCBD-RGD, derivado de la secuencia de la colagenasa de *C. histolyticum* (cCBD). Se ha descrito que la unión entre el factor de von Willebrand y el colágeno ocurre a través de interacciones iónicas entre los residuos cargados negativamente que conforman el dominio de

unión y los aminoácidos con carga positiva del colágeno (Huizinga et al., 1997). Sin embargo, la colagenasa de *C. histolyticum* se une al colágeno a través de una interacción más específica con las secuencias repetitivas (Pro-Hyp-Gly)_n y (Pro-Pro-Gly)_n, siempre que el número de repeticiones (n) sea suficientemente alto como para que formen estructuras de triple hélice (Matsushita et al., 2001). Estas diferencias sustentan la elección de estos dominios de unión, con base en la hipótesis de que ambos péptidos tendrían afinidad por regiones diferentes del colágeno y esto permitiría la co-funcionalización simultánea del material, sin que los péptidos compitieran entre sí.

Para esta tesis doctoral, a diferencia de trabajos anteriores, se decidió emplear una esponja de colágeno disponible comercialmente y aprobada por la FDA para su uso en clínica, como es la esponja hemostática Helistat®. Este cambio facilitaría tanto la posible traslación de estos resultados a estudios clínicos futuros, como la adquisición del biomaterial de forma sostenida. Para validar este nuevo material, se procedió a hacer una comparativa entre las afinidades de los péptidos por Helistat o por la esponja de Nimni.

Los ensayos de pegada cuantitativos (apartados 3.4.1.1 y 3.4.1.2) demostraron que, por separado, ambos péptidos se adhieren de forma estable, tanto a las esponjas de Nimni como a las esponjas de Helistat. Tanto vCBD-RGD como cCBD-PHSRN, presentan una afinidad mayor por el Helistat que por la esponja de Nimni (**Tabla 5 y Tabla 6**), alcanzando densidades de péptido por unidad de área superiores en la primera que en la segunda. Esto es una prueba de que las diferencias en los protocolos de fabricación empleados durante su producción pueden tener efectos sobre la disponibilidad de sitios con los que los dominios de unión al colágeno de nuestros péptidos pueden interactuar de forma estable.

En estudios previos existe cierta discrepancia en cuanto a las densidades de péptido óptimas que pueden tener efectos significativos sobre las células que se cultivan sobre estas superficies funcionalizadas. Trabajos realizados, empleando superficies no-adhesivas funcionalizadas con péptidos de RGD, reportan valores de 0,01 pmol/cm² (Massia y Hubbell, 1991), aproximadamente 4 pmol/cm² (Lagunas et al., 2012; Rezania et al., 1999) o hasta 100 pmol/cm² (Chollet et al., 2009) para inducir la adhesión eficiente de distintos tipos celulares, su extensión y la formación de adhesiones focales. Los péptidos probados en este trabajo se unen a las esponjas de colágeno con densidades que oscilan entre 3 y 14 pmol/cm² lo cual es cercano a los rangos previamente publicados.

6.1.2 La co-funcionalización de Helistat con ambos péptidos de forma simultánea fue posible, sin que hubiera interferencia aparente en cuanto a la estabilidad de la unión de ambas moléculas.

La visualización de los péptidos mediante técnicas de *blot* y por microscopía de fluorescencia, permitió confirmar que es posible funcionalizar las esponjas de Helistat con ambos péptidos de forma simultánea, sin que haya una disminución aparente de la afinidad y con una estabilidad en el tiempo de, al menos, 14 días sometidas a lavados. A pesar de ello, fue imposible, a nivel técnico, llevar a cabo una cuantificación de la cantidad de vCBD-RGD y cCBD-PHSRN retenido cuando se realizaba la co-funcionalización, por lo que no se pueden reportar valores de cantidad o densidad de péptido en esta condición.

6.1.3 Las proporciones utilizadas de ambos péptidos influyen directamente sobre el posible efecto aditivo o sinérgico de la presencia de cCBD-PHSRN sobre la acción de vCBD-RGD.

Habiendo comprobado que vCBD-RGD y cCBD-PHSRN se unen de forma estable al colágeno, añadidos por separado o simultáneamente, se analizó la capacidad de ambos péptidos de influir sobre las células en cultivo.

Como se ha descrito en el apartado 3.1, las secuencias RGD y PHSRN forman parte del dominio con capacidad de adherir células que se encuentra en la fibronectina. La actividad sinérgica que puede ejercer PHSRN sobre la acción de RGD está ligada directamente a su disposición espacial dentro de esta proteína. En la publicación original en la que se describe el péptido PHSRN, se estableció la importancia de que ambas secuencias se presenten con una disposición espacial adecuada para poder observar el efecto sinérgico sobre la adhesión y extensión celular (Aota et al., 1994). No obstante, existe cierta controversia en cuanto al mecanismo mediante el cual estas dos secuencias interactúan con las integrinas.

En un trabajo posterior, se funcionalizaron superficies con péptidos de RGD, PHSRN o un péptido que contenía ambas secuencias separadas mediante un espaciador de polietilenglicol (aaPEG). El resultado indicó que células de riñón de hámster sembradas sobre las superficies funcionalizadas con PHSRN-aaPEG-RGD, tuvieron una extensión mayor que las que se sembraron sobre las superficies únicamente provistas de aaPEG-RGD; mientras que el aaPEG-PHSRN, por sí sólo, no tuvo ningún efecto sobre la adhesión y extensión celular (Hojo et al., 2001).

En una aproximación similar en la que se generó un péptido con ambas secuencias separadas por un espaciador de glicinas (RGDG₁₃PHSRN), se demostró que osteoblastos sembrados en hidrogeles de PEG que incluían este péptido, presentaron una mayor adhesión, extensión y formación de adhesiones focales, así como una proliferación, actividad metabólica y actividad fosfatasa alcalina significativamente mayor a las células sembradas sobre hidrogeles únicamente con RGD (Benoit y Anseth, 2005). En ambos estudios, la distancia comprendida entre las dos secuencias es de, aproximadamente, 44 Å por lo que parece que este factor es importante para la consecución del efecto sinérgico del PHSRN sobre la acción de RGD.

Sin embargo, en otros trabajos se propone que RGD y PHSRN no interactúan de forma sinérgica con los sitios de unión a las integrinas, sino que, por el contrario, compiten por ellos. En un trabajo realizado por Feng y Mrksich, superficies funcionalizadas con RGD o con PHSRN adheridos covalentemente favorecieron, de forma similar, la adhesión de fibroblastos sobre las mismas, por lo que los autores atribuyen propiedades adhesivas a PHSRN de forma independiente a la presencia de RGD. De hecho, en este modelo, la presencia de PHSRN en forma soluble fue capaz de disminuir la adhesión de fibroblastos a las superficies funcionalizadas con RGD, por lo que proponen que ambas secuencias compiten por el mismo sitio en el receptor (Feng y Mrksich, 2004).

Se podría argumentar que, en el trabajo de Feng y Mrksich, no se consiguió el efecto sinérgico porque los péptidos se presentaron por separado y no formando parte de una misma molécula, por lo que no se puede mimetizar la disposición espacial adecuada requerida. Sin embargo, Ochsenhirt y colaboradores, demostraron que también es posible modificar los

patrones de adhesión y, sobre todo, de extensión de las células sobre las superficies funcionalizadas con péptidos de RGD y PHSRN en moléculas por separado. En este estudio realizado con células endoteliales (HUVEC) sembradas sobre superficies funcionalizadas con determinadas cantidades de ambos péptidos, se demostró que la extensión de las células es altamente dependiente tanto de la cantidad de péptido que se presenta en la superficie como de la proporción molar de uno con respecto al otro (Ochsenshirt et al., 2006).

A partir de este trabajo se puede inferir que, al presentar ambos péptidos por separado sobre la misma superficie, es posible conseguir configuraciones favorables para promover la interacción de RGD con las células y la actividad sinérgica de PHSRN, mediante el control de las proporciones y las cantidades totales de péptido que se utilicen en la funcionalización. Posiblemente, en determinadas proporciones y cantidades, la disposición espacial de ambos dominios se presenta mimetizando su configuración nativa en la fibronectina y, por tanto, puede ejercer una influencia similar.

Partiendo de esta aproximación, se realizaron en el presente trabajo pruebas preliminares de la actividad de ambos péptidos sobre células cultivadas en monocapa. Para ello, se diseñó en primer lugar, un experimento de ambos péptidos solubilizados en el medio midiendo su efecto sobre la actividad fosfatasa alcalina, tal y como se realizara previamente en el trabajo con vCBD-RGD y las esponjas de Nimni (Visser et al., 2014). En segundo lugar, se midió la adhesión celular sobre placas recubiertas de colágeno funcionalizadas con diferentes proporciones de ambos péptidos.

Los resultados obtenidos indicaron que el péptido cCBD-PHSRN es capaz de modificar tanto la actividad FA como la adhesión celular sin que fuera necesaria la presencia de vCBD-RGD. No obstante, para ambos experimentos, los valores máximos de actividad y adhesión se obtuvieron en condiciones en las que se emplearon mezclas de ambos péptidos, por lo que pareciera existir tanto un efecto de PHSRN de forma independiente, como un efecto aditivo o sinérgico en su mezcla con RGD para determinadas proporciones probadas.

Tanto el efecto en su forma soluble (para la actividad FA) como adheridos sobre las placas recubiertas de colágeno (para la adhesión), estuvo fuertemente influenciado por las proporciones de cada péptido suministradas. Un buen ejemplo de ello fue el tratamiento con medio suplementado con 4 μM de cCBD-PHSRN (sin vCBD-RGD), el cual aumentó significativamente la actividad FA (**Figura 20**). Sin embargo, mientras el mismo tratamiento mezclado con 1 μM de vCBD-RGD alcanzó el valor máximo de todo el ensayo (efecto aditivo), cuando esta concentración se incrementó hasta 4 μM de vCBD-RGD, más bien se generó una reducción significativa del efecto. Esto es una demostración de cuán relevante es la proporción de ambos péptidos utilizada con la finalidad de generar un efecto sobre las células. Según nuestro modelo, el cCBD-PHSRN puede tener influencia sobre las células de forma independiente pero, si se suministra mezclado con vCBD-RGD, puede potenciar el efecto de éste de forma directamente relacionada con las proporciones utilizadas.

6.1.4 La co-funcionalización de Helistat con vCBD-RGD y cCBD-PHSRN favoreció la adhesión celular pero no tuvo efectos sobre la diferenciación osteogénica.

Ante la imposibilidad técnica de determinar las densidades de péptido logradas en las esponjas funcionalizadas, se decidió añadir una cantidad saturante de cada uno de los péptidos. Como se comentara anteriormente, superficies funcionalizadas con densidades de RGD entre 0,01 pmol/cm² (Massia y Hubbell, 1991) y 4 pmol/cm² (Healy et al., 1999; Lagunas et al., 2012) inducen cambios significativos en la adhesión, extensión y formación de adhesiones focales en las células en cultivo. Sin embargo, estudios más orientados hacia la diferenciación osteogénica indican que los preosteoblastos y las hMSC se diferencian mejor sobre superficies funcionalizadas con RGD a densidades de 100 y 180 pmol/cm², respectivamente (Bilem et al., 2016; Chollet et al., 2009).

Dado que las densidades observadas como resultado de los experimentos de pegada para las esponjas de Helistat alcanzan un máximo de 15 pmol/cm² (Tabla 5 y Tabla 6), decidimos cargar las esponjas con una cantidad relativamente alta de cada péptido (10 µg por esponja) con la intención de conseguir las densidades más elevadas posibles para nuestro sistema, asegurando superar el umbral de los 4 pmol/cm² y, aunque muy por debajo, acercándonos lo más posible a los 100 pmol/cm².

Partiendo de esta base, los cultivos en agitación horizontal demostraron que la co-funcionalización de las esponjas con vCBD-RGD y cCBD-PHSRN, fue la única condición que generó un incremento significativo de la adhesión celular (Figura 30), siendo la intensidad de este efecto mayor para las rBMSC (82% de incremento) que para las MC3T3-E1 (15%). Esta diferencia puede estar asociada a que las rBMSC tienen una velocidad de adhesión mucho más baja que las MC3T3-E1, por lo que el efecto de la funcionalización pudo observarse de forma más patente al haberlas sometido a tiempos de adhesión similares. Además, se ha demostrado que la adhesión de las BMSC a la fibronectina es mediada, en gran medida, a través de la $\alpha_5\beta_1$ integrina que, como se puntualizará más adelante, es dependiente de la presencia tanto de RGD como de PHSRN para formar una interacción célula-matriz adecuada (Dänmark et al., 2012). Es por ello, que la acción conjunta de ambos péptidos pudiera ser especialmente beneficiosa para la adhesión de este tipo celular.

Es importante destacar que muchos de los efectos de este tipo de péptidos reportados en la literatura, se miden sobre superficies que no son inherentemente adhesivas y, en muchos casos, en condiciones controladas de cultivo en las que se utilizan medios libres de suero. En nuestro modelo, los efectos observados en respuesta a la funcionalización, ocurren en medios suplementados con suero que contiene una gran cantidad de proteínas que favorecen la adhesión y sobre un material de colágeno que tiene una capacidad inherente de adherir células, por lo que nuestra aproximación pudiera ser, salvando las distancias, más parecida a las condiciones fisiológicas de un implante *in vivo*.

6.1.5 La co-funcionalización de Helistat con vCBD-RGD y cCBD-PHSRN no favoreció de forma autónoma la osteogénesis.

La señalización por la vía de las integrinas es una importante ruta mediante la cual las células residentes en los tejidos registran las señales físicas provenientes de su entorno. Como ya se ha descrito en la introducción a la sección A de este trabajo (apartado 3.1), la transducción de señales a través de las integrinas deriva en la formación de adhesiones focales en el interior celular, que tienen una fuerte influencia sobre el reordenamiento del citoesqueleto y, adicionalmente, activan rutas de señalización relacionadas con la vía de las MAPK (ver **Figura 9**). Éste es un punto de cruce importante entre la transducción de señales provenientes de las moléculas estructurales de la matriz extracelular y las señales químicas derivadas de factores solubles. Es por ello que la estimulación de las integrinas también ejerce su influencia sobre la expresión de genes relacionados con la diferenciación y no únicamente con la adhesión y extensión celular.

En este sentido, tiene una especial relevancia qué integrinas son estimuladas desde la matriz extracelular. Moléculas como la osteopontina, sialoproteína ósea, vitronectina, colágeno tipo I y fibronectina son capaces de promover la adhesión osteoblástica mediante uniones dependientes de la secuencia RGD a través de una amplia gama de integrinas diferentes (Helfrich et al., 2008). Sin embargo, se ha demostrado que la unión entre los osteoblastos y la fibronectina es especialmente importante durante la formación y regeneración ósea, y que ésta ocurre con una preferencia muy alta a través de la $\alpha_5\beta_1$ integrina y su interacción simultánea con las secuencias RGD y PHSRN (Aota et al., 1994).

La $\alpha_5\beta_1$ es la integrina más presente en las células osteoblásticas y su activación se ha asociado directamente con el proceso de diferenciación osteogénica (Helfrich et al., 2008). Estudios previos han demostrado que la activación de la subunidad α_5 con el péptido GA-CRRETAWAC-GA (el cual estimula de forma específica este receptor), tiene un fuerte efecto inductor sobre la diferenciación osteogénica de MSC *in vitro*, sin mediación de ningún factor soluble osteoinductor. Estas células presentaron un aumento en la expresión de los genes *Runx2* y *Col1a1*, así como un incremento de la formación de matriz extracelular mineralizada de manera equiparable a la inducción mediada por la adición de BMP-2. Adicionalmente, se definió que la inyección directa de una solución de este péptido en un defecto no-crítico en cráneo de ratón, también aumentó de forma significativa el grosor del hueso formado (Fromigüé et al., 2012). En un estudio relacionado, hMSC modificadas para sobreexpresar la subunidad α_5 , también mostraron aumentos significativos de su potencial osteogénico, tanto *in vitro* como *in vivo* (Hamidouche et al., 2009). Otras funciones relevantes durante la osificación, como la capacidad mecanosensitiva de las células osteoblásticas y el bloqueo de la apoptosis en estadios más avanzados, han sido relacionadas con la señalización a través de la $\alpha_5\beta_1$ integrina (Helfrich et al., 2008).

En líneas generales, los experimentos de diferenciación realizados en el presente trabajo indicaron que la funcionalización de Helistat con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN, no tuvo ningún efecto significativo sobre la expresión de genes marcadores de osteogénesis, la actividad FA y la deposición de matriz mineralizada de los preosteoblastos de ratón sembrados sobre Helistat (**Figura 34**, **Figura 35** y **Figura 36**, respectivamente).

Esta mínima influencia de la co-funcionalización puede deberse a una presentación inadecuada de ambos péptidos sobre la superficie de la esponja. En ausencia de factores

osteoinductores, para favorecer la diferenciación osteogénica mediante la activación de integrinas es muy importante, como se ha mencionado previamente, la señalización específica a través de la $\alpha_5\beta_1$ integrina. Es posible que, con la metodología y cantidades de péptido utilizadas, la disposición espacial de las moléculas de vCBD-RGD con respecto a cCBD-PHSRN no fuera capaz de activar adecuadamente a las $\alpha_5\beta_1$ integrinas. Así, no fue posible favorecer la vía osteogénica como sí se observó en los experimentos de inducción de la actividad fosfatasa alcalina con ambos péptidos solubilizados en el medio que, al estar libres en la solución, quizá sí pudieron ejercer su efecto conjunto sobre este receptor (**Figura 21**).

Otra posibilidad añadida es que el colágeno ya aportara suficientes señales a los preosteoblastos puesto que, en su estructura, existen dominios de unión específicos que interactúan con integrinas como la $\alpha_1\beta_1$ y la $\alpha_2\beta_1$. Se ha demostrado que las subunidades α_1 y α_2 se expresan fuertemente durante las fases tempranas de la diferenciación osteoblástica; su sobreestimulación deriva en aumentos de la expresión de genes como *Runx2*, *Alp* y *Bglap* mientras que su bloqueo genera una consecuente disminución de estos marcadores (Helfrich et al., 2008).

Esto hace pensar que, si la disposición espacial de ambos péptidos en el Helistat no fue capaz de estimular la señalización de forma específica a través de las $\alpha_5\beta_1$ integrinas, su posible efecto sobre otras integrinas dependientes de RGD, podría ser apantallado por los dominios de unión ya presentes en el colágeno. De hecho, en los ensayos de mineralización sobre el Helistat presentados en este trabajo (**Figura 36**) se observó que los preosteoblastos sembrados sobre las esponjas control negativo (a las que no se añadió ningún péptido), son capaces de generar matriz mineralizada en medio suplementado con ascorbato y β -glicerofosfato sin la mediación de ningún factor osteoinductor como BMP-2, lo cual no ocurre con las mismas células cuando se siembran sobre el plástico.

Por tanto, se podría concluir a este respecto que, si bien los péptidos RGD y PHSRN pueden tener un efecto significativo en aumentar la adhesión celular y la diferenciación sobre superficies que son naturalmente poco biocompatibles, esta aproximación no da lugar a mejoras detectables cuando se realiza sobre un material que, de por sí, ya establece interacciones relevantes con las células, como es el colágeno tipo I.

6.1.6 La co-funcionalización con vCBD-RGD y cCBD-PHSRN pudiera mejorar la diferenciación osteogénica mediada por BMP-2.

Además de la presencia mayoritaria de la $\alpha_5\beta_1$ integrina, los osteoblastos también expresan otras integrinas que exponen la subunidad α_v en combinación con las subunidades β_3 , β_5 , β_6 y β_8 , todas éstas fundamentalmente asociadas a la adhesión celular. Estas integrinas juegan un papel menos relevante en el proceso de diferenciación osteogénica pero desempeñan un rol esencial durante la resorción ósea mediada por los osteoclastos y, de forma indirecta, en las fases iniciales de la diferenciación de las MSC (Helfrich et al., 2008).

Trabajos previos han demostrado que existe una relación directa entre la acción de BMP-2 y la señalización a través de las $\alpha_v\beta$ integrinas. La expresión de estos receptores aumenta fuertemente en respuesta a la presencia de BMP-2, formando adhesiones focales que colocalizan con más receptores de BMP-2; esto facilita su interacción con el ligando y

deriva en un efecto osteoinductor más potente. En uno de estos estudios, se determinó que el bloqueo de las $\alpha_v\beta$ integrinas con anticuerpos específicos, suprime el aumento de la expresión de Smad1 estimulado por BMP-2, lo cual conlleva a un efecto osteogénico menor (Lai y Cheng, 2004). Todo esto demuestra la estrecha relación entre este grupo de integrinas y la acción de BMP-2 sobre la diferenciación osteoblástica.

