

Capítulo 7

Citocompatibilidad del compuesto biodegradable PLA50

7.1. INTRODUCCIÓN

En los capítulos 5 y 6 se ha hecho una amplia caracterización del material compuesto PLA50 en cuanto a sus propiedades físico-químicas. En este capítulo se estudiarán algunos indicadores de la respuesta celular del mismo, lo cual es indispensable en el análisis integral de un biomaterial. Aunque la biocompatibilidad del PLA ya ha sido estudiada por algunos autores (1;2), es de esperar que la incorporación del vidrio G5 en la matriz polimérica modifique su comportamiento biológico.

Como ya se dijo en el capítulo 4, los estudios *in vitro* son ideales para la observación y el análisis de una determinada línea celular bajo condiciones específicas ya que los cultivos celulares no cuentan con el gran número de variables presentes en un estudio *in vivo*.

Debido a que los materiales desarrollados en la presente Tesis Doctoral tienen como finalidad ser utilizados en aplicaciones de reparación y regeneración ósea, lo más indicado es utilizar células óseas para analizar la respuesta celular de estos materiales. Específicamente osteoblastos, ya que son las células encargadas de la formación del nuevo tejido óseo.

En el capítulo 4 se realizaron estudios de citotoxicidad utilizando fibroblastos de piel humana. En este capítulo, una línea celular representada por células osteoblásticas humanas, conocida como MG63, procedente de osteosarcoma humano, será utilizada para el estudio de la respuesta biológica *in vitro* del material compuesto. El uso de las MG63 representa un mayor acercamiento a las condiciones que simulan el entorno fisiológico donde se implantarán los materiales estudiados.

El análisis de la respuesta celular del material compuesto se llevará a cabo mediante ensayos de adhesión, proliferación y diferenciación. La adhesión celular es un proceso muy importante que se lleva a cabo a través de las proteínas adsorbidas en la superficie del material y las proteínas de la membrana celular conocidas como integrinas (3). La interacción entre las integrinas y las proteínas extracelulares adsorbidas en el sustrato condicionan en gran parte los procesos de proliferación y diferenciación celular. Los estudios de proliferación proveen información respecto al comportamiento celular en relación a un material control, es decir, el hecho de que las células sobre el material proliferen más o menos que en el control, indica que el material afecta de alguna manera el comportamiento celular. Los ensayos de diferenciación por su parte, permiten evaluar la funcionalidad de un tipo celular particular mediante marcadores específicos para cada tipo de célula.

Existen una serie de enzimas y proteínas característicos del proceso de formación ósea, que han sido identificadas como marcadores de la diferenciación osteoblástica. En la Tabla 7.1 se encuentran algunos de estos marcadores (4).

Tabla 7.1

Algunos de los marcadores bioquímicos de la formación ósea (4).

Marcador	Tejido de origen	Función
Fosfatasa Alcalina	Hueso	Mineralización de la matriz extracelular
Osteocalcina	Hueso, plaquetas	Interacciona con la hidroxiapatita. Regeneración ósea
Terminal carboxi del procolágeno tipo I	Hueso, piel, tejidos blandos	Producto de la proliferación osteoblástica y fibroblástica
Terminal amino del procolágeno tipo I	Hueso, piel, tejidos blandos	Producto de la proliferación de osteoblastos y fibroblastos; incorporada en la matriz extracelular ósea

La fosfatasa alcalina (FA) es un enzima, que se encuentra generalmente adherido en la superficie extracelular de la membrana celular mediante un anclaje a través del terminal carboxilo del fosfatidilinositol-glicano (5). Existen en forma general dos tipos de fosfatasa alcalina codificadas por 4 genes diferentes. El primer tipo está constituido

por la fosfatasa tejido-dependiente, expresada en el intestino y placenta madura (6;7) y la fosfatasa no dependiente del tejido (*tissue non-specific*) la cual es expresada en numerosos tejidos, incluyendo principalmente el hueso, hígado y riñones (8). La fosfatasa alcalina es un indicador precoz de la diferenciación osteoblástica y juega un papel importante en la mineralización de la matriz extracelular (9). La función de la fosfatasa alcalina es hidrolizar el fósforo orgánico y liberar fósforo inorgánico para la formación de la hidroxiapatita del hueso. Este enzima es indispensable para la formación del hueso, y su secreción o actividad indica la formación de hueso o el inicio de la etapa de diferenciación (10).

La osteocalcina por su parte, es una proteína de bajo peso molecular, también conocida como la proteína Gla del hueso, ya que contiene 3 residuos de ácido gamma-carboxiglutámico (Gla), requeridos para la unión con el Ca^{2+} , y es una de las proteínas de la matriz ósea más estudiadas. Su expresión está altamente restringida al tejido óseo, específicamente a las regiones destinadas a la mineralización (11). No sólo es sintetizada por los osteoblastos maduros, sino también por los odontoblastos y condrocitos hipertróficos (4) y participa en los procesos de regeneración del hueso. Es una proteína altamente conservada entre las especies vertebradas. Se piensa que interacciona directamente con la hidroxiapatita ósea a través del residuo Gla (12). Es un marcador tardío de la diferenciación y adquiere sus máximos niveles de expresión durante el período de mineralización (13).

Existen algunos compuestos que estimulan la diferenciación celular, entre ellos se encuentran el ácido ascórbico y la dexametasona.

El ácido ascórbico o vitamina C induce la síntesis de colágeno tipo I en varios tipos de tejido conectivo, incluyendo los osteoblastos y los condrocitos. Este ácido estimula la acumulación de matriz extracelular de colágeno, principalmente mediante la estimulación de la secreción y procesado de los componentes del procolágeno tipo I, la estabilización del RNA mensajero y el aumento ligero de la síntesis de procolágeno y la expresión génica (14-16). Aunque la capacidad del ácido ascórbico de inducir la diferenciación osteoblástica en varios tipos de células osteogénicas está bien establecido (15;17-19), algunas células osteoprogenitoras requieren la presencia de otro agente osteoinductivo, como la dexametasona, para incrementar la expresión de fosfatasa alcalina y la formación de los nódulos de mineralización.

La dexametasona es un glucocorticoide sintético que induce la diferenciación osteoblástica de las células estromales de la médula ósea (20-24). Diferentes estudios evidencian que la presencia de dexametasona inhibe la proliferación celular, dirigiendo las células hacia el estado de diferenciación o maduración (24;25).

Existen numerosos parámetros que influyen en la interacción célula-material. En especial la composición química de los materiales tiene un gran peso en la respuesta

celular ya que afecta tanto las características superficiales del material como su comportamiento durante la degradación. Algunos de estos parámetros que influyen en la respuesta biológica son la naturaleza de la carga superficial, la mojabilidad, la química superficial y en el caso de materiales biodegradables, los productos de degradación.

En este sentido, debido a la solubilidad tanto del vidrio G5 como del PLA, además de llevar a cabo estudios de contacto directo para evaluar el efecto de las características superficiales del material, se realizaron ensayos con los extractos del PLA y del PLA50 con la finalidad de evaluar específicamente el efecto de los productos de degradación de dichos materiales.

Objetivo

El objetivo principal de este capítulo es la evaluación de la respuesta celular elicitada por el material compuesto PLA50, tomando como material de referencia el PLA para así poder determinar el efecto de la incorporación de las partículas de vidrio en el material compuesto, así como correlacionar la respuesta biológica de los diferentes materiales con algunas propiedades superficiales y degradativas de los mismos.

7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1. Materiales

En este capítulo se han utilizado el ácido poliláctico (PLA), el PLA50 y el G5 descritos en los capítulos 2 y 5. Para los cultivos celulares se utilizaron discos de 10 mm de diámetro de PLA, PLA50 y G5, mientras que para las mediciones de ángulo de contacto se usaron muestras de 2x2x0,1cm. En ambos casos, es decir, tanto en el caso de los cultivos como en el caso de los ángulos de contacto, la superficie de las muestras fue pulida hasta 0.5 μm .

7.2.2. Métodos

7.2.2.1. Preparación de los extractos

Para la preparación de los extractos de PLA y PLA50, se colocaron pequeñas barras de los materiales previamente esterilizadas con óxido de etileno en envases de polietileno con el medio de cultivo completo siguiendo la relación recomendada por la norma ISO 100993-5 (26), de 3 ml/cm². El medio con los materiales fue incubado a 37° y agitado

ocasionalmente. Después de 24, 48 y 72 horas de incubación, se recuperó el fluido y se congeló a -20°C hasta el momento de su utilización. El fluido fue utilizado sin ser tamponado, diluido o filtrado como en el caso de los extractos preparados en el capítulo 4, apartado 4.2.2.1.

7.2.2.2. Cultivo Celular

Para realizar los diferentes ensayos se utilizaron células provenientes de la línea celular MG63, que está formada por células de osteosarcoma humano de tipo osteoblástico, las cuales son ampliamente utilizadas en los estudios biológicos. Para el cultivo, inicialmente se colocaron las células en placas de cultivo junto con 15 ml de medio de cultivo (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) sin rojo fenol, el cual fue suplementado previamente con 10% de suero bovino fetal (FCS, Gibco), 1% penicilina/estreptomicina y 1% de piruvato y 1% de L-glutamina, todos de Sigma. Las células se mantuvieron a 37°C en un incubador bajo una atmósfera con 5% CO_2 . El medio de cultivo fue cambiado cada dos días.

