

TESI DOCTORAL

**Bioadhesividad celular sobre  
superficies de armazones  
o matrices tisulares**

José Couceiro Otero

Directores:  
Antonio Navarro Quilis  
José Couceiro Follente

A mi hermano Ramiro, por su apoyo incondicional ante cualquier circunstancia

A mis Padres por su comprensión y cariño

A los compañeros del instituto de Ortopedia, en especial a José Luis Balsa, sin vosotros no lo habría conseguido

## Índice:

1- Introducción	3
1.1- El hueso	7
	10
1.2- Ingeniería de tejidos	
1.2.1- Células y Cultivos celulares en la ingeniería de tejidos	10
1.2.2-Factores de señalización celular y factores de crecimiento	14
1.2.3-Armazones celulares	15
1.3- Biomateriales	16
1.3.1- Metales	18
1.3.2- Cerámicas	21
1.3.3- Polímeros	22
1.3.4- Materiales compuestos o composites	23
1.4- Bioreactores	25
2- Objetivos	27
3- Material y métodos	27
4- Resultados	31
5- Discusión	42
6- Conclusiones	45
7- Bibliografía	46

# 1- Introducción

Tradicionalmente, las reparaciones de los grandes defectos óseos y condrales constituyeron y todavía son un reto para cirujanos del sistema músculo-esquelético.

La regeneración ósea y la posibilidad de hacer crecer hueso, han ocupado parte del afán investigador de traumatólogos y cirujanos ortopédcas durante siglos. Un gran defecto óseo se consideraba frecuentemente irrecuperable por lo que en ocasiones los pacientes que los padecían se clasificaban como candidatos a la amputación.

Aunque una aproximación biológica al tratamiento de los defectos traumáticos óseos parece bastante intuitiva, todavía fue en 1915 cuando Albee (2) describió el injerto de hueso autólogo, pero en sus inicios se limitó principalmente a defectos de pequeño tamaño (54).

Posteriormente la osteogénesis por distracción fue introducida por Ilizarov en 1950, con el fin de preservar extremidades con grandes pérdidas óseas. (24,25). En 1970 se comenzaron a utilizar injertos vascularizados de peroné (48).

Las necesidades de regeneración ósea incluyen no solamente los defectos postraumáticos sino también los causados por otras patologías músculo-esqueléticas como tumores, enfermedades inflamatorias, osteopenia, infecciones, necrosis óseas, entre otras, y, sobre todo, defectos óseos relacionados con ciertas técnicas quirúrgicas como osteotomías, aunque, por su frecuencia, merecen mención especial las osteolisis provocadas por el desgaste y la producción de partículas desprendidas de biomateriales empleados en reconstrucciones osteoarticulares. La respuesta inflamatoria inducida por los biomateriales dependen no solo de la composición del material sino también del tamaño y forma de las partículas. Todos los mediadores de la inflamación hacen que ésta reacción destructiva ósea persista y se haga crónica.

Los grandes avances que se han producido en ingeniería tisular han dado lugar a la aparición de técnicas que en la actualidad prometen ventajas como las que podrían estar relacionadas con la implantación quirúrgica de armazones osteoconductores, con transportadores de agentes biológicamente activos u osteoinductores, y finalmente con el trasplante de células aisladas ó en soportes. Frecuentemente, osteoconductores, osteoinductores y células óseas ó indiferenciadas se combinan para tratar defectos óseos.

Para los tratamientos de los defectos óseos segmentarios post-traumáticos, tradicionalmente se han venido utilizando técnicas como: acortamiento de la extremidad, el aporte de hueso autólogo no vascularizado, la osteogénesis por distracción así como la transposición de hueso vascularizado, haloinjertos. Sin embargo, actualmente también se han descrito sistemas de relleno con cajas de titanio(9) así como sustitutivos óseos sintéticos.

Las sustituciones óseas en cirugía oncológica son otra de las indicaciones para las nuevas tecnologías. Aparte de las indicaciones citadas, como también se ha mencionado, la incidencia alta de las osteolisis provocadas por el empleo de biomateriales constituyen una fuente importante en la demanda de investigación tanto para la preservación del tejido y su buena función como para su regeneración en los casos de destrucción.

Por más de tres décadas, las artroplastias totales, principalmente las de cadera y rodilla mejoraron notablemente la calidad de vida de los pacientes.

Estudios recientes sugieren que el incremento de sobrecarga hospitalaria de las artroplastias en los próximos 20 años será notable. Las prótesis primarias de cadera, en algunos países aumentará en un 174%, mientras las de rodilla llegarán a un 673%. Se incrementará también el número de recambios de prótesis que alcanzará el doble del actual en el año 215 para las rodillas y en 2026 para las caderas. En general, las cifras de aumento de cirugías de revisión que se calculan entre los años 2005 y 2030 será de un 137% para las caderas y un 601% para las rodillas. Entre 1990 y 2002, en Estados Unidos, la cirugía de revisión para las prótesis totales de caderas oscilaba entre un 15,2% y un 20,5% (media de 17,5%) y entre 7,5% y 9,7% (8,2% promedio) para las rodillas (29).

La cirugía de revisión se relaciona más frecuentemente con aflojamientos asépticos y pérdidas óseas. En la actualidad, esos problemas se achacan a los materiales empleados que condicionan el desarrollo de una reacción inflamatoria local acompañada de destrucción ósea y a la protección de cargas óseas, éstas ocasionadas por diferencias de las propiedades mecánicas entre el material óseo y el biomaterial. Los primeros se relacionan con el desgaste de los materiales implantados y los segundos por la diferencia en el módulo de elasticidad entre el hueso y el material empleado.

Los estudios de coste-eficacia favorecen el empleo de las artroplastias aunque éstas, como se ha mencionado, no están exentas de complicaciones una de las cuales está relacionada con la pérdida ósea como consecuencia de una reacción inflamatoria inducida por partículas liberadas de los biomateriales empleados. Ésta osteolisis se ha dado en llamar la “enfermedad de las partículas”.

Se puede argumentar que el problema más serio de algunos de los diseños actuales de prótesis totales de cadera lo constituye el desgaste importante del polietileno (UHMWPE) del acetábulo protésico ya que representa la mitad de la totalidad de la artroplastia. Con el fin de reducir la fricción de las superficies articulares y por consiguiente el desgaste, se emplean nuevos materiales por su reducido desgaste “in vitro”, pero todavía están sometidos a estudios clínicos para comprobar la respuesta ante los nuevos tipos de partículas e incluso iones metálicos.

Las partículas inducen una reacción celular desencadenándose una respuesta inflamatoria con la presencia de la cascada del ácido araquidónico y habituales factores de la inflamación tales como interleucina-1 beta (IL-1), interleucina-6 (IL-6), prostaglandina E2 (PGE-2), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) entre otros, sin olvidar la acción de tipos celulares como los osteoclastos con capacidad para provocar reabsorción ósea. Estas células (OCs) como sus precursoras (OCPs) de la línea de monocitos-macrófagos se acumulan en tejidos periprotésicos. El tipo y la intensidad de la respuesta inflamatoria esta relacionada con varios parámetros como pueden ser el tamaño, la composición, la forma, el volumen, la superficie de las partículas. Este tipo acción se ha podido demostrar tanto “in vitro” como en animales de experimentación. Todos estos factores de la inflamación han podido ser analizados en zonas de destrucción ósea contiguas a los biomateriales.

Sigue siendo una demanda científica no solo profundizar en el conocimiento de la actividad celular ante distintos biomateriales sino también la posibilidad de regenerar tejido óseo en los defectos ocasionados.

Como se ha demostrado, el sistema de defensa del organismo puede ser activado resultando en una serie de efectos secundarios no deseados, como la reabsorción del hueso, con el consiguiente aflojamiento del implante.

Se han probado muchos métodos para aliviar éste problema. Las tendencias actuales están generalmente relacionadas con la reducción del desgaste de las superficies articulares sin olvidar la liberación de partículas de las áreas de contacto con el hueso y la migración de aquellas por la interfaz sobre todo sino existe una buena continuidad entre el biomaterial y el hueso u osteointegración.

El desgaste del polietileno ( UHMWPE) se ha enfocado hacia la utilización de métodos de modificación en su procesado y a la sustitución del mismo por otro tipo de material.

Un abordaje complementario al problema lo constituye la búsqueda de métodos que conduzcan a la reducción de la fricción de las superficies articulares artificiales. Una de éstas áreas se relaciona con un conocimiento más profundo de los mecanismos de lubricación de éstos biomateriales, como ocurre en las articulaciones naturales, aunque es dudoso que glicoproteínas y lípidos se puedan llegar a adsorber en el UHMWPE como en el cartílago articular, quedándose en la superficie del polímero desprotegido para reducir la fricción y el desgaste durante la carga. Ésta es una línea de investigación que puede llegar a conseguir mejorar la lubricación de éstos nuevos materiales, modificando tanto su superficie como su composición y de ésta manera disminuir el desgaste y la consiguiente osteolisis y pérdida ósea.

Paralelamente, otra área de investigación está relacionada con la obtención de una óptima integración de los biomateriales al hueso en el que se implanten. Se tendrán que analizar nuevos materiales, que cumplan los objetivos de conducción ósea, que sean biocompatibles y que presenten propiedades mecánicas similares a las del tejido circundante, por tanto, con módulos de elasticidad más parecidos a los del hueso así como nuevos recubrimientos y tratamientos de la superficie de los distintos materiales. Una parte muy importante de estos estudios están relacionados con pruebas “in vitro” mediante cultivos celulares, previos a los implantes en animales. Al mismo tiempo la regeneración ósea se intenta conseguir mediante técnicas de la llamada ingeniería de tejidos.

La ingeniería de tejidos es la aplicación de principios biológicos, químicos para la reparación, restauración y regeneración de tejidos vivos utilizando biomateriales, células y señalizadores, solos ó combinados. Podría constituir una alternativa a los auto y aloinjertos óseos en el reemplazamiento de defectos óseos traumáticos ó patológicos.

Los autoinjertos provocan morbilidad local y se acompañan de una limitación en su disponibilidad y tamaño. Los aloinjertos preocupan por su inmunogenicidad y riesgo de transmisión de enfermedades.

El término sustituto de injerto óseo, describe un espectro de productos, que tienen diferentes efectos sobre la consolidación ósea (10), y por lo general clasificamos sus propiedades en osteoinductivas, osteoconductoras, y osteogénicas.

- Osteoinducción: Fue un concepto introducido por Urist en 1965 (50), y que hoy en día se entiende como un proceso que promueve la mitogénesis de células mesenquimales indiferenciadas, conduciendo a la formación de células progenitoras, con capacidad para formar hueso nuevo.
- Osteoconducción: Se define como un proceso que sostiene el crecimiento de capilares, tejidos perivasculares y células osteoprogenitoras, en la estructura tridimensional de un implante o injerto (13).

- Osteogénesis: El término ha ido evolucionando con la expansión de la ingeniería tisular y una manera simple de entender el proceso es como la regeneración del hueso a partir de osteoblastos.

La reparación de defectos tisulares se lleva a cabo de manera más eficiente, si se rellena el espacio del defecto mediante un material que funcione como armazón (12), entendiendo éste armazón o matriz celular como una estructura de soporte que guía el crecimiento del tejido de manera tridimensional (28).

Para obtener una regeneración tisular uniforme sobre un armazón artificial se necesita realzar la adhesividad y propagación celular. Las integrinas son receptores para la adherencia celular, y aunque algunos proteoglicanos transmembrana actúan como coreceptores para componentes de la matriz extracelular, son las integrinas el receptor principal que media la adherencia de las proteínas de la matriz extracelular, en este caso de osteoblastos, a soportes o estructuras de biomateriales estudiados. Las integrinas funcionan como uniones transmembrana, mediando las interacciones entre el citoesqueleto y la matriz extracelular (37). Algunos productos, entre ellos los bifosfonatos, como el ácido alendrónico aumenta la formación y el tamaño del hueso (7). Ésta y otras sustancias deberían someterse a investigaciones para comprobar su papel en favorecer y acelerar la formación ósea así como la integración de materiales al hueso del receptor.

Tradicionalmente se han venido utilizando una variedad de biomateriales que favorecen la osteointegración aunque ésta se trata de incrementar no solo variando su tipo y composición sino también modificando su morfología, su recubrimiento ó tratamiento de superficie. Independientemente de los estudios in vivo se necesitan evaluaciones previas orientadas a comprobar el comportamiento de determinados fenotipos celulares.

Entre todos los materiales empleados en la Clínica Humana, algunos son de aplicación relativamente nueva, con gran impulso comercial pero poco seguimiento clínico. Uno de éstas estructuras utilizables para favorecer el crecimiento óseo puede ser el tantalio poroso basado en estudios que muestran una osteointegración rápida y fijación resistente a la separación del hueso implantado (8). Éste biomaterial a diferencia de otros utilizados en ingeniería ósea resiste fuerzas, como mínimo fisiológicas, en áreas osteoarticulares. Los estudios “in vivo” muestran el relleno óseo al año de su implantación entre un 63% y un 80% (8) con propiedades fuertemente osteoconductoras según algunos autores (34). Éste material podría constituir un armazón adecuado para algunas aplicaciones en ingeniería de tejidos. Sería conveniente estudiar el efecto de la microestructura sobre la formación ósea, comenzando por las propiedades de retención celular, comparándolo con otros biomateriales tradicionalmente empleados.

La reproducción ex vivo del hueso constituye un reto científico y es recomendable tener presente los aspectos fundamentales de éste tejido, que al mismo tiempo constituye un material y un órgano.

## 1.1- EL HUESO

### - *El tejido óseo:*

La base de datos Mesh del programa Pubmed del Instituto Nacional de Salud Americano lo define como: "*Tejido conectivo especializado, principal componente del esqueleto*", el hueso posee una resistencia tensil casi igual al hierro forjado pero es tres veces más ligero y diez veces más flexible. Sin embargo el hueso no es un material inerte ya que posee una matriz orgánica e inorgánica, y también varios tipos celulares diferentes.

### - Composición:

*Células:* la formación y el mantenimiento del hueso se relacionan con la acción coordinada de diversos tipos celulares. Estas se encuentran clasificadas en cuatro tipos según función y morfología principalmente:

#### - *Células indiferenciadas u osteoprogenitoras:*

Células de pequeño tamaño, núcleo único, pocas organelas, forma irregular, se mantienen en un estado indiferenciado hasta que son estimuladas a proliferar o diferenciarse en osteoblastos. Normalmente residen en los canales del hueso, el endosito y el periostio, aunque también están presentes en tejidos no óseos.

#### - *Osteoblastos:*

Células cuboides, con núcleo único, generalmente excéntrico, contienen grandes volúmenes de orgánulos para síntesis, retículo endoplásmico y membranas de Golgi. Se mantienen en la superficie ósea y cuando resultan estimulados forman matriz ósea orgánica y participan en la mineralización de esa matriz.

Una vez activados pueden encaminarse por dos vertientes: mantenerse en la superficie ósea y adoptar una morfología aplanada, o pueden rodearse de matriz ósea y convertirse en osteocitos.

#### - *Osteocitos:*

Resultan en más del 90% de las células del esqueleto adulto. Sus prolongaciones o excrescencias celulares, se extienden desde sus cuerpos que son ovalados o lenticulares, para contactar con otros osteocitos u osteoblastos, formando una matriz de células que se extienden desde la superficie ósea por todo el entramado óseo. Esta disposición les da acceso a la práctica totalidad de la superficie de matriz extracelular mineralizada, y puede tener importancia en el intercambio mineral mediado por células entre el hueso y la sangre.

#### - *Osteoclastos:*

Células de morfología grande e irregular con múltiples núcleos, rellenan mucho de su citoplasma con mitocondrias que suministran la energía para los procesos de reabsorción ósea que estas células llevan a cabo.

Tienen capacidad para moverse de un punto de reabsorción ósea a otro.



Una de las características más diferenciadoras de los osteoclastos es la morfología compleja de su membrana en la zona de contacto con la matriz ósea, en puntos de reabsorción. Tienen un borde rugoso o en cepillo, que parece jugar un papel importante en el proceso reabsortivo. En el hueso esponjoso, los osteoclastos reabsorbiendo hueso crean una depresión característica llamada laguna de Howship.

*Matriz ósea:*

Consta de macromoléculas orgánicas, material inorgánico y líquido de la matriz intercelular.

- *Matriz orgánica, Osteoide:*

El colágeno de tipo I contribuye aproximadamente al 90% de la matriz orgánica, el resto lo constituyen proteoglicanos, muchas proteínas no colágenas, colágeno tipo V y de otros tipos. La mineralización cambia y estabiliza la composición de la matriz.

- *Matriz inorgánica:*

Constituye aproximadamente el 70% del peso húmedo del hueso, aunque puede contribuir hasta el 80%. Poco después de que los osteoblastos formen la osteoide, aparece mineral depositado en las fibrillas de colágeno tipo I, extendiéndose posteriormente a través de la matriz sin alterar la organización de las fibrillas de colágeno. La matriz ósea mineralizada de manera reciente contiene varias especies de fosfato de calcio, e hidroxapatita. Cuando madura la matriz inorgánica se compone principalmente de Hidroxapatita de calcio.

- *La estructura ósea:*

El hueso maduro puede clasificarse en hueso cortical y hueso esponjoso

- Hueso cortical:

La cortical del hueso se compone de laminillas que se disponen concéntricamente alrededor de pequeños canales, a través de los cuales pasa el aporte sanguíneo. Estos son los canales de Havers que comunican con el exterior del hueso y con la cavidad medular a través de otros canalículos denominados de Volkmann, ésta disposición se conoce como sistema de Havers u osteona.