Dado que, sin la mediación de factores osteoinductores, la funcionalización con los péptidos no indujo mejoras en la osteogénesis *in vitro*, se decidió comprobar si podían mejorar el proceso en presencia de un suplemento de BMP-2 a bajas concentraciones. En la **Figura 35** se evidencia que, en ciertas condiciones, la co-funcionalización con ambos péptidos induce aumentos pequeños pero significativos de la actividad FA, tanto de preosteoblastos de ratón como de rBMSC, cuando éstas se cultivan en presencia de 50 ng/mL de BMP-2.

En cuanto a la expresión génica, las esponjas funcionalizadas con vCBD-RGD también produjeron aumentos significativos en la expresión del gen *mAlp* en células MC3T3-E1, sólo cuando se realizó el cultivo suplementado con BMP-2 (**Figura 34**). A falta de realizar estas mediciones con esponjas co-funcionalizadas e incluyendo condiciones a día 14, estos resultados dejan entrever que, sin ejercer un efecto osteoinductor, la funcionalización con los péptidos biomiméticos podría tener el potencial de mejorar la actividad de BMP-2.

6.1.7 La co-funcionalización con vCBD-RGD y cCBD-PHSRN de Helistat no mejoró la osificación ectópica *in vivo* inducida por BMP-2.

Este conjunto de resultados indica que la funcionalización de las esponjas con vCBD-RGD y cCBD-PHSRN ejerce una influencia positiva sobre la adhesión celular y un efecto inductor, aunque muy moderado, de la diferenciación osteogénica de las células cultivadas sobre ellas en presencia de BMP-2.

Para comprobar si los efectos observados sobre la adhesión y diferenciación osteogénica *in vitro* se podrían traducir en alguna mejora del potencial osteoinductor de la BMP-2 *in vivo*, se realizó un experimento de osificación ectópica introduciendo esponjas co-funcionalizadas y cargadas con BMP-2.

Tanto el análisis histológico de las muestras como la medición de calcio total, reveló que la funcionalización con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN no tiene efectos observables sobre la formación de hueso en los implantes. Para todas las condiciones testadas, observamos implantes en los que únicamente se evidenció una profusa infiltración de células que formaron un tejido de tipo fibrótico (**Figura 37**), mientras que otros mostraron claros signos de osificación con estructuras que recuerdan a trabéculas óseas y una alta presencia de osteocitos embebidos en una densa matriz mineralizada (**Figura 38**). La posible mejora de la adhesión y supervivencia celular, así como la ligera potenciación de la influencia de BMP-2 detectada en alguna de las condiciones en los experimentos *in vitro*, no se tradujo en una mejora de la osificación en este modelo empleado y con esta cantidad de BMP-2 suministrada.

6.2 Combinación de factores de crecimiento.

Otra de las posibilidades exploradas para intentar mejorar el sistema colágeno-BMP que, a día de hoy, sigue siendo la principal alternativa al implante de hueso autólogo, es el empleo de otros factores de crecimiento alternativos a la BMP-2.

El IGF-1 ejerce una fuerte influencia sobre diferentes fases del proceso de osificación. Asimismo, se ha demostrado que puede aumentar la actividad osteogénica de BMP-2 (Choi et al., 2014; Kim et al., 2012), lo cual lo convierte en una interesante alternativa para ser utilizado en estrategias de ingeniería tisular ósea.

Por otro lado, también se ha demostrado que la BMP-6 es un factor de crecimiento capaz de inducir diferenciación osteogénica en dosis menores que otras BMP (Mizrahi et al., 2013; Visser et al., 2016b; Vukicevic y Grgurevic, 2009). Además, BMP-2 y -6 tienen preferencia por diferentes receptores de BMP cuando inducen la diferenciación osteoblástica de las células progenitoras (Lavery et al., 2008), lo cual puede explicar que tengan efectos diferentes sobre el proceso.

Tomando todos estos hechos en cuenta, un paso lógico fue determinar si el IGF-1 también era capaz de mejorar la diferenciación osteoblástica inducida por BMP-6 *in vitro* y la formación de hueso *in vivo*, y si esta nueva combinación podía tener un potencial osteoinductor más alto que la combinación realizada con la BMP-2. Dado que el IGF-1 es un factor de crecimiento estructuralmente más simple y significativamente más barato que las BMP, su combinación con la BMP-6 daría como resultado un tratamiento que, no sólo sería más eficaz y menos perjudicial que la BMP-2 suministrada en altas dosis, sino que resultaría considerablemente más barato.

6.2.1 La adición de IGF-1 multiplica la capacidad de BMP-2 y -6 de incrementar la expresión de *mAlp* y *mBglap*.

Los ensayos de expresión génica *in vitro* en células preosteoblásticas, mostraron que el IGF-1 aumenta, aunque de forma no significativa, la expresión de *mAlp* y *mBglap*. Algunos trabajos previos han propuesto que el efecto que ejerce el IGF-1 sobre células osteoblásticas puede estar relacionado, más que con el aumento de la expresión de genes marcadores de osteogénesis, con el incremento de las tasas de traducción de mRNA y, consecuentemente, de la producción de proteínas, aparentemente a través de la activación de la vía AKT-mTOR (Bakker et al., 2016). En otro estudio, se encontró que la administración de IGF-1 sí fue capaz de aumentar la expresión de marcadores de osteogénesis en células madre de pulpa dental (Feng et al., 2014). En el caso presente, el IGF-1 sí generó cierto incremento de la expresión, pero este efecto no fue estadísticamente significativo debido a la comparación con respecto a las células tratadas con BMP que resultó en incrementos de 2 órdenes de magnitud con respecto al tratamiento control.

A pesar de que el IGF-1 tuvo un efecto menor sobre la expresión de los genes marcadores de osteogénesis, su adición en combinación tanto con BMP-2 como con -6, ejerció un fuerte efecto multiplicador sobre el potencial osteogénico de ambas BMP, especialmente,

para las fases más tardías de cada medición (día 7 para *mAlp* y día 14 para *mBglap*). A este nivel, no se detectaron diferencias entre ambas BMP por separado ni en combinación con IGF-1.

6.2.2 La mezcla de IGF-1 con BMP-2 o -6 actúa de forma sinérgica sobre el aumento que éstas inducen de la actividad fosfatasa alcalina y dicho efecto es significativamente mayor para BMP-6 que para -2.

La dualidad del efecto de IGF-1 se hizo aún más patente para la actividad fosfatasa alcalina de los cultivos. El análisis de este marcador reveló que la adición de IGF-1 reduce la actividad enzimática específica tanto en el día 3 como en el 7. A pesar de ello, cuando se combina con las BMP, tanto la actividad total como normalizada, es potenciada por la combinación con IGF-1. Estos efectos contradictorios de IGF-1 cuando se emplea solo o combinado sugieren una relación sinérgica real entre IGF-1 y las BMP sobre la inducción de la diferenciación osteogénica de las células preosteoblásticas.

También es importante mencionar que, en este caso, BMP-6 sí fue superior a BMP-2 en la inducción de diferenciación celular en el día 7, y también lo fue en su combinación con IGF-1. Dado que se ha demostrado previamente que la BMP-6 ejerce su efecto osteogénico, al menos en parte, a través de la regulación positiva de la expresión de IGF-1 en los osteoblastos (Grasser et al., 2007) la adición exógena de IGF-1 podría estar simplemente acelerando este proceso y consiguiendo una mejora que no se observa para BMP-2.

6.2.3 Los efectos de IGF-1 sobre la osteogénesis mediada por BMP-2 o -6 parecen ocurrir de forma independiente de *Runx2* en el modelo empleado.

En la sección 1.7.1 se describió cómo la estimulación de BMP se transduce, principalmente, a través de la vía de señalización de las Smad que, eventualmente, estimulan la expresión de *Runx2* (Lee et al., 2002). No obstante, estos factores de crecimiento también pueden actuar a través de la vía no-canónica de manera independiente de *Runx2*, involucrando proteínas MAPK como p38 y Erk para regular directamente la expresión de ostérix. Este importante factor de transcripción tiene la capacidad de inducir la expresión de diversos genes que intervienen en la osteogénesis, disparando el proceso sin la intervención de RUNX2 (Celil et al., 2005).

Se ha propuesto que la señalización de IGF-1 y BMP puede converger en este punto, potenciando la expresión de genes “corriente abajo” como *Alp*, *Bglap* o *Col1a1*, así como la inducción de modificaciones postraduccionales de las propias proteínas OSX y RUNX2 (Celil et al., 2005; Giustina et al., 2008). No obstante, el IGF-1 en ausencia de BMP, prácticamente no induce un aumento de marcadores osteogénicos por sí mismo (Bakker et al., 2016; Zhang et al., 2012). Estos datos son consistentes con lo observado en nuestros resultados, en los que IGF-1 no tiene efectos osteoinductores como tal pero potencia la osteogénesis mediada por las BMP.

Un segundo mecanismo posible se basa en la función que desempeña IGF-1 en la homeostasis ósea a través de la vía AKT-mTOR, que actúa como un efector anabólico aumentando la síntesis de proteínas y disminuyendo la expresión de proteasas que degradan el colágeno. Esto podría favorecer la osteogénesis debido a que se produce una cantidad mayor de colágeno y sus tasas de degradación disminuyen significativamente (Giustina et al., 2008).

6.2.4 Para las concentraciones de BMP testadas, únicamente se observó mineralización de la matriz extracelular *in vitro* en aquellas condiciones en las que se suplementó tanto BMP-2 como -6 con IGF-1.

Este aumento en la producción de colágeno y de otras proteínas no-colágenas de la matriz extracelular, la disminución de sus tasas de degradación y la inducción de la sobreexpresión de genes como la *mAlp* y, especialmente, *mBglap*, ofrecen unas condiciones óptimas para la mineralización de la matriz extracelular en los ensayos *in vitro*. En este experimento se demostró que, para las concentraciones de BMP-2 y -6 utilizadas y a excepción de pequeños y aislados depósitos de mineral en las células tratadas con BMP-6, únicamente se observaron núcleos de matriz mineralizada en aquellas condiciones en las que se realizó la combinación con IGF-1 (**Figura 44**).

No obstante, la extracción y posterior cuantificación del colorante reveló que, en contra de lo esperado, únicamente el tratamiento con BMP-2 + IGF-1 indujo niveles de mineralización significativamente mayores con respecto al control negativo. Es posible que este resultado esté ligado, más que a la acción de la mezcla de factores propiamente dicha, al tiempo de administración de los mismos a lo largo de la diferenciación osteogénica, como se comentará en apartados posteriores de esta discusión.

6.2.5 Sólo las esponjas cargadas con BMP-6 indujeron la formación de hueso ectópico en los experimentos *in vivo* y sólo su mezcla con IGF-1 generó diferencias significativas en la acumulación de calcio.

Es importante tomar en cuenta que los experimentos *in vitro*, aunque ofrecen importantes evidencias sobre la potencialidad terapéutica de los distintos tratamientos probados, difícilmente pueden mimetizar la formación de hueso *in vivo*, al ser éste un proceso multifactorial tan complejo. Como ya se ha mencionado con anterioridad, las diferentes BMP y otras citoquinas ejercen su acción de forma específica sobre distintos tipos celulares y a lo largo de las etapas que suceden durante la regeneración ósea. Es por ello que se decidió realizar un ensayo de osificación ectópica *in vivo*, con el objetivo de comparar los diferentes tratamientos desde el enfoque de la ingeniería de tejidos.

El análisis histológico reveló que, como ya se demostrara en trabajos previos en nuestro grupo (Visser et al., 2012, 2016b), la BMP-2 no es capaz de inducir la osteogénesis en la dosis probadas de 10 pmol por implante (≈ 400 ng). Por el contrario, las esponjas cargadas con una cantidad equimolar de BMP-6 sí dieron lugar a la formación de hueso. En ellas, se

pudo identificar tejido inmaduro en transición hueso-cartílago, caracterizado por la presencia de cartílago hipertrófico, así como áreas de hueso más maduro con presencia de osteocitos embebidos en una densa matriz mineralizada formando estructuras de tipo trabecular.

Ni siquiera la adición de IGF-1 fue capaz de desencadenar la formación de hueso en las esponjas cargadas con BMP-2. Sin embargo, las esponjas que se habían cargado con la combinación BMP-6 + IGF-1, mostraron un comportamiento muy similar a las que se implantaron con BMP-6 solo, presentando trabéculas óseas con diferentes grados de madurez (**Figura 45**).

Aunque no se apreciaron diferencias claras a nivel histológico entre los grupos BMP-6 y BMP-6 + IGF-1, la medición del calcio total acumulado en los implantes mostró que la adición de IGF-1 en combinación con BMP-6 incrementa significativamente la acumulación de calcio en estos implantes, hecho que se considera un importante indicador de la madurez de la matriz ósea generada (**Figura 46**).

De acuerdo con estos resultados, se puede afirmar que la señalización inicial de BMP-6 es más potente que la de BMP-2 para inducir el inicio de la osificación endocondral que, debido a la corta vida media que presentan las BMP *in vivo* una vez liberadas del colágeno, debe continuar de forma autónoma durante el período de tres semanas. Una vez que el proceso ha sido iniciado por BMP-6, IGF-1 puede ejercer su efecto anabólico, mejorando la eficiencia de los osteoblastos y promoviendo la supervivencia de los osteocitos, lo cual facilita una mineralización más robusta (Tahimic et al., 2013; Xian et al., 2012).

En definitiva, los resultados obtenidos en esta sección del trabajo demostraron que el IGF-1 es un fuerte potenciador de la actividad osteogénica de la BMP-6, tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, se confirmó que BMP-6 presenta un mayor potencial osteoinductor que la BMP-2 y que el efecto potenciador de IGF-1 es más alto también en su combinación con BMP-6.

6.2.6 Las discrepancias entre la mineralización *in vitro* y la acumulación de calcio *in vivo* podrían estar asociadas a los patrones temporales de administración de los factores.

Los resultados observados para la mineralización de los implantes *in vivo*, contrasta con los obtenidos en los experimentos de mineralización *in vitro*, en los que fue el tratamiento con BMP-2 + IGF-1 el que indujo un incremento significativo de la acumulación de mineral en la matriz extracelular, y no la combinación de BMP-6 + IGF-1. Si bien es cierto que la comparación entre la mineralización *in vitro* y la acumulación de calcio en un escenario *in vivo* es difícil de realizar dadas las características inherentes de cada sistema, una de las variables que sí podemos controlar, y que difiere entre ambos experimentos, está relacionada con los patrones temporales de administración de los factores en ambos modelos.

Mientras el suministro de estas moléculas *in vitro* se realizó de forma continua durante los 21 días de tratamiento, en los implantes *in vivo* se cargan al inicio del proceso en las esponjas de colágeno y presentan una cinética de liberación mucho más compleja. La forma en que se liberan las moléculas cargadas sobre el colágeno en el ambiente fisiológico depende de un gran número de factores relacionados, tales como el tipo de interacción de éstas con el material, la metodología de carga y algunas características físico-químicas intrínsecas de las esponjas de colágeno. Este hecho motivó el planteamiento de la posibilidad de que el control

de la administración temporal de BMP-6 e IGF-1 podría tener un efecto importante sobre su actividad y, en definitiva, sobre su potencial terapéutico.

6.3 Administración controlada de factores.

6.3.1 Retención de factores de crecimiento en el colágeno.

Dado al auge de la utilización de BMP-2 en medicina ortopédica, la interacción entre esta proteína y los materiales de colágeno ha sido estudiada en profundidad. Se ha demostrado que la rhBMP-2 tiene la capacidad de unirse con cierta afinidad a las esponjas de colágeno de forma dependiente del pH, la concentración de aniones en la solución, el tiempo de exposición antes del implante y el grado de entrecruzamiento que tenga la esponja (Friess et al., 1999). Sin embargo, estudios de liberación de la BMP-2 en implantes localizados de forma ectópica (Friess et al., 1999) u ortotópica (Li y Wozney, 2001), han demostrado que más del 50% de la proteína cargada se libera en el transcurso de las primeras 48 horas tras la implantación y, tras 2 semanas, únicamente permanece el 5% de la BMP-2 inicial.

Por otro lado, se ha demostrado que matrices de colágeno cargadas con IGF-1 liberan casi completamente todo el factor durante las primeras horas tras ser implantadas subcutáneamente en ratones (Kanematsu et al., 2004). En general, se ha determinado que los factores de crecimiento adsorbidos sobre el colágeno interactúan con él a través de enlaces iónicos y puentes de hidrógeno (Weadock et al., 1987), lo cual es especialmente relevante en el caso de las moléculas relativamente pequeñas como IGF-1, cuya retención física por “atrapamiento” es menor. A pH fisiológico, IGF-1 presenta una carga neta positiva (Schmidt et al., 2006) y, dado que el colágeno a este pH también está cargado positivamente, la interacción electroestática entre ambas moléculas es prácticamente nula y, por ende, su retención es muy baja. De hecho, la modificación del colágeno incorporando glucosaminoglucanos, cuya carga neta es negativa, incrementa significativamente la retención de IGF-1 en materiales diseñados para su utilización en regeneración del cartílago (Mullen et al., 2010).

Estos hechos son una demostración de que la liberación de los factores cargados sobre las esponjas es muy rápida, por lo que su efecto en escenarios *in vivo* está casi completamente limitado a su capacidad para iniciar la osteoinducción durante las primeras fases del proceso y que éste, una vez facilitado por estos factores, continúe de forma autónoma, tal y como suponemos que ocurrió en los experimentos *in vivo* para las esponjas cargadas con BMP-6 e IGF-1. Sabiendo que existe una relación directa entre la capacidad de los materiales de retener estos factores de crecimiento y su potencial de inducir la osificación *in vivo* (Perez et al., 2015; Solorio et al., 2010; Visser et al., 2009), se decidió comprobar qué efectos tenía el control de la administración secuencial de BMP-6 e IGF-1 *in vitro* y, según los resultados obtenidos, diseñar estrategias para intentar mimetizar dicha secuencia de administración *in vivo*.

6.3.2 La administración de BMP-2 o -6 seguida de IGF-1 genera un aumento significativo de la actividad fosfatasa alcalina con respecto a las demás secuencias temporales probadas.

En trabajos previos, se ha demostrado que el capacidad osteoinductora de BMP-2 es potenciada fuertemente por la adición posterior de IGF-1 (Kim et al., 2012; Raiche y Puleo, 2004). Es por ello que se decidió comprobar si este patrón de distribución temporal también favorecía la actividad osteoinductora de BMP-6, dados los resultados positivos obtenidos para la mezcla de estos dos factores cuando se administran de forma simultánea.

Los datos obtenidos indicaron que existe una fuerte influencia de la distribución temporal de BMP-6 e IGF-1 sobre su actividad osteoinductora. El tratamiento con BMP-2 o -6 seguido de IGF-1, generó el mayor aumento de la actividad fosfatasa alcalina de todas las condiciones testadas (**Figura 52**). Tanto la inversión del orden de administración como su adición simultánea en un solo pulso de 4 días, indujo niveles inferiores de actividad, lo cual invita a pensar que la presencia de IGF-1 es capaz de potenciar la osteoinducción iniciada por las BMP, pero que su presencia cobra especial relevancia durante fases más avanzadas de la diferenciación, entre los días 4 y 8.

Por su parte, la administración de BMP-2 o -6 aumenta la actividad FA tanto si se administra entre los días 0-4 como si se añade durante los días 4-8. Aunque esta combinación no se probó, experimentos previos realizados con BMP-2 han sugerido que la combinación más osteoinductora es aquella en la que a día 0 se añade BMP-2 y al día 3 se añade la mezcla de BMP-2 con IGF-1 (Kim et al., 2012), lo cual es coherente con lo encontrado en nuestros resultados para BMP-6.

6.3.3 Únicamente las condiciones en las que se realizaron pulsos de BMP-6 entre los días 0 - 4 fueron capaces de inducir la mineralización de la matriz extracelular. La presencia de IGF-1 durante ese mismo período fue más bien en detrimento de este efecto.

Si bien en los experimentos de medición de actividad fosfatasa alcalina no se encontraron diferencias entre ambas BMP, el experimento de mineralización *in vitro* demostró que, una vez más, BMP-6 tuvo un potencial osteoinductor más alto que la BMP-2. A las concentraciones utilizadas, únicamente las condiciones en las que se administró BMP-6 durante el primer pulso de 4 días, generaron una fuerte matriz mineralizada. En este experimento es importante destacar dos hechos relevantes.

El primero de ellos es que la administración simultánea de BMP-6 + IGF-1, aunque indujo importantes niveles de mineralización, generó una reducción significativa de este efecto en comparación con las demás condiciones positivas para la tinción de rojo de alizarina. Este resultado refuerza el hecho de que la presencia de IGF-1 puede ser beneficiosa únicamente si se administra en la ventana temporal adecuada, que parece ser después del día 4 en nuestro modelo.

