

## **RESUMEN**

El objetivo de este trabajo, ha sido evaluar la aplicabilidad de tres materiales eutectoides en el sistema dicalcio silicato-tricalcio fosfato (EC1, EC2, EC3) en el campo de la ingeniería del tejido óseo. Por eso es necesario evaluar la biocompatibilidad de estas cerámicas a través de estudios in vitro , la posibilidad de utilizarlas como matrices para soportar el crecimiento celular y al mismo tiempo la capacidad osteoinductora de lo los materiales de estimular la diferenciación de células indiferenciadas ( ahMSCs ) hacia osteoblastos.

### **LA BIO-INGENIERÍA DEL TEJIDO ÓSEO**

La bio-ingenería es un nuevo campo inter-disciplinar que se propone de combinar los principios de la biología y de la ingeniería. Esta disciplina se propone reparar daños óseos utilizando como soportes para el crecimiento celular biomateriales que una vez introducidos en el sito defectivo permitirían a los precursores celulares diferenciarse bajo la influencia de los factores de crecimiento y de los iones presentes.

Los precursores no cometidos mas utilizados para estos estudios son las células mesenquimales adultas humanas (ahMSCs) aisladas de aspirados completos de medula ósea, através de varios protocolos entre los cuales la centrifugación en gradientes de densidad como el Ficoll. Las ahMSCs son células multipotentes capaces de originar progenitores de diferentes tejidos mesenquimales como el óseo, cartilágneo, adiposo o muscular. Por este motivo y por la baja inmunogenicidad presentada son las células mas deseadas. Al día de hoy hay algunas normas para la caracterización de las ahMSCs como la adherencia al plástico y la expresión de algunos marcadores como CD105, CD73, CD90; porque los cultivos primarios de

células mononucleadas separadas por centrifugación en Ficoll, se ha demostrado contener células de la línea hematopoyética y un conjunto de progenitores mesenquimales con diferentes grados de staminalidad. El mayor o menor contenido de células no comisionadas varía de muestra a muestra y está relacionado con factores dependientes del donador como edad o condiciones físicas y del método de extracción o separación.

### **LOS MATERIALES CERAMICOS (EC1, EC2, EC2)**

Los materiales utilizados en este trabajo los ha producido Isabel Martínez de la Universidad de Helche. Son cerámicas contenientes diferentes cantidades de fosfato tricalcico  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (TCP) y dicalcio silicato  $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$  ( $\text{C}_2\text{S}$ ) (EC 1: 31% TCP e 69%  $\text{C}_2\text{S}$ , EC 2: 55% TCP e 45%  $\text{C}_2\text{S}$ , EC 3: 83% TCP e 17%  $\text{C}_2\text{S}$ ). La hipótesis es que estos materiales sean biocompatibles, y debido a su bioactividad (comprobada anteriormente por el laboratorio que los produce) que estimulen la regeneración ósea integrándose al hueso a través de la formación de una capa de hidroxiapatita y promocionando el diferenciamiento osteogénico de las ahMSCs a través de la liberación de iones al medio de cultivo celular. Calcio i Fosfato son iones que actúan como moléculas señal, capaces de estimular la proliferación y el diferenciamiento celular actuando sobre la vía de señalización ERK1/2. En cambio el Silicio es un cofactor de la prolina hidroxilasa, que actúa sobre las cadenas alfa del colágeno promocionando su síntesis y secreción extracelular.

### **MARCADORES DE LA DIFERENCIACIÓN OSTEOLÁSTICA**

Las capacidades regeneradoras del hueso dependen de la re-activación de vías activadas durante la esquelotogénesis en el embrión. En la osteogénesis endocondral como intramembranosa, la generación de nuevo tejido óseo pasa por la formación de agregados de células mesenquimales previamente al inicio de su inducción al diferenciamiento en osteoblastos. El factor de transcripción RUNX2 se ha determinado por varios estudios ser importante para el comisionamiento de las MSCs en osteoblastos. RUNX2 fosforilado por la vía de ERK1/2 junto con otros cofactores se une a la secuencia OSE presente en los promotores de genes expresados en la

diferenciación osteoblastica como la alcalina fosfatasa el colágeno tipoI, la osteopontina, osteocalcina y la sialoproteina.

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

Las ahMSC fueron aisladas a partir de aspirados de medula ósea de pacientes intervenidos de hernia discal. Las células fueron expandidas en plástico hasta el pase 2 antes de empezar el experimento. Las ahMSCs fueron entonces sembradas sobre la superficie de los materiales o sobre plástico y los materiales introducidos en los pocillos conteniendo las células. El periodo de estudio fue de 4 semanas, y a partir de la tercera semana las muestras fueron divididas en dos grupos y todos los materiales y los controles cultivados en paralelo en presencia de medio de crecimiento normal e medio osteogenico. Los resultados de los análisis de ICP demostraron que los tres materiales intercambian con el medio de cultivo iones Calcio, Fosfato y Silicio, de manera diferente para cada material. Los resultados de la microscopia electronica combinados con los microanálisis EDS (Energydispersive X-ray spectroscopy) confirmaron la formación de nódulos de Ca-P sobre la superficie de todos los materiales, nucleación de la capa de hydroxyapatita. Estas formaciones son muy importantes para las ahMSCs, porque le permiten adherir mejor, proliferar y migrar encima de ellos.

