

Respuesta de Células Endoteliales y Pre-osteoblastos a Implantes de Titanio Diseñados para Ingeniería Tisular Ósea

Pre-osteoblasts and Endothelial Cells Response to Titanium Implants designed for Bone Tissue Engineering

Daniel Fernández Villa

Tutoras:

María Teresa Portoles y María José Feito

Universidad Complutense de Madrid

Resumen

La osteoporosis es considerada uno de los grandes problemas de la salud pública actual debido a su elevada incidencia por el envejecimiento de la población y a su estrecha relación con las fracturas óseas. A la hora de reparar o regenerar hueso, dos procesos son de vital importancia: la deposición de la matriz ósea para la generación del hueso nuevo y la angiogénesis para la formación de vasos sanguíneos que permitan la llegada de oxígeno y nutrientes. El objetivo del presente trabajo es estudiar la respuesta de células osteogénicas (pre-osteoblastos) y angiogénicas (derivadas de progenitoras de endotelio) a implantes de titanio diseñados para Ingeniería Tisular ósea, analizando la importancia del recubrimiento del material con hidroxiapatita sustituida con silicio nanocristalina y de la inmovilización del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) sobre su superficie. Los resultados obtenidos demuestran la relevancia del recubrimiento con hidroxiapatita para mejorar la inmovilización del factor y la proliferación de las células con capacidad osteogénica, así como la importancia del VEGF inmovilizado para mejorar la proliferación de células endoteliales derivadas de progenitoras de endotelio y pre-osteoblastos, con lo que se puede concluir que estos implantes de titanio evaluados *in vitro* son unos prometedores biomateriales para regeneración ósea.

Palabras clave: titanio, hidroxiapatita, angiogénesis.

Abstract

Nowadays, osteoporosis is one of the greatest problems of human health, due to its high incidence because of the population's ageing and its close relationship with bone fractures. In order to repair or regenerate bones, two processes must be taken in consideration: bone matrix deposition for new bone generation and angiogenesis to form blood vessels which allow oxygen and nutrients arrival. The objective of this study is to analyze osteogenic (pre-osteoblasts) and angiogenic (endothelium progenitors) response to titanium implants designed for bone Tissue Engineering, evaluating the importance of both the material coating with nanocrystalline silicon-substituted hydroxyapatite and the VEGF immobilization on the implant surface. Results demonstrate the relevance of hydroxyapatite coating to improve VEGF immobilization and osteogenic cell proliferation as well as the relevance of the growth factor immobilization to improve both osteogenic and angiogenic cell proliferation. To sum up, it can be concluded that these *in vitro*-tested titanium implants are promising biomaterials for bone regeneration.

Keywords: titanium, hydroxyapatite, angiogenesis.

Introducción

El aumento en la esperanza de vida de la población que ha tenido lugar desde el siglo pasado ha propiciado que algunas enfermedades, como el cáncer o la osteoporosis, hayan ido ganando una mayor prevalencia, estimándose la de esta última en torno al 30% en mujeres de raza blanca mayores de 50 años, si bien puede llegar al 80% al aumentar las edades (Muñoz-Torres, Varsavsky y Avilés Pérez, 2010).

En la osteoporosis es el tejido óseo el principal afectado, un tejido complejo formado por una abundante matriz compuesta en un 25% por agua, otro 25% por proteínas fibrosas, como colágeno, y el 50% restante lo compone la fase mineral caracterizada por la abundante presencia de cristales de fosfato cálcico y de numerosos iones como fluoruro, carbonato o silicio (Garzón Alvarado, 2004). Es un tejido muy dinámico, sometido a un proceso de formación y destrucción constante (remodelado óseo) llevado a cabo por las células propias de este tejido: los osteoblastos (formación) y los osteoclastos (resorción). Además, está vascularizado, característica esencial para permitir la difusión de los nutrientes y del oxígeno a todas las partes del tejido.

Gracias al desarrollo de la Ingeniería Tisular y la Ciencia de Materiales, se han ido diseñando biomateriales que intentan mimetizar las propiedades del hueso para su reparación y regeneración. La hidroxiapatita, cuyo monómero tiene la siguiente composición: $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, es de gran interés por su parecido a la fase mineral del hueso. Sin embargo, su tasa de resorción *in vivo* es demasiado baja para permitir la formación ósea a un nivel adecuado. Por ello, como se había demostrado el efecto positivo del silicio en la mineralización ósea (Carlisle, 1970), se diseñó un nuevo biomaterial compuesto por hidroxiapatita sustituida con silicio nanocristalina (Botelho, 2005). Por otra parte, para la correcta reparación ósea es necesario el proceso de angiogénesis, inducido por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), entre otros factores, que inducen la formación de nuevos vasos sanguíneos.