- Hueso esponjoso:

La disposición de las laminillas tiene forma trabecular o plexiforme, las fibras colágenas se distribuyen según las fuerzas de sollicitud mecánica, son regulares y se disponen paralelamente en cada capa. Su dirección cambia de una capa a otra formando una red tridimensional. Este tipo de hueso se encuentra principalmente en las metáfisis y epífisis de los huesos largos y en los huesos cortos; como las vértebras.

### *-Osteogénesis, el desarrollo del hueso:*

Existen tres líneas celulares diferentes que generan el esqueleto: las procedentes de los somitas dan lugar al esqueleto axial, el mesodermo de la placa lateral desarrolla el esqueleto de los miembros, la cresta neural craneal genera el arco branquial y los huesos craneofaciales.

#### - Osificación intramembranosa:

Es la manera característica en la que se forman los huesos del cráneo. Durante la osificación intramembranosa (11), las células derivadas de la cresta neural proliferan y se condensan en nódulos compactos. Algunas de éstas células se convierten en capilares y otras se convierten en osteoblastos. Los osteoblastos segregan la matriz con proteoglicanos y colágeno, capaz de unirse a sales de calcio. Así la matriz osteoide se mineraliza. Los osteoblastos quedan inmersos en la matriz que segregan, y se convierten en osteocitos. La región calcificada se rodea de células mesenquimales que forman el periostio.

Los factores de crecimiento como las proteínas morfogenéticas óseas BMP-2, BMP-4, BMP-7, inducen la transformación de las células mesenquimales derivadas de la cresta neural a células óseas directamente. Estimulan el factor de transcripción CBFA1 que promueve la diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos descrita previamente.

#### -Osificación endondral:

Es un proceso que comienza con la formación de cartílago, a partir de células mesenquimales, y su subsiguiente reemplazamiento por tejido óseo. El proceso puede dividirse en cinco fases (11):

- Primera fase: las células mesenquimales se comprometen a nivel molecular para diferenciarse hacia células de estirpe condral.
- Segunda fase: las células se condensan en nódulos compactos y se diferencian hacia condrocitos.
- Tercera fase: los condrocitos proliferan rápidamente para formar el modelo del hueso, al desarrollarse los condrocitos segregan matriz extracelular.
- Cuarta fase los condrocitos dejan de dividirse, y aumentan su volumen considerablemente, convirtiéndose en condrocitos hipertróficos. Estos condrocitos alteran la matriz producida, añadiendo colágeno X, fibronectina, lo que permite que se mineralice con carbonato cálcico.
- Quinta fase: Invasión del cartílago por parte de estructuras vasculares, los condrocitos hipertróficos sufren apoptosis. Al morir los condrocitos, células circundantes se diferencian a osteoblastos, que comienzan a formar su matriz ósea y el cartílago se reemplaza por hueso. En los mamíferos, incluyendo a los humanos, los huesos largos crecen en longitud por éste mecanismo, mediante placas de crecimiento fisario.

## 1.2 - INGENIERÍA DE TEJIDOS

### *Definición*

- Un campo multidisciplinar con el propósito de desarrollar sustitutos biológicos que restauren, mantengan ó mejoren la función tisular. Puede implicar el trasplante de células en matrices artificiales. Podría conducir a nuevas terapias.

En éste campo multidisciplinario se aplican conocimientos procedentes de la ingeniería y del campo biosanitario, para obtener sustitutos ó sucedáneos biológicos que puedan mejorar la función de tejidos y órganos dañados

Para la producción de un nuevo tejido óseo se necesitan componentes que se podrían resumir en:

- Fuente de células osteoprogenitoras para su multiplicación y producción de matriz extracelular.
- Una matriz ó armazón que facilite la adherencia, migración, proliferación y estabilidad celular.
- Factores bioactivos morfogénicos como los factores de crecimiento que amplifiquen la expansión celular, refuercen el fenotipo, favorezcan la producción de la matriz extracelular y reduzcan la degradación catabólica.

### *1.2.1- Células y Cultivos celulares en la ingeniería de tejidos:*

Con el ambiente apropiado, la mayoría de las células vegetales y animales pueden vivir, multiplicarse, e incluso expresar propiedades diferenciadas en una placa de cultivo. Éste método permite que se puedan observar mediante microscopía o ser analizadas bioquímicamente, así como comprobar los efectos de añadir o retirar diferentes moléculas específicas como factores de crecimiento, entre otras posibilidades.

El cultivo de tejidos comenzó el 1907, mediante la experimentación en neurobiología y la denominada hipótesis neuronal, que estableció que cada fibra nerviosa es la prolongación de una única célula nerviosa y no el producto de la fusión de muchas.

La mayoría de las células para cultivo tisular, requieren de un substrato sólido sobre el que crecer y dividirse (37,38). En la actualidad los cultivos celulares suelen llevarse a cabo sobre placas a las que se adhieren las células, migran y proliferan.

Los cultivos preparados directamente de tejido de un organismo sin división celular se denominan *cultivos primarios*. En muchos casos las células de un cultivo primario pueden hacerse proliferar hacia un gran número de *cultivos secundarios*, de esta forma se pueden cultivar de manera repetida durante semanas o meses. Estas células expresan muchas veces propiedades adecuadas a su origen celular, como la producción de matriz extracelular específica, entre otras.

**Roux 1885: cel. embr. pollo+sol. salina**

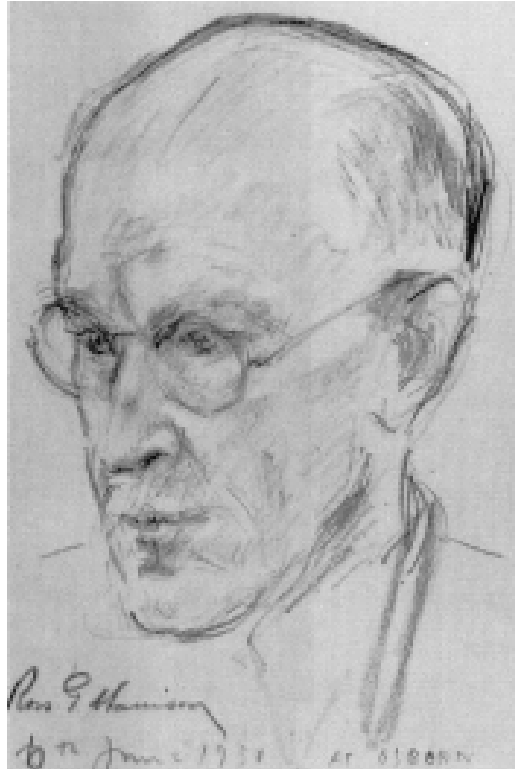
**Ross Granville Harrison:1907  
Explantes del tubo medular de embriones de rana en coágulos de linfa de rana.**

**Burrows: coág. de plasma de pollo**

**Carrel: extracto embrionario Plasma+extracto+asepsia,1912.**

**Eagle 1955: medio basal y MEM 1959**

**Dulbecco,1959**



Existen varios tipos de medio de cultivo. El medio de cultivo es esencial para conseguir que exista un correcto ambiente para obtener un desarrollo y mantenimiento celular, y además de poseer los factores de crecimiento necesarios para ese tipo específico de células, debe poseer los factores nutricionales adecuados, tener un Ph y una osmolaridad correctos, y paralelamente es necesario aportar los gases esenciales, oxígeno y dióxido de carbono.

Algunos de estos medios, también llamados esenciales, están enriquecidos con suero bovino fetal. Este tipo de medio y otros similares hacen difícil la identificación de las macromoléculas necesarias para el crecimiento y la función celular, de ahí que se desarrollasen varios tipos de medio sin suero, con composición química definida. Estos medios poseen ciertas moléculas específicas que las células requieren para sobrevivir en cultivo, entre las que se incluyen los factores de crecimiento y la transferrina (37).

Dentro de los medios de cultivo, existen múltiples tipos, como ya se ha citado, siendo de especial importancia los siguientes:

- Medio basal de Eagle (BME): Es un medio elemental con solo los aminoácidos esenciales. Necesita estar suplementado con suero bovino fetal al 10%. Puede utilizarse para cultivo de fibroblastos de ratón y células HeLa.
- Medio mínimo esencial de Eagle (MEM): Contiene aminoácidos en mayor concentración que el BME, se puede utilizar para múltiples tipos de cultivo celular, requiere suplementación con suero bovino fetal al 10%.
- Medio MEM modificado por Dubelcco (DMEM): Contiene cuatro veces la concentración de aminoácidos y vitaminas que el BME, con utilidad en el cultivo de osteoblastos.

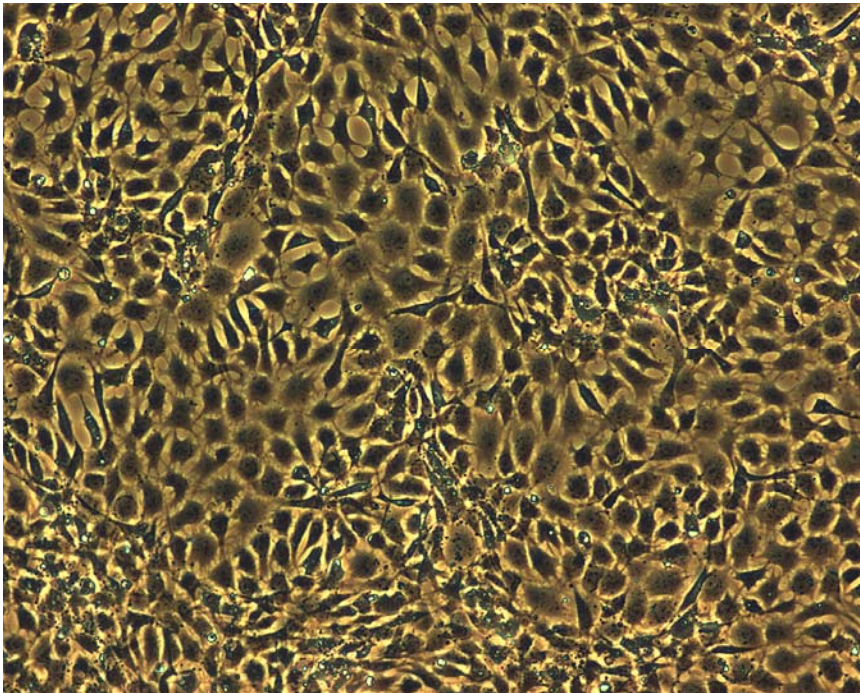
# CULTIVOS CELULARES: TIPOS

**CULTIVOS PRIMARIOS:** células aisladas por digestión tisular.

**LÍNEA CELULAR PRIMARIA:** subcultivadas en sucesivos pasos a diferentes frascos ( cultivos secundarios).

**LÍNEAS CELULARES ESTABLECIDAS:** subcultivada un mínimo de 70 veces en intervalos de tres días.

Cuando las células se mantienen en cultivo, por regla general conservan su carácter original. Cada tipo celular parece tener una memoria de su desarrollo y estar fija en su forma especializada, aunque pueden suceder algunas transformaciones limitadas. Las células madre en cultivo en cambio pueden continuar dividiéndose y pueden diferenciarse en uno o más tipos celulares (37), cada célula madre en particular sirve para la regeneración de un tejido concreto.



*Fig.1: CULTIVOS PRIMARIOS: células aisladas por digestión tisular. LÍNEA CELULAR PRIMARIA: subcultivadas en sucesivos pasos a diferentes frascos ( cultivos secundarios )*

Sin embargo, mediante experimentación con embriones de rata, se ha descubierto que de ellos puede diferenciarse un tipo de célula madre especial denominada célula madre

embrionaria que pueden mantenerse en cultivo casi indefinidamente y mantener un potencial de desarrollo sin restricciones. El uso de éste tipo celular derivado de embriones humanos, de células de ovario o testiculares plantea serios problemas éticos. Su utilización y aprobación o restricciones por parte de la comunidad científica se encuentra en estudio.

El hueso, como se ha expuesto, está formado por osteoblastos, que proceden de células mesenquimales pluripotenciales, en un proceso de múltiples fases. Las células madre que forman el tejido óseo, residen en delgadas capas de tejido alrededor del hueso y dentro de éste: (en el periostio y en la médula ósea) (36).

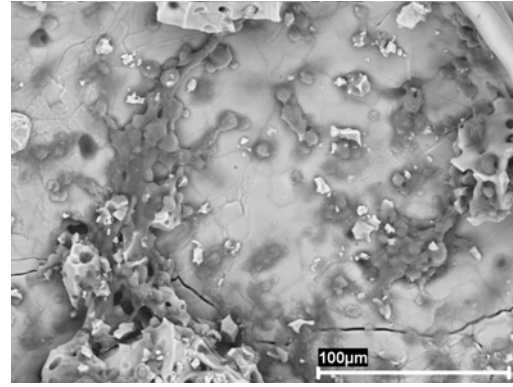
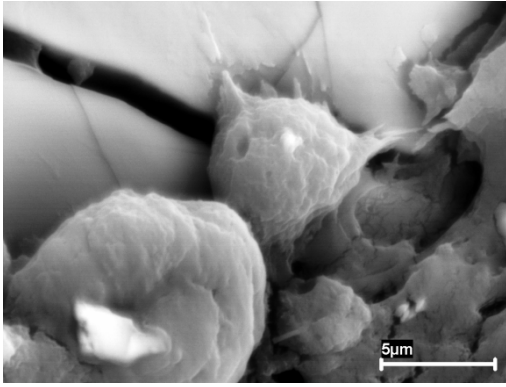
Las ventajas potenciales del uso clínico y experimental de células mesenquimales pluripotenciales o células madre, en contraposición a células diferenciadas, son la mayor capacidad de proliferación, incluso para individuos de edad avanzada, mayor respuesta a factores de crecimiento y moléculas señalizadoras, capacidad para diferenciarse a condroblastos u osteoblastos. (14). Esta última propiedad podría permitir al mismo injerto regenerar tanto el cartílago como el hueso subcondral. La cascada de diferenciación incluye la *adherencia* de células madre, que posteriormente se diferencian a unas células pequeñas y redondas, preosteoblastos, que a su vez se diferencian en células grandes redondas, osteoblastos (36).

Recientemente se han publicado varios estudios sobre el cultivo de células madre humanas y su diferenciación sobre armazones celulares como ya se ha descrito. Las células madre mesenquimales humanas son una fuente interesante de células ya que pueden extraerse de la médula ósea y expandirse y diferenciarse a osteoblastos *in vitro*.

El número de células madre aisladas de médula ósea es muy pequeño, por lo que se necesita realizar una condensación de la fase con mayor riqueza de dichas células madre para la siembra de los diferentes armazones, el proceso requiere un paso de diferenciación intermedio, por lo que se necesitan unas 3 – 4 semanas en cultivo para demostrar formación de hueso en una matriz de hidroxiapatita cálcica (19).

También ha sido estudiada la importancia de la porosidad del armazón, así como la diferencia entre realizar cultivos de manera estática o dinámica.

Con respecto a la estructura tridimensional de soportes que imiten el hueso, resulta importante la porosidad del armazón y el tamaño del poro. Mygind et al en 2007 (39) describieron en su estudio en armazones de hidroxiapatita coralina, que los tamaños de poro en torno a los 200 micrómetros albergaban menos células pero más diferenciadas, mientras que los armazones de tamaño de poro alrededor de 500 micrómetros albergan un número mayor de células, pero con un número menor de células diferenciadas, asimismo el cultivo dinámico resultó superior al cultivo estático en cuanto diferenciación celular y penetración en el armazón.



*Figs 2 y 3 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de osteoblastos cultivados sobre hidroxiapatita cálcica (Trabajo de suficiencia investigadora, José Couceiro)*

Liu, Lin y Roy en 2006 (30) compararon el cultivo en matriz tridimensional de manera dinámica con el mismo de forma estática, estudiando múltiples genes que codifican información para la matriz extracelular, proliferación, diferenciación, y crecimiento celular, resultando más importante la expresión de éstos en el cultivo de manera dinámica en relación al estático.

Por otra parte Baker y Mauck en 2007 (3) estudiaron el efecto de la alineación de las nanofibras en la maduración de armazones para regeneración de meniscos, tanto con células madre mesenquimales, como con fibrocondrocitos meniscales, en armazones con nanofibras alineadas y no alineadas, y como conclusión los autores destacan que los armazones con fibras alineadas sirven como micropatrón para dirección del crecimiento celular, y que cuando son sembrados con fibrocondrocitos meniscales o con células madre pluripotenciales adquieren propiedades mecánicas más favorables en comparación con los armazones con fibras no alineadas.

#### *1.2.2-Factores de señalización celular y factores de crecimiento :*

Existen varios factores de señalización celular, entre ellos se encuentran los mitógenos, los factores de crecimiento y los factores de supervivencia. Son factores reguladores positivos que influyen la progresión del ciclo celular, el crecimiento celular, y la supervivencia celular.

Los factores de crecimiento actúan localmente con efecto paracrino o bien de manera sistémica. Se ha demostrado que una gran cantidad de factores de crecimiento y diferenciación celular influyen tanto el crecimiento como la diferenciación *in vivo* e *in vitro*. Los factores de crecimiento y citocinas de especial importancia en el desarrollo óseo, incluyen las IGF (Insuline Growth factor, factor de crecimiento de la insulina), TGF  $\alpha$ , y TGF  $\beta$ , (transforming growth factor  $\alpha$  y  $\beta$ , factores de crecimiento transformante  $\alpha$  y  $\beta$ ) factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento epidérmico y proteínas morfogenéticas óseas (BMP).