El estudio de proliferación con MTT demostró que los materiales solo débilmente afectaron la proliferación celular durante las primeras 24 horas; pero no hay indicios de toxicidad por parte de los materiales. El estudio de apoptosis por Annexina V-Fosfatidil Serina confirmó que la apoptosis en las muestras incubadas con los materiales era comparable en cada momento con las muestras control. El material EC2 demostró estimular la proliferación de ahMSCs a partir de la segunda semana, superando la muestra control, y aumentando mucho mas en presencia del medio osteogenico, probablemente debido al elevado contenido de fosfatos introducido por este medio. Las imágenes de SEM confirmaron en parte que el material EC2 estimuló mas eficazmente la proliferación de las ahMSCs, pero demostraron que también los otros dos materiales permiten el crecimiento normal de las células. La osteoinductividad de los tres materiales fue comprobada evaluando la expresión de marcadores osteoblasticos por las ahMSCs con el pasar del tiempo. Los resultados de

la PCR cuantitativa mostraron el aumento de la expresión del gen RUNX2 a partir de la segunda semana en las células cultivadas sobre los materiales EC1 y EC2; el medio osteogenico aumentó ulteriormente su expresión en estas muestras, confirmando la hipótesis que este marcador es importante para dirigir las células hacia la diferenciación osteoblástica. Siempre según los resultados obtenidos por qPCR, se observó la inhibición de la expresión del gen que codifica por la fosfatasa alcalina para estos materiales, siendo la fosfatasa un clásico marcador de las células osteoblásticas. La fosfatasa aumenta a los 28 días de estudio cuando las ahMSCs fueron incubadas en EC2 en presencia de medio osteogenico. Fueron estudiadas también la formación y la maduración de la matriz extracelular. El colágeno de tipo I y la osteonectina son marcadores precoces de la diferenciación hacia osteoblastos; sin embargo no hubo cambios significativos en la expresión de su mRNA en presencia de los materiales, sugiriendo una regulación de estas proteínas postraducional. Esta hipótesis sería confirmada por las imágenes de inmunofluorescencia del Colágeno I. De hecho por inmunofluorescencia el colágeno I se detectó a partir de los primeros momentos en cultivo y en las muestras control, aunque se detectó un mayor número de grupos celulares que expresaban ColII en las muestras de EC1 y EC2. Este dato podría estar relacionado con la mayor liberación de Si registrada por estos materiales, sabiendo que el Si interviene en las modificaciones post-traduccionales de las cadenas alfa del colágeno. A partir de la tercera y cuarta semana, EC1 y EC2 se demostró que eran capaces de estimular la expresión de genes codificantes por proteínas de la matriz extracelular como osteopontina, osteocalcina, bone sialoprotein, que regulan también la mineralización. Los datos de q-PCR mostraron que las células sembradas sobre el material EC2 expresaban los mayores niveles de estas proteínas a los 21 días con medio osteogenico; las células cultivadas sobre EC1 mostraron en cambio la mayor expresión a las 4 semanas. Los datos de q-PCR además fueron confirmados por las inmunofluorescencias, demostrando maduración de la matriz extracelular durante las últimas dos semanas de experimento con medio osteogenico. Las imágenes de SEM confirmaron la síntesis de matriz extracelular: en los espacios intercelulares se pudo fotografiar material fibrilar que aumenta en los dichos periodos. Las tinciones de alizarin red para el estudio de la mineralización mostraron datos significativos solo

para las muestras incubadas in medio osteogenico. Solo el material EC2 parece estimular la mineralización también en presencia de medio de cultivo basal. El análisis de los marcadores mesenquimales demostró la disminución con el paso del tiempo de la expresión del CD105 para las muestras sembradas sobre los materiales EC1 y EC2, significativa respecto al control, sugiriendo perdida de la staminalidad. En conjunto los resultados enseñan que los materiales EC1 y EC2, y el EC2 en particular manera, son los dos materiales que mejor activan la diferenciación osteogenica; aunque el EC2 obtiene esto en menor tiempo.

El material EC2, sobre todo en presencia de medio osteogenico, demostró estimular la proliferación de las ahMSCs y tener un efecto positivo sobre la formación y maduración de la matriz extracelular, induciendo la síntesis de proteínas que dirigen la nucleación de los cristales de apatita. La formación de una capa de hydroxyapatita en la superficie del material es importante porque reproduce las características del hueso. Esta superficie estimula la adhesión, proliferación y diferenciamiento de las ahMSCs, y durante este proceso la producción de matriz extracelular. Por eso definimos la cerámica EC2 como la que tiene mejores características osteoinductoras y lo proponemos para ulteriores estudios previos al utilizzo como implante en bioingeniería del tejido óseo.