Para el traspaso de las células del frasco de cultivo a la superficie de los materiales se llevó a cabo el procedimiento descrito en la sección 4.2.2.2 del capítulo 4.

7.2.2.3. Ensayos de adhesión y proliferación

Tanto la adhesión como la proliferación de las células sobre los diferentes materiales se llevó a cabo mediante el ensayo MTT (Roche). El MTT, al igual que el WST mencionado en el capítulo 4, es una sal de tetrazolio (3-(4,5 dimetilthiazol-2-il)-2,5-dipeniltetrazolio bromida) la cual reacciona con el sistema mitocondrial de las células viables dando como resultado cristales de formazán. El formazán es un compuesto de coloración violeta cuya absorbancia puede ser leída a través de un espectrofotómetro. Los valores de absorbancia obtenidos a partir de este método son directamente proporcionales a la cantidad de células viables.

Se realizaron estudios de adhesión a 24 horas y de proliferación a 3, 6, 9 y 14 días. Se tomó un período de 14 días, ya que se consideró que era un período de tiempo suficientemente largo para que las células llegaran a confluencia y comenzaran la etapa de diferenciación.

Para los estudios de adhesión y proliferación, se colocó una concentración de 1.10^4 células/ pozo sobre la superficie de los discos de PLA, PLA50 y G5, en una placa de 48 pozos junto con 300 μl de medio. Los pozos de la placa de poliestireno fueron usados como control.

Después de 24 h, en el caso del estudio de adhesión y de 3, 6, 9 y 14 días de cultivo para la proliferación, las células fueron lavadas con PBS (*Phosphate Buffered Solution*, Sigma)

y se añadieron a cada pozo 30 μ l de la solución de MTT. Una vez añadida la solución de MTT, se incubó nuevamente la placa durante 4 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, se añadieron 300 μ l de solubilizante (10% SDS en 0.01 M HCL) para deshacer los cristales color violeta de formazán formados. La placa con las células, el MTT y el solubilizante, se incubaron durante toda la noche a 37°C, y al día siguiente se procedió a realizar las mediciones de absorbancia con el espectrofotómetro Power-Wave X de la casa Bio-Tek, a una longitud de onda de 570 nm, usando una longitud de referencia de 750 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado.

7.2.2.4. Diferenciación celular

Para el ensayo de diferenciación celular se utilizó una concentración de células igual que la utilizada para los ensayos de adhesión y proliferación, es decir, 1.10^4 células/pozo.

En este estudio, se midieron los valores de fosfatasa alcalina y de osteocalcina, ya que ambos son dos de los principales marcadores de la diferenciación osteoblástica (27).

El protocolo experimental seguido se describe a continuación:

Después de 9 días de cultivo, el medio fue suplementado con ácido ascórbico 50mM (Sigma) y con dexametasona 10^{-8} M (Sigma), ya que diferentes autores han reportado que ambos compuestos estimulan la diferenciación de este tipo de células (24).

Se colocaron 3 μ l de dexametasona y de ácido ascórbico respectivamente diariamente durante 48 horas. Después de suplementar al medio durante las 48 horas, se extrajo el sobrenadante de cada pozo con la ayuda de pipetas *Pasteur* y se congelaron a -80 °C en tubos *ependorf*. Los discos de los diferentes materiales así como el fondo de los pozos usados como control, fueron lavados dos veces con PBS y seguidamente se añadieron 200 μ l de un detergente llamado M-PER® (Pierce, USA), el cual extrae las proteínas citoplasmáticas y nucleares de mamíferos. Este detergente fue utilizado para estimular la lisis o ruptura celular. El lisado celular de cada pozo fue colocado también en tubos *ependorf* y congelados a -80 °C hasta el momento del ensayo.

El lisado celular recuperado de los diferentes materiales fue descongelado y utilizado para la determinación de la proteína total y de la actividad de la fosfatasa alcalina presente en las células, ya que como hemos visto la FA se encuentra alojada en la membrana celular.

La determinación de la proteína total es necesaria, ya que provee información con respecto a la cantidad de células presentes. Tanto los valores de fosfatasa alcalina como los de osteocalcina se normalizaron respecto al valor de proteína total presente.

Proteína Total

Para la cuantificación de la proteína total, se utilizó el ensayo llamado BCA (Pierce), el cual está basado en ácido bicinconicínico (BCA). Esta técnica combina la reducción de los iones Cu^{2+} a Cu^{1+} por parte de las proteínas cuando están en un medio alcalino (que se conoce como la reacción Biuret), junto con la elevada sensibilidad y selectividad que tienen estos iones (Cu^{1+}) de ser detectados usando un reactivo con ácido bicinconicínico. La reacción de dos moléculas de BCA con un Cu^{1+} genera un producto de color violeta cuya absorbancia puede ser leída a una longitud de onda de 562 nm.

En una placa de 96 pocillos, se añadieron 25 μl de cada muestra y de cada estándar por triplicado junto con 200 μl de la solución de trabajo que es preparada siguiendo una relación 50:1 (reactivo A: reactivo B). El reactivo A es una solución que contiene carbonato de sodio, ácido bicinconicínico y tartrato de sodio en hidróxido de sodio 0.1M, el reactivo B contiene sulfato cúprico al 4%. La placa fue incubada a 37°C durante 30 min en baño de María y seguidamente se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente. Posteriormente, la placa fue colocada en el espectofotómetro (Power Wave X, Bio-Tek) para realizar la lectura de las absorbancias a 562 nm. Los valores de absorbancia obtenidos para las diferentes muestras fueron contrastados con los valores obtenidos a partir de la curva patrón, la cual se preparó usando BSA (*Bovine Serum Albumin*, Sigma) en concentraciones entre 0-2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ según las instrucciones del fabricante.

Fosfatasa Alcalina

Para la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina (FA), se utilizó una técnica basada en la capacidad de la FA para convertir el sustrato p-nitrofenilfosfato (pNPP) en p-nitrofenol, el cual es un compuesto muy cromógeno y cuya absorbancia puede ser medida a una longitud de onda de 405 nm.

En primer lugar se preparó la solución sustrato (40 mg de p-NPP (Sigma) en 10 ml de agua destilada). Luego se preparó la solución de p-nitrofenol para la elaboración de la recta patrón. Para esto, se tomó la solución inicial de p-nitrofenol 10mM (Sigma) y se diluyó 1:10 en tampón AMP (0,5M 2-amino-2 metil-1 propanol, 2mM MgCl_2). Una vez obtenida la solución diluida, se procedió a la preparación de las diferentes concentraciones para la recta patrón a partir de ésta. Las concentraciones utilizadas fueron: $2 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$, $8 \cdot 10^{-5}$, $1.2 \cdot 10^{-4}$, $1.6 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-4}$ y $2.4 \cdot 10^{-4}$ M. Finalmente en cada pocillo de una placa de 96, se colocaron por triplicado los blancos, recta patrón y las muestras. Para los blancos se colocaron 50 μl de AMP, 50 μl del sustrato y 100 μl de agua destilada. Para la recta patrón se añadieron 50 μl de cada concentración, 50 μl de AMP y 50 μl de agua destilada. En el caso de las muestras, se añadieron 100 μl de muestra, 50 μl del sustrato y 50 μl de AMP. Una vez preparadas las muestras, los blancos y la recta patrón, se procedió a colocar la placa en baño María a 37°C durante 30 min.

Transcurridos los 30 minutos, se paró la reacción con 100 µl de NaOH 3N y se realizó la lectura con el espectrofotómetro. Al igual que en el caso de la proteína total, los resultados de absorbancia obtenidos fueron contrastados con los valores de la curva patrón, la cual tiene concentraciones conocidas y finalmente los resultados fueron expresados en función de la proteína total y del tiempo de incubación (30 min).

Osteocalcina

Para la detección de la osteocalcina se usó el ensayo Metra™ (Quidel, USA). Este es un enzimoimmunoensayo competitivo que utiliza pozos recubiertos con osteocalcina, un anticuerpo anti-osteocalcina, un conjugado enzimático de IgG-fosfatasa alcalina y un sustrato pNPP (p-nitrofenilfosfato) para cuantificar la osteocalcina en el medio. El principio del método es el siguiente: se acoplan los anticuerpos a la osteocalcina adherida al fondo de los pocillos y a la osteocalcina presente en las diferentes muestras. Luego se incorporan los enzimas, los cuales se acoplarán a los anticuerpos que no hayan sido ocupados por la osteocalcina. Seguidamente se añade el sustrato de pNPP, que reacciona con la fosfatasa alcalina del conjugado enzimático y convierte el pNPP en p-nitrofenol. Este último, genera una coloración amarilla cuya absorbancia puede ser leída en un espectrofotómetro. Por lo que la concentración de osteocalcina es inversamente proporcional a los valores de absorbancia obtenidos.