#### *- Proteínas morfogenéticas óseas (BMP):*

Ésta extensa familia de proteínas ha suscitado gran interés desde la demostración por parte de Urist (49,50) en 1965 de que la matriz ósea desmineralizada implantada subcutáneamente

o intramuscularmente inducía la formación de hueso. A estos factores de la matriz que inducían la formación ósea, se los conoció como proteínas morfogénicas óseas (BMP, *bone morphogenetic proteins*). Las BMP son miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante  $\beta$ , (TGF -  $\beta$ ), y aunque su actividad fue identificada por primera vez por Urist (50), se conoció su estructura con la purificación y secuenciación de la BMP-3 bovina y la clonación de las BMP- 2 y BMP - 4 humanas en los años 80. A día de hoy hay unos 20 tipos de BMP caracterizados. Las formas de recombinantes de BMP- 2 y BMP- 4 inducen generación de hueso ectópico. La BMP- 2 puede regenerar defectos corticales mediante osificación endocranal. La BMP- 2 estimula el crecimiento y la diferenciación, de los condrocitos de la placa de crecimiento *in vitro*, y promueve la diferenciación de fenotipo osteoblástico en líneas celulares pluripotenciales murinas.

### 1.2.3-Armazones celulares:

Los biomateriales contribuyen, en la ingeniería de tejidos, a proporcionar una estructura denominada almacén, en el cual las células se siembran para proliferar y generar un sistema tisular.

La mayoría de los estudios, sugieren que un almacén es esencial para producir la regeneración ordenada del tejido. Aunque las células aisladas tienen la capacidad para reformar su estructura tisular respectiva, esto lo hacen sólo hasta un punto limitado ya que no tienen organización tisular intrínseca. Las células aisladas no pueden transplantarse en grandes cantidades ya que existen problemas para la difusión de los nutrientes, con éste objetivo se intenta sembrar células sobre armazones “inertes” que sirvan de estructura guía del desarrollo tisular (42).

En general un almacén está diseñado para producir una plantilla estructural para la adhesividad y el desarrollo tisular.

Los armazones varían con respecto a:

- La composición química del material (colágeno, agarosa, polímeros sintéticos...)
- Geometría (geles, redes fibrosas, esponjas porosas...)
- Estructura (porosidad, distribución, orientación, y conectividad del poro...),
- Propiedades mecánicas (resistencia compresiva, elasticidad...)
- Degradación.

La porosidad del almacén debe permitir el intercambio de nutrientes y productos de deshecho, mientras que tiene que proveer de un soporte físico adecuado para las células y la matriz extracelular.

Los armazones tienen que estar fabricados con materiales biocompatibles y preferiblemente biodegradables. En caso de poseer esta segunda propiedad el almacén debe reabsorberse a la misma velocidad a la que se forma la matriz extracelular.

Las propiedades mecánicas del almacén pueden determinar la mecanotransducción en el tejido en desarrollo, y por tanto si éste es adecuado o no para una aplicación particular de ingeniería de tejidos.



Varios estudios han investigado el efecto de la carga mecánica sobre células osteoblásticas *in vitro*. Akhouayri *et al* (1) estudiaron el efecto mecánico sobre osteoblastos de rata sembrados tridimensionalmente en un armazón de colágeno, comparando geles colágenos que flotaban en el medio sin tensión, geles sometidos a una tensión estática isométrica, y geles dinámicos que se encontraban flotando en el medio y eran sometidos a estímulos mecánicos de una manera periódica. Los autores concluyeron que las fuerzas aplicadas de manera estática aumentaron la diferenciación celular, y promovieron también la expresión de fosfatasa alcalina, y osteocalcina, ambos, marcadores de diferenciación osteoblástica.

Por tanto los armazones deben cumplir ciertos requisitos entre los que se encuentran, propiedades mecánicas similares a las del tejido a regenerar, biocompatibilidad y biodegradabilidad a un ritmo consistente con el del remodelado. (15,27,32,13).

Características de los armazones:

- Propiedades mecánicas similares a las del tejido a regenerar
- Biocompatibilidad
- Biodegradabilidad a un ritmo consistente con el remodelado en productos no tóxicos
- Manufacturables

### 1.3- BIOMATERIALES:

La conferencia de consenso del Instituto Nacional de Salud norteamericano (NIH) sobre aplicaciones clínicas de biomateriales define un biomaterial como:

*“Cualquier sustancia diferente a un fármaco, o combinación de sustancias con origen sintético o natural, que pueden ser utilizadas durante cualquier periodo de tiempo, como un sistema o parte de un sistema, que trata, aumenta, o reemplaza cualquier tejido, órgano o función del cuerpo”*

Existen biomateriales de dos tipos principales: biológicos y sintéticos.

Los biomateriales biológicos, pueden dividirse a su vez en blandos y duros.

En la práctica clínica, en la actualidad, hay cuatro clases de materiales sintéticos para implantes biomédicos. Estos son las biocerámicas, biometales, biopolímeros y compuestos.

En general cuando un material extraño se implanta en el organismo humano, no es completamente compatible y el tejido que lo rodea reacciona contra el implante de varias maneras dependiendo del tipo de material; estas reacciones se clasifican como :

- 1- *Bioinerte*: Se refiere a un material que una vez implantado en el organismo tiene una mínima interacción con el tejido circundante. Ejemplos de estos materiales son el

acero inoxidable, titanio, tantalio, así como aleaciones de estos metales, también la alumina, la zirconia parcialmente estabilizada y el polietileno de alto peso molecular.

- 2- *Bioactivos*: Materiales que una vez implantados interaccionan con el tejido óseo circundante, o incluso con los tejidos blandos. Esto ocurre mediante una modificación de la superficie dependiente del tiempo de contacto. Existe un intercambio de iones, entre el implante bioactivo y los fluidos, lo cual desemboca en la formación de carbonato de apatita biológicamente activa, que es similar o equivalente a la fase mineral del tejido óseo tanto cristalográficamente como químicamente. Ejemplos son el biovidrio y la hidroxiapatita de calcio.
- 3- *Bioreabsorbibles*: Materiales que al implantarse en el cuerpo comienzan a disolverse y lentamente son reemplazados por tejido circundante, tal como hueso, esto sucede por ejemplo con el fosfato tricálcico.

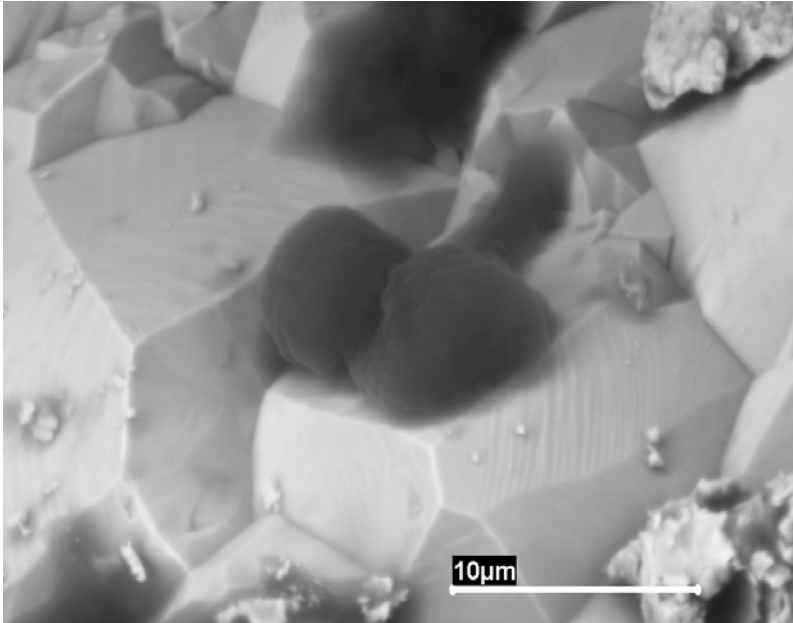
Desde mediados de los años 80, se han estudiado varias clases de materiales osteoinductores y osteoconductores (47,45).

La aproximación actual para producir construcciones por ingeniería de tejidos, incluye combinar células con un andamiaje. El armazón provee la integridad estructural inicial, así como el punto de inicio para que las células produzcan un tejido funcional (12).

Los armazones sirven principalmente como osteoconductores, ya que se deposita hueso nuevo desde el hueso vivo adyacente (17,12).

Pueden servir como vehículos para factores osteoinductores. También es posible sembrar los andamiajes con células que provean de un potencial osteogénico (12).

Las células se encuentran normalmente en un microambiente complejo. Este está formado por matriz extracelular, citokinas, factores de crecimiento, así como células adyacentes (12). Cuando una célula se une a un sustrato y forma adherencias, se generan fuerzas desde el citoesqueleto hasta estas uniones adhesivas. Se cree que las células crean unas adherencias más resistentes en relación directa a la rigidez del sustrato.



*Figura.4 INGENIERIA DE TEJIDOS  
SUPERFICIE, TIPO DE MATERIAL, ADSORCIÓN PROTEICA, ADHERENCIA, DISEMINACIÓN,  
MIGRACIÓN Y PROLIFERACIÓN.*

La rigidez del sustrato parece controlar la proliferación y la diferenciación dependiendo del tipo celular (12).

Aunque el concepto de que las células pueden percibir las propiedades mecánicas del tejido subyacente ha ido ganando aceptación, la base molecular no es aún bien conocida.

La investigación sobre diferentes materiales que se puedan utilizar para controlar la rigidez ha comenzado recientemente.

El efecto del tamaño de los poros del material sobre la osteogénesis *in vitro* ha sido demostrado en osteoblastos y células indiferenciadas.

Si se siembran osteoblastos de rata primarios sobre andamiajes con diferentes estructuras de poro, se encuentran más células en los andamiajes con tamaño de poro pequeño. Las células migran más rápido en los tamaños de poro más grandes (100 micras), el tamaño de poro no afecta la mineralización, ni a la penetración celular (13,12).

También ha sido estudiado el efecto del tamaño del poro *in vivo*.

En el trabajo inicial de Hulbert et al se fijó el tamaño mínimo de poro utilizable en 100 micras, mediante múltiples estudios se ha demostrado que la actividad de la fosfatasa alcalina, el contenido de osteocalcina, y la formación de hueso nuevo son mayores en los tamaños de poro entre 300 y 400 micras siendo por encima de este tamaño donde se pueden encontrar capilares (13).

### *1.3.1- Metales:*

Tienen múltiples aplicaciones biomédicas, debido a que sobrepasan al plástico o la cerámica en términos de resistencia ténsil, fatiga, y resistencia a la fractura. Asimismo poseen mejores capacidades de electroconductividad.

#### 1.3.1.1- *Metales típicos (46):*

Los materiales metálicos típicos, más habitualmente usados como biomateriales en la actualidad son:

- Acero inoxidable 316 L
- Aleaciones de Cromo – Cobalto
- Titanio Comercialmente puro
- Aleaciones de Ti – 6Al- 4V
- Aleaciones de Ni – Ti
- Tantalio

Estos materiales se desarrollaron inicialmente para su uso industrial, aplicándose después como biomateriales, aunque presentan diversos problemas:

- Toxicidad de los productos de corrosión
- Rigidez excesiva en comparación con el hueso
- Gravedad específica elevada
- Fracturas debidas a fatiga por corrosión y por fricción
- Falta de biocompatibilidad con los tejidos circundantes
- Afinidad para la integración con células y tejidos inadecuada
- Dificultad del examen por rayos X

#### 1.3.1.2- *Tantalio poroso:*

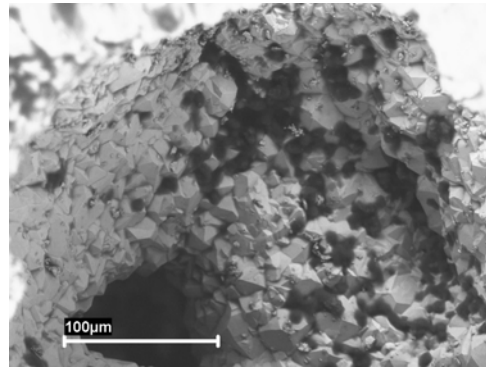
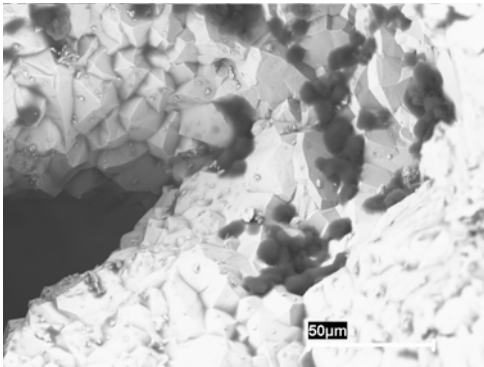
El tantalio es un elemento químico metálico, su símbolo es Ta, número atómico 73, peso atómico 180.948 (43), fue descubierto en Suecia por Anders Ekeberg en 1802 y se extrae principalmente de la tantalita mineral.

Ha habido interés en disponer de un biomaterial altamente poroso, capaz de rellenar defectos óseos y de resistir cargas fisiológicas a corto o largo plazo. Con una elasticidad similar a la del hueso, y poco inmunogénico (8,14).

Con este fin se desarrolló el tantalio poroso, un material que requiere de una mención especial. El tantalio poroso es, en peso, un 99% de tantalio y un 1% de carbón vítreo. Se fabrica mediante infiltración química de vapor, por la cual el metal de tantalio puro se precipita sobre un esqueleto de carbón vítreo reticular. Los brazos de tantalio se unen en puntos de intersección o nudos. La rigidez de la estructura aumenta al disminuir la porosidad. La rigidez en flexión aumenta con la densidad relativa elevado a una potencia de 1.2, se demuestra que es similar a la del peroné humano (14).

Findlay et al en el 2004 (15), compararon cultivos de osteoblastos sobre tantalio, titanio, y cromo – cobalto, en discos. No encontraron diferencias en la morfología celular entre los tres metales estudiados. La avidéz con la que las células se fijaban al tantalio era comparable a la de los otros dos metales y al plástico, tampoco se apreciaron diferencias en el número total de células o de divisiones celulares. Los autores concluyeron que el tantalio era un buen material para la adhesión, diferenciación y crecimiento de los osteoblastos humanos.

El tantalio poroso, es por tanto un material que resulta adecuado para múltiples aplicaciones ortopédicas.



*Figs 4 y 5 Imágenes de miscoscopía electrónica de barrido de osteoblastos cultivados sobre un armazón de tantalio poroso (Trabajo de suficiencia investigadora, José Couceiro)*

Debido a la composición de superficie y características físicas, se asume hoy en día, que éste tipo de soportes metálicos, favorecen la adherencia celular.

#### 1.3.1.3- *Modificación de superficie de los implantes metálicos (20):*

En los metales, debido a su configuración atómica, la superficie presenta unas propiedades diferentes al interior del material. Una superficie metálica, está normalmente cubierta de una película de óxido; ésta a su vez está cubierta por una capa de grupos hidroxilo.

La modificación de superficie es un proceso mediante el cual se cambia la composición de superficie de un material, su microestructura y morfología, manteniendo las propiedades mecánicas intactas. La modificación de superficie es muy importante en los biomateriales y tanto el procesamiento en seco, con rayo de iones, como el procesamiento hídrico, en solución acuosa, son técnicas predominantes en éste campo.

La cobertura del titanio con apatita mediante spray de plasma, el sputtering del nitrato sobre titanio, y la producción de capa de óxido de titanio con control de morfología mediante electrólisis, son procesos disponibles de manera comercial en el momento actual.

Los procesos de modificación de superficie se dividen en procesos en seco, y procesos hídricos.

##### - *Proceso en seco:*

La mayoría de éste tipo de procesos se realizan con rayo de iones. El rayo de iones permite la formación de capas delgadas a nivel atómico y molecular. El procesamiento mediante rayo de iones se puede clasificar según los efectos sobre superficie sólida como: formación de películas, sputtering (chisporroteo) e implantación de iones. Cuando un ión impacta la superficie de un material, los efectos de adhesión, sputtering e implantación, se producen según la energía del ión.

##### - *Proceso hídrico:*

Se lleva a cabo en solución acuosa. La capa modificada resultante cambia según los siguientes parámetros:

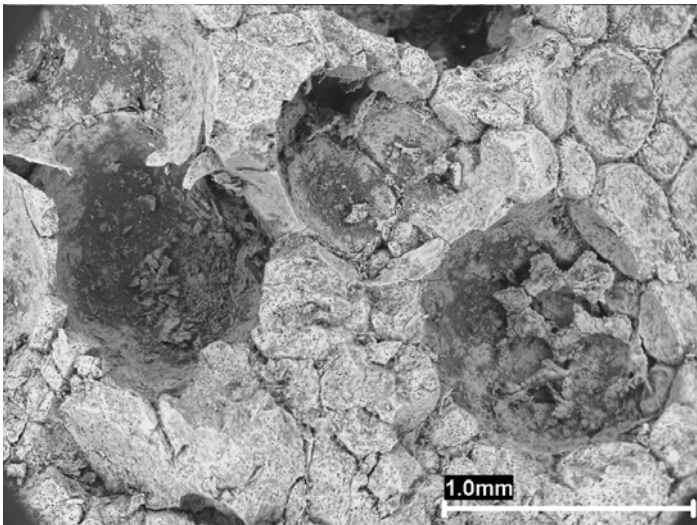
- Composición y pH de la solución acuosa
- Ganancia de potencial por electrólisis
- Densidad de la electrólisis

### 1.3.2 – Cerámicas:

Las cerámicas son compuestos de fosfato cálcico que han venido usándose en Ortopedia y Odontología desde los años 80 (10,13). La hidroxiapatita (HA), tiene una estequiometría similar a la del mineral óseo. Las cerámicas de hidroxiapatita (HA) y de fosfato tricálcico beta ( $\beta$ - TCP), han sido utilizadas para el relleno de defectos óseos, y es un dato bien conocido que son biocompatibles y osteoconductoras. Asimismo el  $\beta$  - TCP es bioreabsorbible (10,13).