En segundo lugar, se puede observar que los niveles de mineralización evidenciados en este experimento fueron mucho más elevados que los registrados como respuesta a la

administración continua de la Sección B, aunque se utilizaron las mismas concentraciones de los factores. Esto permite asumir que, incluso la presencia de las BMP a estas concentraciones durante un período de tiempo tan largo, pudiera ir en detrimento de la osteogénesis, observando efectos mucho más potentes con pulsos relativamente cortos de 4 días.

Un paso lógico tras la obtención de estos resultados fue intentar mimetizar estos patrones de liberación en modelos *in vivo*, empleando como base las evidenciadas arrojadas por los experimentos *in vitro*. Para ello, se decidió estudiar formas de recubrimiento de las esponjas de colágeno que permitieran ejercer control sobre la secuencia y tiempo de administración de BMP-6 e IGF-1.

En este punto es importante tener en cuenta que, a diferencia de los experimentos de diferenciación osteogénica *in vitro* en los que el proceso se inicia desde el momento en que se establece el cultivo celular, la formación de hueso *in vivo* presenta una fase inflamatoria previa antes de que se active la osteogénesis propiamente dicha. Durante este período, el organismo persigue, mediante la liberación de moléculas pro-inflamatorias, llamar a los macrófagos y a células del sistema inmune para combatir el daño, eliminar el tejido afectado y posibles agentes infecciosos (tal y como se describe en el apartado 1.6). Durante la colocación de los implantes, tanto si son ectópicos como si son ortotópicos, esta fase se reactiva, por lo que la liberación de los factores osteogénicos en este período, no es el momento más idóneo para que ejerzan adecuadamente su influencia. Es por ello que el empleo de recubrimientos y estrategias de encapsulación pudieran ser de mucha utilidad para controlar la liberación de los factores cargados sobre los biomateriales y, a su vez, para protegerlos durante la fase inicial inflamatoria.

Aunque este conjunto de experimentos no ha culminado a la fecha de presentación de esta Tesis Doctoral, se discutirán algunos aspectos basados en los resultados que se han obtenido hasta el momento.

6.3.4 Las esponjas recubiertas de alginato presentaron una capacidad de retención de la BMP-2 mayor que la esperada y no indujeron la formación de hueso ectópico en un modelo *in vivo*.

Dado el bajo control sobre la administración de factores que ofrecen las esponjas de colágeno como biomaterial, se decidió realizar pruebas con polímeros naturales simples que permitieran recubrir las esponjas con el objetivo de lograr una liberación continua y controlada de BMP-6 desde el inicio del proceso y una aparición retrasada de IGF-1. Para ello, se decidió usar como primer modelo el recubrimiento de las esponjas de colágeno con alginato, dado que es un material natural, biocompatible y con el que se forman hidrogeles mediante el entrecruzamiento con iones divalentes como el Ca^{2+} o el Mg^{2+} , sin que sean necesarios agentes químicos potencialmente citotóxicos.

Este material ha sido utilizado ampliamente en aplicaciones de administración controlada de fármacos y como agente para encapsular células (Augst et al., 2006). Los hidrogeles de alginato están cargados negativamente, por lo que presentan cierta capacidad de retener factores que, a pH fisiológico, presenten una carga neta positiva, como lo son BMP-2, -6 o IGF-1, todas proteínas con puntos isoeléctricos por encima de 8. Por otro lado, la

degradación del alginato *in vivo* es un proceso relativamente lento que depende, exclusivamente, de la liberación al medio circundante de los iones divalentes que entrecruzan la estructura. Esto se debe a que, en mamíferos, no existen enzimas específicas que degraden este polímero. Por ello, el alginato también puede funcionar como barrera física que retrase la liberación de los factores al ambiente del implante (Sun y Tan, 2013).

Estas características nos llevaron a considerar la posibilidad de que, empleando recubrimientos de alginato sobre las esponjas de colágeno, se podrían modular los patrones de liberación de la BMP-6 y el IGF-1 cargadas sobre este sistema, para que mimetizaran la secuencia derivada de los experimentos *in vitro*. El modelo implicó la carga del IGF-1 sobre la esponja de colágeno, un posterior recubrimiento con alginato que retrasara la liberación de este factor y, por último, la carga de BMP-6 por adsorción sobre la superficie, lo cual generaría una liberación inicial relativamente alta de este factor, seguida de una liberación continuada dependiente de la difusión simple y de la degradación progresiva del recubrimiento y de la esponja.

Las primeras pruebas en las que se empleó BMP-2 como proteína modelo, demostraron que las esponjas recubiertas de alginato tienen una capacidad más alta de lo esperado de retener la BMP-2 cuando eran sometidas a lavados progresivos (**Figura 55**). Dado que la degradación de este polímero en solución salina es muy baja y no mimetiza los niveles de degradación del material *in vivo*, se decidió hacer un ensayo prospectivo de osificación ectópica con esponjas recubiertas de alginato y cargadas con una cantidad de BMP-2 que, con frecuencia, induce la formación de hueso al ser cargada sobre esponjas sin recubrir. El resultado de este experimento fue que, en contra de lo esperado, no hubo signos de osificación en respuesta a la BMP-2. Es importante tomar en cuenta que, al ser un experimento prospectivo, se empleó un número de réplicas relativamente bajo, lo cual deja la posibilidad de que, de haber utilizado un número mayor de réplicas, hubiéramos observado algún implante con signos de osificación en respuesta a la BMP-2 añadida. Dicho esto, se pueden enumerar algunas posibles explicaciones a este resultado.

Es factible pensar que, a pesar de la disponibilidad de una cantidad total de BMP-2 suficiente para inducir la osificación en las esponjas sin recubrir, el patrón de liberación generado en las esponjas recubiertas con alginato no haya sido el adecuado para disparar la respuesta osteogénica de los implantes. Si, por ejemplo, estas esponjas no presentaron una liberación inicial significativa durante las primeras horas tras su implantación, tal y como se intuye a partir de los experimentos de detección por *blot*, puede que la ausencia de esta señal inicial derivara en una inhibición o retraso en el inicio de la osificación. Como se ha comentado previamente, la evidencia *in vitro* apunta a que la actividad de las BMP al comienzo del proceso favorece la diferenciación osteogénica y, en los modelos *in vivo* en los que se aplica BMP-2, siempre hay una fuerte liberación inicial del factor que quizá no ocurrió en nuestras esponjas recubiertas.

También es posible que el recubrimiento de alginato jugara en contra de la atracción de las células hacia los implantes. Es ampliamente sabido que las células no tienen la capacidad de adherirse al alginato sin que esté combinado con otras moléculas o péptidos biomiméticos que aporten dominios adhesivos al sistema (Augst et al., 2006; Sun y Tan, 2013). Si la degradación del recubrimiento de alginato fue más lenta de lo inicialmente esperado, puede haber interferido con la llegada inicial de células, lo cual iría en detrimento de las fases iniciales del proceso de osificación.

6.3.5 La inclusión de gelatina en la mezcla de recubrimiento aumentó la liberación de BMP-2 al medio, posiblemente, por el aumento de sus tasas de degradación.

Es por ello que se decidió realizar pruebas incluyendo gelatina en la mezcla de recubrimiento con alginato, con el fin de intentar aumentar su degradabilidad y de hacer el constructo más atractivo para la pegada de células que sí presentan una gran afinidad por este polímero natural. La evidencia inicial como resultado de la detección por *blot* indicó que hubo un aumento notable de la liberación de BMP-2 debido a la inclusión de gelatina en el recubrimiento (**Figura 57**). Fue posible detectar cantidades de proteína visibles mediante esta técnica, durante las 24 horas a la que se sometió a lavados a las esponjas, con una consecuente cantidad de BMP-2 retenida en el recubrimiento mucho menor, como puede observarse en los extractos de citrato realizados.

Teniendo en cuenta que se evidenció un aumento de la liberación en lavados de solución salina, puede asumirse que, en futuras pruebas *in vivo*, esta liberación podría ser mayor dado que, al contrario de lo que ocurre para el alginato, la gelatina que no se ha sometido a procesos de entrecruzamiento químico, se degrada rápidamente en el ambiente fisiológico.

No obstante, y de forma independiente al recubrimiento empleado, aún es posible detectar cantidades de BMP-2 importantes asociadas a la esponja de colágeno lo cual, en principio, sería beneficioso en un posible modelo futuro en el que se aplique este constructo de Helistat recubierto con mezclas de alginato + gelatina.

6.3.6 A falta de realizar más pruebas, la liberación de BMP-6 e IGF-1 cargadas sobre Helistat se modifica como resultado del recubrimiento con alginato.

Como una prueba inicial para observar la liberación simultánea de los dos factores en las esponjas recubiertas, se decidió medir mediante ELISA directo, la liberación de IGF-1 cargado sobre Helistat, recubierto de alginato y, posteriormente, cargado con BMP-6 antes del inicio de los lavados. En este experimento fue posible realizar los lavados empleando PBS en lugar de solución salina, lo cual mimetiza mejor la degradación *in vivo*. Los iones de calcio (Ca^{2+}) liberados forman un precipitado insoluble al unirse con los iones fosfato (PO_4^{3-}) en la solución, lo cual genera una disminución de la concentración de Ca^{2+} libre que favorece que este ion siga liberándose del alginato a consecuencia del gradiente de concentración formado entre el medio y la esponja recubierta. En la medida en que se libera el Ca^{2+} , el alginato pierde su estructura y se degrada paulatinamente.

La presencia de este precipitado impidió la transferencia correcta a las membranas empleadas para la visualización por *blot*, razón por la cual hubo que realizar los lavados con solución salina, incluso sabiendo que mimetizaban peor las condiciones de degradación *in vivo*. Sin embargo, las pruebas preliminares realizadas para calibrar la técnica de ELISA, no parecieron indicar que la presencia del precipitado modificara la adhesión de los antígenos a la placa tratada, por lo que se empleó el PBS como solución de lavado.

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos ELISA confirmaron también para BMP-6, que las esponjas de Helistat tienen una inesperada capacidad de retención de esta proteína. En la **Figura 58** se puede observar que las esponjas sin recubrimiento de alginato, retuvieron 157 ng de los 1.000 ng que se cargaron inicialmente, tras 7 días de lavados. Esto confirma lo observado para los *blot* en los que, independientemente del recubrimiento, las esponjas retuvieron considerables cantidades de BMP-2.

Por otro lado, ante los lavados con PBS, se observó un aumento significativo de la cantidad total de BMP-6 liberada en las esponjas recubiertas de alginato, con una cantidad final que ascendió hasta los 344 ng totales. Además, el patrón de liberación fue más progresivo, pudiendo registrar liberación de BMP-6 entre todos los puntos y su medición inmediatamente posterior. El Helistat sin recubrimiento, prácticamente, liberó toda la BMP-6 durante las primeras 8 horas de lavados sin que se detectara la liberación de más factor en el resto del período experimental. Todo esto indica que, al menos para BMP-6, su liberación a partir de las esponjas recubiertas pudiera estar asociada a las tasas de degradación de dicho recubrimiento.

Por el contrario, el recubrimiento de alginato disminuyó la liberación de IGF-1 a partir de las esponjas de 68 a 25 ng totales, tras los 7 días de lavado y la extracción final con citrato. En principio éste es el efecto esperado en cuando a la retención del factor. Sin embargo, las cantidades totales de factor que se liberan representan sólo una pequeña fracción de los 530 ng cargados de inicio sobre el sistema y, además, se liberan de forma muy rápida en las primeras horas de lavado de manera totalmente independiente a la degradación del alginato.

Existe la posibilidad de que las esponjas de Helistat también presenten una alta capacidad de retener el IGF-1 y que el resto de factor que no se detectó, haya permanecido dentro retenido en el colágeno y, en las esponjas recubiertas, con una retención aún mayor debida a la presencia del alginato. También es posible que la diferencia encontrada entre las esponjas recubiertas y las que están sin recubrir se deba a que, durante el proceso de gelificación del alginato en la solución de CaCl_2 , se haya perdido una fracción del factor que quedaría disponible para ser liberado y que, por ello, no se detecta en las fracciones de lavado por ELISA. Experimentos futuros en los que se prueben más condiciones de formación del recubrimiento y en los que se intente visualizar mediante *blots* directos sobre las esponjas, la presencia de IGF-1 remanente tras el proceso de lavado, ayudarían a dilucidar el comportamiento de este factor en las esponjas recubiertas.

6.4 Perspectivas de futuro.

Desde el año 2002 en que el uso de BMP-2 y BMP-7 en cirugía ortopédica fue aprobadas por la FDA y la EMA, se abrió la oportunidad de dejar de lado el trasplante de hueso autólogo para dar paso a otras estrategias que promovieran la regeneración ósea. Sin embargo, para la fecha de escritura de este trabajo, el uso de rhBMP-7 en clínica ha sido retirado y la rhBMP-2 está siendo objeto de controversia por la aparición de un importante número de casos en los que han surgido complicaciones, especialmente graves para intervenciones de fusiones vertebrales.

A día de hoy, la empresa Medtronic, que produce y comercializa los productos de colágeno + rhBMP-2 (Infuse® en EE. UU y su versión europea InductOs®), se enfrenta a demandas por agravio masivo de un alto número de pacientes que han presentado síntomas adversos en respuesta al producto. Dado que las revisiones retrospectivas de las estadísticas de fracaso del producto han revelado que presenta un riesgo más elevado que el que se comunicara en los ensayos clínicos iniciales que derivaron en la aprobación de su comercialización por parte de la FDA y la EMA, la ingeniería tisular sigue en búsqueda de alternativas para mejorar este sistema.

En cuanto al uso de terapia celular como alternativa a la administración de moléculas y factores de crecimiento, la legislación actual es altamente restrictiva y únicamente permite el uso de células que se extraigan de los pacientes durante la cirugía y que, con un mínimo procesamiento en el mismo quirófano, vuelvan a implantarse de forma autóloga. Si las células dejan el quirófano, automáticamente han de ser tratadas y cultivadas en salas de alta bioseguridad que sigan protocolos GMP (*Good Manufacturing Practices*), lo cual hace de extrema complejidad y de un altísimo coste la aplicación de estas terapias a la fecha.

Es en este contexto en el que la aplicación de alternativas como el empleo de péptidos biomiméticos, el uso de mezclas de factores de crecimiento alternativos a la BMP-2 y la tecnología de materiales inteligentes que permitan controlar la liberación dichas moléculas, puede dar respuestas terapéuticas que permitan sustituir el empleo de hueso autólogo con biomateriales que mimeticen, lo más fielmente posible, las señales naturales que inducen un proceso de regeneración normal del hueso.

Una de las conclusiones más importantes de esta tesis doctoral está asociada con los diferentes escenarios que han de tomarse en cuenta para el diseño de estrategias novedosas en ingeniería tisular ósea. Factores que se han estudiado en mucha menos profundidad como la disposición espacio-temporal de las señales que los implantes transmiten a las células residentes en la zona afectada, deben estudiarse profundamente y controlarse de la forma más estricta posible.

En este trabajo pudimos observar cómo las proporciones utilizadas de vCBD-RGD y cCBD-PHSRN que, hipotéticamente, se traducen en diferentes arreglos espaciales de una molécula con respecto a la otra; así como la secuencia y distribución temporal de la mezcla de las BMP con IGF-1, tienen una fuerte influencia sobre los posibles efectos beneficiosos que estos sistemas pueden tener.

En una línea relacionada al desarrollo de esta Tesis Doctoral, el grupo ha publicado una revisión en la que se enumeran y describen una importante cantidad de péptidos biomiméticos con potencial de ser utilizados en ingeniería tisular ósea (Visser et al., 2016a). En ella, se recogen diferentes péptidos involucrados en los procesos de adhesión celular, péptidos inherentemente osteoinductores, péptidos angiogénicos y péptidos antimicrobianos; todos con la capacidad de mejorar el potencial regenerativo de los implantes en medicina regenerativa del hueso.

Dados los bajos costes de producción de estas moléculas, la facilidad para modificarlas con dominios de unión (como los mostrados en este trabajo), su mayor estabilidad y su baja inmunogenicidad, podrían ser una interesante alternativa para la mejora de materiales que no presenten actividad biológica intrínseca pero que tengan otras propiedades físico-químicas que puedan ser beneficiosas para un implante. Por ejemplo, en el área de la impresión tridimensional de biomateriales personalizados, el uso de péptidos podría ser de especial

utilidad para facilitar el empleo de materiales compatibles con esta tecnología, pero que presenten una baja actividad biológica.

En este sentido, también pueden jugar un papel fundamental las mezclas de factores de crecimiento dado que pueden proveer a los materiales de las características osteoinductoras necesarias para disparar la formación de hueso. El uso de biomateriales y *composites* de última generación cuyas características permitan la administración controlada de estos factores, podría ser una alternativa interesante a los materiales clásicos de colágeno-BMP-2.

Como resultado de este trabajo proponemos la BMP-6, como osteoinductor más potente que la BMP-2, así como el IGF-1, cuya actividad sinérgica sobre la osteogénesis se ha demostrado en los resultados aquí presentados y publicados recientemente (Rico-Llanos et al., 2017). Futuros experimentos con esta mezcla de factores, así como el establecimiento de trabajos en colaboración con otros grupos de investigación con experiencia en la síntesis de distintos tipos de biomateriales, podrían ser una línea de investigación interesante en la búsqueda del diseño de estrategias que mejoren la regeneración ósea.

7 Conclusiones.

1. Tanto vCBD-RGD como cCBD-PHSRN se unen a los materiales de colágeno, observándose densidades de péptido por unidad de superficie mayores en las esponjas de Helistat que en las esponjas de Nimni. La co-funcionalización de Helistat con vCBD-RGD y cCBD-PHSRN es posible, sin evidenciarse una interferencia patente entre ambas moléculas.
2. La funcionalización de superficies de plástico recubiertas de colágeno con las mezclas de vCBD-RGD y cCBD-PHSRN generan los mayores incrementos de adhesión de células preosteoblásticas. Igualmente, en cultivos convencionales de estas células, las mezclas de vCBD-RGD y cCBD-PHSRN generan los mayores incrementos de actividad FA. Estos efectos están fuertemente influenciados tanto por las proporciones como por las cantidades totales de ambas moléculas.
3. La co-funcionalización de esponjas de Helistat con vCBD-RGD y cCBD-PHSRN genera aumentos significativos de la adhesión de células madre mesenquimales y células preosteoblásticas sobre el colágeno. Sin embargo, no modifica de forma significativa la diferenciación osteoblástica *in vitro*, ni mejora de forma visible la osificación mediada por rhBMP-2 en un modelo de formación de hueso ectópico *in vivo*. Es posible que el bajo control sobre la disposición espacial de ambas moléculas en las esponjas tras su funcionalización, genere una presentación inadecuada de las mismas que, en estas condiciones, no sean capaces de provocar los efectos deseados.
4. El IGF-1 es un fuerte potenciador de la diferenciación osteoblástica *in vitro* y de la formación de hueso ectópico *in vivo* inducidas por BMP-6. La combinación de IGF-1 con BMP-6 tiene un potencial osteoinductor mayor que el presentado por BMP-2, tanto solo como en combinación con IGF-1. Estas propiedades convierten a la combinación de BMP-6 e IGF-1 en una interesante alternativa al uso de BMP-2 en medicina regenerativa del hueso.
5. La secuencia y tiempos de administración de BMP-6 e IGF-1 influyen fuertemente sobre su potencial para inducir la diferenciación de preosteoblastos *in vitro*. La presencia de BMP-6 durante las fases más tempranas (primeros cuatro días) seguida de la administración más tardía de IGF-1 (entre los días cuatro y ocho) incrementa significativamente el potencial osteogénico de esta combinación con respecto a otras secuencias.
6. El recubrimiento de las esponjas de Helistat con mezclas de alginato y gelatina modifica los patrones de retención y liberación de los factores cargados sobre ellas. Estudios en mayor profundidad en los que se analicen diferentes condiciones de carga y recubrimiento con éstos y otros polímeros, podrían derivar en el diseño de estrategias que permitan controlar la secuencia de liberación de mezclas de factores de crecimiento con mayor potencial osteogénico que la BMP-2.