El protocolo experimental fue el siguiente. Se descongelaron los sobrenadantes recolectados de los cultivos después de la estimulación con dexametasona y ácido ascórbico. 25 µl de los estándares, controles y muestras fueron adicionados en cada pocillo de las tiras cubiertas con osteocalcina. Seguidamente, 125 µl de anti-osteocalcina fueron incorporados y la placa fue incubada a temperatura ambiente durante dos horas. Después de este primer período de incubación, los pocillos fueron lavados 3 veces con PBS, y 150 µl de la enzima conjugada fueron incorporados a cada pozo. La placa fue nuevamente incubada durante 1 hora a temperatura ambiente y el procedimiento de lavado con PBS fue repetido. Después del lavado, 150 µl de la solución sustrato fueron añadidos y la placa se incubó una vez más por 35 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 50 µl de la solución de parada (1 N NaOH) y se leyeron los valores de absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm. Finalmente los resultados fueron expresados en función de la proteína total.

7.2.2.5. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Después de 3 días de cultivo, se observaron las células cultivadas en la superficie de los discos de PLA, PLA50 y G5, por medio de microscopía electrónica de barrido. Las muestras biológicas son por lo general tejidos blandos que poseen un alto contenido de agua, y muy sensibles a los cambios de presión generados por la MEB. Debido a esto, la preparación de las muestras en el caso de sistemas biológicos conlleva una serie de

pasos especiales, como la fijación de las células, los lavados, la post fijación, la deshidratación, el punto crítico, el recubrimiento con oro y finalmente la observación. Para la fijación de las células, se utilizó una solución al 2,5% de glutaraldehído en tampón fosfato (PBS) 0,1M, se reemplazó progresivamente el medio de cultivo por el fijador y se dejó actuar durante 3 horas a 4°C. Una vez finalizada la fijación, se lavaron las muestras con PBS 3 veces, durante 10 minutos cada vez, a 4°C y seguidamente se llevó a cabo la post fijación con tetraóxido de Osmio al 1% con ferricianuro potásico en tampón fosfato 0,1M, durante 2h a 4°C. Después de la post fijación se repitió el procedimiento de lavado y se hizo la deshidratación progresiva con diferentes concentraciones de etanol (50, 70, 80, 90, 96 y 100%), a continuación se realizó el secado por punto crítico (CPD, *critical point drying*). EL CPD, es un método utilizado para pasar del estado líquido al gas seco, sin causar efectos nocivos en la muestra debidos principalmente a los efectos de la tensión superficial, por lo que es una técnica adecuada para la deshidratación de especímenes biológicos, los cuales son muy delicados. El secado por punto crítico se llevó a cabo siguiendo condiciones estándar (CO₂, 31.1°C y 1072 psi). Por último, las muestras fueron recubiertas con oro para su observación en el microscopio electrónico de barrido *Jeol JSM-6400*.

7.2.2.6. Análisis estadístico

La significación estadística de las diferencias de los valores medios de los resultados obtenidos para de los diferentes materiales (G5, PLA y PLA/G5) fueron evaluadas mediante el método *One-way-ANOVA* con el software Origin 6.1. Se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

7.3. RESULTADOS

7.3.1. Adhesión y proliferación celular

a) *Ensayos en contacto directo con los materiales*

La Figura 7.1 muestra los valores de absorbancia para la adhesión celular después de 24 horas de cultivo en contacto directo con los materiales a estudiar. Después de 24 horas de contacto, el vidrio G5 presentó valores de absorbancia similares a los obtenidos para el control. El PLA y el compuesto PLA50 presentaron valores significativamente diferentes ($p < 0.05$) a los del control, siendo el polímero el material con la menor absorbancia.

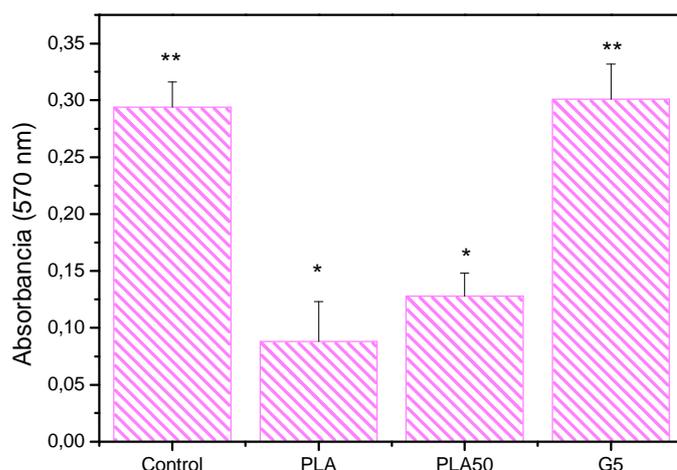


Figura 7.1. Resultados de los ensayos de MTT para la adhesión celular en la superficie de los materiales estudiados después de 24 h de cultivo. Los asteriscos indican los resultados sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), ($n=3$).

Los resultados correspondientes al ensayo de proliferación se encuentran en la Figura 7.2. Los tres materiales mostraron una tendencia creciente hasta llegar a los 6 días de cultivo. Sin embargo, después de este período de tiempo, las células adheridas al vidrio G5 parecieron dejar de proliferar, mientras que las células de los otros materiales continuaron su ciclo de proliferación. Después de 9 días de cultivo, todos los materiales, incluyendo el vidrio G5, mostraron valores de absorbancia similares. A los 9 y 14 días, el compuesto PLA50 alcanzó niveles de absorbancia similares a los del control.

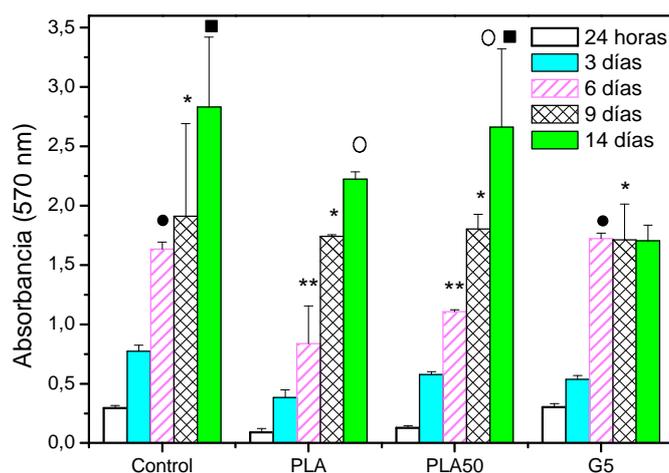


Figura 7.2. Resultados de proliferación después de 24 h, 3, 6, 9 y 14 días de contacto con los diferentes materiales. Los símbolos indican los resultados sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), ($n=3$).

b) Ensayos con los extractos de los materiales

La Figura 7.3, muestra los valores de absorbancia para el cultivo celular realizado con los extractos de los materiales. Después de 24 horas de contacto, el extracto de PLA a 24 horas mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto al resto de los extractos y al control. A su vez, los diferentes extractos, excepto el PLA24h, mostraron niveles de absorbancia similares. Después de 48 horas de contacto entre las células y los extractos, la respuesta fue similar entre los extractos de los diferentes materiales, pero se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, siendo menor la respuesta celular en el caso de los extractos que con el medio control. Este hecho indica que los productos de degradación de los materiales indujeron algún tipo de efecto en el comportamiento celular.

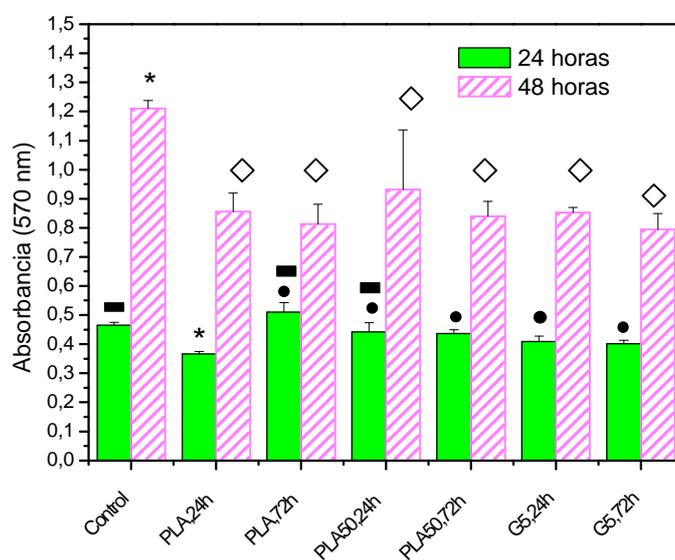


Figura 7.3. Resultados de proliferación después de 24 y 48 horas de contacto con los diferentes extractos. Se evaluaron extractos obtenidos tras 24 y 72 horas de inmersión de los materiales en medio de cultivo. Los asteriscos(*) indican diferencias significativas con respecto al resto de los extractos para un mismo tiempo de cultivo. Los otros símbolos indican los resultados sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), ($n=3$).