El objetivo del presente trabajo ha sido realizar un estudio comparativo de la respuesta de células osteogénicas y angiogénicas a diferentes discos de titanio, diseñados para Ingeniería Tisular ósea debido a su ligereza y resistencia: i y ii) discos de titanio sin recubrimiento con y sin VEGF inmovilizado; y iii y iv) discos de titanio recubiertos con hidroxiapatita sustituida con silicio al 0.4% nanocristalina con y sin VEGF inmovilizado.

Materiales y métodos

Biomateriales

Los implantes de titanio fueron sintetizados y caracterizados en el Instituto Tecnológico de las Islas Canarias (Las Palmas de Gran Canaria) y recubiertos por el equipo de

la Profesora María Vallet-Regí (Universidad Complutense de Madrid). Para la inmovilización del VEGF se añadió sobre los discos una concentración 2.5mg/0.5mL del factor y su unión se evaluó indirectamente detectando en el medio a distintos tiempos el factor libre mediante un ensayo de inmunoenzima (ELISA).

Aislamiento, cultivo y caracterización celular

En los estudios se utilizaron, como células osteogénicas, pre-osteoblastos de la línea celular MC3T3-E1 (ATCC) y, como células angiogénicas, células derivadas de progenitoras de endotelio (EPCs) en estado de diferenciación tardía (ECs) obtenidas de sangre periférica porcina. El aislamiento y diferenciación de estas últimas se llevó a cabo según el protocolo (Serrano, Pagani, Ameer, Vallet-Regí y Portolés, 2008) y se observaron mediante microscopía confocal con 2 sondas específicas para visualizar el núcleo celular y los filamentos de actina (DAPI y faloidina/rodamina) y 1 marcador específico de células endoteliales (anticuerpo anti-CD31).

Interacciones célula – biomaterial

Por cada tipo de disco a analizar se llevaron a cabo cultivos puros por duplicado en los que se sembraron 300.000 ECs (en Endothelial Growth Medium-2) y 600.000 MC3T3 (en Dulbecco's Modified Eagle's Medium con ascórbico y glicerol-fosfato). La proliferación de cada tipo celular sobre los discos se evaluó mediante medida de la actividad mitocondrial (WST-8) y las muestras se visualizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

Resultados y discusión

Biomateriales

Los resultados obtenidos mediante ELISA confirman que la inmovilización del factor es prácticamente instantánea, si bien es cierto que a tiempos cortos el recubrimiento con hidroxiapatita promueve esta unión sobre los implantes (Figura 1).

Aislamiento, cultivo y caracterización celular

Los resultados de la caracterización de las ECs tardías concluyeron que el día 29 de cultivo tras el aislamiento las células endoteliales ya presentan las características morfológicas típicas de este tipo celular y marcadores específicos como el CD31, una molécula de adhesión celular entre células endoteliales y plaquetas (PECAM-1); con lo que se pueden considerar células endoteliales totalmente diferenciadas (Figura 2).

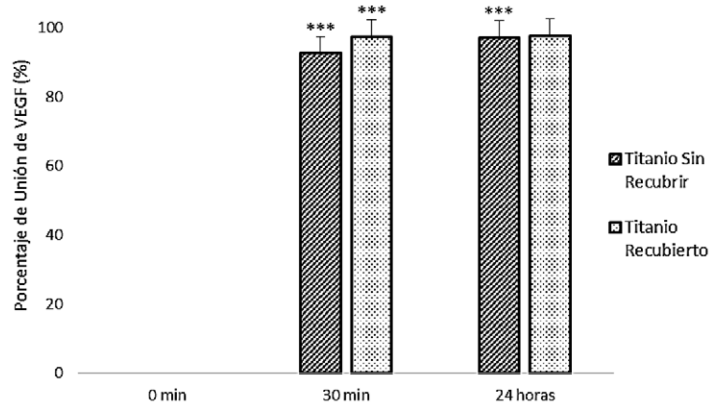


Figura 1. Evaluación de la unión del VEGF sobre los discos de titanio. Los datos se expresan como la media ± el error estándar de la media de las mediciones llevadas a cabo por triplicado. Significación estadística de ANOVA: ***p<0.005.

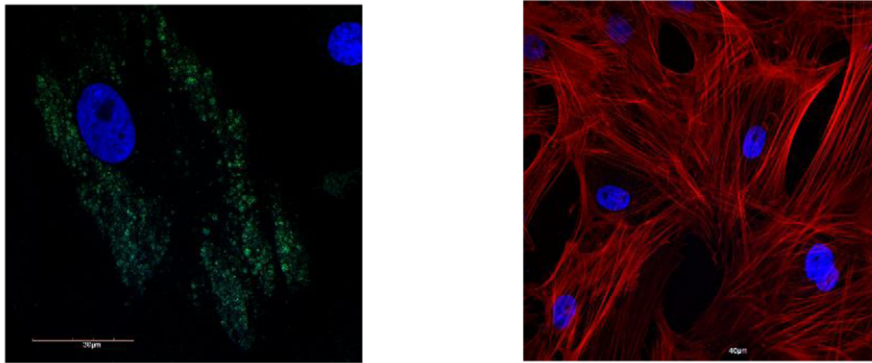


Figura 2. Imágenes de microscopía confocal de células endoteliales. En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI; en verde, PECAM-1 teñido con anticuerpo anti-CD31 y en rojo, los filamentos de actina del citoesqueleto teñidos con faloidina/rodamina.