Las cerámicas son materiales duros, con unas propiedades tensionales relativamente pobres, tienen generalmente una fuerza compresiva excelente, alta resistencia al desgaste, y propiedades de baja fricción en articulación. Pueden pulirse en gran medida, por tanto proveyendo una superficie de carga adecuada contra sí misma o contra superficies poliméricas en ambiente fisiológico.

Por sí mismas las cerámicas sintéticas no tienen potencial osteogénico u osteoinductor. Cuando se adhieren a tejido óseo sano, se produce osteoide por aposición directa, sin existencia de una interfaz de tejidos blandos (10).



*Fig 6 Hidroxiapatita cálcica vista con microscopía electrónica de barrido (Trabajo de suficiencia investigadora, José Couceiro)*

Una cerámica cuya construcción tenga menor densidad y mayor porosidad, nos provee de una interfaz mayor para la vascularización y el crecimiento óseo (13).

### 1.3.3 – Polímeros:

*“Compuestos formados por unidades más pequeñas habitualmente repetidas unidas por enlaces covalentes, estos compuestos forman con frecuencia grandes macromoléculas (biopolímeros, plásticos)”*, base de datos MESH del Instituto de Salud norteamericano (NIH).

Los polímeros pueden ser termoestables o termoplásticos, según su comportamiento térmico. Un polímero termoplástico, se puede fluidificar a alta temperatura y solidificar a baja temperatura varias veces. Por tanto un polímero termoplástico puede reformarse hasta cierto punto tras su fabricación. Por otra parte un polímero termoestable no se puede fluidificar a altas temperaturas, por tanto un polímero termoestable una vez fabricado, no puede reformarse sin destruir su estructura.

Los polímeros también se pueden caracterizar por su biodegradabilidad. Un material biodegradable es aquel que puede ser absorbido por el cuerpo humano una vez implantado en éste.

Los polímeros se pueden clasificar Según su comportamiento térmico en:

- Termoplásticos
- Termoestables

Según su biodegradabilidad en:

- Biodegradables
- no biodegradables

El uso de polímeros como biomaterial está muy extendido y entre sus aplicaciones se encuentran el uso del polietileno en las prótesis articulares, también en la fabricación de materiales compuestos o composites. También tienen uso en la fabricación de matrices sintéticas como vehículos de factores bioactivos, en éste último caso suelen ser homo u heteropolímeros de ácido poliláctico o poliglicólico. Los avances en el estudio de los polímeros han llevado al desarrollo de matrices capaces de vehicular varios factores con cinéticas diferentes.

#### 1.3.3.1- Colágeno:

El colágeno puede considerarse dentro del grupo de biomateriales naturales, constituyendo la principal proteína insoluble de la matriz extracelular y del tejido conectivo. Existen como mínimo 16 tipos diferentes de colágeno pero en el cuerpo humano, los predominantes son el tipo I, tipo II y tipo III. Estas moléculas de colágeno se empaquetan a modo de fibras delgadas de estructura similar, el tipo IV en cambio forma un retículo bidimensional. El tipo I es el principal componente de la piel y el hueso, es con mucho el tipo más común.

Una característica principal del colágeno es su estructura helicoidal de triple hebra, en la que tres cadenas polipeptídicas llamadas cadenas  $\alpha$ , se envuelven entre ellas para formar una superhélice cordonal. Los colágenos son muy ricos en prolina y glicina, ambos son importantes en la formación de la triple hélice. La prolina por su estructura en anillo,

estabiliza la conformación helicoidal en cada cadena  $\alpha$ ; la glicina es el aminoácido más pequeño, permite que las tres cadenas de colágeno se empaqueten para formar la superhélice.

Los colágenos tipo I, II, III, V y IX son colágenos formadores de fibrillas, tienen estructura cordonal, y tras ser secretados al espacio extracelular se ordenan como polímeros de orden superior llamados fibrillas de colágeno; éstas se organizan como fascículos denominados fibras de colágeno. Los colágenos tipos IX y XII se denominan colágenos asociados a fibrillas, se considera que unen las fibrillas entre ellas y con otros componentes de la matriz extracelular. Los colágenos IV y VII son colágenos formadores de redes, el tipo IV forma parte de la lámina basal, los tipo VII forman dímeros que se unen a estructuras denominadas fibrillas de anclaje, éstas ayudan a mantener unida la lámina basal de los epitelios multilaminares al tejido conjuntivo subyacente.

Las cadenas de colágeno se sintetizan como precursores más largos denominados procolágenos. En el retículo endoplásmico rugoso el procolágeno sufre una serie de reacciones de procesamiento. La glicosilación tiene lugar en el aparato de Golgi y en el retículo endoplásmico rugoso; residuos de galactosa y glucosa se unen a los de hidroxilisina, y residuos de asparagina se unen al propéptido C- terminal, se hidroxilan residuos de prolina y lisina en posiciones centrales de la cadenas, por último uniones disulfuro entre el C – terminal y el N – terminal de las cadenas alinean las tres cadenas para formar una triple hélice. Durante ó tras la exocitosis del procolágeno, las peptidasas procolágenas, eliminan los péptidos C- terminal y N – terminal. Esto produce como resultado la proteína denominada tropocolágeno (o colágeno) que está formada casi por completo por una triple hélice.

Por otra parte se ha observado que el cultivo de osteoblastos sobre colágeno de tipo I produce cambios consistentes con un fenotipo de osteoblastos más diferenciados, cuando se compara con su cultivo sobre plástico.

El colágeno como componente de la matriz extracelular puede ser un material de elección para su uso como armazón celular. Varios estudios han concluido que los armazones de colágeno pueden tener propiedades bioactivas, promoviendo la migración celular hacia el armazón. Los geles de colágeno fibrilar hidratados, no presentan resistencia mecánica inherente. Se han desarrollado varios métodos para mejorar las propiedades mecánicas de éstas sustancias. Así se pueden producir uniones cruzadas para aumentar la rigidez del armazón, pero esto afecta a sus características biomiméticas (6).

Bitar et al en 2006 (6), analizaron el crecimiento celular sobre armazones de colágeno densos, producidos mediante compresión doble o simple, concluyendo que eran más adecuados para la proliferación de osteoblastos los armazones producidos compresión simple.

#### 1.3.4 – Materiales compuestos o *Composites* (23):

Los materiales compuestos (en inglés *composites*) son materiales que contienen dos o más fases constituyentes distintas, en una escala mayor que la atómica. Tienen propiedades diferentes a la de sus constituyentes originales, generalmente tiene dos constituyentes, la



fase matriz, y la fase de refuerzo. La fase matriz es continua y provee la forma del conjunto, la fase de refuerzo, tal como partículas o fibras, es generalmente más dura que la matriz. Los materiales compuestos se pueden clasificar según la fase de refuerzo o la fase matriz. Según la fase de refuerzo pueden ser:

- Refuerzos de Fibra continua:

Aquellos con una tasa entre su longitud y su diámetro mayor de  $10^5$ . Los compuestos se denominan compuestos reforzados con fibras.

- Refuerzos de fibras cortas o cortadas:

Tienen una tasa entre su longitud y su diámetro entre 5 y 200, los compuestos resultantes, se llaman compuestos reforzados con fibras cortas o fibras cortadas.

- Refuerzos en pulverizado o en partícula:

Tienen una proporción de longitud en relación al diámetro de menos de 1 hasta aproximadamente 2, los compuestos resultantes son llamados compuestos con refuerzo de partículas.

También se pueden clasificar según la matriz utilizada. Se clasifican como compuestos con matriz metálica, matriz cerámica, y matriz polimérica.

Los materiales compuestos poseen muchas aplicaciones biomédicas potenciales, como fabricación de dispositivos de fijación interna o externa, así como reemplazamientos protésicos.



*Fig 7: foto de prótesis tipo EPOCH, ejemplo de material compuesto de polímero y metal en la práctica clínica,*

#### 1.4- BIOREACTORES (51):

Se entiende como biorreactor, un sistema que produce un ambiente especializado, tiene gran utilidad en los cultivos celulares, y en el campo de la ingeniería de tejidos.

Proveen idealmente un ambiente *in vitro* para el desarrollo rápido de estructuras tisulares. Los bioreactores están diseñados para cumplir una o más de las siguientes funciones:

- a- Establecer concentraciones espacialmente uniformes de células en el interior de armazones celulares
- b- Controlar las condiciones de los medios de cultivo (temperatura, Ph, osmolaridad, niveles de oxígeno, nutrientes, metabolitos, moléculas de regulación)
- c- Facilitar la transferencia entre las células y el medio de cultivo.
- d- Proporcionar señales físicas con relevancia fisiológica (cizallamiento, compresión, presión)

Los recipientes de cultivo funcionan en incubadoras (para mantener el Ph y la temperatura), con reemplazo periódico del medio e intercambio de gases continuo. Existen recipientes que pueden servir para cultivo estático o mixto con agitación magnética. Los recipientes rotatorios, contienen las construcciones suspendidas libremente en el medio de cultivo, entre dos cilindros concéntricos, el más interior de los cuales, sirve como una membrana de intercambio de gases. Realizar el cultivo celular de manera dinámica o estática produce diferencias tanto a nivel de diferenciación celular como de expresión génica.

#### - Adsorción de proteínas:

Cuando un material metálico se implanta en el cuerpo humano, se adsorben proteínas por parte del material.

La adsorción de proteínas influye la corrosión del material y por tanto la adhesividad celular. Asimismo la adsorción de proteínas, la desnaturalización y fragmentación de proteínas, la cual puede afectar la respuesta del organismo huésped.

Existen unas reglas generales sobre los factores que influyen la adsorción de proteínas(22):

- La hidrofobicidad exterior de la proteína y el aumento de la hidrofobicidad de la superficie adsorbente, aumentan la afinidad de superficie, sin verse muy afectado por el Ph de la solución o las variaciones de la fuerza iónica (mientras el pH o la fuerza iónica no afecten a la estructura de la proteína).
- Una correspondencia de cargas opuestas entre la proteína y la superficie de adsorción, aumenta la afinidad, esta disminuye cuando dejan de corresponderse.
- La disminución de la estabilidad frente a la desnaturalización de la proteína aumenta la afinidad por la mayoría de las superficies.
- El tamaño de la proteína cumple una función importante ya que el número de puntos de unión, y la superficie adsorbente de la proteína aumenta con el tamaño de ésta.

#### - Adsorción de células:

La adhesividad celular es una característica importante de los biomateriales. Para el desarrollo de materiales con mejor biocompatibilidad es necesario evaluar cuantitativamente la afinidad del material por las células. La fuerza de adherencia a un material está parcialmente determinada por la adsorción de proteínas a la superficie del material así como por la actividad de la propia célula.

Existen varios métodos para cuantificar la adhesión celular a la superficie de un biomaterial, estos incluyen:

- Recuento directo de células marcadas
- Recuento indirecto mediante tinción celular por espectrofluorimetría tras lisis celular
- Medición de densidad y área celular con técnicas ópticas.
- La técnica de microbalance con disipación (QCM-D) utilizando cristales de cuarzo es un método atractivo *in vitro*, para la caracterización de la adhesividad celular inicial en tiempo real y sin necesidad de intervenciones destructivas.

El cálculo de la masa adsorbida puede realizarse mediante la ecuación de Saurbrey, ésta puede enunciarse (35) como  $\Delta m = -C\Delta f/n$ , donde  $n = 1,3,5,7$  es el número del tono.

En el caso de células se debe tener en cuenta el efecto de amortiguación añadido. La amortiguación se mide como un cambio en el factor de disipación del cristal (D), el cual nos provee subsiguientemente de una idea de las características viscoelásticas de la capa adsorbida.

Modin et al en 2005 (35) utilizando el método QCM – D, concluyeron que el tantalio presentaba mayor diseminación de preosteoblastos MC3T3 – E1 cuando era comparado con el cromo – cobalto. Establecieron también que para obtener una medición más adecuada de la adhesividad celular, el medio utilizado en el experimento con el QCM preferiblemente no debía contener suero bovino.

#### - Adsorción de fibrinógeno:

El fibrinógeno y los productos de degradación de la fibrina, han sido detectados en concentraciones elevadas, en pacientes con tromboembolismo venoso, y también en traumatismos, procedimientos quirúrgicos, infecciones, neoplasias y anemia de células falciformes. Estando relacionado asimismo con la coagulación intravascular diseminada. La parte mejor caracterizada del proceso de la formación de trombos es la fase final de la cascada de la coagulación en la cual se convierte el fibrinógeno a fibrina por medio de trombina un enzima proteolítico. El fibrinógeno está compuesto por tres unidades globulares unidas por dos tubulares. La trombina corta el fibrinógeno y produce dos moléculas llamadas fibrinopéptidos. La molécula de fibrinógeno sin fibrinopéptidos se conoce como monómero de fibrina. Los monómeros de fibrina se ordenan espontáneamente en mallas fibrosas denominadas fibrina (4).

Progresivamente se produce la formación del trombo que se va estabilizando, mediante uniones tipo amida entre las cadenas laterales.

La adhesividad del fibrinógeno a los diferentes biomateriales, tiene importancia como medida de la hemocompatibilidad de los mismos.

## 2- *Objetivos:*

### - *Objetivo principal:*

- Estudio de la adherencia de células osteogénicas a distintos biomateriales de uso clínico
- El estudio comparativo de la adhesividad celular de osteoblastos de línea celular SAOS 2 sobre tantalio, titanio, y colágeno tipo Ia.

### - *Objetivos secundarios:*

- El estudio de la adhesividad de proteínas al tantalio, al colágeno tipo Ia y al titanio.
- El estudio del efecto sobre la adhesividad celular precoz de osteoblastos de línea SAOS 2, ejercido por la proteína BMP-2, en colágeno tipo Ia, titanio y tantalio
- El estudio de la hemocompatibilidad del tantalio, el titanio y el colágeno tipo Ia.

## 3-*Material y métodos:*

### - *Cultivos celulares:*

Se cultivaron osteoblastos de línea celular SAOS – 2 (ATTC LGC Promochem, Barcelona, España), en medio DMEM (Medio de Eagle modificado por Dubelcco) (Lonza, Verviers, Belgium) con suero bovino 50 ml / 500ml (FBS, Biowhitaker, Lonza, Verviers, Belgium) y gentamicina 650 microlitros / 0.5 ml (Genta-Gonbens, laboratorios Normon S.A., Madrid, España) a 37 °C de temperatura y 5% de CO<sub>2</sub>, hasta que alcanzan confluencia, se tripsinizan con 5ml de tripsina bovina (SAFC Biosciences; Lenexa, Kansas USA) en cabina de flujo laminar (telstar advanced technologies; Terrasa; Spain), se centrifugan durante 3 minutos a 1500 revoluciones (Baxter, Deerfield, IL, USA). Se resuspende en medio DMEM sin suero y se generan alícuotas de 1ml en tubos Eppendorf, a una concentración de 300.000 células / ml, medidas mediante coulter (Beckman coulter inc, Fullerton, CA, USA), en los experimentos con células pretratadas se utilizó BMP-2 (Wyeth Pharmaceuticals, Arcola, Pennsylvania, USA), en una sola dosis de 10 ng/ml incubando las células posteriormente durante 24 y 48 horas .

### - *Análisis de adhesividades y propiedades viscoelásticas mediante técnica de microrbalance con cristales de cuarzo (QCM):*

Para nuestro estudio se utilizó un equipo QCM Q – Sense E4, (Qsense AB; Hångpilsgatan, Västra Frölunda, Sweden). Asimismo se utilizaron discos de oro recubiertos de colágeno tipo Ia (cellmatrix gel culturing Kit, Wako pure chemical industries, Ltd; Osaka, Japan), titanio, y tantalio.

Con la bomba peristáltica suministrada con el equipo funcionando a 90 microlitros/minuto, primero se hizo pasar con medio DMEM sin suero, hasta conseguir una línea de base estable, en el caso del colágeno se utilizó el gel de colágeno tipo Ia para realizar un

recubrimiento sobre los discos de oro, en los experimentos con proteína se utilizó BMP-2 (Wyeth Pharmaceuticals, Arcola, Pennsylvania, USA), 1mg/ml, alicuotada en tubos Eppendorf, como control se utilizó albúmina bovina (Sigma – Aldrich, Steinheim, Gmbh) 1mg / ml alicuotada en tubos Eppendorf, hasta obtener una línea de base estable. Una vez alcanzada una línea de base estable; se hicieron pasar los osteoblastos de línea celular SAOS – 2 en medio DMEM sin suero, hasta alcanzar una línea de base estable.

En el caso de los estudios con fibrinógeno para hemocompatibilidad, se calibró igualmente con DMEM sin suero, y posteriormente se hizo pasar fibrinógeno humano (Haemocomplettan P, Zlb Behring, GMBH), a una concentración de 1mg / ml sobre superficies de tantalio y titanio con la bomba peristáltica del equipo funcionando como se ha mencionado previamente.

Un QCM consiste de un cristal de cuarzo en forma de disco intercalado entre dos electrodos, cuando el cristal se excita por una corriente alterna, resuena con una frecuencia que depende de la masa oscilante total, incluida el agua asociada. Así una capa adsorbida con propiedades viscoelásticas amortiguará la oscilación del cristal(22,33).

El principio mediante el que funcionan los dispositivos de medición acústica son las propiedades piezoeléctricas de ciertos materiales cristalinos, el material más comúnmente usado es el cuarzo –  $\alpha$ , una forma cristalina del dióxido de silicio  $\text{SiO}_2$ , los resonadores en base a cristal de cuarzo tienen una característica extremadamente importante, tienen un valor de factor Q muy elevado, el factor Q es un factor de disipación que sirve para medir pérdidas de fricción. Los resonadores de cristal de cuarzo también son capaces de mantener con gran precisión una frecuencia constante.

En un material resonador piezoeléctrico, una masa y una corriente eléctrica oscilan simultáneamente, por tanto la función de un QCM se puede representar mediante sus propiedades eléctricas o mecánicas, por tanto ambos modelos físicos el eléctrico o el mecánico son válidos en lo que respecta a su funcionamiento.