8 Anexos.

8.1 Experimentos de biología molecular.

8.1.1 Ensayo de pegada de vCBD-RGD y cCBD-PHSRN a esponjas de colágeno.

1. Para este ensayo se tomaron 8 esponjas de colágeno, 6 de ellas para ser cargadas con vCBD-RGD o cCBD-PHSRN y 2 para ser cargadas únicamente con agua a modo de control negativo.
2. Para la carga, se prepararon soluciones de vCBD-RGD o cCBD-PHSRN de 100, 200 y 500 ng/ μ L de modo que, al cargar 10 μ L por esponja, se añadieran 1.000, 2.000 o 5.000 ng totales de cada péptido. Las condiciones con 1.000 y 5.000 ng de vCBD-RGD en la esponja de Nimni, habían sido realizadas en un trabajo anterior cuyos datos fueron utilizados en este trabajo para hacer las diferentes comparativas (Visser et al., 2014).
3. Las esponjas cargadas con péptidos se dejaron secar parcialmente al aire durante 30 minutos para empezar los lavados a continuación.
4. Cada esponja se colocó sobre una placa de Petri limpia y se añadieron 15 μ L de PBS. Transcurrido 1 minuto, se recuperaron 10 μ L de dicho volumen ejerciendo suavemente presión sobre la esponja con la misma punta de la pipeta así como con pinzas.
5. Los primeros 10 μ L obtenidos, que constituyeron el primer lavado (L1), se almacenaron en tubos limpios en hielo y, posteriormente, se guardaron a -20°C para su posterior análisis.
6. Estos lavados se repitieron 7 veces para cada esponja hasta acumular 8 lavados totales de 10 μ L cada uno (80 μ L de lavado total por esponja). Para las esponjas cargadas con 5 μ g de vCBD-RGD se realizaron 12 lavados, completando 120 μ L totales.
7. Empleando un NanoDrop 2000C, se midió la absorbancia a 205 nm en las fracciones de lavado. A esta longitud de onda absorben los enlaces peptídicos, permitiendo la estimación de la concentración de péptido en la solución por interpolación sobre una recta patrón entre 0 y 1 μ g/mL medida de la misma manera.
8. Posteriormente, se promediaron las 6 réplicas por lavado, se restó el valor promedio de las esponjas control negativo para corregir la posible absorción generada por restos de colágeno liberados de la esponja y se realizó la suma de los lavados para obtener la cantidad total liberada.

8.1.2 Método del ácido bicinonínico (BCA) para cuantificación de proteína total.

La concentración de péptido total resultante de cada una de las fracciones, se estimó mediante el método del ácido bicinonínico para la cuantificación de proteína total. Este método se basa en la capacidad de las proteínas de reducir los iones de Cu^{2+} a Cu^{1+} en medio alcalino. Los iones reducidos son quelados por las moléculas de ácido bicinonínico generando un producto de color púrpura con fuerte absorbancia a 562 nm, que puede ser cuantificado

mediante espectrofotometría. Las absorbancias obtenidas presentan una relación directamente proporcional a la cantidad de proteína en la muestra.

Para llevar este protocolo a cabo se han seguido las instrucciones del fabricante (kit Pierce™ BCA Protein Assay, Thermo Fischer):

1. Se preparó la solución de BCA mezclando 50 partes de la solución A con 1 parte de solución B.
2. Adicionalmente, se prepararon mediante diluciones seriadas $\frac{1}{2}$, soluciones de albúmina de suero bovino (BSA) de concentración conocida para medirlas en paralelo y utilizar los valores de absorbancia obtenidos para generar 2 rectas patrón sobre las cuales interpolar los valores de las muestras.
3. En una placa de 96 pocillos para lectura espectrofotométrica, se añadieron 25 μL de cada muestra por pocillo + 200 μL de la solución de BCA.
4. Se mezcló con la pipeta y se incubó durante 30 minutos a 37 °C.
5. Se midió la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro de placas y, con los valores obtenidos, se estimó la concentración final de péptido en las muestras.

8.1.3 Adición de biotina al vCBD-RGD y al cCBD-PHSRN.

Para añadir biotina a ambos péptidos se siguió el protocolo indicado por el kit EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin (Thermo Fischer). Este procedimiento se basa en la mezcla del reactivo con la solución del péptido o proteína a estudiar, con el objetivo de añadir moléculas de biotina a las aminas primarias libres ($-\text{NH}_2$) presentes tanto en el extremo amino terminal como en las cadenas laterales del aminoácido lisina. El protocolo fue el siguiente:

1. Inmediatamente antes de usar, se resuspendió Sulfo-NHS-biotina en 224 μL de agua para tener una solución 10 mM.
2. A ésta se añadieron 190 μL de solución de vCBD-RGD (1 mg/mL) o 200 μL de cCBD-PHSRN (1 mg/mL). Con estos volúmenes se consiguió una relación molar recomendada de 1:20 péptido:biotina.
3. Se incubó 2 horas en hielo, tiempo tras el cual las muestras estuvieron listas para la purificación.

8.1.4 Purificación de los péptidos biotinilados.

Las muestras resultantes del protocolo anterior se purificaron empleando columnas de exclusión molecular de poliacrilamida con un punto de corte de 1.800 daltons (Pierce™ Polyacrylamide Desalting Columns, Thermo Fischer). La masa molecular teórica de ambos péptidos antes y después de incorporar las biotinas es:

- vCBD-RGD: = 1.696 Da
- cCBD-PHSRN: = 1.789 Da
- vCBD-RGD-B: 1.696 Da + 244 Da = 1.940 Da
- cCBD-PHSRN-B: 1.789 Da + (3 x 244 Da) = 2.521 Da

Mientras en el vCBD-RGD sólo puede incorporarse 1 molécula de biotina en el extremo amino terminal, el cCBD-PHSRN tiene 2 lisinas por lo que se pueden incorporar, teóricamente, 3 biotinas por molécula de este péptido. Estos aumentos de masa como consecuencia de la biotinilación, permitieron discriminar con las columnas de exclusión las fracciones de péptido biotinilado (MW > 1.800 Da) de las que contenían tanto péptido sin biotinilar como moléculas de biotina libres (MW < 1.800 Da).

El protocolo seguido fue:

1. Las columnas de poliacrilamida se mezclaron por inversión para resuspender la resina.
2. Tras dejarlas reposar varios minutos, se quitó el tapón y se retiró la solución de almacenaje, dejando una capa de 5-10 mm por encima del lecho de resina.
3. Se equilibró la columna haciendo pasar lenta y progresivamente por la misma un total de 25 mL de PBS. Terminado el proceso se almacenó toda la noche a 4 °C.
4. Se añadió la muestra del péptido correspondiente ya biotinilado.
5. Tras permitir que la muestra entrara completamente en el lecho, se comenzó a realizar la elución añadiendo 500 µL de PBS por vez y recogiendo las fracciones expulsadas por el otro extremo de la columna en tubos limpios previamente rotulados.
6. Se realizó la elución total con 10 mL de PBS, repartidos en un total de 20 fracciones de aproximadamente 500 µL cada una.

8.1.5 Cuantificación de biotina.

Para este procedimiento, se siguió estrictamente el protocolo indicado por el fabricante (Pierce™ Biotin Quantitation Kit, Thermo Fischer). El kit provee una premezcla del complejo HABA/Avidina (Ácido 4'-hidroxiazobenceno-2-carboxílico/avidina). Dada la alta afinidad entre la avidina y la biotina, la adición de la muestra hace que la biotina presente desplace al HABA del complejo, lo cual genera una disminución proporcional de la absorbancia a 500 nm. La medición de este valor comparado con un control positivo provisto por el fabricante permite el cálculo de la cantidad de biotina presente. El protocolo seguido fue el siguiente:

1. Se atemperó la premezcla de HABA/Avidina a temperatura ambiente.
2. Se resuspendió en agua milliQ y se mezcló por pipeteo. Se preparó el volumen adecuado para el número de muestras a analizar. Para ello, se añadieron 100 µL de agua milliQ por tubo de la premezcla de HABA/Avidina provisto por el kit.
3. Se mezclaron 160 µL de PBS con 20 µL de la solución anterior por pocillo en una placa de 96 pocillos, uno para cada muestra a medir.
4. Se midió la absorbancia a 500 nm y se guardó el dato como A₅₀₀ HABA/Avidina.

5. Se añadieron 20 μL de muestra o 20 μL de control de HRP biotinilada al pocillo con la mezcla de reacción y se homogenizó en un agitador de placas.
6. La absorbancia de la solución a 500 nm se midió de nuevo y se guardaron los valores obtenidos como A_{500} HABA/Avidina/biotina una vez que la lectura se mantuvo constante durante, al menos, 15 segundos.
7. Con los valores obtenidos y los datos de la cuantificación de proteínas de las muestras, se calculó la ratio biotina:péptido para cada una de las fracciones medidas utilizando una herramienta de cálculo online provista por la casa comercial (<https://www.thermofisher.com>).

8.1.6 Blot directo sobre esponjas cargadas con vCBD-RGD y/o cCBD-PHSRN biotinilados.

Las esponjas fueron sometidas al procedimiento de pegada de ambos péptidos o las diferentes mezclas testadas y se lavaron para retirar el péptido que no se hubiera adherido a las mismas. Posteriormente, se realizó el siguiente protocolo:

1. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBST.
2. Se incubó directamente con estreptavidina-HRP (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en PBST + 1% BSA durante 1 hora en oscuridad.
3. Se realizaron 8 lavados de 10 minutos con abundante PBST y luego, 2 lavados finales de 5 minutos en PBS.
4. Se procedió al revelado con el reactivo de detección quimioluminiscente ECL (Amersham Biosciences). Para ello, se mezcló 1 parte de solución A (solución de luminol) con 1 parte de solución de peroxidasa (solución B).
5. Con esta mezcla se cubrieron las esponjas y se dejó actuar durante 2-3 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
6. A continuación, se retiró el reactivo y las esponjas se transfirieron a una envoltura de plástico sobre la cual se colocó una película fotográfica (Kodak Biomax) para la detección de la señal quimioluminiscente generada. El tiempo de exposición fue dependiente de la intensidad de las correspondientes señales.

Tras la exposición, se realizó el revelado de la película en una procesadora automática de placas radiográficas modelo SRX-101^a (Konica Minolta).

8.1.7 Recubrimiento de esponjas de Helistat con mezclas de alginato y gelatina.

Este protocolo se desarrolló con la finalidad de generar un recubrimiento sobre las esponjas de Helistat y comprobar si el mismo modificaba los patrones de liberación de los factores cargados sobre las esponjas. Para ello, se eligieron dos polímeros naturales que se utilizan de forma rutinaria en el ámbito de los biomateriales, específicamente en forma de hidrogeles.

El primero de ellos es el alginato sódico, el cual es un polisacárido capaz de gelificar en presencia de iones divalentes como el calcio y el magnesio. Por su parte, la gelatina es una forma hidrolizada del colágeno tipo I que puede formar hidrogeles en respuesta a la disminución de la temperatura.

Tomando en cuenta estos factores se realizó el siguiente protocolo:

- Se prepararon en esterilidad las soluciones stock de alginato al 2% (p/v), de gelatina al 6% (p/v) y del agente gelificador (solución de CaCl_2 0,2 M):
 - Se añadió 0,5 g de alginato sódico o 1,5 g de gelatina tipo B en 25 mL de NaCl 0,9% (p/v) en un tubo de 50 mL.
 - Se mezcló en un agitador de vaivén a 50 °C alternando con agitación en un vórtex hasta obtener una solución homogénea. Ambas soluciones stock se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.
 - Para la solución de gelificación, se mezcló la cantidad correspondiente de CaCl_2 con agua milliQ para obtener una concentración final de 0,2 M. La misma se esterilizó a través de un filtro de 0,2 μm de tamaño de poro y se almacenó a 4 °C.
- Las esponjas de Helistat se esterizaron bajo la luz UV durante 15 minutos por cada lado.
 - Si el experimento a realizar requería cargar algún factor antes de realizar el recubrimiento, en este punto se añadieron 20 μL de dicho factor a la concentración deseada y se dejaron secar parcialmente al aire durante 30 minutos.
 - De no requerirlo, se continuó directamente al siguiente paso.
- Se atemperaron las soluciones stock tanto de alginato como de gelatina en un baño termostático a 37 °C.
- Se prepararon diferentes soluciones de recubrimiento mezclando ambas soluciones stock y solución salina con la finalidad de tener distintas proporciones de ambos componentes:

Nombre	Volumen del stock (μL)			Concentración final (%)	
	Alginato 2%	Gelatina 6%	NaCl 0,9%	Alginato	Gelatina
A2/G0	1.000	0	0	2	0
A1,5/G1,5	750	250	0	1,5	1,5
A1,5/G0	750	0	250	1,5	0
A1/G3	500	500	0	1	3
A0,5/G4,5	250	750	0	0,5	4,5
A0,5/G3	250	500	250	0,5	3
A0,5/G1,5	250	250	500	0,5	1,5
A0,5/G0	250	0	750	0,5	0

Tabla 12. Preparación de soluciones de recubrimiento de alginato y gelatina. Se muestran distintas formulaciones para generar 1 mL de soluciones de recubrimiento con concentraciones finales de ambos componentes.

5. Se añadieron 20 μL de la correspondiente solución de recubrimiento a cada esponja.
6. Con una pinza se sumergieron en un baño de solución de gelificación preenfriado y se incubaron durante 20 minutos en hielo.
7. Se recuperaron las esponjas ya gelificadas y se sometieron a 3 lavados en abundante solución salina.
8. Se transfirieron a tubos de 1,5 mL con el tapón agujereado, a razón de 3 esponjas por tubo.
9. Con la punta de la pipeta, se retiró cualquier exceso de líquido remanente.
10. Los tubos se sumergieron en nitrógeno líquido para congelar rápidamente las esponjas.
11. Las esponjas se liofilizaron durante 18 horas en un liofilizador (Telstar Lyoquest) a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 0,2 bares de vacío.
12. Las esponjas liofilizadas se almacenaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

8.1.8 Detección por *immunoblot* de BMP-2 presente en lavados realizados sobre esponjas.

Este protocolo se llevó a cabo para detectar la presencia de BMP-2 en soluciones con las cuales se lavaron esponjas recubiertas de diferentes mezclas de alginato y gelatina. El protocolo general fue el siguiente:

1. Se cortó la membrana de nitrocelulosa de modo tal que pudiera abarcar el número total de muestras a transferir.
2. La misma se hidrató en sumergiéndola en solución tamponada con Tris (TBS) durante 5 minutos y se transfirió a un aparato de vacío específico en el cual se realizó la transferencia de las muestras a la membrana (*DotBlot apparatus*, BioRad). La membrana se colocó en el mismo y se selló el sistema tal y como indican las instrucciones del fabricante.
3. Se añadieron 400 μL de TBS en cada pocillo para asegurar que estuviera humedecido cada uno y se hicieron pasar por la membrana ejerciendo vacío.
4. Con la salida de aire sellada, se añadieron 100 μL de cada una de las muestras empleando que se fuera evaluar, así como de muestras de concentración conocida de BMP-2 para elaborar una recta patrón de referencia visual.
5. Abriendo la salida de aire para permitir la transferencia por gravedad de los analitos a la membrana, se incubó hasta que se completó el proceso en todos los pocillos (aproximadamente 30-40 min).
6. Se realizaron 3 lavados añadiendo 400 μL de TBS + 0,05% de Tween-20 (TTBS) a cada pocillo y haciendo pasar la solución ejerciendo vacío.
7. Se retiró la membrana con cuidado y se transfirió a un recipiente cristizador en el que se sometió a la siguiente secuencia de lavados e incubaciones:
 - a. Bloqueo en TBS 1% BSA 1 x 1 hora.
 - b. Lavado con TTBS 2 x 5 min.

- c. Incubación en anti-hBMP-2 (2 µg/mL)
en TBST 1 % BSA 18 horas a 4 °C.
 - d. Lavado con TTBS 6 x 10 min.
 - e. Incubación con anti-mouse IgG biotinilado
en TBST + 1% BSA (1:2.500) 1 hora a 25 °C.
 - f. Lavado con TTBS 6 x 10 min.
 - g. Incubación (en oscuridad) con reactivo ABC 30 min. a 25°C.
 - h. Lavado con TTBS (en oscuridad) 3 x 10 min.
 - i. Lavado con TBS (en oscuridad) 2 x 5 min.
8. Se procedió al revelado con el reactivo de detección quimioluminiscente ECL (Amersham Biosciences). Para ello, se mezcló 1 parte de solución A (solución de luminol) con 1 parte de solución de peroxidasa (solución B).
 9. A continuación, transfirió la membrana a una envoltura de plástico sobre la cual se colocó la película para la detección de la señal quimioluminiscente generada. El tiempo de exposición fue dependiente de la intensidad de las correspondientes señales.
 10. Tras la exposición, se realizó el revelado en una procesadora automática de placas radiográficas SRX-101A.

8.1.9 *Inmunoblot* directo sobre esponjas de colágeno para detección de BMP-2 retenida.

Con las esponjas sometidas a experimentos de liberación de factores, tras el proceso de lavado, se realizó un *inmunoblot* directamente sobre dichas esponjas para detectar la presencia de BMP-2 remanente. Para ello, se siguió el siguiente protocolo:

1. Las esponjas fueron depositadas en placas multipocillo de 12 pocillos para los lavados y de 48 pocillos para las diferentes incubaciones:
 - a. Bloqueo con PBST + 2% BSA + 5% leche 2 x 30 min.
 - b. Lavado con PBST 2 x 5 min.
 - c. Incubación en anti-hBMP-2 (2 µg/mL)
en PBS + 2% BSA + 0.02% NaN₃ 18 horas a 4 °C.
 - d. Lavado con PBST 6 x 10 min.
 - e. Incubación (en oscuridad) con anti-mouse IgG-HRP
en PBST + 2% BSA + 5% leche (1:5.000) 1 hora a 25 °C.
 - f. Lavado con PBST (en oscuridad) 6 x 10 min.
 - g. Lavado con PBS (en oscuridad) 2 x 5 min.
2. A continuación, se retiró el reactivo y las esponjas se transfirieron a una envoltura de plástico sobre la cual se colocó la película para la detección de la señal quimioluminiscente generada. El tiempo de exposición fue dependiente de la intensidad de las correspondientes señales.
3. Tras la exposición, se realizó el revelado en una procesadora automática de placas radiográficas SRX-101A (Konica Minolta).

8.1.10 Cuantificación por ELISA de BMP-6 e IGF-1 liberado a partir de Helistat recubierto con alginato.

Este procedimiento se llevó a cabo para cuantificar la cantidad de BMP-6 e IGF-1 liberada a partir de esponjas recubiertas con alginato y/o gelatina y cargadas con ambos factores. Para ello, se realizó un protocolo de ELISA directo midiendo la cantidad de ambos factores contenida en los sucesivos lavados en PBS obtenidos a partir de las diferentes esponjas y condiciones puestas a prueba.

1. En los pocillos de una placa de ELISA (una placa para BMP-6 y otra para medir IGF-1), se añadieron 100 μ L de tampón de recubrimiento (2X) y 100 μ L de cada uno de los lavados. En paralelo, se incluyeron pocillos con soluciones de concentraciones conocidas de ambos factores para generar 2 rectas patrón por placa.
2. Ambas placas se incubaron durante 18 horas a 4 °C en atmósfera húmeda.
3. Tras la incubación, se siguió el siguiente procedimiento de lavados e incubaciones con los diferentes anticuerpos y reactivos.

a. Solución de lavado	3 x 2 min.
b. Bloqueo con solución de saturación	2 horas a 25 °C.
c. Solución de lavado	3 x 2 min.
d. Incubación con anticuerpo primario	
Anti-hBMP6 (2 μ g/mL) o	2 horas a 25 °C.
Anti-hIGF-1 (1 μ g/mL)	
e. Solución de lavado	3 x 2 min.
f. Incubación con el anticuerpo secundario	
anti-mouse IgG-biotin (1:20.000)	1 hora a 25 °C.
g. Solución de lavado	3 x 2 min.
h. Incubación con ABC	1 hora a 25 °C.
i. Solución de lavado	3 x 2 min.
j. Agua destilada	1 x 2 min.
k. Revelado con TMB	5-30 min a 25 °C.
l. Detención de la reacción con ácido sulfúrico 1 M	

Las soluciones de lavado se añadieron con un frasco lavador mientras que se añadieron 100 μ L de los correspondientes anticuerpos y reactivos empleando una pipeta multicanal.

Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de placas de ELISA. Los valores de absorbancia promedio de las muestras con concentración conocida, se sometieron a un ajuste sobre una función logística de 4 parámetros para generar una ecuación en la que, interpolando los valores de absorbancia de los analitos, deducir las concentraciones de BMP-6 y de IGF-1 de los diversos lavados.

Los anticuerpos utilizados fueron:

- Anticuerpo monoclonal anti-BMP-6 humano en ratón (MAB-507 de R&D systems).
- Anticuerpo monoclonal anti-IGF-1 humano en ratón (MAB-291 de R&D systems).

- Anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón en cabra conjugado con biotina (A-5906 de Sigma).