7.3.2. Diferenciación celular

La Figura 7.4 muestra los valores obtenidos para la actividad de la fosfatasa alcalina (FA) de los tres materiales después de 11 días de cultivo. Los materiales estudiados presentaron valores de FA mayores que los de la muestra control. Tanto el PLA como el PLA50 presentaron valores estadísticamente similares ($p < 0.05$). El G5 presentó la mayor actividad de FA.

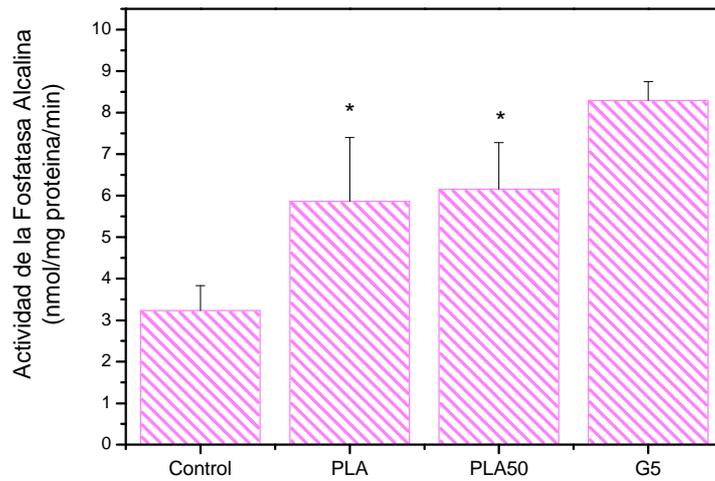


Figura 7.4. Actividad de la fosfatasa alcalina normalizado respecto a la proteína total de las células osteoblásticas después de 11 días de cultivo. Los asteriscos indican los resultados sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), ($n=4$).

En cuanto a la osteocalcina, la Figura 7.5 muestra las concentraciones obtenidas para cada material luego del período de cultivo. Como se puede observar, no se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes materiales y el control, aunque la tendencia fue la misma que la observada en la fosfatasa alcalina.

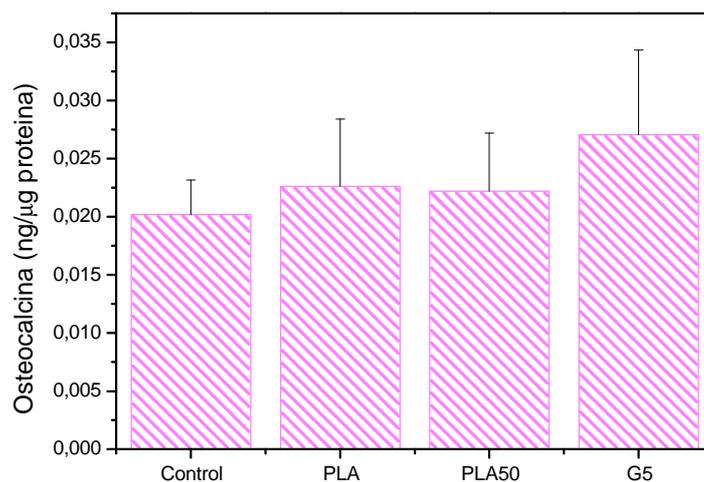


Figura 7.5. Valores de osteocalcina normalizada respecto a la proteína total para las células MG63 después de 11 días de cultivo. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), ($n=4$).

7.3.3. Morfología celular

Las Figuras 7.6-7.9 muestran células MG63, adheridas a los diferentes sustratos (PLA, G5 y PLA50) después de 3 días de cultivo. Se observa una clara diferencia entre las células adheridas sobre el PLA y el G5 (los materiales con superficie homogénea), y las células cultivadas sobre el PLA50.

Las células cultivadas sobre los discos de PLA y G5 mostraron una morfología bastante plana y extendida sobre la superficie del material. De acuerdo a las imágenes de microscopía electrónica, estas células mostraron un citoplasma bastante expandido, con el núcleo muy bien definido. Además, son muy delgadas y están adheridas a la superficie de los materiales a través de extensiones citoplasmáticas en forma de lamelopodios.

Las células cultivadas sobre los discos de PLA50, mostraron una morfología bastante diferente, son más redondeadas, tienen más volumen y no es posible distinguir el núcleo debido a su espesor, también presentaron una serie de extensiones citoplasmáticas como pequeñas protuberancias en la parte dorsal de las células. En el caso del material compuesto, además, las células parecen engancharse a los agujeros creados por las desuniones entre el PLA y el G5. En muchos casos se observa también la fuerte adhesión de las células en la superficie de las partículas de vidrio. A diferencia de las células cultivadas sobre el PLA y el G5, las células cultivadas sobre el PLA50 mostraron numerosos filamentos extracelulares o filopodios y algunos pseudopodios a través de los cuales se adherieron a la superficie del material.

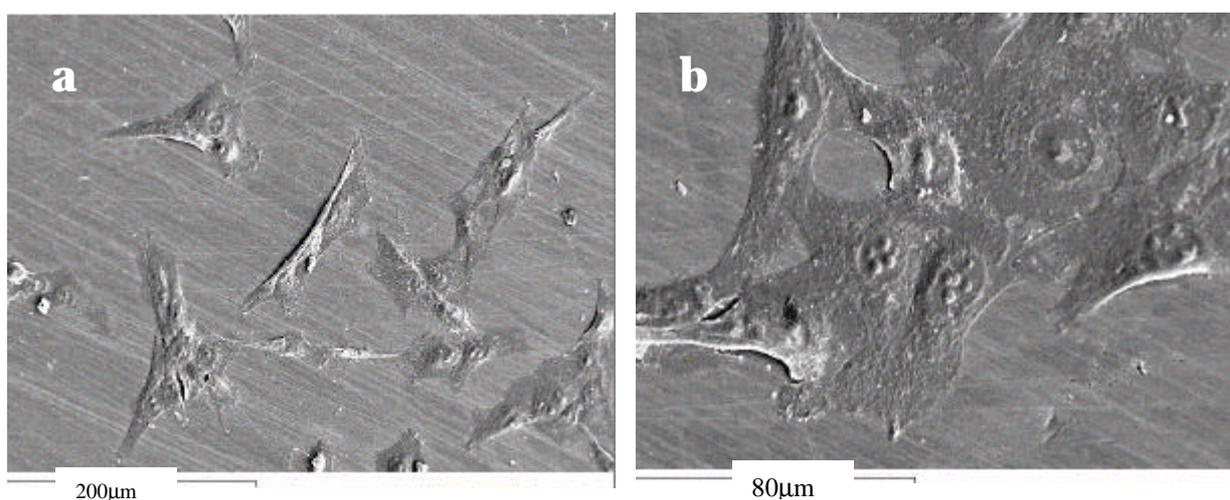


Figura 7. 6. Células MG63 cultivadas sobre discos de PLA después de 3 días de cultivo. (b) se observan los núcleos y nucleolos de las células y un citoplasma bastante plano y extendido.

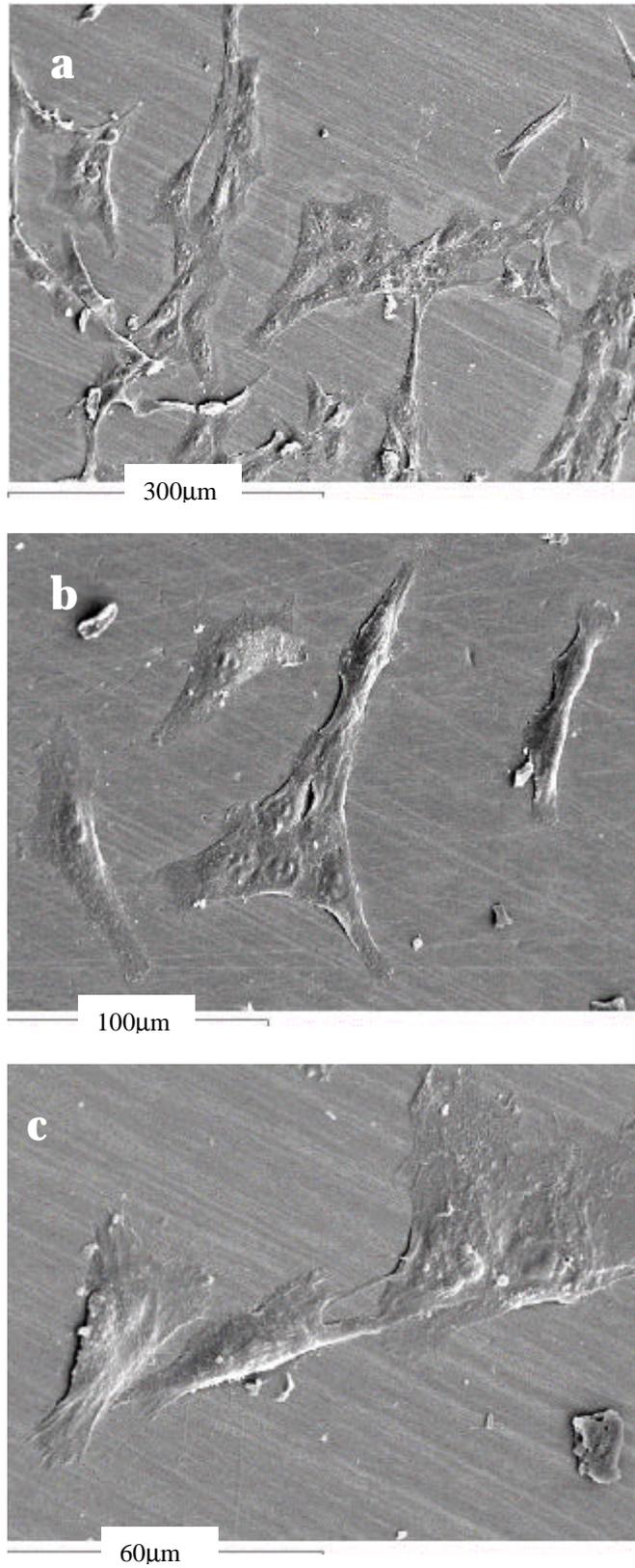


Figura 7. 7. Células MG63, después de 3 días de cultivo sobre discos de G5.