En condiciones óptimas, los cambios de masa absolutos, de hasta 0.5 ng se pueden detectar mediante la ecuación de Sauerbrey  $\Delta f = [-(0.057 \text{ Hz cm}^2 \text{ ng}^{-1}) \Delta m]/A_e$ , donde  $A_e$  es el área activa del electrodo, la huella geométrica, no el área total externa e interna.

Sin embargo, cuando la película adsorbida no es rígida, si no que se comporta como un sistema viscoelástico, como es el caso de una capa de células, el agua atrapada entre las capas y los efectos disipativos, pueden interferir con el cálculo de la masa adsorbida (33).

En nuestro estudio se utilizó el modelo Viscoelástico de Voigt (52), incluido en el software del equipo Q – Sense.

#### *- Estudio con microscopía electrónica de barrido (SEM)*

El Microscopio Electrónico de Barrido (**SEM**) permite la observación de la superficie de materiales orgánicos e inorgánicos, obteniendo imágenes de hasta 290.000 aumentos y una resolución de hasta 4nm en condiciones de alto vacío y 6nm a presión variable. El funcionamiento se basa en la incidencia de un haz electrónico sobre una muestra conductora. El electrónico se enfoca en un punto y escanea la superficie. Como resultado de la interacción del haz electrónico con la muestra se produce la emisión de señales: electrones retodispersados, electrones secundarios o rayos X entre otros. Estas

señales son captados por detectores que los procesan, son amplificados y transformados en señales eléctricas como píxeles a un monitor.

Los **electrones retrodispersados (BSE)** se forman cuando un electrón del haz incidente de exploración impacta contra un átomo de la muestra es desviado en la misma dirección, en sentido contrario. El número de electrones retrodispersados varía directamente con número atómico (Z) de muestra. A mayor Z, aumenta la probabilidad de choque, obteniéndose más respuesta. Las imágenes de retrodispersados proporcionan información composicional e topográfica.

Los **electrones secundarios (ES)** se forman cuando un electrón del haz incidente colisiona con un electrón de los átomos de muestra, expulsando a este último de la capa. Cada electrón incidente puede producir muchos ES. Los electrones secundarios son muy poco energéticos (50eV) e proporcionan información de la capa más superficial de muestra.

La formación de **Rayos X (RX)** está vinculada a la vacante electrónica causada por el electrón secundario. Un electrón de la capa superficial del átomo pasa a ocupar ese vacío produciéndose una pérdida de energía que da lugar al Rayo X característico. La señal de Rayos X se utiliza en el sistema de microanálisis EDX, que permite detectar elementos químicos a partir del Berilio.

Características del Microscopio Electrónico de Barrido LEO-435VP con Microanálisis (EDX):

- Voltaje variable entre 0,3 e 30 kV.
  - Magnificación comprendida entre 15x hasta 290.000x y resolución de 4mm (alto baleiro) y 6nm (presión variable).
  - Detectores: detector de electrones secundarios (**ES**), detector de electrones retrodispersados (**QBDS**) y detector de Rayos X (**X-Ray**).
  - Sistema de Microanálisis EDX, que permite detectar elementos químicos a partir del Berilio.
- Preparación de muestras para SEM:

Las muestras analizadas mediante esta técnica deben ser sólidas, incluyendo también los residuos sólidos de cualquier tipo de muestra obtenidos por desecación, calcinación o filtración. Todas las muestras deben estar deshidratadas, ser conductoras, resistir las bajas presiones (vacío) y en la medida de lo posible tener una alta producción de electrones secundarios.

Las muestras rígidas e non deformables pueden ser secadas al aire y si se desea una imagen de alta calidad es recomendable sombrearlas con oro, oro-paladio ( nuestro caso) o carbono, proceso que se realizó en los siguientes equipos: Metalizador automático-manual VG MICROTECH , Punto crítico VG MICROTECH.

En el caso de las muestras biológicas es necesario realizar una serie de procesos con la finalidad de mantener las estructuras en las condiciones más próximas a las vitales. En este caso se puede realizar una fijación con formaldehído (nuestro caso) o con tetraóxido de osmio seguido de una deshidratación con etanol o con acetona. Estas muestras se secan por medio de la técnica del punto crítico que permite que no se produzcan retracciones y

artefactos debido a las tensiones superficiales en la interfase líquido-gas, que, en definitiva distorsionarían la muestra.

*- Estudio con microscopía láser confocal:*

Para control de la morfología celular sobre gel de colágeno se utilizó microscopía láser confocal (Leica microsistemas S.A., Barcelona, España). El principio de la microscopía confocal fue descrito inicialmente por Minsky en 1957 (31), propuso que tanto la iluminación (el condensador), como el sistema de observación (el objetivo), están enfocados en un mismo punto (tienen puntos focales comunes), de ahí el nombre confocal, esto aumentó importantemente la resolución axial (z) y lateral (x,y), permitiendo una magnificación mucho mayor (26).

La microscopía confocal se ha utilizado para el análisis morfológico de materiales, gatti et al en 2006 (16), estudiaron la morfología del titanio y la morfología celular mediante éste método, añadiendo una cámara de flujo, concluyeron, que era adecuado para la detección de la viabilidad, y morfología de los osteoblastos vivos, sembrados no solo en metal si no en otras superficies opacas, tales como los polímeros o las biocerámicas.

Se utilizó un marcador fluorescente verde CMFDA (5 – Clorometilfluoresceín diacetato) (Celltracker, Molecular probes inc., OR, USA), siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante se procedió al marcaje celular mediante 5 microlitros de CMFDA, se mantuvo los discos sin contacto con la luz durante 20 minutos, y se procedió a realizar un lavado con medio DMEM con suero bovino 50 ml / 500 ml y gentamicina 650 micorlitros / 0.5 ml. El análisis de imágenes se realizó con el paquete de análisis de imágenes del instrumento (LCS, Leica confocal software, Leica microsistemas S.A., Barcelona, España).

*- Estudio mediante microscopía de fuerza atómica:*

El control de rugosidad de superficie de materiales y de las proteínas en superficie, se realizó mediante microscopía atómica de fuerza (AFM) (Nanotech, Madrid, España). La microscopía atómica de fuerza fue descrita originalmente por Binnig en 1986 (5); la microscopía de fuerza atómica se puede entender como se sugería en el artículo de su descripción inicial de una manera similar a la que tienen los infantes de entender el mundo tocando y notando los objetos(18).

Tiene múltiples aplicaciones tales como electrónica semiconductores o biomateriales (18). Un AFM se compone de un microbalancín (40), con una punta afilada montada en un dispositivo piezoeléctrico; y un fotodetector sensible a posiciones, éste se utiliza para recibir la señal de un rayo láser que proporciona la información sobre la posición del microbalancín.

Los modos en los que funciona son principalmente tres (40): sin contacto, con contacto y modo dinámico. En el modo de no contacto, la punta del microbalancín se encuentra oscilando entre 50 – 150 armstrongs con respecto a la superficie de la muestra, para detectar las fuerzas de atracción de Van der Waals entre la muestra y el microbalancín. Genera de esta manera imágenes topográficas. El modo de no contacto presenta problemas en relación a las fases líquidas siendo éste un inconveniente principal de éste método.

En el modo contacto también conocido como modo por repulsión, la punta está en contacto directo con la superficie mientras explora la superficie, su principal punto en contra es que la oscilación de la punta tiende a dañar las muestras biológicas blandas, creando una distorsión en las imágenes generadas.

En el modo dinámico, el microbalancín se hace oscilar y contactar ligeramente con la superficie, cuando la punta cruza por un relieve la amplitud de oscilación disminuye, cuando cruza sobre una depresión la amplitud de oscilación aumenta. Los cambios de oscilación se miden, así se genera la topografía de superficie.

La AFM se puede utilizar también para hacer estudios de superficie mediante indentación, rayado o pruebas de desgaste.

- Los cálculos de masa se realizaron con el paquete matemático suministrado con el equipo Q- Sense.

- Cálculos estadísticos con paquete SPSS 14.0, (SPSS, Chicago, IL, USA)

#### 4.- Resultados:

El análisis de resultados se realizó comparando intervalos de confianza de los diferentes grupos. En lo que respecta a la adhesividad de los osteoblastos sobre Tantalio, Titanio y colágeno tipo Ia, se registró una viscosidad media ( $\text{Kg/m}^2$ ) superior en Ta en relación al Ti, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (tabla 1).

También se registró una mayor viscosidad media en el grupo del colágeno Tipo Ia, que a su vez resultó estadísticamente significativa, sin embargo al comparar en éste último grupo la viscosidad media del gel colágeno con el mismo parámetro para gel con células, se registró una mayor viscosidad en el caso del gel colágeno sin células con una diferencia estadísticamente significativa (tabla 1), a pesar de ser confirmada la presencia de osteoblastos en el gel mediante microscopía láser confocal (fig 13 y 14), éste resultado es atribuible a la importante viscosidad del gel colágeno, y a resultar éste menos estable en cuanto a su adherencia a la superficie de los cristales de oro.

Variable	Viscosidad Media	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%
Ti Saos	0.0032518 ( $\text{kg/m}^2$ )	1.94e-07	0.0032514 – 0.0032521
Ta Saos	0.0037898 ( $\text{Kg/m}^2$ )	6.82e-07	0.0037884 – 0.0037911
Col Saos	0.0058692 ( $\text{Kg/m}^2$ )	3.00e-07	0.0058686 – 0.0058698
Gel col	0.0059784 ( $\text{Kg/m}^2$ )	7.52e-07	0.0059769 – 0.0059799

Tabla 1

Éstos hallazgos resultaron consistentes con las gráficas de viscosidad frente a tiempo obtenidas en nuestro equipo Q- Sense (Fig 8, 9 y 10). La presencia de osteoblastos en la superficie del cristal se comprobó mediante microscopía electrónica de barrido en el caso de



los cristales de Titanio y Tantalio (Figs 11, 12, 13 y 14), y mediante microscopía láser confocal en el caso del colágeno Tipo Ia (Figs 15 y 16). El estudio de rugosidad mediante microscopía de fuerza atómica obtuvo un resultado de rugosidad media (RMS) de 2.62316 nm para Tantalio y de 2.12679 nm para Titanio, siendo mayor la del primero, la altura media resultó ser de 6.74427 nm para Tantalio y de 7.64526 nm para Titanio. Las imágenes de microscopía de fuerza atómica se muestran en las figuras 17 y 18.

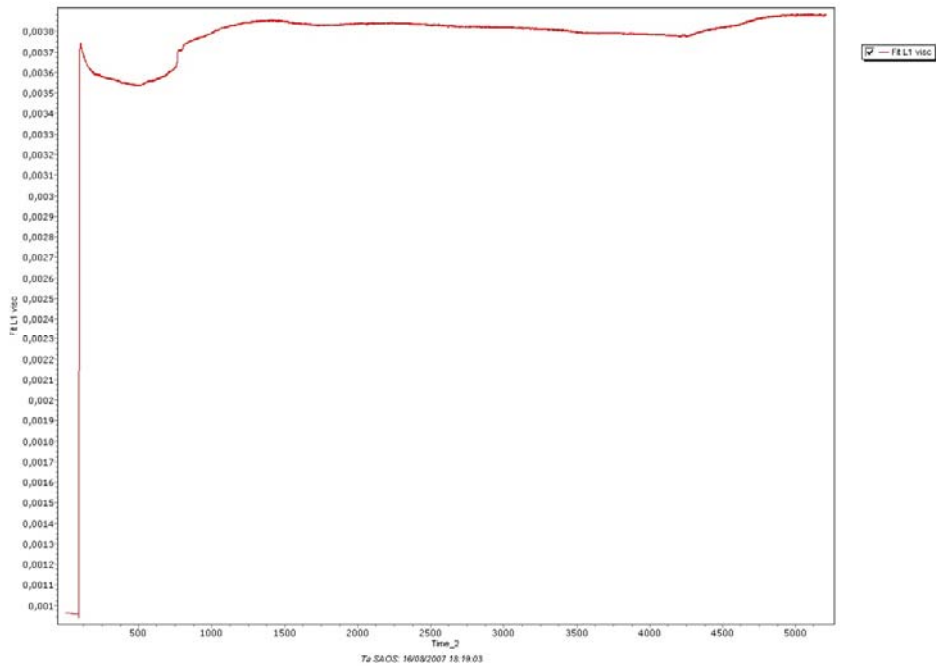


Fig 8 Gráfica de viscosidad de osteoblastos ( $Kg/m^2$ ) frente a tiempo (seg) en superficie de Tantalio

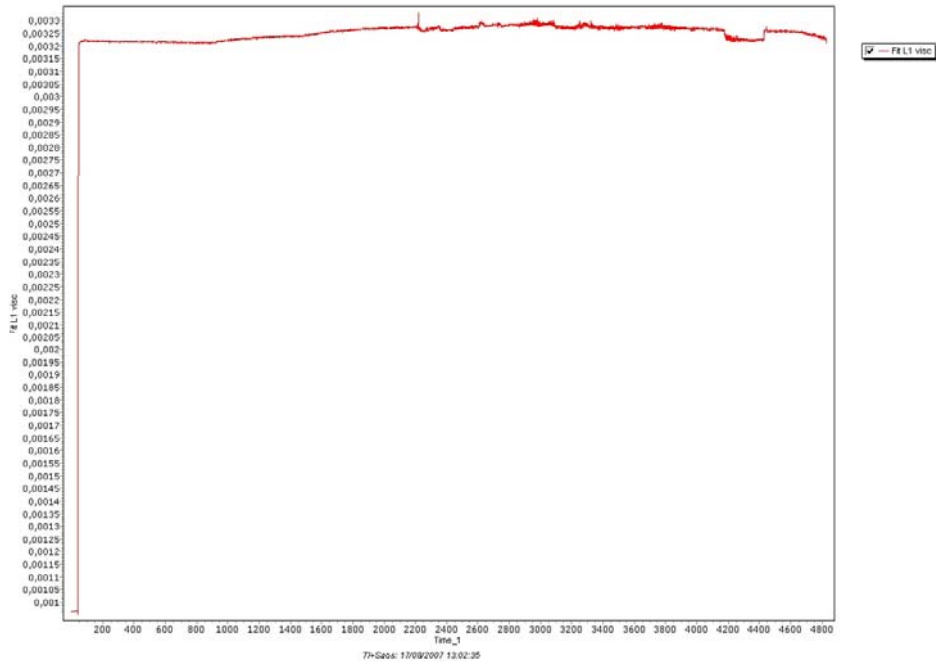


Fig 9 Gráfica de viscosidad de osteoblastos ( $\text{Kg/m}^2$ ) frente a tiempo (Seg) en superficie de Titanio