8.2 Experimentos *in vitro* con cultivos celulares.

8.2.1 Cultivo y mantenimiento de células para experimentos *in vitro*.

En este trabajo se utilizaron 2 tipos celulares. En primer lugar, se establecieron cultivos de células mesenquimales de médula ósea de rata (rBMSC) que se aislaron según se indica en el anexo 8.2.2. En segundo lugar, se utilizó la línea celular de preosteoblastos de ratón MC3T3-E1, que es una línea celular osteoblástica que se ha establecido a partir de muestras de calvaria de ratón C57BL / 6 con capacidad de diferenciarse en osteoblastos y osteocitos, así como de formar matriz extracelular calcificada *in vitro* (*European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC), número de catálogo 99072810).

Ambos tipos celulares se cultivaron en medio completo compuesto por alpha-Minimum Essential Medium (α -MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 12,5 μ g/mL anfotericina B, 100 U/mL penicilina y 0,1 mg/mL estreptomycin. Según necesidad, se realizaron hasta un máximo de 3 pases de cultivo despegando las células con 1-3 mL de 0,25% tripsina, 0,03% EDTA durante 5 minutos a 37 °C y sembrando entre 5.000 y 10.000 células por cm². Dichos pases se llevaron a cabo en frascos de 75 o 175 cm² según las necesidades de números de células y siempre dejándolos proliferar hasta un máximo de entre 70 y 80% de confluencia. Todos los cultivos se mantuvieron a 37 °C en atmósfera humidificada con 5% CO₂ (condiciones estándar).

8.2.2 Aislamiento de células madre de médula ósea de rata.

Para el aislamiento de las células madre de médula ósea de rata (rBMSC) se utilizaron ratas macho de la cepa Fischer 344 de 6-8 semanas de edad y se siguió el siguiente protocolo:

1. Los animales se sacrificaron dislocación por cervical tras anestesia por inhalación de sevoflurano y se extrajeron ambos fémures.
2. Se retiró cualquier tejido blando remanente en la superficie del hueso para evitar posterior contaminación de fibroblastos o células satélite derivadas del músculo.
3. Los fémures se transfirieron a tubos falcon de 50 mL precargados con 15 mL de α -MEM suplementado con 300 U/mL de penicilina y 300 mg/mL de estreptomycin (medio 3x antibiótico). Se mantuvieron en hielo hasta el momento de la extracción de la médula ósea.

4. Ya trabajando en esterilidad en una cabina de seguridad biológica, se transfirieron los fémures a una placa de Petri con 10 mL de medio 3x antibiótico fresco, sobre la cual se cortaron ambas epífisis para exponer la médula ósea
5. Empleando una jeringa de 10 mL, se expelió la médula en un tubo falcon vacío insuflando medio completo. Se realizó este procedimiento hasta dejar las diáfisis traslúcidas.
6. La suspensión obtenida se sometió a disgregación mecánica haciéndola pasar repetidas veces a través de una aguja de 22G.
7. Se completó el volumen con α -MEM 10% FBS hasta 15 mL totales y se transfirió a un frasco de cultivo FT75 para su expansión inicial.
8. A los 3 días, se realizó un cambio de medio en el que se retiraron las células no adherentes y se procedió con el mismo como un cultivo convencional.

8.2.3 Adhesión de células sobre biomateriales.

Con el objetivo de realizar diferentes pruebas *in vitro* sobre las esponjas de colágeno, se desarrollaron 3 protocolos diferentes mediante los que cuales cultivar células sobre las mismas. Para ello, se pusieron a punto los siguientes 3 procedimientos partiendo de MC3T3-E1 o rBMSC cultivadas mediante la metodología estándar y sobre esponjas de colágeno funcionalizadas o no con los péptidos de interés:

8.2.3.1 Adhesión de células a biomateriales mediante cultivo directo.

En aquellos casos en los que se necesitó fijar el número inicial de células cultivadas o en los que se necesitó forzar una condición de confluencia inicial, se procedió a la siembra directa de las células sobre las esponjas de colágeno. Para ello, se siguió el siguiente procedimiento:

1. Se despegaron las células que se iban a cultivar.
2. Tras el recuento, se realizó una suspensión celular tal que contuviera la cantidad de células deseada contenida en 20 μ L de medio completo, asegurándose de homogenizar lo más posible dicha suspensión con repetidos pipeteos de la misma.
3. Una vez tratadas o funcionalizadas como correspondiera a cada tratamiento específico, se colocó con las pinzas una esponja por pocillo en placas de 48 pocillos.
4. Se añadieron 20 μ L por esponja de la suspensión celular.
5. Se incubó durante 2 horas en condiciones estándar de cultivo.
6. Transcurrido este período, se dejaron incubando durante 18 horas más en 500 μ L de medio completo.
7. Al día siguiente, las esponjas se transfirieron a una placa nueva para evitar el crecimiento de las células que se hubieran podido adherir al plástico.

8. Tras este traslado, las esponjas cultivadas estuvieron listas para ser sometidas al tratamiento o medida correspondiente.

8.2.3.2 Adhesión de células a biomateriales mediante cultivo en suspensión con agitación orbital.

Este protocolo se desarrolló con la finalidad de cultivar de la forma más homogénea posible las células por toda la superficie del biomaterial.

1. Se tripsinizaron las células en cultivo (MC3T3-E1 o rBMSC).
2. Se realizó una suspensión celular tal que contuviera, por norma general, 20.000 células/mL. En experimentos puntuales, se probaron suspensiones con cantidades de células diferentes.
3. Se homogenizó haciendo pasar las células 3 veces a través de una aguja de 21G para disminuir la presencia de acúmulos celulares.
4. Se transfirió 1 mL de dicha suspensión a un tubo de 2 mL estéril, preparando 1 tubo por cada esponja que se quisiera probar.
5. En cada tubo, se introdujo esponja con ayuda de una pinza estéril.
6. Se selló el tubo y se cultivó en un agitador orbital durante 3 horas a 37 °C para permitir la adhesión de las células al biomaterial.
7. Transcurrido el tiempo, las esponjas se retiraron de las suspensiones y se transfirieron a placas de cultivo de 24 pocillos con medio completo. Para las MC3T3-E1, los biomateriales ya sembrados se utilizaron tras 1 hora de incubación, mientras que las rBMSC se dejaron incubando toda la noche dado que su proceso de adhesión es más lento que el de los preosteoblastos.
8. Tras el período de incubación, las esponjas cultivadas ya estuvieron listas para tratamientos y medidas posteriores.

8.2.3.3 Adhesión de células a biomateriales mediante cultivo en suspensión con agitación horizontal.

Dados los resultados obtenidos con el protocolo anterior, se diseñó un procedimiento diferente con condiciones de cultivo y agitación más suaves para favorecer la homogenización de la adhesión y la pegada de un mayor número de células por pieza. Básicamente, este protocolo es idéntico al del anexo 8.2.3.2 pero introduciendo las siguientes variaciones:

- Según las necesidades del experimento, se cultivaron 20.000, 50.000 o incluso 100.000 células por esponja.
- La incubación se realizó en tubos de 2 mL con agitación horizontal con el fin de que la agitación fuera continua pero más suave.
- Tras el período de adhesión de 3 horas, las esponjas se retiraron y se lavaron en 500 µL de PBS durante 5 minutos en un agitador de placas a 150 rpm.

- Una vez lavadas para retirar el exceso de células que no se hubieran adherido, se transfirieron a una placa de cultivo de 24 pocillos y se incubaron durante 18 horas en medio completo.
- Tras este paso de incubación, las esponjas cultivadas estuvieron listas para ser sometidas al tratamiento o medida correspondiente.

8.2.4 Tinción de células en cultivo con Cell Tracker green (CMFDA).

El diacetato de 5-clorometilfluoresceína (CMFDA) o su nombre comercial *CellTracker™ Green*, es una tinción fluorescente que atraviesa libremente la membrana celular y, una vez en el citoplasma, se modifica convirtiéndose en un producto incapaz de abandonar la célula atravesando la membrana. El reactivo se mantiene estable dentro de la célula y, según los datos del fabricante, se puede monitorizar la fluorescencia durante 72 horas dado que no presenta toxicidad alguna.

Para este protocolo se siguieron las indicaciones del fabricante de la siguiente manera:

1. El reactivo CMFDA en polvo se diluyó en DMSO estéril para obtener una dilución final del stock de 10 mM.
2. Se preparó un volumen suficiente de medio completo sin suplementar con FBS para tener 300 µL por esponja.
3. Se añadió solución stock CMFDA en una dilución 1:1000 para tener una concentración final de CellTracker™ en el medio de 10 µM.
4. Las esponjas se transfirieron a una placa de 48 pocillos y se añadieron 300 µL de la solución anterior por esponja.
5. Se incubaron 30-45 minutos en condiciones estándar de cultivos.
6. Se retiró la tinción, se añadieron 500 µL de medio completo y se incubó durante otros 30 minutos.
7. Transcurrida la incubación, se retiró el medio y se añadieron 500 µL de PBS.

Las células teñidas por este método, se observaron y fotografiaron en un estereoscopio de fluorescencia con el filtro adecuado para el canal verde.

8.2.5 Medición de la adhesión de células mediante ensayo de XTT.

Para estos experimentos en los que se estimó el número de células adheridas a diferentes superficies funcionalizadas, se empleó el ensayo metabólico XTT (*Cell Proliferation Kit II*, Roche), basado en la capacidad de las células metabólicamente activas de reducir las sales de tetrazolio. El reactivo XTT (amarillo) es reducido por las células, generándose un derivado de formazán de color naranja que puede medirse en un lector de placas de ELISA a 450 nm y relacionarse indirectamente con el número de células viables en el cultivo. El procedimiento seguido fue el siguiente:

1. Se descongelaron los dos reactivos contenidos en el kit: *labelling reagent* (LR) y *electron coupling reagent* (ECR).
2. Se mezclaron 100 μL de ECR con 5 mL de LR y se homogenizó asegurando que desapareciera cualquier precipitado de la solución.
3. Se añadieron 50 μL de la mezcla anterior a cada uno de los pocillos que contenían 100 μL de medio completo.
4. Se incubó durante un tiempo comprendido entre 1 y 4 horas, monitorizando los cultivos cada 30 minutos para evitar la saturación del color.
5. Tras el tiempo de espera, se midió la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro de placas.
6. Los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron sobre una recta patrón realizada con números conocidos de células que se cultivaron y se dejaron adherir sobre la superficie recubierta de colágeno, sin realizar el paso de aspiración a los 30 minutos. De este modo, los valores reportados para este experimento se expresan en números de células.

8.2.6 Método del Alamar Blue para estimación del número total de células presentes en esponjas cultivadas.

El método del Alamar Blue se basa en la capacidad que tienen las células metabólicamente activas de reducir la resazurina, una tinción indicadora no fluorescente, al producto resorufina, que es un compuesto de color rosa fluorescente con un pico de excitación a 570 nm y con una emisión máxima a 585 nm. La cantidad de fluorescencia producida es directamente proporcional a la cantidad de células activas presentes en un cultivo determinado. El protocolo básico seguido fue el siguiente:

1. Se preparó la solución stock de resazurina sódica en PBS para tener una concentración final de 450 μM . Dicha solución se esterilizó a través de un filtro de jeringa de 0,2 μm de tamaño de poro y se almacenó a -20°C .
2. Antes de realizar la medición, se descongelaron las alícuotas necesarias de la solución stock a 37°C .
3. Se preparó la solución de trabajo realizando una dilución 1/5 de solución stock en medio completo para una concentración final de 90 μM de resazurina.
4. Se retiró el medio de cultivo a las esponjas cultivadas en placas de 24 pocillos y a pocillos con cantidades de células conocidas que se utilizaron como rectas patrón.
5. Se añadieron 400 μL de solución de trabajo a cada pocillo.
6. Se incubó durante 3-4 horas en condiciones estándar de cultivo.
7. Cada hora, se realizó una agitación manual de la placa para homogenizar el reactivo reducido en la esponja con el resto del medio circundante.
8. Transcurrido el tiempo, se transfirieron 100 μL de cada muestra a una placa negra de 96 pocillos.

9. Se midió en un fluorímetro con una longitud de onda de excitación de 530 nm y una de emisión a 590 nm.
10. Para los experimentos de proliferación, se retiró la solución de trabajo remanente de cada muestra, se realizó un lavado con PBS para eliminar el exceso de colorante retenido en las esponjas y se añadió medio completo para continuar con el cultivo.

A los días 1, 3 y 7, se repitió el protocolo sobre las mismas esponjas.

8.2.7 Lisis de células cultivadas sobre biomateriales.

Este protocolo se llevó a cabo para obtener lisados de las células cultivadas sobre las esponjas de colágeno, con el fin de cuantificar en ellos la cantidad de DNA de doble cadena (anexo 8.2.8) o la actividad fosfatasa alcalina (anexo 8.2.9).

1. Una vez finalizado el período de adhesión o tratamiento, las esponjas cultivadas se lavaron en 500 μ L de PBS frío.
2. Posteriormente, se transfirieron a tubos de 1,5 mL estériles precargados con 150-250 μ L de tampón de lisis: Tris-HCl 0,1 M, 1 % v/v Tritón X-100, pH 9.
3. Se incubaron en hielo durante 5 minutos.
4. Se sometieron a dos ciclos de congelación / descongelación:
 - a. Agitación por vórtex 30 seg.
 - b. Centrifugación a 10.000 rpm 1 min.
 - c. Congelación a -80 °C: durante 30 min.
 - d. Descongelación a 30 °C 2 min.
 - e. Centrifugación a 8.000 g 1 min.

Tras este par de ciclos, los lisados se utilizaron directamente para su análisis.

8.2.8 Cuantificación de DNA de doble cadena total.

Este procedimiento se llevó a cabo para determinar la cantidad total de DNA de doble cadena presente en los lisados preparados a partir de los diferentes experimentos realizados. Este protocolo se realizó con el kit *Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit* (Thermo Fischer), siguiendo las indicaciones propuestas por la casa comercial. El reactivo *PicoGreen™* es una tinción que reacciona de forma altamente específica con moléculas de DNA. Formado el complejo, las muestras se excitan a una longitud de onda de 480 nm, emitiendo una señal fluorescente cuya máxima intensidad se puede medir a 520 nm. La señal registrada guarda una relación directamente proporcional con la cantidad de DNA total en la muestra que, a su vez, puede ser utilizado como un indicador del número de células presente antes del lisado.

El procedimiento empleado fue el siguiente:

1. Se preparó el tampón 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5 (TE) diluyendo 1/20 con agua milliQ la solución stock provista por el kit.
2. A partir de una muestra de DNA de concentración conocida incluida en el kit, se prepararon 2 rectas patrón mediante diluciones seriadas 1/2 entre 0 y 1.000 ng/mL, realizadas en el mismo tampón de lisis de las muestras.
3. En una placa negra de 96 pocillos, se añadieron 100 μ L por pocillo de cada lisado a analizar. Este lisado se prediluyó en tampón de lisis en aquellos casos en los que se partió de números de células altos, para asegurar que las medidas estuvieran dentro del intervalo lineal de las rectas patrón.
4. Adicionalmente, se añadieron 100 μ L de las muestras de concentración conocida para constituir las rectas patrón.
5. El reactivo *PicoGreen*[™] fue diluido 1/200 en tampón TE en el volumen necesario para tener 100 μ L por cada muestra a analizar.
6. Con una pipeta multicanal, se añadieron 100 μ L de la solución anterior a cada pocillo asegurando de mezclar bien cada uno de ellos.
7. Se incubó entre 10 y 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
8. Se midió en un fluorímetro con longitudes de onda de excitación a 480 nm y de emisión a 520 nm.
9. Los valores obtenidos se interpolaron sobre la recta patrón promedio y, corrigiendo por las diluciones realizadas y el volumen total de lisado, se calculó la cantidad de DNA total de las muestras originales.

En algunos experimentos, se incluyeron muestras provenientes de cultivos con números de células conocidos a modo de “rectas patrón de células”. En estos casos, la interpolación se realizó también sobre estas rectas obteniendo una estimación expresada en número de células.

8.2.9 Actividad fosfatasa alcalina (FA) sobre células en cultivo.

La actividad fosfatasa alcalina es un conocido y ampliamente utilizado marcador de la diferenciación osteogénica. Para su cuantificación se utilizó el sustrato “SIGMAFAST[™] *p*-nitrophenyl phosphate tablets” (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. El *p*-nitrofenil fosfato (*p*NPP) es hidrolizado por la enzima, generando *p*-nitrofenol fosfato, que es un producto soluble de color amarillo que puede ser medido a 450 nm por espectrofotometría.

Este protocolo se realizó a partir de 2 tipos de muestra: medición de la FA a partir de células en cultivo de forma directa o de lisados de células.

Para este método se siguió el siguiente protocolo:

1. Se disolvió en 20 mL de agua milliQ, una pastilla provista por el kit para generar un tampón Tris 0,2 M. Se agitó en un vórtex hasta su completa disolución.
2. Se añadió una pastilla de *p*NPP al tampón anterior y se mezcló en el vórtex.

3. Se retiró el medio de los pocillos o biomateriales sembrados con células a los que se iba a medir la actividad FA.
 - a. Para la medición de la actividad de forma directa, se lavó cada pocillo con 200 μ L de PBS. Se retiró el lavado y se procedió con el paso 4.
 - b. Para la medición sobre lisados celulares, se realizó el lisado (como indica el anexo 8) y se transfirieron 100 μ L del mismo a una placa de 96 pocillos.
4. Se añadieron 100 μ L de la solución de pNPP a cada pocillo con las células o los lisados precargados.
5. Se incubó a 37 °C en oscuridad durante un período de entre 5 y 30 minutos según se fuera desarrollando el color.
6. Transcurrido el tiempo, se midió en el espectrofotómetro directamente sobre la placa a 405 nm.
7. Con el resultado de la absorbancia generado y el tiempo en minutos, se convirtió en unidades de actividad enzimática empleando la siguiente ecuación que genera medidas en U/L:

$$FA \text{ (U/L)} = \frac{\left(\frac{\text{Abs}}{\text{Tiempo}}\right) \cdot \text{Vol. ensayo} \cdot 1.000}{18,8 \cdot \text{Vol. muestra} \cdot \text{Paso de luz}}$$

- a. **Abs:** Absorbancia a 405 nm.
- b. **Tiempo:** Minutos hasta el momento la lectura.
- c. **Vol. ensayo:** Volumen en mL que se midió en el espectrofotómetro.
- d. **Vol. muestra:** Volumen del lisado. Para la medición directa sobre células es igual a **Vol. ensayo**.
- e. **Paso de luz:** Distancia en cm por la que atraviesa el haz de luz.
- f. **18,8:** Coeficiente de extinción molar del *p*-nitrofenol.
- g. **1.000:** Factor de conversión de U/mL a U/L.

En los casos en que se indique, la actividad FA puede expresarse también en mmol/min, caso para el cual el valor se corrigió por el volumen total de lisado.

8.2.10 Tinción de rojo de alizarina.

La tinción de rojo de alizarina es un método ampliamente utilizado que permite teñir los depósitos de fosfato cálcico formados por las células en cultivo. Además de la observación directa y por microscopía, el colorante puede ser extraído para realizar una cuantificación relativa de los niveles de mineralización.

Para este trabajo, esta tinción se realizó sobre células en placas de cultivo sobre la base de un protocolo previamente publicado (Gregory et al., 2004). Adicionalmente, el mismo se modificó para realizar la tinción de forma directa sobre las esponjas cultivadas. El procedimiento seguido fue el siguiente:

1. Se aspiró completamente el medio de cultivo de los pocillos con células sembradas sobre el plástico o sobre las esponjas y se lavaron con abundante PBS.
2. Se añadió formalina tamponada (4%) durante 15 minutos para fijar las células.

3. Tras la fijación, se realizaron 3 lavados con agua destilada en agitación suave durante 5 minutos cada uno.
4. Se añadieron 500 μL de solución de rojo de alizarina (40 mM a pH 4,1 ajustado con hidróxido amónico) y se incubó en agitación suave durante 20 minutos a temperatura ambiente.
5. Se retiró el exceso de colorante:
 - a. Para los cultivos sobre plástico, se realizaron 5 lavados con 800 μL de agua destilada durante 5 minutos en agitación suave.
 - b. En el caso de las esponjas, se transfirieron a tubos de 5 mL y se lavaron con 4 mL de agua destilada agitando los tubos en un agitador de rodillos. Se realizaron lavados hasta que dejó de haber liberación evidente del colorante.
6. En este paso, se fotografiaron pocillos y esponjas con un estereoscopio.
7. Tras el registro fotográfico, se procedió a la extracción del color. Para ello, se añadieron entre 100 y 200 μL de ácido acético (10% v/v) a las muestras y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente.
 - a. Para los cultivos en placas, se añadió el ácido directamente al pocillo. Tras la incubación, se raspó el pocillo con un rascador de células y se transfirió la solución a tubos eppendorf de 1,5 mL.
 - b. Las esponjas se colocaron directamente en los tubos con ácido acético, donde se realizó la incubación y el resto del protocolo.
8. Las muestras se agitaron en un vórtex durante 1 minuto e incubaron a 85 °C durante 10 minutos.
9. Se enfriaron en hielo por 5 minutos.
10. Cada tubo se centrifugó a 12.000 g durante 5 minutos.
11. Se transfirieron 100 μL por muestra a una placa de 96 pocillos para leer en un espectrofotómetro.
12. Se añadieron 40 μL de hidróxido amónico (10% v/v) por pocillo para neutralizar el ácido.