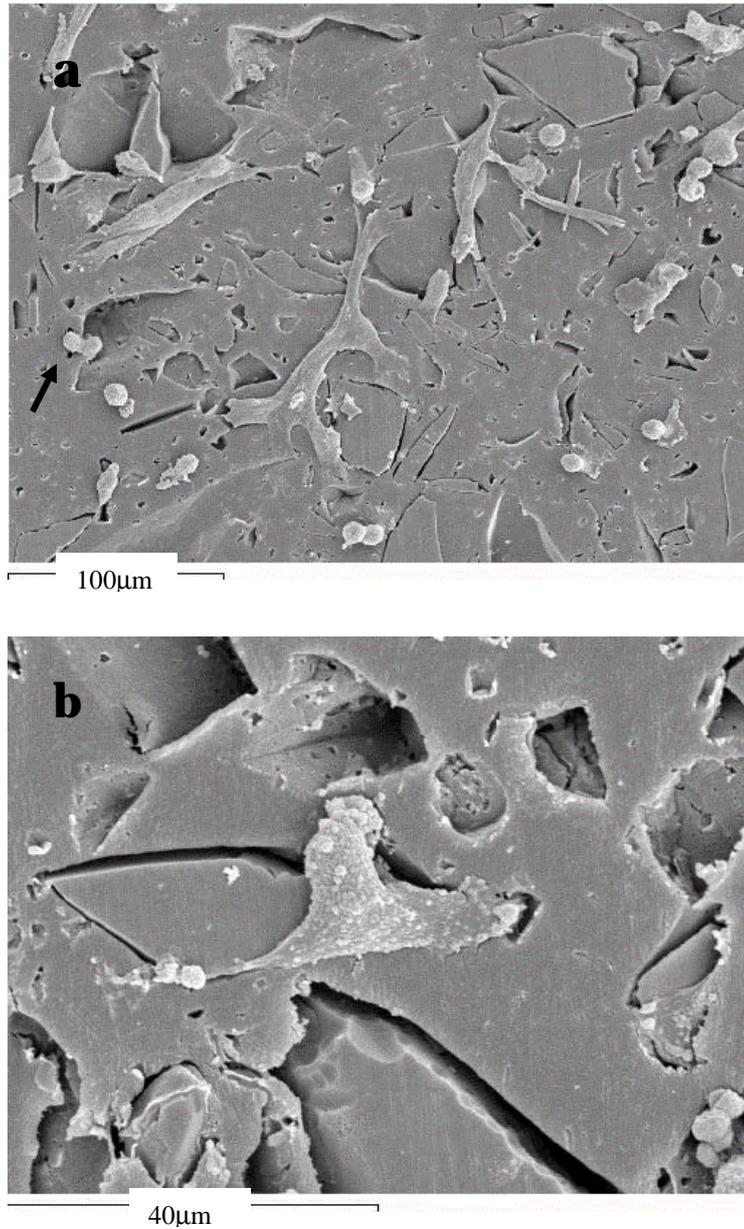


Figura 7. 8. Células MG63, adheridas a las superficie del material compuesto PLA50, después de 3 días de cultivo.(a) Células dispersas por la superficie y células en división (ver flechas), (b) Célula adherida a una partícula de vidrio.

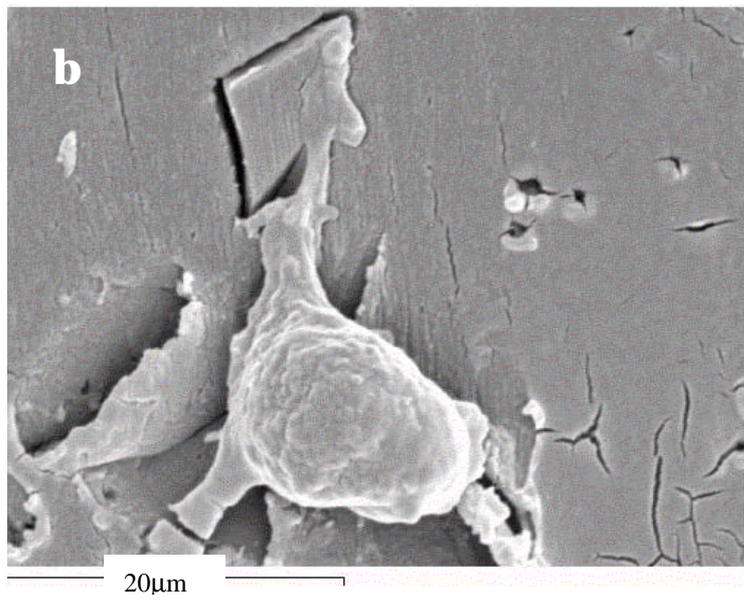
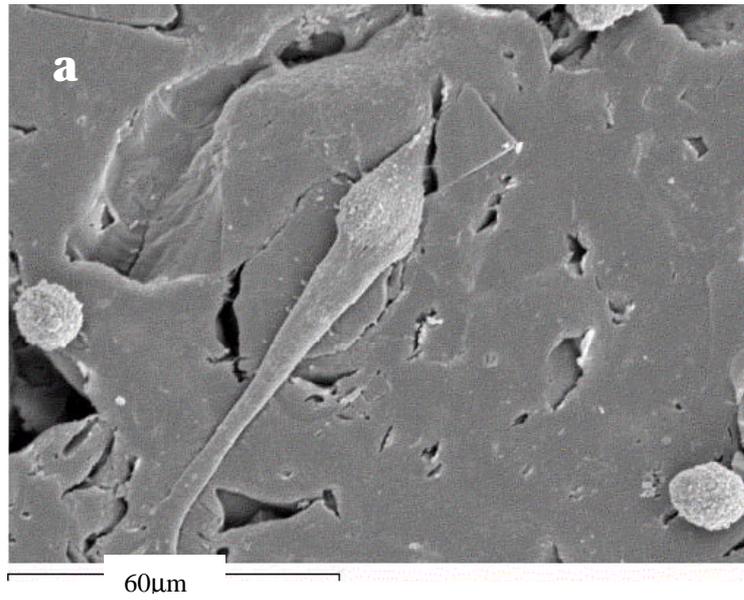


Figura 7. 9. Células MG63 adheridas a la superficie del PLA50, después de 3 días de cultivo. Ambas células se encuentran adheridas a las partículas de vidrio.

7.4. DISCUSIÓN

En este capítulo se han analizado tres materiales biodegradables en función de su respuesta biológica después de diferentes tiempos de cultivo de células osteoblásticas de la línea MG63.

El PLA es un material bioabsorbible y biocompatible actualmente muy utilizado en aplicaciones biomédicas y que ha sido ampliamente estudiado en cuanto a sus propiedades físicas y biológicas (28-30). El G5 por su parte, es un vidrio de fosfato de calcio soluble, que ha sido estudiado en detalle en los anteriores capítulos de la presente Tesis Doctoral en cuanto a sus propiedades fisico-químicas. Sin embargo, en lo concerniente a los cultivos celulares, tan sólo estudios de citotoxicidad a corto plazo han sido llevados a cabo (ver capítulo 4). Por otro lado, el efecto de la combinación del PLA con el G5 en cuanto a la interacción célula-material, no ha sido estudiada hasta ahora.

Existen múltiples factores que afectan la respuesta biológica de un material. La composición química es uno de los factores determinantes en el comportamiento celular ya que determina algunas de las características de la superficie del material y también el proceso de degradación del mismo. Algunas de las características superficiales dependientes de la composición del material son: la naturaleza de la carga superficial (31), la energía superficial (32), la química y estequiometría de los iones superficiales (33). Por otra parte, en los materiales biodegradables tienen especial importancia los productos de degradación, que se liberan a los tejidos circundantes y que pueden afectar el comportamiento celular.