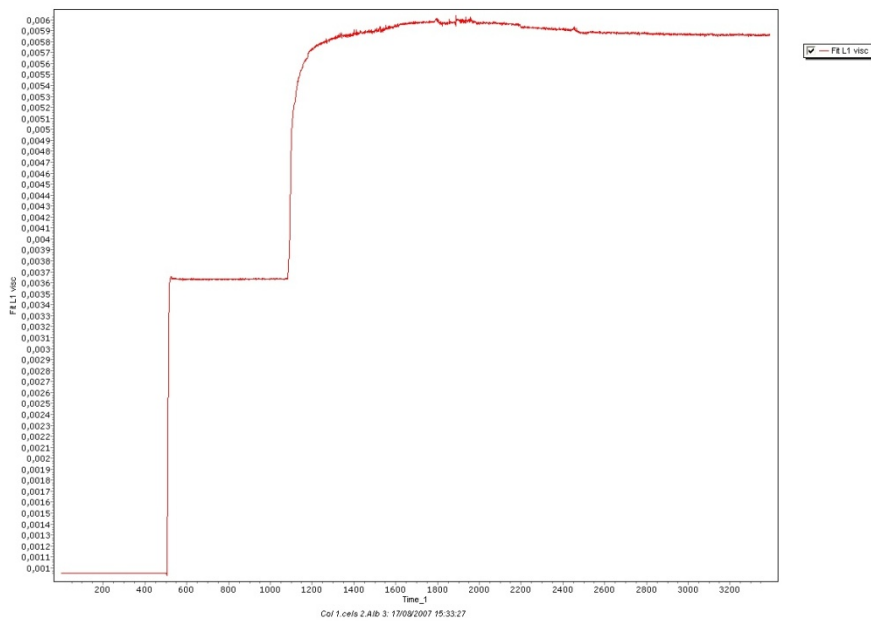
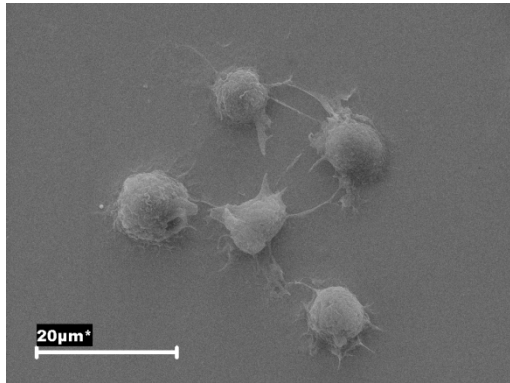
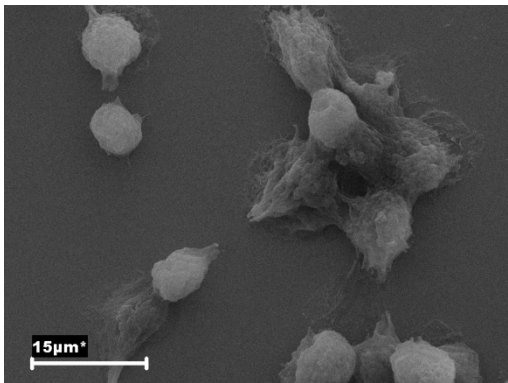
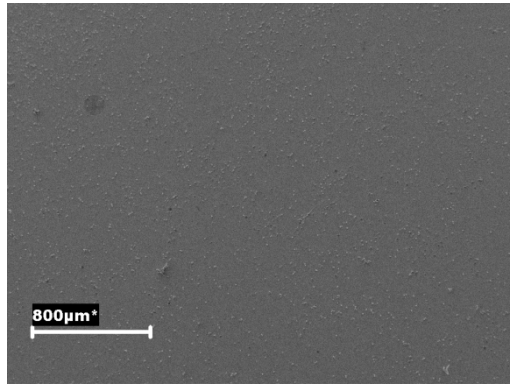
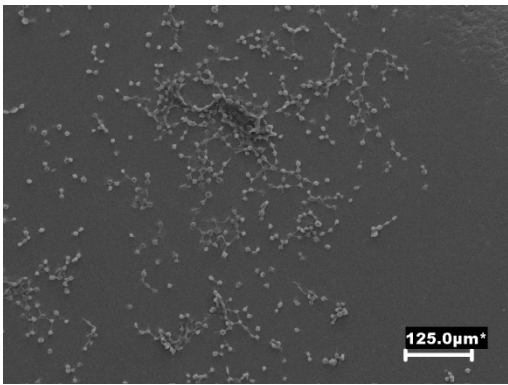
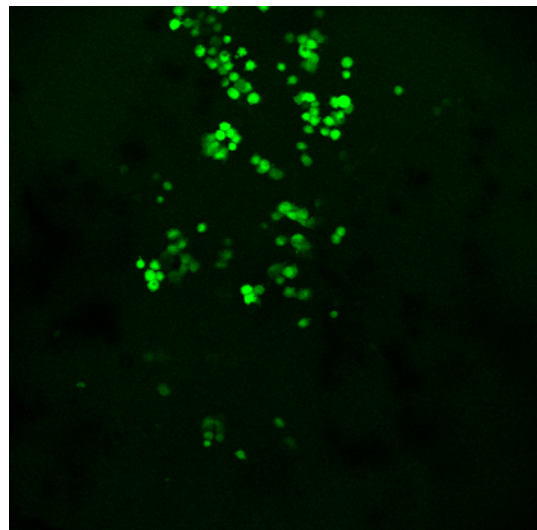
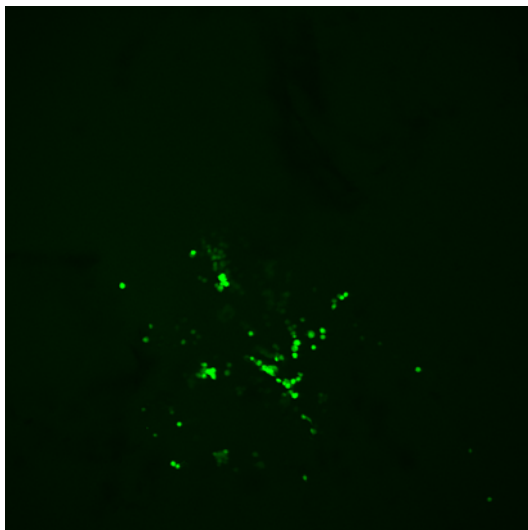


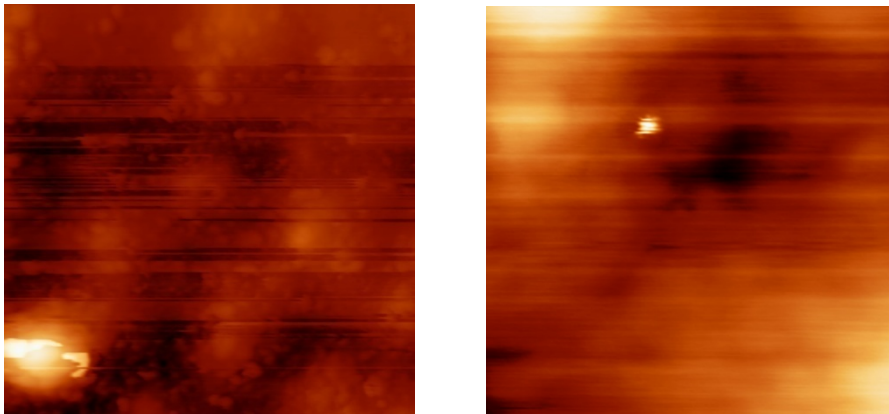
Fig 10 Gráfica de viscosidad de osteoblastos ( $\text{Kg/m}^2$ ) frente a tiempo (Seg) con gel de colágeno



*Fig 11 y 12 (Izquierda) imágenes de microscopía electrónica de barrido mostrando células SAOS- 2 sobre una superficie de Titanio. Figs 13 y 14 (derecha) imágenes de microscopía electrónica de barrido que mostrando células SAOS –2 sobre una superficie de Tantalio.*



*Figs 15 y 16 Imágenes de microscopía láser confocal de capa de colágeno tipo Ia con células SAOS - 2*



*Fig 17 (Izquierda) Imagen de microscopía de fuerza atómica de superficie de Tantalio, Fig 18 (Derecha) Imagen de microscopía de fuerza atómica de superficie de Titanio*

Para el análisis de los datos de la adhesividad de la BMP –2 y la albumina a titanio y tantalio, se aplicó la ecuación de Sauerbrey, y se extrajeron los datos correspondientes con las líneas de base. Los resultados del análisis se muestran en la tabla 2.

	Área/masa Media	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%
Albúmina en Ta	5353.953 ng/m <sup>2</sup>	0.191944	5353.576 – 5354.329
BMP-2 en Ta	6061.896 ng/m <sup>2</sup>	0.4041777	6061.076 – 6062.662
Albúmina en Ti	5634.398 ng/m <sup>2</sup>	0.3706688	5633.67 – 5635.125
BMP – 2 en Ti	6867.471 ng/m <sup>2</sup>	0.6885749	6866.118 – 6868.824

*Tabla 2*

Obtuvimos un área/masa media de albúmina (ng/m<sup>2</sup>) superior en Titanio con respecto a Tantalio, esto resultó estadísticamente significativo, asimismo obtuvimos un área/masa media (ng/m<sup>2</sup>) de BMP –2 superior en el Titanio con respecto al Tantalio, resultando ésta diferencia estadísticamente significativa. Las gráficas de área/masa frente a tiempo se muestran en las figuras 19 – 22.

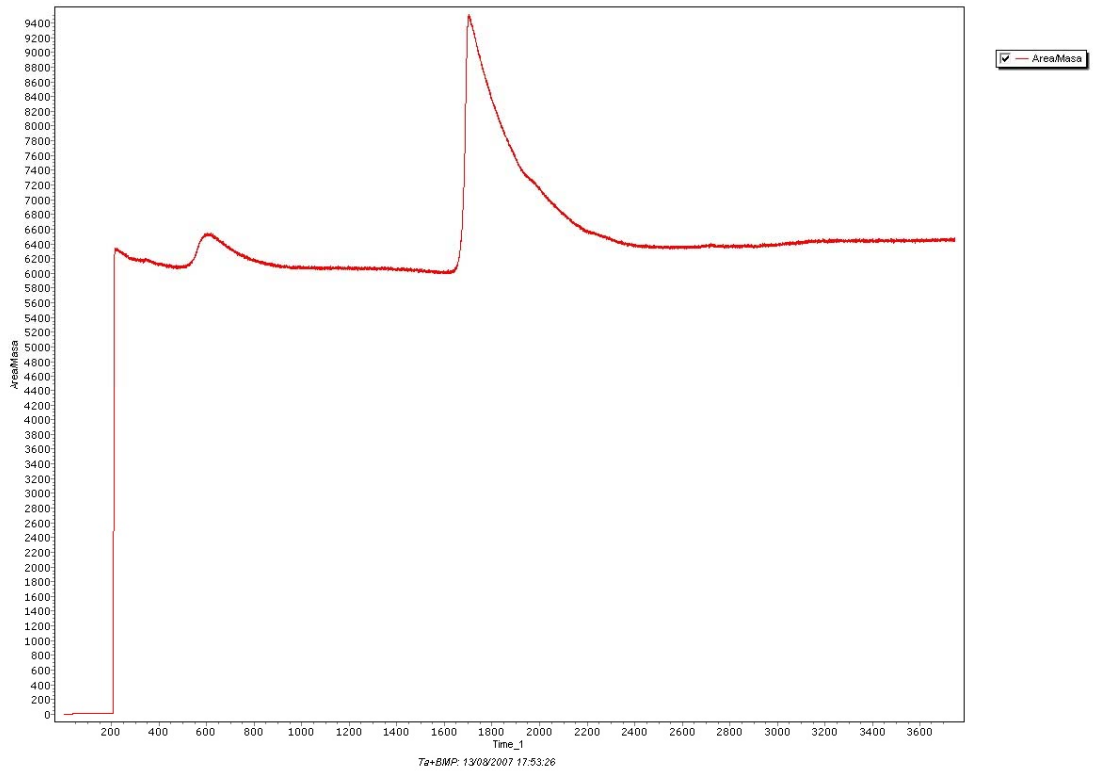


Fig 19 Gráfica de área/masa de Ta con BMP-2 y células SAOS - 2

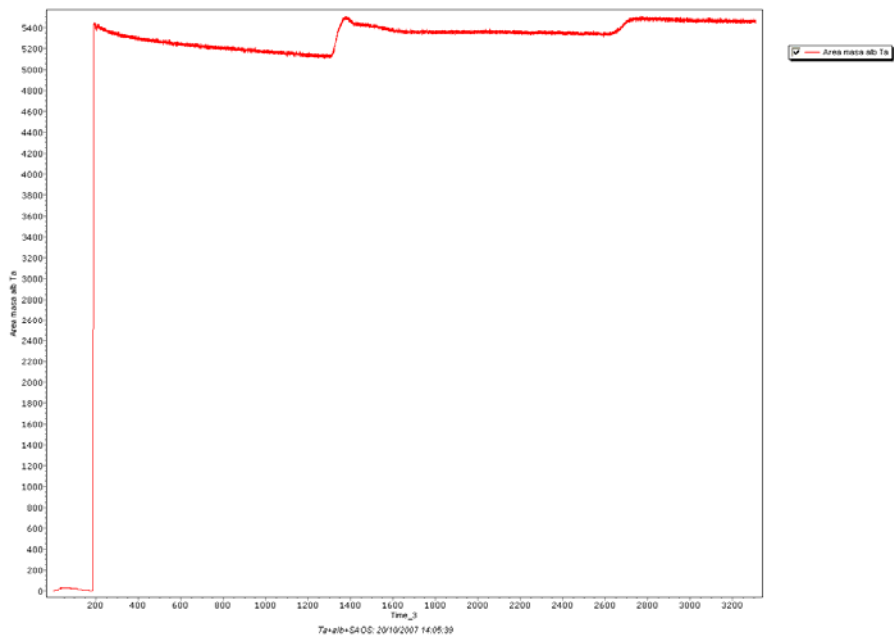


Fig 20 Gráfica de área/mas de Ta con albúmina y células SAOS -2



Fig 21 Gráfica de área/masa de Ti con BMP-2 y células SAOS –2

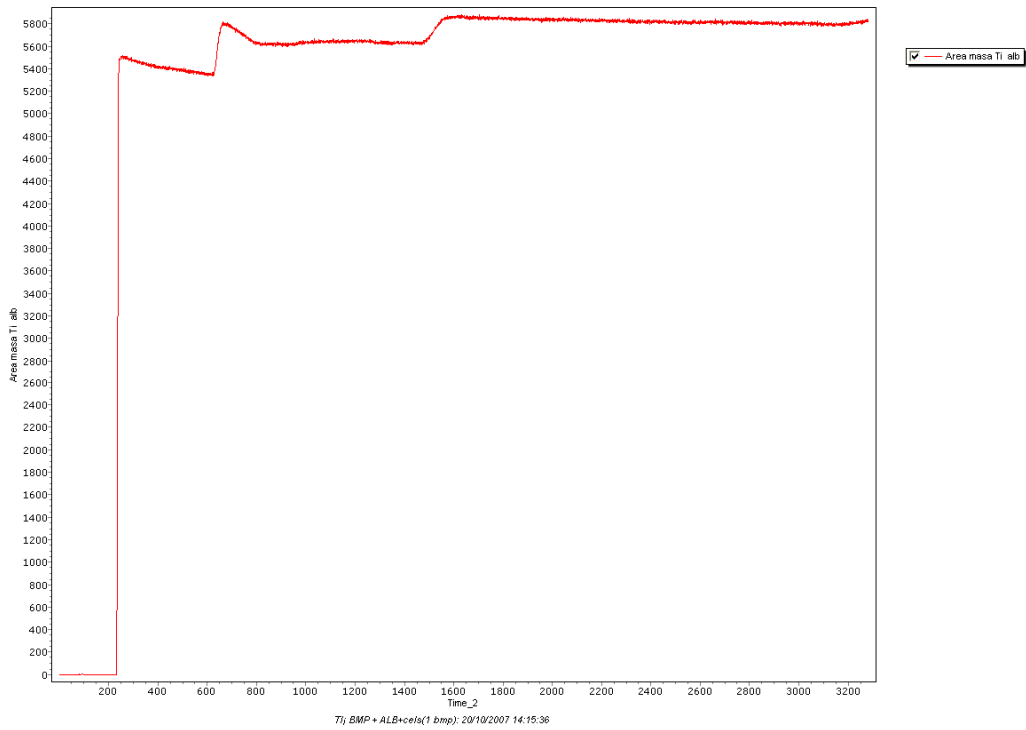


Fig 22 Gráfica de área /masa de Ti con Albúmina y células SAOS –2

El efecto de la BMP-2 sobre la adhesividad celular se estudió extrayendo los datos de las líneas de base correspondientes. Los resultados del análisis de intervalos de confianza al 95% se muestran en la tabla 3.

	Viscosidad media	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%
SAOS-2 sobre Ta con albúmina	0.0037612 (Kg/m <sup>2</sup> )	5.18 e -07	0.0037611 – 0.0037613
SAOS-2 sobre Ta con BMP-2	0.0037467 (Kg/m <sup>2</sup> )	2.44 e -07	0.0037462 – 0.0037472
SAOS-2 sobre Ti con albúmina	0.0038422 (Kg/m <sup>2</sup> )	9.92 e -08	0.003842 – 0.0038424
SAOS-2 sobre Ti con BMP-2	0.004072 (Kg/m <sup>2</sup> )	2.97 e -07	0.0040714 – 0.0040725
SAOS-2 pretratadas 24 h con BMP-2 sobre Ta	0.0039873 (Kg/m <sup>2</sup> )	1.41 e -07	0.003997 – 0.0039976
SAOS-2 pretratadas 24 h con BMP-2 sobre Ti	0.0042505 (Kg/m <sup>2</sup> )	1.41 e -07	0.0042503 – 0.0042508
SAOS-2 pretratadas 48 h con BMP-2 sobre Ta	0.0039769 (Kg/m <sup>2</sup> )	4.00 e -07	0.0039761 – 0.0039776
SAOS-2 pretratadas 48 h con BMP-2 sobre Ti	0.0041896 (Kg/m <sup>2</sup> )	1.86 e -07	0.0041893 – 0.00419

*Tabla 3*

Obtuvimos una viscosidad media superior en los cristales de Titanio comparándolos con el Tantalio si se adhería previamente una capa de BMP-2, o de albúmina, siendo más importante la diferencia en el caso de la BMP-2, ésto resultó estadísticamente significativo.

En los experimentos con SAOS- 2, pretratadas con BMP-2, se obtuvo una viscosidad media superior a la obtenida creando la capa de BMP –2 sobre el cristal, con diferencia estadísticamente significativa. También se apreció una diferencia en la viscosidad cuando se comparó la adhesividad celular pretratando las SAOS –2 a 24 h y 48 h, con BMP –2. La mayor viscosidad se registró en el grupo de 24 horas, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Las gráficas de representación de viscosidad frente al tiempo se muestran en las figuras de la 23 a la 30.