Se midió la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro de placas.

8.2.11 Aislamiento de RNA total y retrotranscripción.

Este protocolo se llevó a cabo con el kit de extracción de RNA *RNeasy MiniKit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para todos los casos, se incluyó un paso de digestión con DNAasa en la columna para eliminar el DNA genómico presente en las muestras y minimizar el riesgo de amplificación inespecífica del mismo en la RT-qPCR.

Para las extracciones realizadas a partir de células cultivadas sobre las esponjas de colágeno se adaptó la fase inicial del protocolo.

1. Para ello, se transfirieron 3 réplicas de esponjas sembradas con células a un tubo eppendorf de 1,5 mL libre de RNasas.
2. Se añadieron 350 μL de tampón de lisis provisto por el kit (RLT) a cada tubo y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente.

3. Tras la incubación, se agitó cada tubo suavemente en un vórtex durante 1 minuto.
4. Se retiró el lisado haciendo presión con una pipeta sobre las esponjas para desplazar la mayor cantidad de líquido posible y se cargó directamente en las columnas de homogenización *QIAshredder* (Qiagen).
5. A partir de este paso, se procedió con el protocolo estándar del kit.

La concentración final de las muestras de RNA obtenidas se calculó mediante mediciones espectrofotométricas en un Nanodrop. El aparato mide la absorbancia a 260 nm de las muestras y realiza la siguiente conversión:

$$\text{Concentración de RNA } (\mu\text{g/mL}) = \text{Abs } 260\text{nm} \cdot 40 \cdot \text{Factor de dilución}$$

La pureza de las muestras se determinó utilizando el cociente A260:A280. Sólo se utilizaron muestras cuyos cocientes fueran mayores a 1,8.

Una vez cuantificados, cada uno de los RNA obtenidos se retrotranscribieron empleando el kit *Prime Script RT master mix* (Takara) siguiendo la siguiente receta general:

1. En tubos de pared fina para PCR se realizó la siguiente mezcla por reacción:
 - a. 4 μL de PrimeScript Takara *master mix*.
 - b. El volumen de RNA correspondiente a 500 ng de muestra total.
 - c. Se completó hasta 20 μL totales añadiendo agua de grado biología molecular.
2. Se mezcló cada tubo bien para homogenizar la solución.
3. Se retrotranscribió incubando durante 15 minutos en un baño termostático a 37 °C.
4. La reacción se detuvo incubando durante 5 segundos a 85 °C en un termobloque.
5. Cada muestra se enfrió inmediatamente y se utilizó para las qPCR.

8.2.12 Análisis de la expresión de genes marcadores de osteogénesis.

En este apartado se explica una visión general del protocolo para el análisis de la expresión de los genes marcadores del proceso osteogénico elegidos para ser estudiados tanto sobre células de rata (rBMSC) como derivadas de ratón (MC3T3-E1).

Todas las qPCR se llevaron a cabo utilizando el reactivo *SYBR Premix Ex Taq II* (Takara). El kit provee una mezcla preestablecida de todos los elementos necesarios para llevar a cabo el proceso de la qPCR mediante el método del SybrGreen. Sólo se deben añadir los oligonucleótidos correspondientes al gen de interés y las muestras de cDNA a analizar. El diseño general de los experimentos de análisis de la expresión de genes marcadores de osteogénesis fue el siguiente:

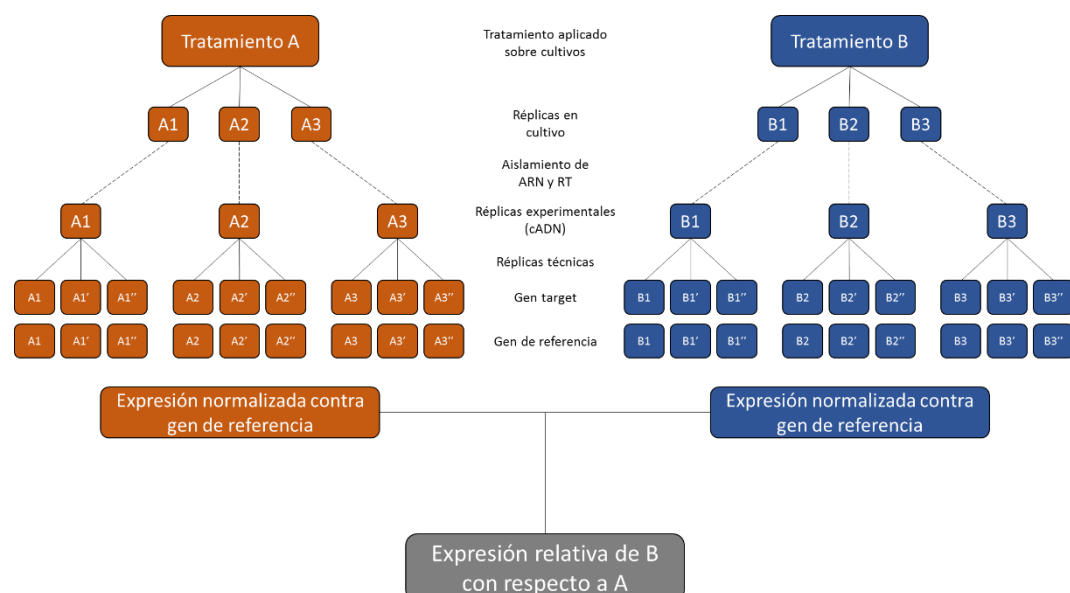


Figura 59. Esquema general del diseño experimental para la medición de la expresión relativa de un gen.

Para cada reacción de qPCR se utilizaron las siguientes condiciones:

Reactivo	Concentración stock	Volumen	Concentración final
Sybr Premix Ex Taq	2x	10 µL	1x
Oligonucleótido <i>up</i>	3 µM	2 µL	0,3 µM
Oligonucleótido <i>down</i>	3 µM	2 µL	0,3 µM
Agua	-	6 µL	-

Tabla 13. Condiciones generales de la mezcla de reacción preparada por muestra de qPCR.

Las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes estudiados fueron las siguientes:

Nombre del gen		Secuencia	Número de acceso del GenBank	Tamaño del amplicón (pb)
<i>mAlp</i>	Forward	5'-TCGGAACAACCTGACTGACC-3'	NM_007431.3	112
	Reverse	5'-TCAATCCTGCCTCCTTCCA-3'		
<i>mBglap</i>	Forward	5'-GAAGACCGCCTACAAACGC-3'	NM_001032298.3	150
	Reverse	5'-CTGCTGTGACATCCATACTTGC-3'		
<i>mRunx2</i>	Forward	5'-GGAACCAAGAAGGCACAGA-3'	NM_001146038.2	89
	Reverse	5'-GATGAGGAATGCGCCCTAA-3'		
<i>mGapdh</i>	Forward	5'-CTCCCACTCTTCCACCTTCG-3'	NM_001289726	110
	Reverse	5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'		
<i>mHprt</i>	Forward	5'-CCAGCGTCGTGATTAGCGAT-3'	NM_013556	133
	Reverse	5'-GCAAGTCTTTCAGTCCTGTCC-3'		

Tabla 14. Secuencias de oligonucleótidos empleados para la amplificación por qPCR para muestras de ratón. Se muestra el nombre oficial del gen, la secuencia orientada 5'-3', el número de acceso a una de las variantes del gen en el GenBank y el tamaño del amplicón generado.

Nombre del gen		Secuencia	Número de acceso del GenBank	Tamaño del amplicón (pb)
<i>rAlp</i>	Forward	5'-CAACCTGACTGACCCTTCC-3'	NM_013059.1	98
	Reverse	5'-TGCCTCCTTCCACTAGCAA-3'		
<i>rBglap</i>	Forward	5'-CAGACCTAGCAGACACCAT-3'	NM_013414.1	160
	Reverse	5'-CGGAGTCTATTACCACCTTA-3'		
<i>rRunx2</i>	Forward	5'-GTCCCATCCATCCATTCC-3'	NM_001278484.2	110
	Reverse	5'-CAGAGGTGGCAGTGTCATCA		
<i>rSp7</i>	Forward	5'-GATATGTCCCATCCCTACGG-3'	NM_181374.2	127
	Reverse	5'-GCCCACCACCTAACCAAT-3'		
<i>rHprt</i>	Forward	5'-CCTCCTCAGACCGCTTTTC-3'	NM_012583.2	75
	Reverse	5'-CACTAATCAGACGCTGGG-3'		
<i>rGapdh</i>	Forward	5'-CATGCCGCTGGAGAAAC-3'	NM_017008	88
	Reverse	5'-CCCAGGATGCCCTTTAGT-3'		

Tabla 15. Secuencias de oligonucleótidos empleados para la amplificación por qPCR para muestras de rata. Se muestra el nombre oficial del gen, la secuencia orientada 5'-3', el número de acceso a una de las variantes del gen en el GenBank y el tamaño del amplicón generado.

Al hacer el diseño de los mismos, las secuencias se eligieron de tal manera que tuvieran temperaturas de fusión muy similares entre sí. Tomando en cuenta todos los genes, las temperaturas de fusión oscilaron entre 59,4 °C y 61,3 °C. De este modo, las condiciones de amplificación de las qPCR fueron exactamente iguales para todos los genes y condiciones pudiendo realizar la amplificación simultánea de varios genes con ciclos a 60 °C. En todos los casos, experimentos preliminares para cada par de oligonucleótidos permitieron validar cada una de estas secuencias para estas condiciones de amplificación.

Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador CFX96 (BioRad) en placas de qPCR de 96 pocillos selladas con un film. El programa general seguido fue el siguiente:

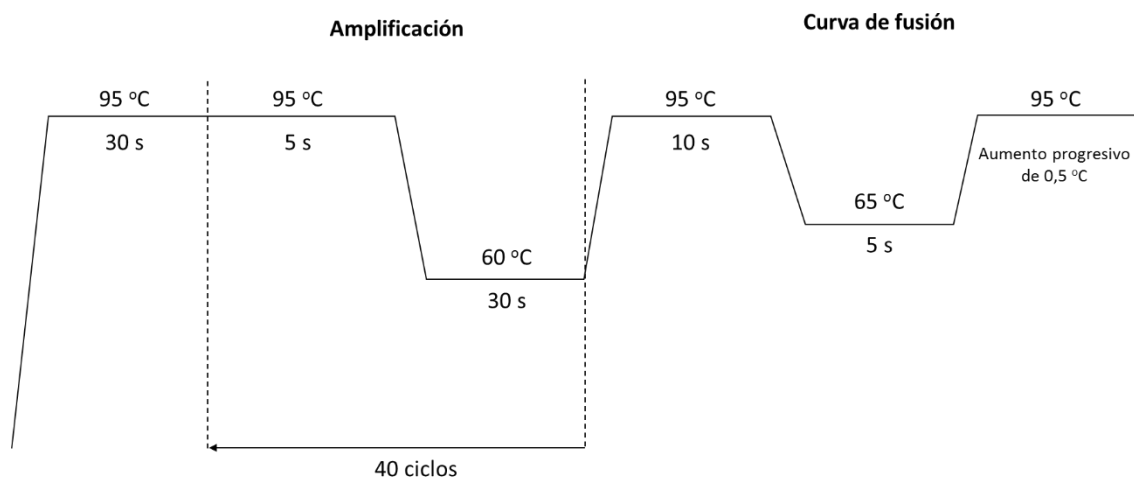


Figura 60. Esquema representativo de los ciclos de amplificación y las condiciones de las curvas de fusión para las qPCR realizadas para todos los genes estudiados. Se muestran los tiempos de duración, la cantidad de ciclos y las temperaturas de cada uno de ellos.

El programa incluyó la realización de una curva de fusión para cada muestra. Mediante esta metodología se somete la muestra a aumentos progresivos de temperatura y se registra la fluorescencia emitida por cada aumento de 0,5 °C. Esta medida permite generar curvas de disociación mediante las cuales se puede inferir la especificidad de los oligonucleótidos empleados. Los resultados se expresaron en términos de expresión relativa con respecto a la condición control negativo. El análisis de los datos se realizó íntegramente con el software provisto por la casa comercial de BioRad.

8.3 Experimentos de osificación ectópica *in vivo* en ratas.

8.3.1 Ensayos de implantación ectópica intramuscular en ratas.

Todos los cuidados y procedimientos quirúrgicos llevados a cabo con los animales se realizaron de acuerdo con las leyes y normativas nacionales (RD 1201/2005) e internacionales (Directiva 2010/63/EU) que rigen la protección de animales de experimentación utilizados para investigación científica. Dichos procedimientos fueron previamente evaluados y aprobados por el comité de bioética del Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología (BIONAND).

Todas las ratas empleadas en este trabajo para los implantes ectópicos fueron machos de la cepa Wistar HAN de 8 semanas y de edad de entre 200 y 250 gramos de peso. Los animales se mantuvieron en el estabulario de BIONAND bajo condiciones de temperatura de 23 °C y un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Durante todo el período de

estabulación, tanto pre- como postoperatorio, los animales tuvieron libre acceso a comida y agua.

Una vez preparadas las esponjas cargadas con alguno de los tratamientos a evaluar, se siguió el siguiente procedimiento quirúrgico.

A los animales se les administraron 16 μ L por cada 100 g de peso de hidrocloreuro de buprenorfina (Buprecare 0,3 mg/mL, Divasa-Farmavic SA) mediante inyección subcutánea a modo de analgesia preoperatoria, 30 minutos antes de la intervención. Posteriormente, fueron anestesiados mediante inhalación de sevoflurano y su región dorsal fue rasurada y desinfectada con etanol al 70%. A continuación, se hicieron incisiones en la piel de la zona media dorsal para exponer la musculatura subyacente. Para ubicar los implantes intramuscularmente, se realizaron pequeños cortes con tijera para generar una cavidad donde colocar los implantes en contacto directo con el tejido muscular.

Se realizaron 4 de estos bolsillos por rata: dos implantes en cada *gluteus maximus* en localización más rostral y caudal. Los bolsillos se cerraron mediante sutura con hilo no reabsorbible mientras que la piel se cerró con una combinación de puntos de sutura con hilo reabsorbible y grapas quirúrgicas.

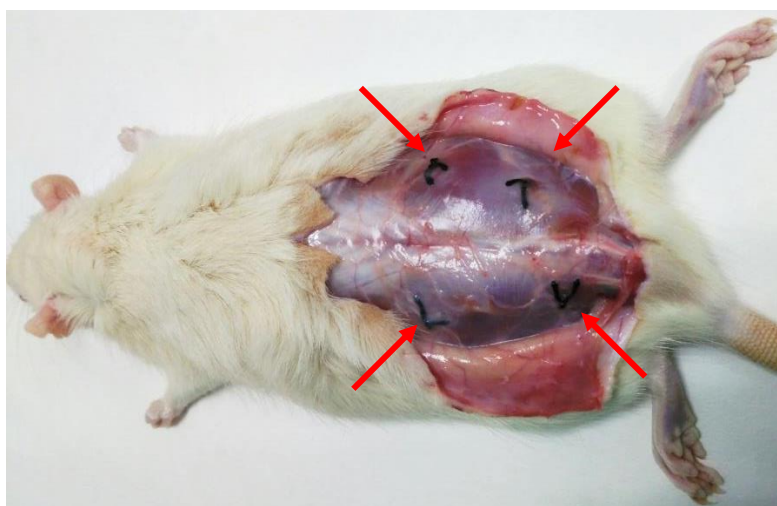


Figura 61. Fotografía de la ubicación de los implantes en los animales. Se muestra la ubicación de los implantes en el momento de la extracción de los mismos.

Tras la cirugía, los animales se mantuvieron estabulados de forma individual con libre acceso a comida y agua. Durante una semana se mantuvo un tratamiento analgésico con buprenorfina (350 μ L por cada 100 mL) suministrada en el agua de beber y se monitorizaron diariamente para comprobar la progresión de las heridas y para detectar posibles indicios de sufrimiento del animal.

8.3.2 Procesamiento histológico de las muestras.

Los implantes que se destinaron para el análisis histológico se trataron con el siguiente protocolo estándar de fijación, descalcificación, deshidratación e inclusión en parafina:

1. Fijación en formalina tamponada (4%) 18 horas.
2. Lavado con PBS 3 x 1h
3. Descalcificación con Histofix decalcifier 2 (Panreac) 2 horas.
4. Deshidratación en vacío un procesador de tejidos (Leica TP 1020):

a. Etanol 70°	2 x 1h
b. Etanol 80°	1 x 1h
c. Etanol 96°	2 x 1h
d. Etanol 100°	2 x 1h
e. Sub X	3 x 30 min
f. Parafina	2 x 2h
5. Las diferentes muestras se incluyeron en parafina, se realizaron cortes de 10 µm de espesor en un microtomo (Modelo HM 360, Thermo Scientific), se montaron en portaobjetos silanados y se dejaron secar a 37 °C.
6. Los mismos se sometieron al siguiente protocolo estándar de tinción con hematoxilina-eosina y a la posterior deshidratación y montaje:

a. Xileno	2 x 10 min
b. Etanol 100°	2 x 10 min
c. Etanol 96°	2 x 10 min
d. Etanol 70°	1 x 10 min
e. Agua destilada	1 x 10 min
f. Hematoxilina de Harris	5 min
g. Etanol 96° + A. Acético	5 min
h. Agua corriente	5 min
i. Etanol 96°	5 min
j. Eosina hidroalcohólica	3 min
k. Etanol 96°	3 lavados breves
l. Etanol 100°	2 x 10 min
m. Xileno	2 x 10 min
n. Montaje con resina hidrofóbica DPX.	

8.3.3 Medición de calcio total a partir de implantes ectópicos.

Este protocolo se realizó para estimar la cantidad total de calcio acumulada en las esponjas implantadas durante los 21 días de tratamiento. Para ello, se empleó el kit de medición de calcio por colorimetría Calcium OCC (Cromatest, linear chemicals). Este método se

basa en la unión específica que se forma entre *o*-cresolftaleína complexona y el calcio en medio alcalino. Esta unión genera un aumento en la absorción del complejo que puede ser medido a 570 nm y que se relaciona de forma proporcional con la concentración de calcio en la muestra testada.