La finalidad de este estudio es analizar la respuesta celular teniendo en cuenta las diferentes variables. No obstante, hay que mencionar que en el caso de los materiales estudiados donde se combinan diferencias de química superficial con diferencias de topografía y de velocidad de degradación, es imposible separar estas variables ya que están mezcladas en los diferentes materiales y por lo tanto existen interacciones entre ellas. Tanto la topografía como la química superficial afectan en la distribución de las cargas superficiales y esto a su vez afecta a la mojabilidad de la superficie del material, y el conjunto de todas estas variables afecta las interacciones célula-material. Por lo que en el caso particular del material compuesto PLA50 es especialmente difícil separar el efecto de las diferentes variables ya que este material combina dos materiales con características diferentes.

Los resultados de adhesión mostrados en la Figura 7.1, mostraron que después de 24 horas de cultivo, la respuesta de las células MG63 fue comparable entre el control y el vidrio G5. El compuesto PLA50 presentó una respuesta intermedia y el PLA, el más hidrofóbico, presentó los menores valores de absorbancia. Según algunos autores, los valores de ángulo de contacto utilizados para evaluar la mojabilidad de una superficie,

son de gran ayuda para predecir las interacciones célula-material en las primeras etapas de contacto (34;35). Por lo tanto, los valores de absorbancia obtenidos después de 24 horas de cultivo, podrían estar relacionados en parte con los resultados de ángulo de contacto, ya que G5, el material más hidrofílico, presentó la mejor respuesta celular, mientras que el PLA presentó los menores valores de absorbancia. Estos resultados están en concordancia con algunos estudios que confirman que un grado de hidrofiliidad moderado (20-40°, ángulo de contacto con agua) conlleva al máximo grado de adhesión (36;37). Este es el caso del vidrio G5, que tiene un ángulo de contacto de 29° tal como vimos en el capítulo 5.

Como se ha dicho anteriormente, el proceso de adhesión de las células en los diferentes sustratos es de gran importancia. Este es un proceso que es mediado por proteínas y donde las características de la superficie como la química superficial, la energía superficial y la topografía juegan un papel muy importante y tienen una gran influencia en la interacción célula-material. De hecho, las características superficiales afectan la adsorción de proteínas en la superficie del material, y las diferencias en el proceso de adsorción, es decir, la cantidad y el tipo de proteínas que se adsorben, la orientación y la configuración de éstas al ser adsorbidas, o la velocidad con que se adsorben, conllevan variaciones en el número de células y en la fuerza con que las células se adhieren al sustrato. A su vez, el proceso de adhesión está mediado por la interacción de las proteínas adsorbidas en la superficie con las integrinas, que son las encargadas de crear los vínculos entre la célula y el material. Por lo tanto, la adsorción de proteínas en el sustrato es determinante en los subsecuentes procesos de adhesión, proliferación y diferenciación celular.

En el capítulo 5 se realizaron estudios de mojabilidad sobre las superficies de PLA, G5 y PLA50 con agua destilada y con medio de cultivo suplementado con 10%FCS para estudiar la respuesta de la mezcla de proteínas presentes en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos a partir de ese estudio mostraron que la compleja combinación de proteínas del FCS interactuó de forma diversa en la superficie de los diferentes materiales y que esta interacción conllevó cambios en la mojabilidad de las superficies. En el caso del material compuesto las proteínas adsorbidas cambiaron poco el grado de hidrofiliidad de la superficie del material en comparación con las medidas con agua destilada. En el caso del PLA y del vidrio G5, los ángulos de contacto con el medio de cultivo suplementado mostraron que la superficie se volvió menos hidrofílica que en el ensayo con agua destilada.

Es posible que los cambios en la mojabilidad de la superficie de los materiales debido al contacto con la solución proteica hayan afectado en el proceso de adhesión de las MG63 en los materiales estudiados. Sin embargo, para establecer relaciones más precisas entre las proteínas adsorbidas y los resultados de adhesión, es necesario realizar estudios de adsorción de proteínas para analizar con mayor profundidad las diferentes interacciones proteína-material.

Los ensayos de proliferación mostraron una tendencia creciente para todos los materiales hasta el día 6. Durante este período, G5 mostró un comportamiento similar al del control. Después de este intervalo de tiempo, las células cultivadas en el vidrio G5, parecieron dejar de proliferar mientras que las células cultivadas sobre los otros materiales continuaron su tendencia creciente de proliferación.

De forma general, una vez que las células han alcanzado la confluencia dejan de proliferar para entrar en la etapa de diferenciación. Hay que mencionar que la línea celular utilizada mostró un comportamiento en cierto modo anómalo, formando multicapas, es decir, después de llegar a confluencia y formar una monocapa continuaron proliferando formando más de una capa. Por esto se observa un aumento en la proliferación celular durante todo el período estudiado.

Sin embargo, las células sembradas en los discos del vidrio G5 dejaron de proliferar a los 9 días de cultivo. Este cambio en el patrón de proliferación de las células sembradas en el G5 puede ser atribuido al inicio de la etapa de diferenciación de las células osteoblásticas, ya que es un hecho conocido que una disminución en la velocidad de proliferación induce la expresión de algunos de los marcadores fenotípicos de los osteoblastos como la osteocalcina (13;38) y la actividad de la fosfatasa alcalina (13;39;40), los cuales son expresados normalmente en las etapas de maduración y mineralización de los osteoblastos (25).

Tanto el PLA como el PLA50 presentaron resultados de fosfatasa alcalina sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Sin embargo, los resultados correspondientes a la actividad de la FA, parecen corroborar lo dicho anteriormente ya que las células cultivadas en la superficie de los discos de G5 presentaron los valores medios más altos de FA, seguidos por el PLA50 y el PLA. El material control, es decir, el poliestireno de la placa de cultivos presentó los menores valores de FA. Estos resultados, indican que los tres materiales estudiados (PLA, PLA50 y G5), indujeron la diferenciación celular. No obstante, tomando en cuenta que las células sembradas sobre el vidrio G5 dejaron de proliferar antes que las células sembradas en el PLA y el PLA50, el proceso de diferenciación pareció iniciarse antes en el G5 que en los otros materiales.

La osteocalcina es el único de los marcadores osteoblásticos específico de estas células. Los resultados obtenidos mostraron una tendencia similar a la de la fosfatasa alcalina (ver Figura 7.5). Sin embargo, los valores de osteocalcina no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes materiales ni entre éstos y el control, a pesar de que sí las hubo para los valores obtenidos de FA, particularmente los obtenidos para el vidrio G5.

Esta ausencia de significación estadística en la inducción de osteocalcina puede ser debida a diversas razones.

La osteocalcina es un marcador tardío de la diferenciación osteoblástica que no es inducido simplemente con la inhibición de la actividad proliferativa (13). En las bases particulares de este estudio, los resultados obtenidos indicaron que, a pesar de que los materiales estudiados sí indujeron la diferenciación celular y además el vidrio G5 pareció promover el desarrollo osteoblástico antes que el resto de los materiales, después de 11 días de cultivo, las células aún no se encuentran en una etapa de maduración avanzada y por lo tanto, la síntesis de la osteocalcina no se encuentre en su punto máximo. Es posible que un período de proliferación de estimulación con dexametasona y ácido ascórbico más prolongado hubiese estimulado una mayor expresión de osteocalcina y quizás se hubiesen amplificado las diferencias entre los diferentes materiales.

En relación con los extractos de los materiales, se observaron algunas diferencias estadísticamente significativas en los cultivos a 24 h (ver Figura 7.3). Sin embargo, después de 48 horas de cultivo, se observaron diferencias más marcadas, principalmente con respecto al medio control. Después de este período de tiempo, los extractos afectaron ligeramente el comportamiento celular en comparación con el medio control, ya que los valores de absorbancia fueron menores para los extractos que para el control. No obstante, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes extractos.

Los extractos utilizados en este trabajo fueron usados en su estado original, esto quiere decir que no se eliminó la presencia de posibles partículas o se modificó el nivel de pH del medio con el fin de simular las condiciones estándar de cultivo y evitar los posibles cambios de pH provocados por la degradación ácida del polímero. Por lo tanto, tomando en cuenta que los extractos utilizados no fueron filtrados, tamponados o diluidos, los resultados obtenidos podrían ser considerados como positivos.

A pesar de las diferencias en la velocidad de degradación del PLA, PLA50 y G5, mostradas en el capítulo 6, no se observaron diferencias significativas en proliferación celular en los estudios con extractos. Dado que tanto el extracto del PLA como el del PLA50 y el del vidrio G5 ejercieron un efecto similar sobre las células, podría decirse que el cambio en el comportamiento celular en contacto directo es debido principalmente a las características superficiales de cada material y no a los productos de degradación del polímero o del vidrio.