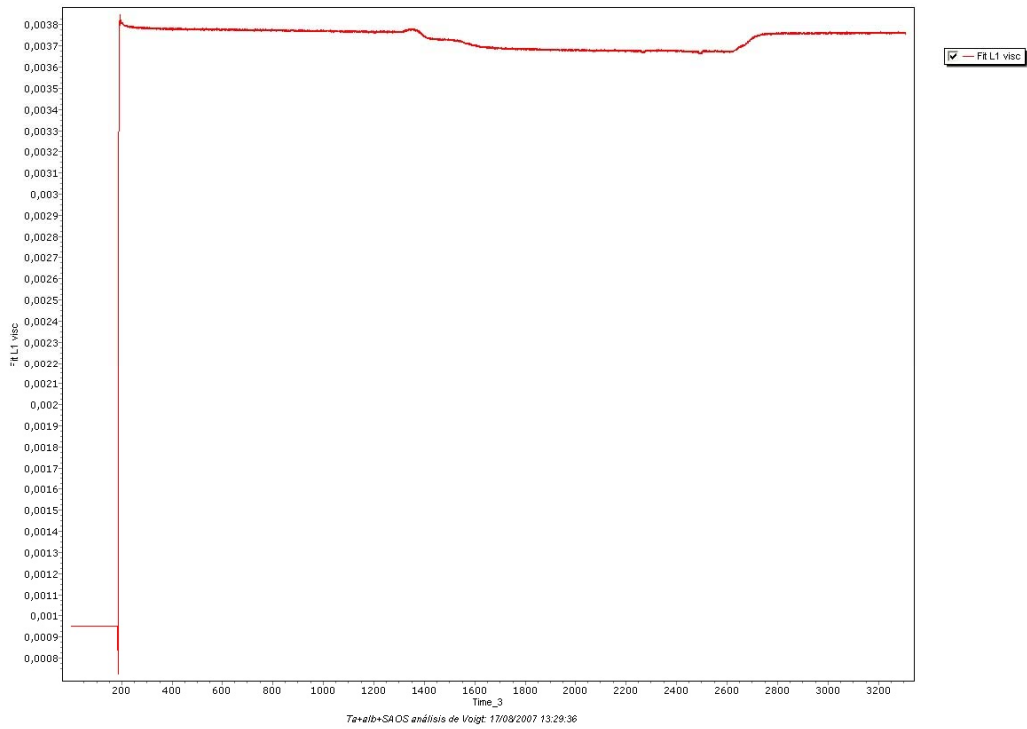


Fig 23 Gráfica de representación de viscosidad frente a tiempo de SAOS –2 sobre Ta con una capa de albúmina

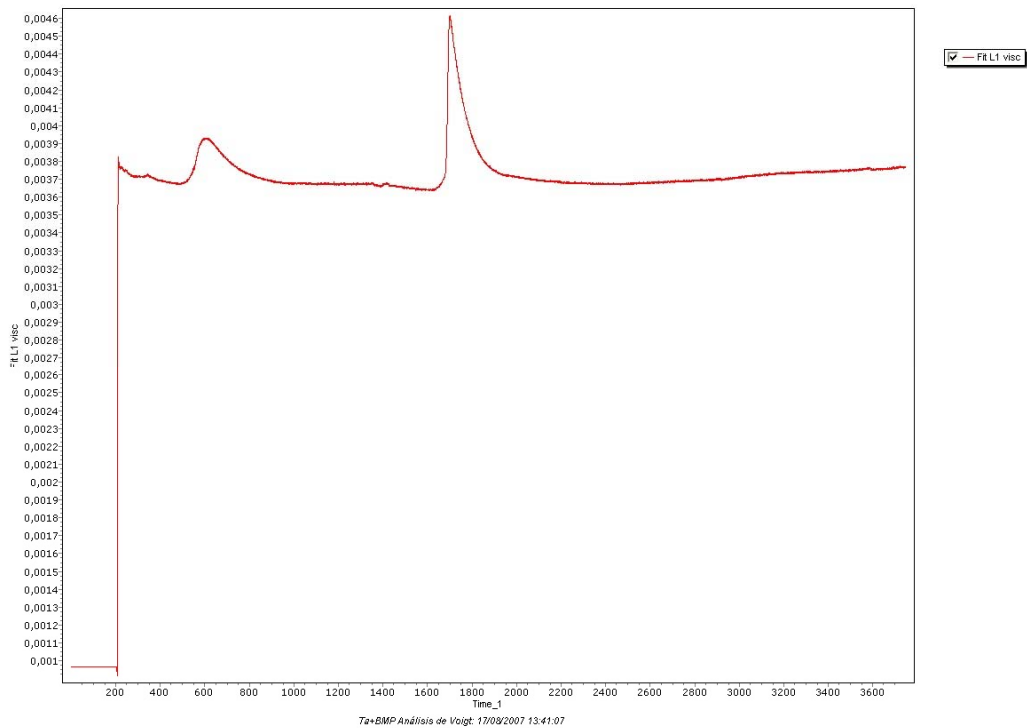


Fig 24 Gráfica de representación de viscosidad frente a tiempo de SAOS –2 sobre Ta con una capa de BMP –2



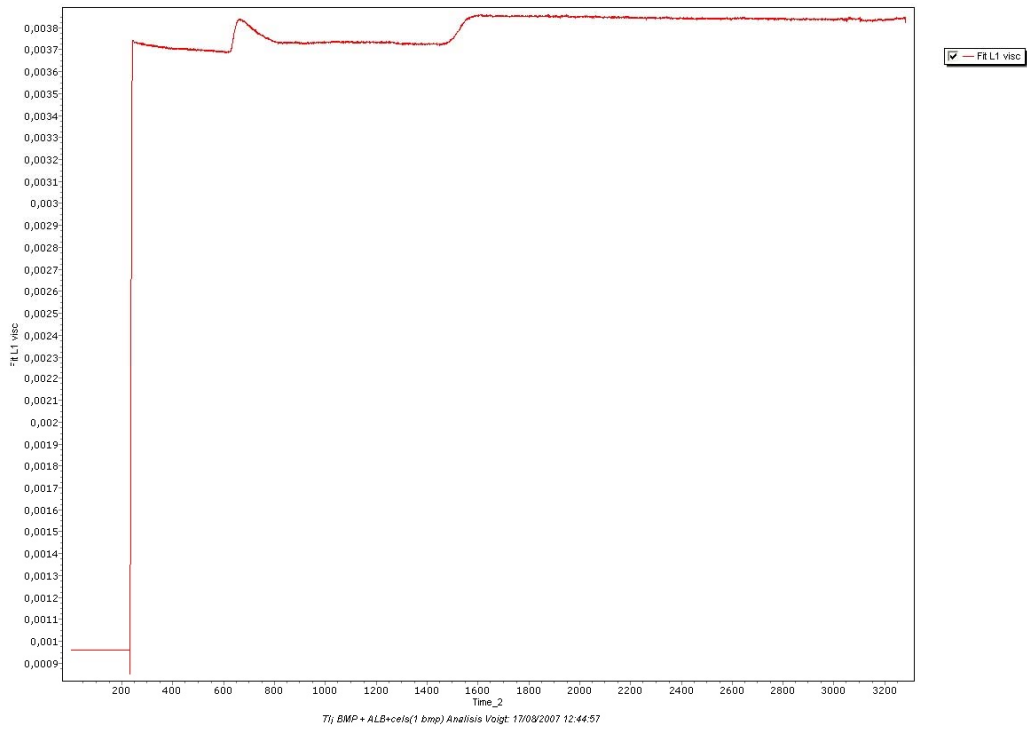


Fig 25 Gráfica de representación de viscosidad frente a tiempo de SAOS –2 sobre Ti con una capa de albúmina

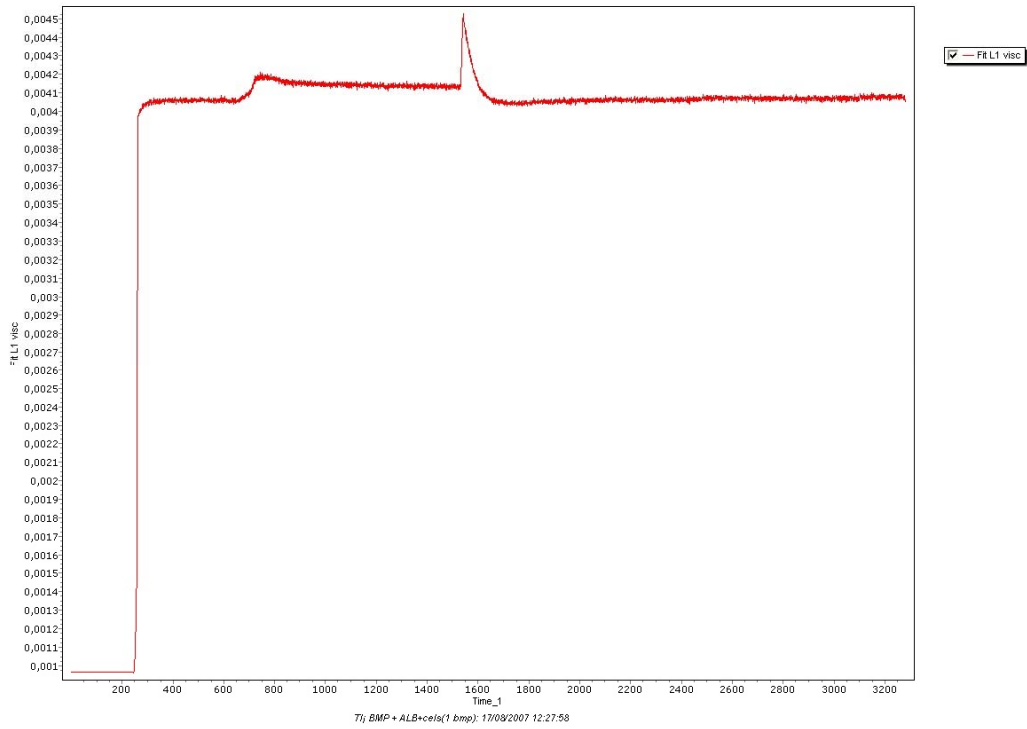


Fig 26 Gráfica de representación de viscosidad frente a tiempo de SAOS –2 sobre Ti con una capa de BMP –2

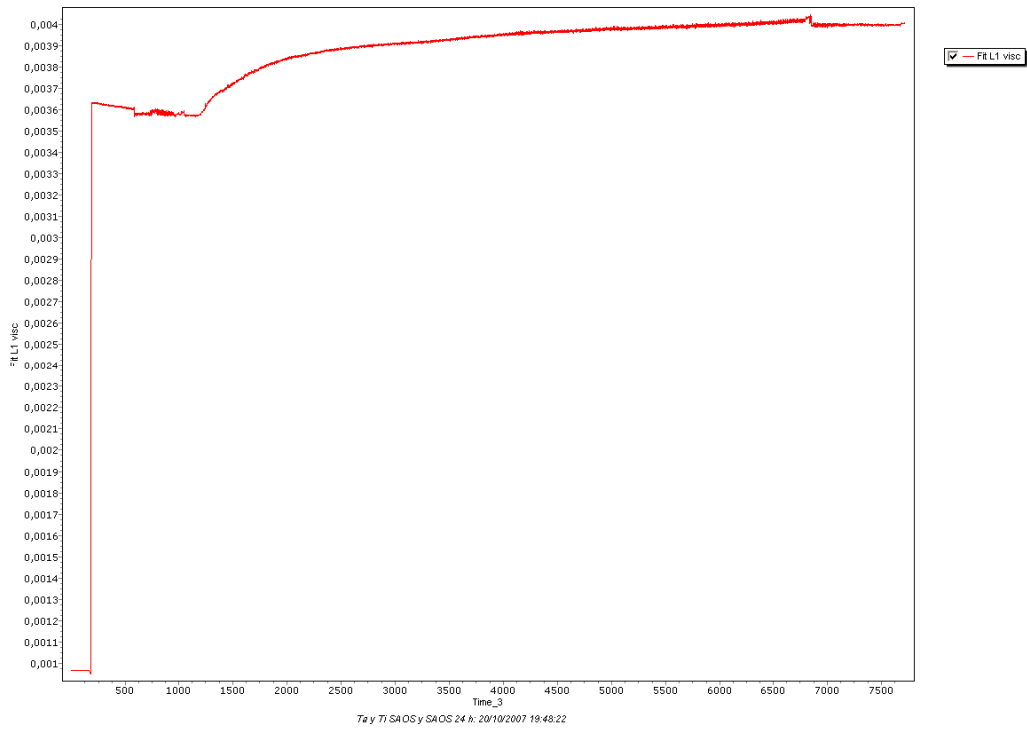


Fig 27 Gráfica de representación de viscosidad sobre  $T_a$  frente a tiempo de células SAOS – 2 pretratadas con BMP –2 durante 24 horas

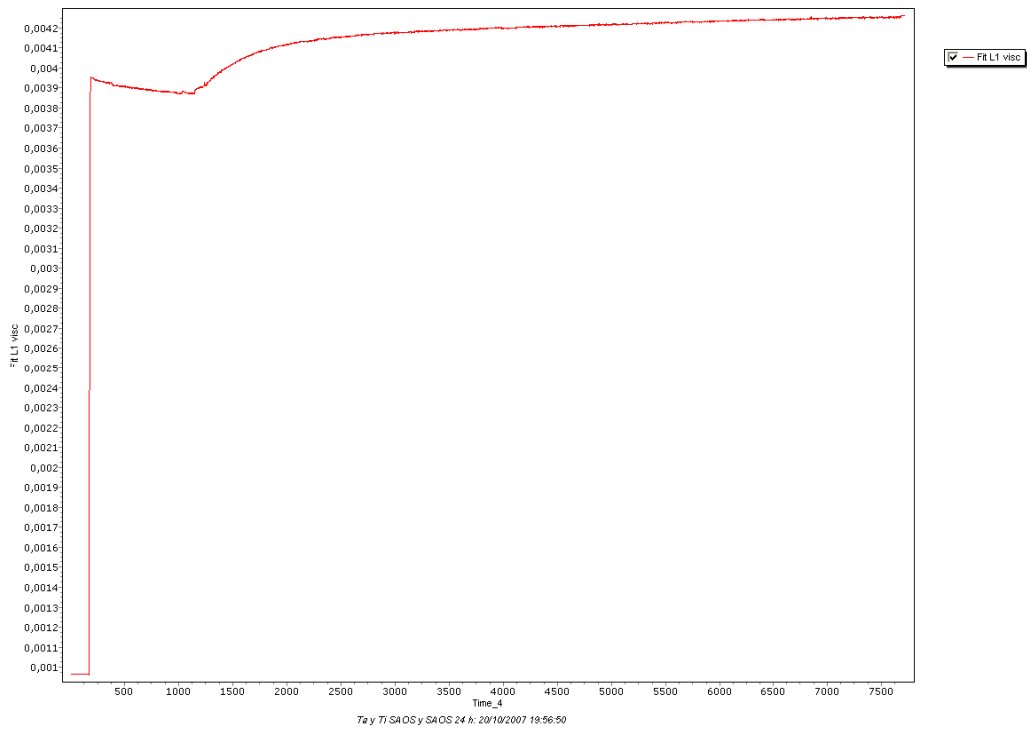


Fig 28 Gráfica de representación de viscosidad sobre  $T_i$  frente a tiempo de células SAOS – 2 pretratadas con BMP –2 durante 24 horas

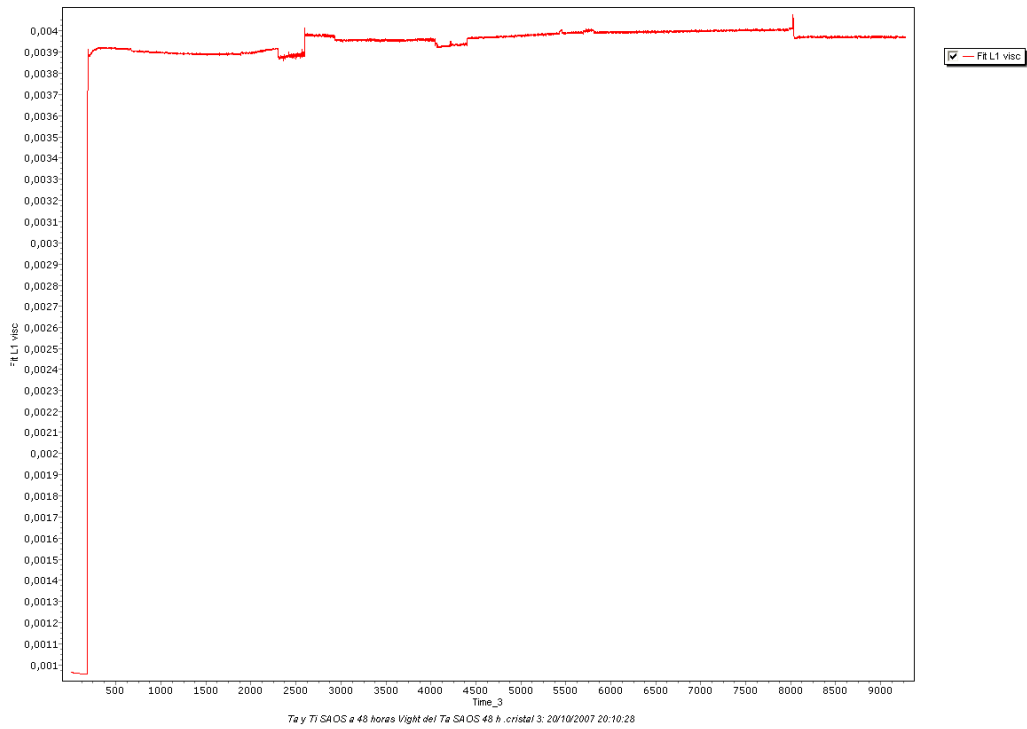


Fig 29 Gráfica de representación de viscosidad sobre Ta frente a tiempo de células SAOS – 2 pretratadas con BMP –2 durante 48 horas

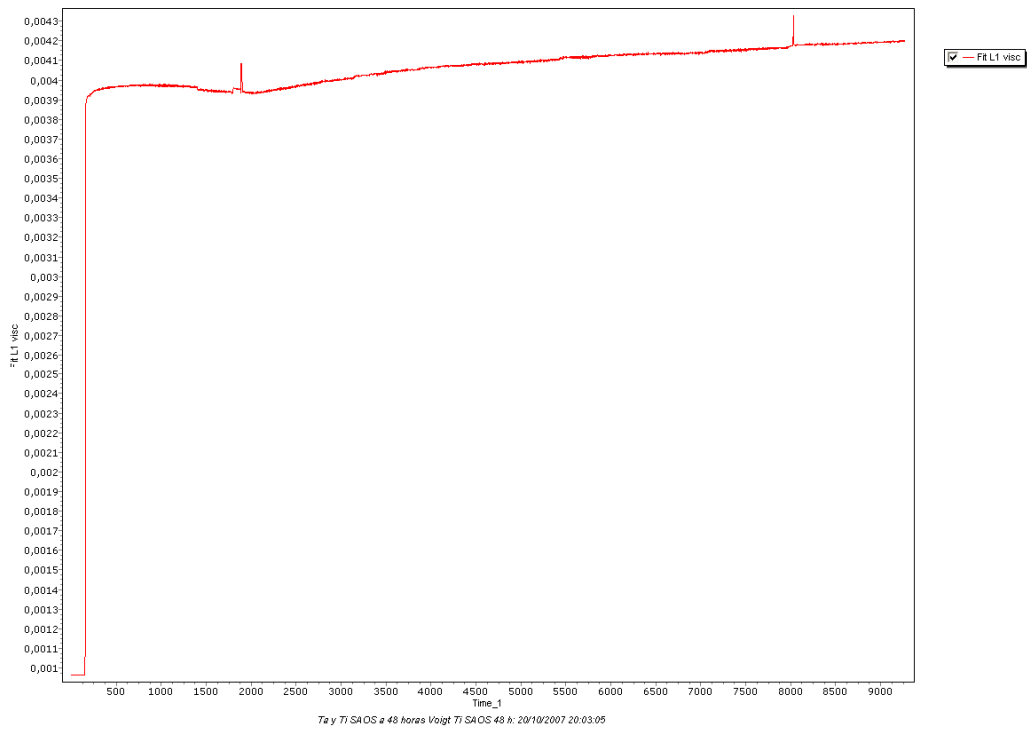


Fig 30 Gráfica de representación de viscosidad sobre Ti frente a tiempo de células SAOS – 2 pretratadas con BMP –2 durante 48 horas

En lo que respecta a los estudios con fibrinógeno, obtuvimos mayor viscosidad media sobre Titanio cuando lo comparamos con tantalio, lo cual resultó estadísticamente significativo tabla 4.