La metodología seguida fue la siguiente:

1. Los implantes extraídos se liberaron los más posible de músculo para que su presencia no interfiriera con la medida de calcio.
2. Se lavaron en NaCl 0,9% para retirar los posibles restos de sangre remanentes.
3. Para extraer el calcio retenido en los implantes, se transfirieron a tubos precargados con HCl 10% (v/v) e incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente.
4. Se mezclaron en una relación 1:1 los dos reactivos provistos por el kit, para obtener un volumen de 200 μ L de esta mezcla por muestra a analizar, cargados en una placa de 96 pocillos con una pipeta multicanal.
5. En cada uno de estos pocillos, se añadieron 10 μ L de las muestras diluidas 1/5 en NaCl 0,9% (v/v), entre las que se encontraban 3 réplicas de una muestra de calcio con concentración conocida provista por el fabricante.
6. La placa se incubó durante 5 minutos a 37 °C.
7. Se midió la absorbancia a 550 nm y, comparando con los valores promedio obtenidos en el control positivo, se estimó la cantidad de calcio total por implante.

$$\frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs estándar}} \cdot 10 \text{ mg/dL} \cdot \text{factor dilución} = \text{mg de Calcio}$$

9 Bibliografía.

1. Agarwal, R., González-García, C., Torstrick, B., Guldberg, R.E., Salmerón-Sánchez, M., y García, A.J. (2015). Simple coating with fibronectin fragment enhances stainless steel screw osseointegration in healthy and osteoporotic rats. *Biomaterials* 63, 137-145.
2. Alt, V., Borgman, B., Eicher, A., Heiss, C., Kanakaris, N.K., Giannoudis, P. V, y Song, F. (2015). Effects of recombinant human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) in grade III open tibia fractures treated with unreamed nails-A clinical and health-economic analysis. *Injury* 46, 2267-2272.
3. Amini, A.R., Laurencin, C.T., y Nukavarapu, S.P. (2012). Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 40, 363-408.
4. Andrades, J.A., Han, B., Becerra, J., Sorgente, N., Hall, F.L., y Nimni, M.E. (1999). A recombinant human TGF-beta1 fusion protein with collagen-binding domain promotes migration, growth, and differentiation of bone marrow mesenchymal cells. *Exp. Cell Res.* 250, 485-498.
5. Andrades, J.A., Santamaría, J.A., Wu, L.T., Hall, F.L., Nimni, M.E., y Becerra, J. (2001a). Production of a recombinant human basic fibroblast growth factor with a collagen binding domain. *Protoplasma* 218, 95-103.
6. Andrades, J.A., Santamaría, J.A., Nimni, M.E., y Becerra, J. (2001b). Selection and amplification of a bone marrow cell population and its induction to the chondro-osteogenic lineage by rhOP-1: an in vitro and in vivo study. *Int. J. Dev. Biol.* 45, 689-693.
7. Aota, S., Nomizu, M., y Yamada, K.M. (1994). The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. *J. Biol. Chem.* 269, 24756-24761.
8. Arrabal, P.M., Visser, R., Santos-Ruiz, L., Becerra, J., y Cifuentes, M. (2013). Osteogenic molecules for clinical applications: improving the BMP-collagen system. *Biol. Res.* 46, 421-429.
9. Asti, A., y Gioglio, L. (2014). Natural and synthetic biodegradable polymers: different scaffolds for cell expansion and tissue formation. *Int. J. Artif. Organs* 37, 187-205.
10. Aubin, J.E. (2008). Chapter 4 – Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation. In *Principles of Bone Biology*, pp. 85-107.
11. Augst, A.D., Kong, H.J., y Mooney, D.J. (2006). Alginate Hydrogels as Biomaterials. *Macromol. Biosci.* 6, 623-633.
12. van Baardewijk, L.J., van der Ende, J., Lissenberg-Thunnissen, S., Romijn, L.M., Hawinkels, L.J.A.C., Sier, C.F.M., y Schipper, I.B. (2013). Circulating bone morphogenetic protein levels and delayed fracture healing. *Int. Orthop.* 37, 523-527.
13. Bakker, A.D., Gakes, T., Hogervorst, J.M.A., de Wit, G.M.J., Klein-Nulend, J., y Jaspers, R.T. (2016). Mechanical Stimulation and IGF-1 Enhance mRNA Translation Rate in Osteoblasts Via Activation of the AKT-mTOR Pathway. *J. Cell. Physiol.* 231, 1283-1290.
14. Benoit, D.S.W., y Anseth, K.S. (2005). The effect on osteoblast function of colocalized RGD and PHSRN epitopes on PEG surfaces. *Biomaterials* 26, 5209-5220.
15. Bianco, P. (2014). «Mesenchymal» Stem Cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 677-704.

16. Bilem, I., Chevallier, P., Plawinski, L., Sone, E.D., Durrieu, M.C., y Laroche, G. (2016). RGD and BMP-2 mimetic peptide crosstalk enhances osteogenic commitment of human bone marrow stem cells. *Acta Biomater.* 36, 132-142.
17. Blokhuis, T.J., Calori, G.M., y Schmidmaier, G. (2013). Autograft versus BMPs for the treatment of non-unions: What is the evidence? *Injury* 44, S40-S42.
18. Boerckel, J.D., Kolambkar, Y.M., Dupont, K.M., Uhrig, B.A., Phelps, E.A., Stevens, H.Y., García, A.J., y Guldberg, R.E. (2011). Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration. *Biomaterials* 32, 5241-5251.
19. Boskey, A.L. (2006). Mineralization, Structure and Function of Bone. In *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*, pp. 201-212.
20. Brunauer, S., Emmett, P.H., y Teller, E. (1938). Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J. Am. Chem. Soc.* 60, 309-319.
21. Campana, V., Milano, G., Pagano, E., Barba, M., Cicione, C., Salonna, G., Lattanzi, W., y Logroscino, G. (2014). Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 25, 2445-2461.
22. Carragee, E.J., Hurwitz, E.L., y Weiner, B.K. (2011). A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J.* 11, 471-491.
23. Carreira, A.C., Lojudice, F.H., Halcsik, E., Navarro, R.D., Sogayar, M.C., y Granjeiro, J.M. (2014). Bone Morphogenetic Proteins Facts, Challenges, and Future Perspectives. *J. Dent. Res.* 93, 335-345.
24. Celeste, A.J., Iannazzi, J.A., Taylor, R.C., Hewick, R.M., Rosen, V., Wang, E.A., y Wozney, J.M. (1990). 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.
25. Celil, A.B., y Campbell, P.G. (2005). BMP-2 and Insulin-like Growth Factor-I Mediate Osterix (Osx) Expression in Human Mesenchymal Stem Cells via the MAPK and Protein Kinase D Signaling Pathways. *J. Biol. Chem.* 280, 31353-31359.
26. Celil, A.B., Hollinger, J.O., y Campbell, P.G. (2005). Osx transcriptional regulation is mediated by additional pathways to BMP2/Smad signaling. *J. Cell. Biochem.* 95, 518-528.
27. Chang, Y.-C., Ho, K.-N., Feng, S.-W., Huang, H.-M., Chang, C.-H., Lin, C.-T., Teng, N.-C., Pan, Y.H., y Chang, W.-J. (2016). Fibronectin-Grafted Titanium Dental Implants: An *In Vivo* Study. *Biomed Res. Int.* 2016, 1-11.
28. Charles, L.F., Woodman, J.L., Ueno, D., Gronowicz, G., Hurley, M.M., y Kuhn, L.T. (2015). Effects of low dose FGF-2 and BMP-2 on healing of calvarial defects in old mice. *Exp. Gerontol.* 64, 62-69.
29. Chen, Q., y Thouas, G.A. (2015). Metallic implant biomaterials. *Mater. Sci. Eng. R Reports* 87, 1-57.

30. Chen, B., Lin, H., Zhao, Y., Wang, B., Zhao, Y., Liu, Y., Liu, Z., y Dai, J. (2007). Activation of demineralized bone matrix by genetically engineered human bone morphogenetic protein-2 with a collagen binding domain derived from von Willebrand factor propolypeptide. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **80**^a, 428-434.
31. Chen, D., Zhao, M., y Mundy, G.R. (2004). Bone Morphogenetic Proteins. *Growth Factors* **22**, 233-241.
32. Chen, F.-M., Chen, R., Wang, X.-J., Sun, H.-H., y Wu, Z.-F. (2009). In vitro cellular responses to scaffolds containing two microencapsulated growth factors. *Biomaterials* **30**, 5215-5224.
33. Chen, L., Zou, X., Zhang, R.-X., Pi, C.-J., Wu, N., Yin, L.-J., y Deng, Z.-L. (2016). IGF1 potentiates BMP9-induced osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells through the enhancement of BMP/Smad signaling. *BMB Rep.* **49**, 122-127.
34. Chen, X., Sevilla, P., y Aparicio, C. (2013). Surface biofunctionalization by covalent co-immobilization of oligopeptides. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **107**, 189-197.
35. Cheng, H., Jiang, W., Phillips, F.M., Haydon, R.C., Peng, Y., Zhou, L., Luu, H.H., An, N., Breyer, B., Vanichakarn, P., et al. (2003). Osteogenic Activity of the Fourteen Types of Human Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). *J Bone Jt. Surg Am* **85**, 1544-1552.
36. Chien, H.-W., Fu, S.-W., Shih, A.-Y., y Tsai, W.-B. (2014). Modulation of the stemness and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by controlling RGD concentrations of poly(carboxybetaine) hydrogel. *Biotechnol. J.* **9**, 1613-1623.
37. Cho, T.-J., Gerstenfeld, L.C., y Einhorn, T.A. (2002). Differential Temporal Expression of Members of the Transforming Growth Factor β Superfamily During Murine Fracture Healing. *J. Bone Miner. Res.* **17**, 513-520.
38. Choi, G.H., Lee, H.J., y Lee, S.C. (2014). Titanium-Adhesive Polymer Nanoparticles as a Surface-Releasing System of Dual Osteogenic Growth Factors. *Macromol. Biosci.* **14**, 496-507.
39. Chollet, C., Chanseau, C., Remy, M., Guignandon, A., Bareille, R., Labrugère, C., Bordenave, L., y Durrieu, M.-C. (2009). The effect of RGD density on osteoblast and endothelial cell behavior on RGD-grafted polyethylene terephthalate surfaces. *Biomaterials* **30**, 711-720.
40. Chuen, F.S., Chuk, C.Y., Ping, W.Y., Nar, W.W., Kim, H.L., y Ming, C.K. (2004). Immunohistochemical Characterization of Cells in Adult Human Patellar Tendons. *J. Histochem. Cytochem.* **52**, 1151-1157.
41. Chung, Y.-I., Ahn, K.-M., Jeon, S.-H., Lee, S.-Y., Lee, J.-H., y Tae, G. (2007). Enhanced bone regeneration with BMP-2 loaded functional nanoparticle-hydrogel complex. *J. Control. Release* **121**, 91-99.
42. Ciarelli, T., Fyhrie, D., y Parfitt, A. (2003). Effects of vertebral bone fragility and bone formation rate on the mineralization levels of cancellous bone from white females. *Bone* **32**, 311-315.
43. Claes, L., Recknagel, S., y Ignatius, A. (2012). Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat. Rev. Rheumatol.* **8**, 133-143.

44. Dänmark, S., Finne-Wistrand, A., Albertsson, A.-C., Patarroyo, M., y Mustafa, K. (2012). Integrin-mediated adhesion of human mesenchymal stem cells to extracellular matrix proteins adsorbed to polymer surfaces. *Biomed. Mater.* 7, 35011.
45. Daughaday, W.H., Hall, K., Raben, M.S., Salmon, W.D., van den Brande, J.L., y van Wyk, J.J. (1972). Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature* 235, 107.
46. Deligianni, D., Korovessis, P., Porte-Derrieu, M.C., Amedee, J., y Repantis, T. (2006). Experimental usage of hydroxyapatite preadsorption with fibronectin to increase permanent stability and longevity of spinal implants. *Stud. Health Technol. Inform.* 123, 289-298.
47. Demirtaş, T.T., Göz, E., Karakeçili, A., y Gümüşderelioğlu, M. (2015). Combined delivery of PDGF-BB and BMP-6 for enhanced osteoblastic differentiation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 27, 1-11.
48. Dimitriou, R., Mataliotakis, G.I., Angoules, A.G., Kanakaris, N.K., y Giannoudis, P. V. (2011). Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: A systematic review. *Injury* 42, S3-S15.
49. Doorn, J., Roberts, S.J., Hilderink, J., Groen, N., van Apeldoorn, A., van Blitterswijk, C., Schrooten, J., y de Boer, J. (2013). Insulin-Like Growth Factor-I Enhances Proliferation and Differentiation of Human Mesenchymal Stromal Cells In Vitro. *Tissue Eng. Part A* 19, 1817-1828.
50. Ducy, P., y Karsenty, G. (2000). The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int.* 57, 2207-2214.
51. Ebisawa, T., Tada, K., Kitajima, I., Tojo, K., Sampath, T.K., Kawabata, M., Miyazono, K., y Imamura, T. (1999). Characterization of bone morphogenetic protein-6 signaling pathways in osteoblast differentiation. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 20), 3519-3527.
52. Egol, K.A., Nauth, A., Lee, M., Pape, H.-C., Watson, J.T., y Borrelli, J. (2015). Bone Grafting. *J. Orthop. Trauma* 29, S10-S14.
53. Einhorn, T.A., y Gerstenfeld, L.C. (2015). Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat. Rev. Rheumatol.* 11, 45-54.
54. Felgueiras, H.P., Evans, M.D.M., y Migonney, V. (2015). Contribution of fibronectin and vitronectin to the adhesion and morphology of MC3T3-E1 osteoblastic cells to poly(NaSS) grafted Ti6Al4V. *Acta Biomater.* 28, 225-233.
55. Feng, Y., y Mrksich, M. (2004). The Synergy Peptide PHSRN and the Adhesion Peptide RGD Mediate Cell Adhesion through a Common Mechanism†. *Biochemistry* 43, 15811-15821.
56. Feng, X., Huang, D., Lu, X., Feng, G., Xing, J., Lu, J., Xu, K., Xia, W., Meng, Y., Tao, T., et al. (2014). Insulin-like growth factor 1 can promote proliferation and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells via mTOR pathway. *Dev. Growth Differ.* 56, 615-624.
57. Fridenshtein, A.I. (1991). [Osteogenic stem cells of the bone marrow]. *Ontogenez* 22, 189-197.

58. Friedlaender, G., Perry, C.R., Dean Cole, J., Cook, S.D., Cierny, G., Muschler, G., Zych, G.A., Calhoun, J.H., Laforte, A.J., y Yin, S. (2001). Osteogenic Protein-1 (Bone Morphogenetic Protein-7) in the Treatment of Tibial Nonunions. *J. Bone Joint Surg. Am.* **83-A Suppl**, S151-S158.
59. Friedman, M.S., Long, M.W., y Hankenson, K.D. (2006). Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. *J. Cell. Biochem.* **98**, 538-554.
60. Friess, W., Uludag, H., Foskett, S., Biron, R., y Sargeant, C. (1999). Characterization of absorbable collagen sponges as recombinant human bone morphogenetic protein-2 carriers. *Int. J. Pharm.* **185**, 51-60.
61. Fromigué, O., Brun, J., Marty, C., Da Nascimento, S., Sonnet, P., y Marie, P.J. (2012). Peptide-based activation of $\alpha 5$ integrin for promoting osteogenesis. *J. Cell. Biochem.* **113**, 3029-3038.
62. Garrison, K.R., Donell, S., Ryder, J., Shemilt, I., Mugford, M., Harvey, I., y Song, F. (2007). Clinical effectiveness and cost-effectiveness of bone morphogenetic proteins in the non-healing of fractures and spinal fusion: a systematic review. *Health Technol. Assess.* **11**, 1-150, iii-iv.
63. Gehron Robey, P. (2008). Chapter 17 – Noncollagenous Bone Matrix Proteins. In *Principles of Bone Biology*, pp. 335-349.
64. Geiger, M., Li, R.H., y Friess, W. (2003). Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 1613-1629.
65. Gerstenfeld, L.C., Cullinane, D.M., Barnes, G.L., Graves, D.T., y Einhorn, T.A. (2003). Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J. Cell. Biochem.* **88**, 873-884.
66. Giorgio Calori, M., Capanna, R., Colombo, M., De Biase, P., O'Sullivan, C., Cartareggia, V., y Conti, C. (2013). Cost effectiveness of tibial nonunion treatment: A comparison between rhBMP-7 and autologous bone graft in two Italian centres. *Injury* **44**, 1871-1879.
67. Giustina, A., Mazziotti, G., y Canalis, E. (2008). Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factors, and the Skeleton. *Endocr. Rev.* **29**, 535-559.
68. Globus, R.K., Doty, S.B., Lull, J.C., Holmuhamedov, E., Humphries, M.J., y Damsky, C.H. (1998). Fibronectin is a survival factor for differentiated osteoblasts. *J. Cell Sci.* **111**.
69. Govender, S., Csimma, C., Genant, H.K., Valentin-Opran, A., Amit, Y., Arbel, R., Aro, H., Atar, D., Bishay, M., Börner, M.G., et al. (2002). Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 for Treatment of Open Tibial Fractures. *J. Bone Jt. Surg.* **84**, 2123-2134.
70. Govoni, K.E., Wergedal, J.E., Florin, L., Angel, P., Baylink, D.J., y Mohan, S. (2007). Conditional Deletion of Insulin-Like Growth Factor-I in Collagen Type 1 $\alpha 2$ -Expressing Cells Results in Postnatal Lethality and a Dramatic Reduction in Bone Accretion. *Endocrinology* **148**, 5706-5715.
71. Grasser, W.A., Orlic, I., Borovecki, F., Riccardi, K.A., Simic, P., Vukicevic, S., y Paralkar, V.M. (2007). BMP-6 exerts its osteoinductive effect through activation of IGF-I and EGF pathways. *Int. Orthop.* **31**, 759-765.

72. Gregory, C.A., Grady Gunn, W., Peister, A., y Prockop, D.J. (2004). An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal. Biochem.* 329, 77-84.
73. Hak, D.J., Fitzpatrick, D., Bishop, J.A., Marsh, J.L., Tilp, S., Schnettler, R., Simpson, H., y Alt, V. (2014). Delayed union and nonunions: Epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury* 45, S3-S7.
74. Hall, B.K., y Hall, B.K. (2015). Chapter 2 – Bone. In *Bones and Cartilage*, pp. 17-42.
75. Hamidouche, Z., Fromigue, O., Ringe, J., Haupl, T., Vaudin, P., Pages, J.-C., Srouji, S., Livne, E., y Marie, P.J. (2009). Priming integrin α_5 promotes human mesenchymal stromal cell osteoblast differentiation and osteogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 18587-18591.
76. Hayrapetyan, A., Jansen, J.A., y van den Beucken, J.J.J.P. (2015). Signaling pathways involved in osteogenesis and their application for bone regenerative medicine. *Tissue Eng. Part B. Rev.* 21, 75-87.
77. Healy, K.E., Reznia, A., y Stile, R.A. (1999). Designing Biomaterials to Direct Biological Responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 875, 24-35.
78. Heilig, J., Paulsson, M., y Zaucke, F. (2016). Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) signaling regulates osterix expression and cartilage matrix mineralization during endochondral ossification. *Bone* 83, 48-57.
79. Helfrich, M.H., Stenbeck, G., Nesbitt, S.A., y Horton, M.A. (2008). Chapter 20 – Integrins and Other Cell Surface Attachment Molecules of Bone Cells. In *Principles of Bone Biology*, pp. 385-424.
80. Hindié, M., Degat, M.-C., Gaudière, F., Gallet, O., Van Tassel, P.R., y Pauthe, E. (2011). Pre-osteoblasts on poly(L-lactic acid) and silicon oxide: Influence of fibronectin and albumin adsorption. *Acta Biomater.* 7, 387-394.
81. Hojo, K., Susuki, Y., Maeda, M., Okazaki, I., Nomizu, M., Kamada, H., Yamamoto, Y., Nakagawa, S., Mayumi, T., y Kawasaki, K. (2001). Amino acids and peptides. Part 39: a bivalent poly(ethylene glycol) hybrid containing an active site (RGD) and its synergistic site (PHSRN) of fibronectin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 1429-1432.
82. Huizinga, E.G., Martijn van der Plas, R., Kroon, J., Sixma, J.J., y Gros, P. (1997). Crystal structure of the A3 domain of human von Willebrand factor: implications for collagen binding. *Structure* 5, 1147-1156.
83. James, A.W., LaChaud, G., Shen, J., Asatrian, G., Nguyen, V., Zhang, X., Ting, K., y Soo, C. (2016). A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue Eng. Part B. Rev.* 22, 284-297.
84. Jilka, R.L., Weinstein, R.S., Bellido, T., Parfitt, A.M., y Manolagas, S.C. (1998). Osteoblast Programmed Cell Death (Apoptosis): Modulation by Growth Factors and Cytokines. *J. Bone Miner. Res.* 13, 793-802.
85. Jo, J.-Y., Jeong, S.-I., Shin, Y.-M., Kang, S.-S., Kim, S.-E., Jeong, C.-M., y Huh, J.-B. (2015). Sequential delivery of BMP-2 and BMP-7 for bone regeneration using a heparinized collagen membrane. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 44, 921-928.