Los resultados del capítulo 4 donde se hizo el estudio de citotoxicidad con fibroblastos humanos, comparando dos vidrios con diferente solubilidad, el G0 más soluble, sin TiO_2 y el G5, menos soluble, con un 5 % molar de TiO_2 , mostraron que el efecto iónico es mucho mayor en los cultivos en contacto directo que en el caso de los extractos. En el caso del G0, se observó un incremento en la síntesis de proteínas de los fibroblastos al estar en contacto directo con el material, y un aumento en los valores de absorbancia en los cultivos realizados con los extractos del G0 después de 72 h. El estudio descrito

en el presente capítulo se llevó a cabo con células osteoblásticas y no fibroblásticas, lo que implica que los resultados de ambos capítulos no pueden ser comparados ya que las células osteoblásticas reaccionan de forma diferente. No obstante, es muy probable que también en el caso de los osteoblastos, el efecto de la composición química sea mayor en el estudio en contacto directo que con los extractos. Por lo tanto, las diferencias observadas en los estudios de adhesión, proliferación y diferenciación pueden ser atribuidas principalmente a la química superficial del vidrio, ya que es un hecho conocido que las adhesiones focales a través de las cuales la célula interactúa con la matriz extracelular son sensibles a la química superficial (41).

Por lo tanto, el hecho de que el vidrio G5 no haya mostrado diferencias significativas en el caso de los extractos y si en los ensayos de adhesión, proliferación y diferenciación en contacto directo podría ser atribuido a que la baja velocidad de degradación del vidrio no permitió la liberación de una concentración considerable de iones en el medio durante el tiempo de inmersión utilizado en los extractos que fue como máximo de 72 horas. Es posible que en el caso de los extractos, con un período de inmersión mayor, el vidrio hubiese liberado una mayor concentración de iones al medio de cultivo y se hubiese observado el efecto de la composición química del vidrio en los cultivos con extractos. De hecho, hay que notar que en los cultivos en contacto directo el período estudiado fue más largo, llegándose a 14 días.

En el caso específico del ensayo de proliferación en contacto directo, el hecho de que a partir de los 9 días de cultivo las células sembradas sobre los discos de vidrio G5 hayan dejado de proliferar, puede ser atribuido también a la química superficial del material. Así como en el caso de los estudios de adhesión, la mojabilidad de la superficie de los materiales juega un papel fundamental, en los estudios de proliferación las diferencias de mojabilidad pierden peso y las diferencias de química superficial ganan una mayor importancia. Por lo tanto, en el caso de los ensayos de proliferación a 9 y 14 días, es lógico pensar que las diferencias encontradas en el vidrio G5 se deben principalmente al efecto de la química superficial del mismo.

Otro punto importante en la interacción célula-material es la topografía de la superficie (42). De hecho, las adhesiones focales entre célula y matriz extracelular son dependientes de la rugosidad de la superficie del material. Tanto el número como el tipo de adhesión de los puntos focales conlleva cambios en el citoesqueleto de las células. Estas modificaciones en el citoesqueleto traen como consecuencia cambios en términos de la expresión génica (43), lo cual sugiere que la rugosidad superficial puede controlar la proliferación y diferenciación celular.

El análisis superficial realizado por interferometría óptica (capítulo 5) reveló aspectos importantes en la topografía de los materiales estudiados, especialmente en el caso del material compuesto.

Los grandes valles detectados por la interferometría debido a la separación entre las partículas de vidrio G5 y la matriz polimérica, se acentuaron al estar el material en contacto con el medio de cultivo debido al efecto degradativo del mismo. Estas desuniones sirvieron como punto de anclaje para las diferentes células. Los valores de rugosidad reportados para el PLA y el vidrio G5 fueron similares entre ellos, por lo que las diferencias encontradas en los estudios de adhesión y proliferación entre estos dos materiales pueden atribuirse principalmente a diferencias de mojabilidad y de composición y no a la topografía de los mismos.

La observación de la morfología de las células con microscopía electrónica, mostró diferencias relevantes entre las células adheridas en las superficies lisas del PLA y del G5 y las cultivadas sobre el material compuesto PLA50. Ya es sabido que, la topografía del material tiene un efecto importante sobre el comportamiento celular (44). En el caso de las superficies lisas, las MG63 mostraron la morfología típica de las células cultivadas sobre las placas de poliestireno o cubreobjetos de vidrio utilizados comúnmente para cultivo celular, esto es, células muy extendidas y planas. En el caso del compuesto PLA50, la presencia de agujeros debidos a las desuniones entre el PLA y el G5 así como los cambios superficiales debidos a la presencia de las partículas de vidrio en la matriz polimérica, indujeron cambios conformacionales en la forma de las células para poder adaptarse a la topografía del material. Esto implica adoptar una morfología más redondeada y no tan plana. En las diferentes imágenes se observa que muchas de las células buscan adherirse a partir de las desuniones matriz-refuerzo, mientras que otras se ven bastante adheridas a las partículas de vidrio (Figuras 7.8b, 7.9). Por lo que, el hecho de que las partículas de vidrio le confieren al material una topografía superficial diferente, conlleva cambios conformacionales en el citoesqueleto de las células. Estas modificaciones en la conformación de las células conllevan a su vez una remodelación de la matriz nuclear y de la cromatina influyendo así en la expresión génica de las mismas (25).

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido concuerdan con los resultados reportados por otros autores de estudios realizados con células MG63 sobre superficies de titanio con diferentes rugosidades (45-47). Según estos estudios las células sembradas sobre materiales con superficie lisa mostraron células con morfología plana y muy extendidas como en el caso del plástico de las placas de cultivo. En las superficies rugosas, las células mostraron forma redonda o cuboidal con extensiones citoplasmáticas que se comunicaban con otras células o que se anclaban en los picos presentes en la superficie.

Finalmente, a pesar de que tanto el método de preparación de muestras utilizado como la microscopía electrónica de barrido son técnicas ampliamente utilizadas para el estudio de muestras biológicas, en nuestro caso mostraron ser técnicas bastante agresivas ya que en algunos casos, se vieron algunas células fracturadas (ver Figura 7.9b parte inferior) y en otros casos se observó claramente el efecto de retracción que

tiene el método de preparación sobre las células. En la Figura 7.7a, se ve claramente una especie de sombra alrededor de las células, lo cual puede deberse al retraimiento del citoplasma. Tanto el retraimiento como la fractura de las células son efectos comunes inherentes a la técnica utilizada, por lo que sería mejor utilizar una técnica menos agresiva como la microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) ya que en este caso la preparación de las células es mínima y las células no son sometidas a cambios bruscos de presión.

Hay que mencionar que debido a que el ESEM es poco utilizado como técnica para la observación de tejidos vivos, existe una carencia de protocolos para la fijación de las células, lo cual es de gran importancia. En el caso particular de este estudio se intentó inicialmente observar las células mediante ESEM. Sin embargo, esto no fue posible presuntamente porque la fijación de las células no fue la adecuada. Parece ser que cada tipo de células requiere un tipo de fijación específico.

En este capítulo se ha estudiado la citocompatibilidad del material compuesto PLA50. El PLA y el G5 fueron utilizados como materiales de referencia. Los resultados obtenidos en este capítulo demuestran que la respuesta celular de un material es un fenómeno donde participan múltiples variables. En el caso particular de este estudio las características superficiales mostraron una mayor influencia que los productos de degradación de los materiales estudiados. El vidrio G5 mostró el mejor comportamiento celular, y mejoró la interacción célula-material del PLA.

Un aspecto interesante a estudiar sería la respuesta celular en compuestos con diferentes proporciones de vidrio, o el comportamiento de andamios tridimensionales elaborados a partir de PLA y G5, para estudiar el efecto de la incorporación de porcentajes de vidrio variados y el efecto de la porosidad en una estructura tridimensional. La citocompatibilidad de andamios 3D elaborados a partir del vidrio G5 y del compuesto será estudiada en los capítulos 8 y 9.

7.5 REFERENCIAS

- (1) Ishaug S, Yaszemski M, Bizios R, Mikos A. Osteoblast function on synthetic biodegradable polymers. *Journal of Biomedical Materials Research* 1994; 28:1445-1453.
- (2) Beumer G, van Blitterswijk C, Bakker D, Ponec M. Cell-seeding and in vitro biocompatibility evaluation of polymeric matrices of PEO/PBT copolymers and PLLA. *Biomaterials* 1993; 14(8):598-604.
- (3) Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000; 21(7):667-681.
- (4) Seibel M, Eastell R, Gundberg C, Hannon R, Pols H. Biochemical Markers of Bone Metabolism. *Principles of Bone Biology*. Academic Press, 2002: 1543-1571.
- (5) Low MG, Saltiel AR. Structural and Functional Roles of Glycosyl-Phosphatidylinositol in Membranes. *Science* 1988; 239(4837):268-275.
- (6) Henthorn PS, Raducha M, Kadesch T, Weiss MJ, Harris H. Sequence and Characterization of the Human Intestinal Alkaline-Phosphatase Gene. *Journal of Biological Chemistry* 1988; 263(24):12011-12019.
- (7) Knoll BJ, Rothblum KN, Longley M. Nucleotide-Sequence of the Human Placental Alkaline-Phosphatase Gene - Evolution of the 5' Flanking Region by Deletion Substitution. *Journal of Biological Chemistry* 1988; 263(24):12020-12027.
- (8) Weiss MJ, Ray K, Henthorn PS, Lamb B, Kadesch T, Harris H. Structure of the Human-Liver Bone Kidney Alkaline-Phosphatase Gene. *Journal of Biological Chemistry* 1988; 263(24):12002-12010.
- (9) Harris H. The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clinical Chimica Acta* 1989; 186:133-150.
- (10) Yang L, Tao TZ, Wang XT, Du N, Chen WZ, Tao SQ et al. Effects of dexamethasone on proliferation, differentiation and apoptosis of adult human osteoblasts in vitro. *Chinese Medical Journal* 2003; 116(9):1357-1360.
- (11) Bronckers ALJJ, Gay S, Finkelman RD, Butler WT. Developmental Appearance of Gla Proteins (Osteocalcin) and Alkaline-Phosphatase in Tooth Germs and Bones of the Rat. *Bone and Mineral* 1987; 2(5):361-373.
- (12) Hauschka PV, Lian JB, Cole DEC, Gundberg CM. Osteocalcin and Matrix Gla Protein - Vitamin K-Dependent Proteins in Bone. *Physiological Reviews* 1989; 69(3):990-1047.
- (13) Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS et al. Progressive Development of the Rat Osteoblast Phenotype In vitro - Reciprocal Relationships in Expression of Genes Associated with Osteoblast Proliferation and Differentiation During Formation of the Bone Extracellular-Matrix. *Journal of Cellular Physiology* 1990; 143(3):420-430.