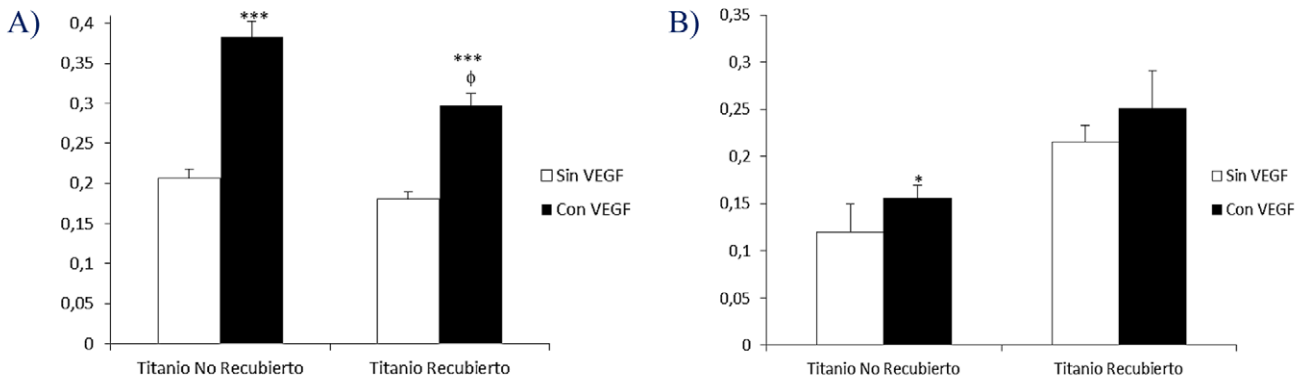


Figura 3. Resultados de proliferación mediante WST-8 de A) ECs y B) MC3T3. Los datos se expresan como la media ± el error estándar de la media de las mediciones llevadas a cabo por triplicado. Significación estadística de ANOVA: ***p<0.005.

Interacciones célula – biomaterial

Los resultados indican que el crecimiento óptimo en las condiciones ensayadas para las ECs se consigue sin recubrimiento, pero con el VEGF inmovilizado, seguido de las condiciones en las que hay recubrimiento y factor (Figura

3A). Esto indica el importante papel de la unión del VEGF sobre el implante para potenciar el crecimiento de este tipo celular. Por otro lado, como estas células tienden a tapizar superficies no es de extrañar que al alterar la superficie de los implantes se vea disminuida su proliferación.

Con respecto a las MC3T3, se observa que las dos

mejores condiciones de proliferación son aquellas en las cuales está presente el recubrimiento (Figura 3B). Ello indica que dicho tratamiento, si bien disminuye escasamente la proliferación de las ECs, potencia en gran medida a las células osteoblásticas, alcanzando ambas unos niveles de proliferación similares bajo esta condición (Figura 3).

Conclusiones

Teniendo en cuenta todos los resultados anteriores se puede concluir que los discos de titanio recubiertos con hidroxiapatita sustituida con silicio nanocristalina y con VEGF inmovilizado son prometedores biomateriales para la regeneración ósea puesto que, además de mejorar la unión del VEGF, aumentan la proliferación de las células angiogénicas.

Referencias

- Botelho, C. M. d. C. F. (2005). Silicon-substituted hydroxyapatite for biomedical applications (Tesis doctoral, Universidade do Porto, Portugal). Recupera de <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/12970/2/Texto%20integral.pdf>
- Carlisle, E. M. (1970). Silicon: A possible factor in bone calcification. *Science*, *167*(3916), 279-280. <https://doi.org/10.1126/science.167.3916.279>
- Garzón Alvarado, D. A. (2004). *Análisis por elementos finitos del proceso de regeneración ósea*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Muñoz-Torres, M., Varsavsky, M., & Avilés Pérez, M. D. (2010). Osteoporosis. Definición. *Epidemiología. Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, *2*(3), S5-S7. <https://www.revistadeosteoporosisy-metabolismomineral.com/pdf/articulos/92010020300050007.pdf>
- Serrano, M. C., Pagani, R., Ameer, G. A., Vallet-Regí, M., & Portolés, M. T. (2008). Endothelial cells derived from circulating progenitors as an effective source to functional endothelialization of NaOH-treated poly(ϵ -caprolactone) films. *Journal of Biomedical Materials Research Part, 87A*, 964-971. <http://doi.org/10.1002/jbm.a.31728>