86. Kanematsu, A., Yamamoto, S., Ozeki, M., Noguchi, T., Kanatani, I., Ogawa, O., y Tabata, Y. (2004). Collagenous matrices as release carriers of exogenous growth factors. *Biomaterials* 25, 4513-4520.
87. Kang, Q., Sun, M.H., Cheng, H., Peng, Y., Montag, A.G., Deyrup, A.T., Jiang, W., Luu, H.H., Luo, J., Szatkowski, J.P., et al. (2004). Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Ther.* 11, 1312-1320.
88. Karaplis, A.C. (2008). Chapter 3 – Embryonic Development of Bone and Regulation of Intramembranous and Endochondral Bone Formation. In *Principles of Bone Biology*, pp. 53-84.
89. Kempen, D.H.R., Lu, L., Heijink, A., Hefferan, T.E., Creemers, L.B., Maran, A., Yaszemski, M.J., y Dhert, W.J.A. (2009). Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration. *Biomaterials* 30, 2816-2825.
90. Kesavan, C., Wergedal, J.E., Lau, K.-H.W., y Mohan, S. (2011). Conditional disruption of IGF-I gene in type 1 collagen-expressing cells shows an essential role of IGF-I in skeletal anabolic response to loading. *AJP Endocrinol. Metab.* 301, E1191-E1197.
91. Kim, S., Kang, Y., Krueger, C.A., Sen, M., Holcomb, J.B., Chen, D., Wenke, J.C., y Yang, Y. (2012). Sequential delivery of BMP-2 and IGF-1 using a chitosan gel with gelatin microspheres enhances early osteoblastic differentiation. *Acta Biomater.* 8, 1768-1777.
92. Kim, S.E., Yun, Y.-P., Lee, J.Y., Shim, J.-S., Park, K., y Huh, J.-B. (2015). Co-delivery of platelet-derived growth factor (PDGF-BB) and bone morphogenic protein (BMP-2) coated onto heparinized titanium for improving osteoblast function and osteointegration. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 9, E219-E228.
93. King, W.J., y Krebsbach, P.H. (2012). Growth factor delivery: How surface interactions modulate release in vitro and in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 1239-1256.
94. Klein-Nulend, J., y Bonewald, L. (2008). Chapter 8 – The Osteocyte. In *Principles of Bone Biology*, pp. 153-174.
95. Koch, H., Jadlowiec, J.A., y Campbell, P.G. (2005). Insulin-like growth factor-I induces early osteoblast gene expression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 14, 621-631.
96. Kósa, J.P., Kis, A., Bácsi, K., Balla, B., Nagy, Z., Takács, I., Speer, G., y Lakatos, P. (2011). The protective role of bone morphogenetic protein-8 in the glucocorticoid-induced apoptosis on bone cells. *Bone* 48, 1052-1057.
97. Kreiner, M., Chillakuri, C.R., Pereira, P., Fairhead, M., Li, Z., Mardon, H.J., Holt, S.A., van der Walle, C.F., Bella, J., y Humphries, M.J. (2009). Orientation and surface coverage of adsorbed fibronectin cell binding domains and bound integrin $\alpha 5 \beta 1$ receptors. *Soft Matter* 5, 3954.
98. Lagunas, A., Comelles, J., Martínez, E., Prats-Alfonso, E., Acosta, G.A., Albericio, F., y Samitier, J. (2012). Cell adhesion and focal contact formation on linear RGD molecular gradients: study of non-linear concentration dependence effects. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 8, 432-439.

99. Lai, C.-F., y Cheng, S.-L. (2004). $\alpha\text{v}\beta$ Integrins Play an Essential Role in BMP-2 Induction of Osteoblast Differentiation. *J. Bone Miner. Res.* 20, 330-340.
100. Laron, Z. (2001). Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Mol. Pathol.* 54, 311-316.
101. Lavery, K., Swain, P., Falb, D., y Alaoui-Ismaïli, M.H. (2008). BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J. Biol. Chem.* 283, 20948-20958.
102. Lee, J.H., Jang, S.-J., Baek, H.-R., Lee, K.M., Chang, B.-S., y Lee, C.-K. (2015). Synergistic induction of early stage of bone formation by combination of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and epidermal growth factor. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 9, 447-459.
103. Lee, K.-S., Hong, S.-H., y Bae, S.-C. (2002). Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein. *Oncogene* 21, 7156-7163.
104. Legate, K.R., Wickstrom, S.A., y Fassler, R. (2009). Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev.* 23, 397-418.
105. Li, R.H., y Wozney, J.M. (2001). Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. *Trends Biotechnol.* 19, 255-265.
106. Lian, J.B., y Stein, G.S. (2006). The Cells of Bone. *Dyn. Bone Cartil. Metab.* 221-258.
107. Lin, H., Chen, B., Sun, W., Zhao, W., Zhao, Y., y Dai, J. (2006). The effect of collagen-targeting platelet-derived growth factor on cellularization and vascularization of collagen scaffolds. *Biomaterials* 27, 5708-5714.
108. Loi, F., Córdova, L.A., Pajarinen, J., Lin, T., Yao, Z., y Goodman, S.B. (2016). Inflammation, fracture and bone repair. *Bone* 86, 119-130.
109. Lutolf, M.P., y Hubbell, J.A. (2005). Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* 23, 47-55.
110. Luu, H.H., Song, W.-X., Luo, X., Manning, D., Luo, J., Deng, Z.-L., Sharff, K.A., Montag, A.G., Haydon, R.C., y He, T.-C. (2007). Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 25, 665-677.
111. Lyons, K.M., Pelton, R.W., y Hogan, B.L. (1989). Patterns of expression of murine Vgr-1 and BMP-2^a RNA suggest that transforming growth factor-beta-like genes coordinately regulate aspects of embryonic development. *Genes Dev.* 3, 1657-1668.
112. Mackie, E.J., Ahmed, Y.A., Tatarczuch, L., Chen, K.-S., y Mirams, M. (2008). Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 46-62.
113. Maegawa, N., Kawamura, K., Hirose, M., Yajima, H., Takakura, Y., y Ohgushi, H. (2007). Enhancement of osteoblastic differentiation of mesenchymal stromal cells cultured by selective combination of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 1, 306-313.

114. Malafaya, P.B., Silva, G.A., y Reis, R.L. (2007). Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 207-233.
115. Manolagas, S.C. (2000). Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis ¹. *Endocr. Rev.* 21, 115-137.
116. Marie, P.J., Haÿ, E., y Saidak, Z. (2014). Integrin and cadherin signaling in bone: role and potential therapeutic targets. *Trends Endocrinol. Metab.* 25, 567-575.
117. Marsell, R., y Einhorn, T.A. (2011). The biology of fracture healing. *Injury* 42, 551-555.
118. Martin, R.B., Burr, D.B., Sharkey, N.A., y Fyhrie, D.P. (2015). *Skeletal Biology. In Skeletal Tissue Mechanics*, (New York, NY: Springer New York), pp. 35-93.
119. Massia, S.P., y Hubbell, J.A. (1991). An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin alpha V beta 3-mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation. *J. Cell Biol.* 114, 1089-1100.
120. Matsushita, O., Koide, T., Kobayashi, R., Nagata, K., y Okabe, A. (2001). Substrate Recognition by the Collagen-binding Domain of *Clostridium histolyticum* Class I Collagenase. *J. Biol. Chem.* 276, 8761-8770.
121. Mehta, M., Schmidt-Bleek, K., Duda, G.N., y Mooney, D.J. (2012). Biomaterial delivery of morphogens to mimic the natural healing cascade in bone. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 1257-1276.
122. Meynard, D., Kautz, L., Darnaud, V., Canonne-Hergaux, F., Coppin, H., y Roth, M.-P. (2009). Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat. Genet.* 41, 478-481.
123. Mizrahi, O., Sheyn, D., Tawackoli, W., Kallai, I., Oh, A., Su, S., Da, X., Zarrini, P., Cook-Wiens, G., Gazit, D., et al. (2013). BMP-6 is more efficient in bone formation than BMP-2 when overexpressed in mesenchymal stem cells. *Gene Ther.* 20, 370-377.
124. Moatz, B., y Tortolani, P.J. (2013). Transforaminal lumbar interbody fusion and posterior lumbar interbody fusion utilizing BMP-2 in treatment of degenerative spondylolisthesis: neither safe nor cost effective. *Surg. Neurol. Int.* 4, S67-73.
125. Mueller, T.D., y Nickel, J. (2012). Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Lett.* 586, 1846-1859.
126. Mullen, L.M., Best, S.M., Brooks, R.A., Ghose, S., Gwynne, J.H., Wardale, J., Rushton, N., y Cameron, R.E. (2010). Binding and release characteristics of insulin-like growth factor-1 from a collagen-glycosaminoglycan scaffold. *Tissue Eng. Part C. Methods* 16, 1439-1448.
127. Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A., Cohen, R., Cros, J., Faivre, S., Raymond, E., y de Gramont, A. (2015). Targeting the TGFβ pathway for cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* 147, 22-31.
128. Nohe, A., Keating, E., Knaus, P., y Petersen, N.O. (2004). Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell. Signal.* 16, 291-299.

129. Ochsenhirt, S.E., Kokkoli, E., McCarthy, J.B., y Tirrell, M. (2006). Effect of RGD secondary structure and the synergy site PHSRN on cell adhesion, spreading and specific integrin engagement. *Biomaterials* 27, 3863-3874.
130. Osathanon, T., Bespinyowong, K., Arksornnukit, M., Takahashi, H., y Pavasant, P. (2006). Ti-6Al-7Nb promotes cell spreading and fibronectin and osteopontin synthesis in osteoblast-like cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 17, 619-625.
131. Oya, K., Tanaka, Y., Saito, H., Kurashima, K., Nogii, K., Tsutsumi, H., Tsutsumi, Y., Doi, H., Nomura, N., y Hanawa, T. (2009). Calcification by MC3T3-E1 cells on RGD peptide immobilized on titanium through electrodeposited PEG. *Biomaterials* 30, 1281-1286.
132. Patterson, J., Siew, R., Herring, S.W., Lin, A.S.P., Guldberg, R., y Stayton, P.S. (2010). Hyaluronic acid hydrogels with controlled degradation properties for oriented bone regeneration. *Biomaterials* 31, 6772-6781.
133. Perez, R.A., Kim, J.-H., Buitrago, J.O., Wall, I.B., y Kim, H.-W. (2015). Novel therapeutic core-shell hydrogel scaffolds with sequential delivery of cobalt and bone morphogenetic protein-2 for synergistic bone regeneration. *Acta Biomater.* 23, 295-308.
134. Peters, A., Schell, H., Bail, H.J., Hannemann, M., Schumann, T., Duda, G.N., y Lienau, J. (2010). Standard bone healing stages occur during delayed bone healing, albeit with a different temporal onset and spatial distribution of callus tissues. *Histol. Histopathol.* 25, 1149-1162.
135. Pierschbacher, M.D., y Ruoslahti, E. (1984). Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309, 30-33.
136. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., y Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.
137. Raiche, A.T., y Puleo, D.A. (2004). In vitro effects of combined and sequential delivery of two bone growth factors. *Biomaterials* 25, 677-685.
138. Rapuano, B.E., Hackshaw, K.M., Schniepp, H.C., y MacDonald, D.E. (2012). Effects of coating a titanium alloy with fibronectin on the expression of osteoblast gene markers in the MC3T3 osteoprogenitor cell line. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 27, 1081-1090.
139. Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S.R., Anuradha, E., y Solomon, F.D.P. (2015). 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *J. Cell. Physiol.* 230, 16-26.
140. Rengachary, S.S. (2002). Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurg. Focus* 13, e2.
141. Rezaia, A., Johnson, R., Lefkow, A.R., y Healy, K.E. (1999). Bioactivation of metal oxide surfaces. 1. Surface characterization and cell response. *Langmuir* 15, 6931-6939.
142. Rico-Llanos, G.A., Becerra, J., y Visser, R. (2017). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) enhances the osteogenic activity of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in vitro and in vivo , and together have a stronger osteogenic effect than when IGF-1 is combined with BMP-2. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 105, 1867-1875.

143. Rinderknecht, E., y Humbel, R.E. (1976). Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 2365-2369.
144. Romijn, R.A., Westein, E., Bouma, B., Schiphorst, M.E., Sixma, J.J., Lenting, P.J., y Huizinga, E.G. (2003). Mapping the collagen-binding site in the von Willebrand factor-A3 domain. *J. Biol. Chem.* 278, 15035-15039.
145. Ruppert, R., Hoffmann, E., y Sebald, W. (1996). Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *Eur. J. Biochem.* 237, 295-302.
146. Salmon, W.D., y Daughaday, W.H. (1957). A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J. Lab. Clin. Med.* 49, 825-836.
147. Samee, N., Geoffroy, V., Marty, C., Schiltz, C., Vieux-Rochas, M., Levi, G., y de Vernejoul, M.-C. (2008). Dlx5, a Positive Regulator of Osteoblastogenesis, is Essential for Osteoblast-Osteoclast Coupling. *Am. J. Pathol.* 173, 773-780.
148. Schmidt, M.B., Chen, E.H., y Lynch, S.E. (2006). A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthr. Cartil.* 14, 403-412.
149. Schmidt-Bleek, K., Kwee, B.J., Mooney, D.J., y Duda, G.N. (2015). Boon and Bane of Inflammation in Bone Tissue Regeneration and Its Link with Angiogenesis. *Tissue Eng. Part B. Rev.* 21, 354-364.
150. Schönmeier, B.H., Wong, A.K., Li, S., Gewalli, F., Cordiero, P.G., y Mehrara, B.J. (2008). Treatment of hydroxyapatite scaffolds with fibronectin and fetal calf serum increases osteoblast adhesion and proliferation in vitro. *Plast. Reconstr. Surg.* 121, 751-762.
151. Shen, J., James, A.W., Zara, J.N., Asatrian, G., Khadarian, K., Zhang, J.B., Ho, S., Kim, H.J., Ting, K., y Soo, C. (2013). BMP2-Induced Inflammation Can Be Suppressed by the Osteoinductive Growth Factor NELL-1. *Tissue Eng. Part A* 19, 2390-2401.
152. Shibuya, N., y Jupiter, D.C. (2015). Bone Graft Substitute. *Clin. Podiatr. Med. Surg.* 32, 21-34.
153. Shweikeh, F., Hanna, G., Bloom, L., Sayegh, E.T., Liu, J., Acosta, F.L., y Drazin, D. (2016). Assessment of outcome following the use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 for spinal fusion in the elderly population. *J. Neurosurg. Sci.* 60, 256-271.
154. Solorio, L., Zwolinski, C., Lund, A.W., Farrell, M.J., y Stegemann, J.P. (2010). Gelatin microspheres crosslinked with genipin for local delivery of growth factors. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 4, 514-523.
155. Sun, J., y Tan, H. (2013). Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials (Basel)*. 6, 1285-1309.
156. Tada, S., Kitajima, T., y Ito, Y. (2012). Design and synthesis of binding growth factors. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 6053-6072.
157. Tahimic, C.G.T., Wang, Y., y Bikle, D.D. (2013). Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 4.

158. Takahashi, N., Udagawa, N., Kobayashi, Y., Takami, M., y Suda, T. (2008). Chapter 9 – Osteoclast Generation. In *Principles of Bone Biology*, pp. 175-192.
159. Takarada, T., Nakazato, R., Tsuchikane, A., Fujikawa, K., Iezaki, T., Yoneda, Y., y Hinoi, E. (2016). Genetic analysis of Runx2 function during intramembranous ossification. *Development* *143*, 211-218.
160. Toyoshima, T., Matsushita, O., Minami, J., Nishi, N., Okabe, A., y Itano, T. (2001). Collagen-binding domain of a *Clostridium histolyticum* collagenase exhibits a broad substrate spectrum both in vitro and in vivo. *Connect. Tissue Res.* *42*, 281-290.
161. Tuan, T.L., Cheung, D.T., Wu, L.T., Yee, A., Gabriel, S., Han, B., Morton, L., Nimni, M.E., y Hall, F.L. (1996). Engineering, expression and renaturation of targeted TGF-beta fusion proteins. *Connect. Tissue Res.* *34*, 1-9.
162. Uludag, H., Gao, T., Porter, T.J., Friess, W., y Wozney, J.M. (2001). Delivery systems for BMPs: factors contributing to protein retention at an application site. *J. Bone Joint Surg. Am.* *83-A Suppl 1*, S128-35.
163. Väänänen, H.K., y Zhao, H. (2008). Chapter 10 – Osteoclast Function: Biology and Mechanisms. In *Principles of Bone Biology*, pp. 193-209.
164. Visser, R., Arrabal, P.M., Becerra, J., Rinas, U., y Cifuentes, M. (2009). The effect of an rhBMP-2 absorbable collagen sponge-targeted system on bone formation in vivo. *Biomaterials* *30*, 2032-2037.
165. Visser, R., Arrabal, P.M., Santos-Ruiz, L., Becerra, J., y Cifuentes, M. (2012). Basic fibroblast growth factor enhances the osteogenic differentiation induced by bone morphogenetic protein-6 in vitro and in vivo. *Cytokine* *58*, 27-33.
166. Visser, R., Arrabal, P.M., Santos-Ruiz, L., Fernandez-Barranco, R., Becerra, J., y Cifuentes, M. (2014). A Collagen-Targeted Biomimetic RGD Peptide to Promote Osteogenesis. *Tissue Eng. Part A* *20*, 34-44.
167. Visser, R., Rico-Llanos, G.A., Pulkkinen, H., y Becerra, J. (2016a). Peptides for bone tissue engineering. *J. Control. Release* *244*, 122-135.
168. Visser, R., Bodnarova, K., Arrabal, P.M., Cifuentes, M., y Becerra, J. (2016b). Combining bone morphogenetic proteins-2 and -6 has additive effects on osteoblastic differentiation in vitro and accelerates bone formation in vivo. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* *104*, 178-185.
169. Vukicevic, S., y Grgurevic, L. (2009). BMP-6 and mesenchymal stem cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev.* *20*, 441-448.
170. Wang, J., Wang, L., Li, X., y Mao, C. (2013a). Virus activated artificial ECM induces the osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells without osteogenic supplements. *Sci. Rep.* *3*.
171. Wang, S., Mu, J., Fan, Z., Yu, Y., Yan, M., Lei, G., Tang, C., Wang, Z., Zheng, Y., Yu, J., et al. (2012). Insulin-like growth factor 1 can promote the osteogenic differentiation and osteogenesis of stem cells from apical papilla. *Stem Cell Res.* *8*, 346-356.
172. Wang, X., Yan, C., Ye, K., He, Y., Li, Z., y Ding, J. (2013b). Effect of RGD nanospacing on differentiation of stem cells. *Biomaterials* *34*, 2865-2874.

173. Wang, Y., Nishida, S., Elalieh, H.Z., Long, R.K., Halloran, B.P., y Bikle, D.D. (2006). Role of IGF-I Signaling in Regulating Osteoclastogenesis. *J. Bone Miner. Res.* **21**, 1350-1358.
174. Weadock, K.S., Wolff, D., y Silver, F.H. (1987). Diffusivity of ¹²⁵I-labelled macromolecules through collagen: mechanism of diffusion and effect of adsorption. *Biomaterials* **8**, 105-112.
175. Wei, S., Cai, X., Huang, J., Xu, F., Liu, X., y Wang, Q. (2012). Recombinant Human BMP-2 for the Treatment of Open Tibial Fractures. *Orthopedics* **35**, e847-e854.
176. Wu, M., Chen, G., y Li, Y.-P. (2016). TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res.* **4**, 16009.
177. Xian, L., Wu, X., Pang, L., Lou, M., Rosen, C., Qiu, T., Crane, J., Frassica, F., Zhang, L., Rodriguez, J.P., et al. (2012). Matrix IGF-1 regulates bone mass by activation of mTOR in mesenchymal stem cells. *Nat. Med.* **18**, 1095-1101.
178. Yakar, S., Rosen, C.J., Beamer, W.G., Ackert-Bicknell, C.L., Wu, Y., Liu, J.-L., Ooi, G.T., Setser, J., Frystyk, J., Boisclair, Y.R., et al. (2002). Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J. Clin. Invest.* **110**, 771-781.
179. Yakar, S., Courtland, H.-W., y Clemmons, D. (2010). IGF-1 and bone: New discoveries from mouse models. *J. Bone Miner. Res.* **25**, 2543-2552.
180. Yamamoto, M., Ikada, Y., y Tabata, Y. (2001). Controlled release of growth factors based on biodegradation of gelatin hydrogel. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **12**, 77-88.
181. Yang, F., Williams, C.G., Wang, D., Lee, H., Manson, P.N., y Elisseeff, J. (2005). The effect of incorporating RGD adhesive peptide in polyethylene glycol diacrylate hydrogel on osteogenesis of bone marrow stromal cells. *Biomaterials* **26**, 5991-5998.
182. Yeh, L.-C.C., Adamo, M.L., Olson, M.S., y Lee, J.C. (1997). Osteogenic Protein-1 and Insulin-Like Growth Factor I Synergistically Stimulate Rat Osteoblastic Cell Differentiation and Proliferation. *Endocrinology* **138**, 4181-4190.
183. Zanetti, M. (2003). Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 39-48.
184. Zha, J., y Lackner, M.R. (2010). Targeting the Insulin-like Growth Factor Receptor-1R Pathway for Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.* **16**, 2512-2517.
185. Zhang, J., Ding, L., Zhao, Y., Sun, W., Chen, B., Lin, H., Wang, X., Zhang, L., Xu, B., y Dai, J. (2009). Collagen-Targeting Vascular Endothelial Growth Factor Improves Cardiac Performance After Myocardial Infarction. *Circulation* **119**, 1776-1784.
186. Zhang, W., Shen, X., Wan, C., Zhao, Q., Zhang, L., Zhou, Q., y Deng, L. (2012). Effects of insulin and insulin-like growth factor 1 on osteoblast proliferation and differentiation: differential signalling via Akt and ERK. *Cell Biochem. Funct.* **30**, 297-302.
187. Zhao, W., Chen, B., Li, X., Lin, H., Sun, W., Zhao, Y., Wang, B., Zhao, Y., Han, Q., y Dai, J. (2007). Vascularization and cellularization of collagen scaffolds incorporated with two different collagen-targeting human basic fibroblast growth factors. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*.

10 Publicaciones relacionadas con la Tesis Doctoral.