	Área/masa Media	Error estándar de la media	Intervalo de confianza al 95%
Fibrinógeno sobre Titanio	9308.611 ng /m <sup>2</sup>	1.838	9304.984 – 9312.238
Fibrinógeno sobre Tantalio	9610.605 ng/m <sup>2</sup>	1.905	9606.845 – 9614.364

Tabla 4

## 5.- *Discusión:*

El hueso es uno de los tejidos con mayores demandas para su regeneración, sustitución, o reconstrucción. Es atractiva la idea de disponer de un armazón que actúe a modo de plantilla para la regeneración tisular, que incorpore en su estructura células y al mismo tiempo factores que induzcan y al mismo tiempo mantengan el fenotipo celular como ocurre con las proteínas morfogenéticas óseas (48). Por otra parte, la adhesividad de células formadoras de hueso es uno de los factores estudiados cuando se quiere comprobar el potencial de un biomaterial para albergar la diferenciación osteogénica y la integración tisular (34). La tecnología QCM – D nos permite realizar estudios de la adhesividad de células y proteínas a diferentes biomateriales. La adhesividad de las células SAOS – 2 resultó mayor al ser evaluada sobre tantalio, en comparación al titanio (tabla 1). Sin embargo, al medir la rugosidad media de superficie, ésta resultó ser superior para el Tantalio, cuyo valor fue de 2,62316 nm para éste material, frente a 2,12679 nm para Titanio. Cabría pensar que éste factor ha tenido una influencia sobre una mayor adhesividad de las células SAOS-2 a la superficie del tantalio en comparación a la del titanio.

En nuestro estudio, el gel de colágeno tipo 1 se comportó de una manera inestable, no mantuvo su viscosidad constante durante todo el experimento. La viscosidad media sobre gel colágeno fue mayor que la de los cristales de Titanio y tantalio, pero no así al compararse con gel colágeno con células adheridas.

Por tanto aplicando el modelo viscoelástico de Voight no fue posible diferenciar la presencia de células adheridas, aunque estas se observaron mediante microscopía láser confocal. Esto puede ser debido en parte a la viscosidad excesiva del gel colágeno, y a que se solubiliza con relativa facilidad, además de afectarse por la temperatura. Todo esto hace el trabajo con geles colágenos más complicado que con los metales. Apreciamos una limitación en nuestra técnica de estudio en éste sentido.

La QCM-D es una técnica que originalmente fue concebida para el estudio de la adhesividad proteica a diferentes superficies (35). Entre las proteínas evaluadas se encuentran el fibrinógeno (21) y la la fibronectina (21). Hemos podido observar, que dentro de la hemocompatibilidad de los materiales estudiados, la del titanio puede considerarse mayor, al registrarse una menor area/masa de fibrinógeno sobre la superficie de éste material.

En nuestro estudio hemos estimado la adhesividad de BMP –2, y, albúmina bovina como control, al Tantalio y al Titanio, presentando ambas una mayor área/masa media en el

Titanio con respecto al Tantalio de manera estadísticamente significativa (tabla 2). No tenemos noticia de otros estudios de adhesión de BMP –2 medida mediante técnica QCM – D.

El QCM – D nos ha permitido estimar no sólo adhesividades de proteínas sino también su influencia sobre la adhesividad celular. En éste sentido, Shah et al (44) atribuyen el efecto adhesivo de las células tratadas mediante BMP- 2 a una modificación en su citoesqueleto.

El QCM – D nos permite realizar experimentación de adhesividad en tiempo real, pudiendo valorarse así el efecto de una capa de BMP-2 adherida a la superficie del cristal sobre la adhesividad celular.

Nuestros resultados (tabla 3), indican que la BMP –2, incrementó la viscosidad de la capa celular una vez depositada sobre los cristales de QCM –D de manera estadísticamente significativa. Siendo éste efecto más importante en los cristales cubiertos con BMP –2 frente a los cubiertos con albúmina, lo cual puede indicar un efecto celular directo de la BMP-2 independiente de la modificación del citoesqueleto descrita por Shah et al (44) que requiere probablemente una mayor exposición para tener lugar.

Esto resultó ser cierto para el Titanio y no así para el Tantalio, en el que fue menor la adhesión celular, al comparar el efecto de una capa BMP –2 frente a la albúmina, disminuyendo incluso frente a la situación de base, es decir, superficie sin proteínas. Esto pudo ser debido a que presentó una menor área/masa de la propia capa de BMP –2, traduciéndose en un menor efecto adhesivo.

Puede suceder que distintos biomateriales favorezcan la fijación de algunos tipos de proteínas que modifiquen la adhesividad celular a la superficie.

Los resultados del tercer tipo de análisis experimental (tabla 3), en el que pretratamos SAOS –2 con BMP –2, tanto a 24 horas como a 48 horas, muestran que la viscosidad máxima se registró en el grupo de las 24 horas, siendo a su vez mayor que la situación de base y que depositando una capa de BMP-2 o albúmina sobre el cristal. Esto ocurrió así tanto en el Tantalio como en el Titanio, sin embargo el tantalio resultó menos afectado en términos de adhesividad, aumentando la viscosidad media de la capa celular de manera estadísticamente significativa, aunque en una pequeña cantidad.

La viscosidad media de la capa celular sobre Titanio, resultó modificarse de una manera importante con significación estadística al pretatarse las células con BMP-2.

El mayor aumento en la adhesividad se apreció en las células pretratadas 24 horas, siendo éste menor en las tratadas durante 48 horas. Cabe pensar que éste resultado probablemente fue debido a la degradación de la BMP – 2 en el medio, puesto que se suministró una sola dosis al comienzo del periodo del tratamiento.

Liu et al (31) concluyen en su artículo que la osteoconductividad de los diferentes implantes puede variar de manera substancial con la modificación por BMP –2 en la superficie.

El ritmo de degradación de la BMP –2 en los implantes y su integración en ellos, es un campo de estudio importante en la actualidad.

## 6.- Conclusiones:

- 1- La técnica QCM-D ha resultado de gran utilidad en el estudio de adhesividad, de células y proteínas en tiempo real a superficies duras tales como metales como el tantalio o el titanio. Presenta un manejo más complicado, y una cierta limitación en lo referente a trabajar con materiales más inestables que los metales, como son por ejemplo los geles colágenos.
- 2- Se ha podido demostrar una importante adhesividad de osteoblastos tanto al tantalio como al titanio. Sin embargo ésta se modificó de manera importante en presencia de la BMP – 2 en el medio, reaccionando a su vez de una manera diferente según si el material de base era tantalio o titanio.
- 3- La proteína BMP-2 tuvo en nuestro estudio un efecto sobre la adhesividad de los osteoblastos, favoreciendo ésta, tanto al utilizarse para pretratar los osteoblastos como al utilizarse como recubrimiento de los cristales.
- 4- La adhesividad estimada de los osteoblastos, sobre superficies metálicas de Titanio y Tantalio, se incrementó, al adherir una capa de BMP –2 a la superficie del material. La adhesividad de éstas células se incrementó todavía más al pretratar los osteoblastos con BMP – 2 en el medio.
- 5- Los osteoblastos pretratados mostraron la mayor adhesividad en ambos metales a las 24 horas de incubación. La adhesividad estimada de osteoblastos, pretratados con BMP – 2 en el medio fue superior sobre la superficie de Titanio, tanto en el grupo de 24 horas como en el de 48 horas.
- 6- La cantidad de BMP –2 requerida para la experimentación fue inferior al cultivar las células con proteína en el medio, necesitándose una cantidad mayor para producir una capa sobre el cristal.

## 7.- Bibliografía:

1 - O. Akhouayri, MH. Lafage-Proust, A. Rattner, N. Laroche, A. Caillot-Augusseau, C. Alexandre, and L. Vico. (1999). Effects of static or dynamic mechanical stresses on osteoblast phenotype expression in three-dimensional contractile collagen gels *J Cell Biochem* 76: 2 217-230. ([PubMed](#))

2 - Albee F.H.; Bone graft surgery. Philadelphia: W.B. Saunders; 1915.

3 - Baker B.M., Mauck R. L.; The effect of nanofiber alignment on the maturation of engineered meniscus constructs. *Biomaterials*; 2007; 28 (11): 1967 – 1977.

4 - Berg MJ, Tymoczko JL, Stryer L; *Biochemistry* fifth edition: 2002, W.H. Freeman and co.

5 - Binnig G., Quate C.F.; Atomic force microscope; *Physical review letters*; 56; 9, 1986, 930-933.

6 - Bitar et al; Effect of multiple unconfined compression on cellular dense collagen scaffolds for bone tissue engineering; *J Mater. Sci*; 2007; 18: 237 –244

7 - J. D. Bobyn, S. A. Hacking, J. J. Krygier, E. J. Harvey, D. G. Little, and M. Tanzer Zoledronic acid causes enhancement of bone growth into porous implants. *J Bone Joint Surg Br*, Mar 2005; 87-B: 416 - 420.

8 - J. D. Bobyn, G. J. Stackpool, S. A. Hacking, M. Tanzer, and J. J. Krygier Characteristics of bone ingrowth and interface mechanics of a new porous tantalum biomaterial *J Bone Joint Surg Br*, Sep 1999; 81-B: 907 - 914.

9 - Cobos J, Lindsey RW, Gugala Z. The Cylindrical Titanium Mesh Cage for the Treatment of a Long Bone Defect: Description of a New Technique and Report of Two Cases. *Journal of Orthopaedic Trauma* 14(1):54-59, 2000.

10 - De Long Jr W.G., et al; Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *JBJS am*, 2007; 89: 649 – 658.

11- **Developmental Biology**. 6th ed.  
Gilbert, Scott F.  
Sunderland (MA): [Sinauer Associates, Inc.](#); c2000

12 - Domach M.M.; Introduction to biomedical engineering. Pearson Prentice Hall, 2004; 121-126.

13 - Einhorn T.A.; Tissue engineering of fracture repair. In *Tissue engineering in musculoskeletal clinical practice*, AAOS, 107-122.

14 - **Eurekah Bioscience Collection**.  
Chapters taken from the Eurekah Bioscience database.  
[Eurekah.com](#) and [Landes Bioscience](#); 2003.

- 15 - Findlay DM, Welldon K, Atkins GJ, Howie DW, Zannettino ACW, Bobyn D. The proliferation and phenotypic expression of human osteoblasts on tantalum metal. *Biomaterials* 2004; 25: 2215-2227.
- 16 - Gatti R., et al; Analysis of living cells grown on different titanium surfaces by time – lapse confocal microscopy. *JMIC* 2007: article in press
- 17 - Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update, *Injury* 2005; 36S: S20 – S27.
- 18 - Giessibl F.J., AFM's Path to atomic resolution; *Materials today*; May 2005; 32-41
- 19 - Hajime Ohgushi, Jun Miyake, Tetsuya Tateishi; Mesenchymal stem cells and bioceramics: strategies to regenerate the skeleton.. In *tissue engineering of cartilage and bone*, Novartis foundation symposium 249, 2003, 118 – 132
- 20 - Hanawa T.; Surface modification of metallic biomaterials; in *Biomaterials engineering and processing series*. Vol 1;4, 1 – 36
- 21 - Hemmersam A G., et al, Adsorption of fibrinogen on tantalum oxide, Titanium oxide and gold studied by the QCM – D technique. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*; 2005, 43: 208 –215.
- 22 - Höök F.; Development of a novel QCM technique for protein adsorption studies, *Chalmers* 2004.
- 23 - Huang Z., Ramakrishna S.; Composites in biomedical applications; in *Biomaterials engineering and processing series*. Vol 1;9, 1 – 49.
- 24 - Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I: the influence and stability of fixation and soft-tissue preservation. *Clin. Orth.* 1989;238:249-81.
- 25 - Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part II: the influence of the rate and frequency of distraction. *Clin. Orth.* 1989; 239: 263-85.
- 26 - Jalbert I, et al; In vivo confocal microscopy of the human cornea; *BrJ Ophthalmol.* 2003; 87: 225 – 236.
- 27 - Karegeorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3 D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005; 26 5474 – 5491
- 28 - Kuhn L.T., *Biomaterials*, in *Introduction to biomedical engineering*. Elsevier academic press. 256 – 311.
- 29 - Kurtz S. et al. projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J B J S Am.* 2007; 89: 780-5.



30 - Liu H., Lin j., Roy K., Effect of 3 scaffold and dynamic culture condition on the global gene expression profile of mouse embryonic stem cells. *Biomaterials*, 2006; 27 (36): 5978 – 5989

31 - Liu Y., et al, The influence of BMP –2 and its mode of delivery on the osteoconductivity of implant surfaces during the early phase of osteointegration. *Biomaterials*; 2007, 28:2677 – 2686

32 - Liu WF, Chen CS. Engeneering biomaterials to control cell function. *Materials Today* 2005; 12 (3): 28 – 35

33 - Lord MS, et al; Monitoring cell adhesion on tantalum and oxisidised polysytrieneusing a quartz crystal microbalance with dissipation. *Biomaterials*; 2006, 26: 4529 –4537

34 - G. A. Macheras, P. J. Papagelopoulos, K. Kateros, A. T. Kostakos, D. Baltas, and T.Karachalios Radiological evaluation of the metal-bone interface of a porous tantalum monoblock acetabular component *J Bone Joint Surg Br*, March 1, 2006; 88-B(3): 304 – 309

35 - Modin et al; QCM – D studies os attachment and differential spreading of pre – osteoblastic cells on Ta and Cr surfaces. *Biomaterials*; 2006;27: 1346 – 1354

### 36 - **Mechanosensitivity in Cells and Tissues**

Kamkin, Andre; Kiseleva, Irina, editors  
Moscow: [Academia Publishing House Ltd](#); c2005

### 37 - **Molecular Biology of the Cell** 4th ed.

Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter  
New York and London: [Garland Science](#); c2002

### 38 - **Molecular Cell Biology**. 4th ed.

Lodish, Harvey; Berk, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E.  
New York: [W. H. Freeman & Co.](#); c2000.

39 - Mygind T., Mesenchimalstem cell ingrowth and differentiation on coralline Hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials*; 28: 1036 – 1047

40 - Nader J., Karthik L., A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences; *Mechatronics*; 2004; 14, 907 – 945

41 - J.S. Price, B.O. Oyajobi and R.G.G. Russel The cell biology of bone growth, Department of Human Metabolism and Clinical Biochemistry, Sheffield University Medical School, Beech Hill Road, Sheffield S10 1RX, UK

42 - Ratner B., Hoffman A.S., Schoen F.J., Lemons J.E.; *Biomaterials science*. An introduction to materials in medicine; Elsevier academic press, 2004

- 43 - Russel Levine B., Experimental and clinical performance of porous tantalum in orthopaedic surgery. *Biomaterials*; 2006, 27: 4671 – 4681.
- 44 - Shah A. K., Mechanism of BMP – 2 stimulated adhesion of osteoblastic cells to titanium alloy. *Biology of the cell*; 1999, 91: 131 –142
- 45 - Spriano S, Verné E, Faga MG, Bugliosi S, Maina G. Surface treatment on an implant cobalt alloy for high biocompatibility and wear resistance. *Wear* 2005; 259: 919 – 925
- 23 - Sumita M., Teoh S. H.; Durability of metallic implant materials; in *Biomaterials engineering and processing series*. Vol 1;4,1-31
- 47 - Suzuki O. Interface of synthetic inorganic biomaterials and bone regeneration. *International congress series*. 2005; 1284: 274 – 283
- 48 - Taylor GI, Miller GD, Ham FJ. The free vascularized bone graft: a clinical extension of microvascular techniques. *Plast. Reconstr. Surg.* 1975; 55:533-44.
- 49 - Urist M.R., et al; Quantification of new bone formation in intramuscular implants of bone matrix in rabbits. *CORR*, 1970;68:279-93
- 50 - Urist M.R.; Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965; 150: 893 –899
- 51 - Vunjak – Novakovic G.; The fundamentals of tissue engineering: Scaffolds and bioreactors; In *tissue engineering of cartilage and bone*, Novartis foundation symposium 249, 2003, 34 – 51
- 52 - Voinova MV, et al; Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid – solid interfaces: continuum mechanics approach; *physica Scripta*; 1998; 21: 1-22
- 53 - J. A. Witkowski, Rr Carrel's Immortal Cells, *Medical History*, 24, 1980: 129-142.
- 54 - Young MH. Bone and derivatives of bone for repair of skeletal defects. *Clin. Orth.* 1967;50:257-68.