- (14) Alcaín FJ, Buron MI. Ascorbate on Cell-Growth and Differentiation. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 1994; 26(4):393-398.
- (15) Franceschi RT, Iyer BS, Cui YQ. Effects of Ascorbic-Acid on Collagen Matrix Formation and Osteoblast Differentiation in Murine Mc3T3-E1 Cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 1994; 9(6):843-854.
- (16) Davidson JM, LuValle PA, Zoia O, Quaglino D, Giro MG. Ascorbate differentially regulates elastin and collagen biosynthesis in vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by pretranslational mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272(1):345-352.
- (17) Franceschi RT, Iyer BS. Relationship Between Collagen-Synthesis and Expression of the Osteoblast Phenotype in Mc3T3-E1 Cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 1992; 7(2):235-246.
- (18) Wenstrup RJ, Witte DP, Florer JB. Abnormal differentiation in MC3T3-E1 preosteoblasts expressing a dominant-negative type I collagen mutation. *Connective Tissue Research* 1996; 35:249-257.
- (19) Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ. Distinct Proliferative and Differentiated Stages of Murine Mc3T3-E1 Cells in Culture - An Invitro Model of Osteoblast Development. *Journal of Bone and Mineral Research* 1992; 7(6):683-692.
- (20) Maniatopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone-Formation Invitro by Stromal Cells Obtained from Bone-Marrow of Young-Adult Rats. *Cell and Tissue Research* 1988; 254(2):317-330.
- (21) Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang SF, Avioli LV. Differentiation of Human Bone-Marrow Osteogenic Stromal Cells in Vitro - Induction of the Osteoblast Phenotype by Dexamethasone. *Endocrinology* 1994; 134(1):277-286.
- (22) Peter SJ, Liang CR, Kim DJ, Widmer MS, Mikos AG. Osteoblastic phenotype of rat marrow stromal cells cultured in the presence of dexamethasone, beta-glycerolphosphate, and L-ascorbic acid. *Journal of Cellular Biochemistry* 1998; 71(1):55-62.
- (23) Atmani H, Audrain C, Mercier L, Chappard D, Basle MF. Phenotypic effects of continuous or discontinuous treatment with dexamethasone and/or calcitriol on osteoblasts differentiated from rat bone marrow stromal cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2002; 85(3):640-650.
- (24) Porter RM, Huckle WR, Goldstein AS. Effect of dexamethasone withdrawal on osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2003; 90(1):13-22.
- (25) Lian JB, Stein GS. Concepts of Osteoblast Growth and Differentiation - Basis for Modulation of Bone Cell-Development and Tissue Formation. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 1992; 3(3):269-305.

- (26) Valutazione biologica dei dispositivi medici, prove per la citotossicità. UNI EN ISO 10993-5 2000.
- (27) Pastoureau P, Delmas PD. Measurement of Serum Bone Gla-Protein (Bgp) in Humans with An Ovine Bgp-Based Radioimmunoassay. *Clinical Chemistry* 1990; 36(9):1620-1624.
- (28) Agrawal CM, Niederauer G, Micallef D, Athanasiou KA. The use of PLA-PGA polymers in orthopaedics. In: Wise D, Trantolo D, Altobelh D, Yaszemski M, Greser J, Schwartz E, editors. *Encyclopaedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering. Part A. Materials*. New York: Marcel Dekker, 1995: 1055-1089.
- (29) Barrows T. Degradable implants materials: a review of synthetic absorbable polymers and their applications. *Clinical Materials* 1986; 1:233-267.
- (30) Dunn RL. Clinical applications and update on the poly(alpha-hydroxy acids). In: Hollinger JO, editor. *Biomedical applications of synthetic biodegradable polymers*. Boca Raton: CRC Press, 1995: 17-31.
- (31) Hench LL, Paschall HA. Direct Chemical Bond of Bioactive Glass-Ceramic Materials to Bone and Muscle. *Journal of Biomedical Materials Research* 1973; 7(3):25-42.
- (32) Chehroudi B, Gould TRL, Brunette DM. Titanium-Coated Micromachined Grooves of Different Dimensions Affect Epithelial and Connective-Tissue Cells Differently *In Vivo*. *Journal of Biomedical Materials Research* 1990; 24(9):1203-1219.
- (33) Hay DI, Moreno EC. Differential Adsorption and Chemical Affinities of Proteins for Apatitic Surfaces. *Journal of Dental Research* 1979; 58:930-942.
- (34) Lampin M, WarocquierClerout R, Legris C, Degrange M, SigotLuizard MF. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. *Journal of Biomedical Materials Research* 1997; 36(1):99-108.
- (35) Vogler EA. Interfacial chemistry in biomaterials science. In: Berg JC, editor. *Wettability, surfactant science series*. 1993: 183-250.
- (36) Khang G, Jeon JH, Lee LW, Cho SC, Lee HB. Cell and platlet adhesion on plasma glow discharge-treated poly(lactide-co-glycolide). *Biomedical Materials Engineering* 1997; 7:357-368.
- (37) Webb K, Hlady V, Tresco PA. Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization. *Journal of Biomedical Materials Research* 1998; 41(3):422-430.
- (38) Pockwinse SM, Wilming LG, Conlon DM, Stein GS, Lian JB. Expression of Cell-Growth and Bone Specific Genes at Single Cell Resolution During Development of Bone Tissue-Like Organization in Primary Osteoblast Cultures. *Journal of Cellular Biochemistry* 1992; 49(3):310-323.

- (39) Turksen K, Aubin JE. Positive and Negative Immunoselection for Enrichment of 2 Classes of Osteoprogenitor Cells. *Journal of Cell Biology* 1991; 114(2):373-384.
- (40) Malaval L, Modrowski D, Gupta AK, Aubin JE. Cellular Expression of Bone-Related Proteins During In-Vitro Osteogenesis in Rat Bone-Marrow Stromal Cell-Cultures. *Journal of Cellular Physiology* 1994; 158(3):555-572.
- (41) Hench LL, Paschall HA. Direct Chemical Bond of Bioactive Glass-Ceramic Materials to Bone and Muscle. *Journal of Biomedical Materials Research* 1973; 7(3):25-42.
- (42) Squire MW, Ricci JL, Bizios R. Analysis of osteoblast mineral deposits on orthopaedic dental implant metals. *Biomaterials* 1996; 17(7):725-733.
- (43) Gronowicz G, McCarthy MB, Ahmad M. Direct integrin-mediated attachment of human osteoblasts to implants. *Journal of Bone and Mineral Research* 1996; 11:S323.
- (44) Boyan BD, Dean DD, Lohmann CH, Cochran DL, Sylvia VL, Schwartz Z. The Titanium-Bone Cell Interface In Vitro: The Role of the Surface in Promoting Osteointegration. In: Brunette D, Tengvall P, Textor M, Thomsen P, editors. *Titanium in Medicine*. Berlin: Springer-Verlag, 2001: 562-585.
- (45) Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J et al. Effect of Titanium Surface-Roughness on Proliferation, Differentiation, and Protein-Synthesis of Human Osteoblast-Like Cells (Mg63). *Journal of Biomedical Materials Research* 1995; 29(3):389-401.
- (46) Boyan BD, Hummert TW, Kieswetter K, Schraub D, Dean DD, Schwartz Z. Effect of titanium surface characteristics on chondrocytes and osteoblasts in vitro. *Scan Electron Microscopy (Cells & Materials)* 1995; 5:323-335.
- (47) Boyan BD, Sylvia VL, Liu Y, Sagun R, Cochran DL, Lohmann CH et al. Surface roughness mediates its effects on osteoblasts via protein kinase A and phospholipase A₂. *Biomaterials* 1999; 20:2305-2310.

