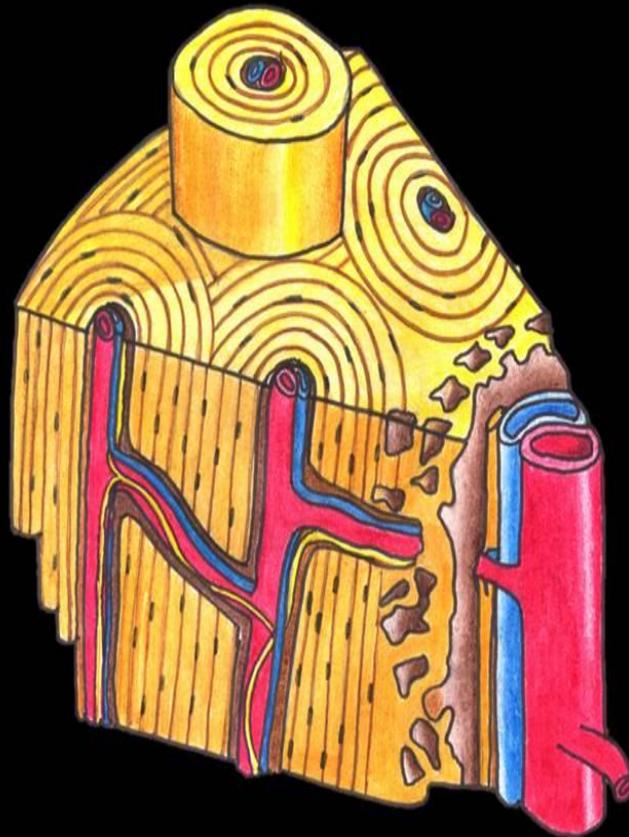


Implicaciones del Calcio Extracelular y su Receptor en Membrana (CaSR) en la Angiogénesis y la Osteogénesis. Relevancia en Ingeniería Tisular.

Arlyng González Vázquez

Memoria de tesis presentada para la obtención del título de Doctora por la Universitat Politècnica de Catalunya. Programa de Doctorado de Ingeniería Biomédica.





Curso académico: 2012/2013

Acta de calificación de tesis doctoral

Nombre y apellidos

Arlyng Gyveth González Vázquez

DNI / NIE / Pasaporte

X9401762Y

Programa de doctorado

Ingeniería Biomédica

Unidad estructural responsable del programa

ESAI

Resolución del Tribunal

Reunido el Tribunal designado a tal efecto, el doctorando / la doctoranda expone el tema de su tesis doctoral titulada: **Implicaciones del Calcio Extracelular y su receptor en Membrana (CaSR) en la Angiogénesis y la Osteogénesis. Relevancia en Ingeniería Tisular.**

Acabada la lectura y después de dar respuesta a las cuestiones formuladas por los miembros titulares del tribunal, éste otorga la calificación:

APTA/O NO APTA/O

(Nombre, apellidos y firma)		(Nombre, apellidos y firma)	
Presidente/a		Secretario/a	
(Nombre, apellidos y firma)			
Vocal	Vocal	Vocal	Vocal

_____, _____ de _____ de _____

El resultado del escrutinio de los votos emitidos por los miembros titulares del tribunal, efectuado por la Escuela de Doctorado, a instancia de la Comisión de Doctorado de la UPC, otorga la MENCIÓN CUM LAUDE:

SÍ NO

(Nombre, apellidos y firma)	(Nombre, apellidos y firma)
Presidenta de la Comisión de Doctorado	Secretaria de la Comisión de Doctorado

Barcelona a _____ de _____ de _____

DEDICATORIA

A mí mamá

Mis hermanos

y mi tía

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo tengo que agradecer a mi **mami** quien además de darme la vida, me enseñó el valor del trabajo, la importancia de aspirar siempre a algo mejor, y me ha apoyado incondicionalmente en TODO lo que me he propuesto. En segundo lugar mi **mamaela**, quien ha sido una segunda madre para mí, quien me ha dado amor y apoyo incondicional. Otra mención especial merecen mis hermanos **Antonio y Kaleana**, por hacerme sentir siempre como un buen ejemplo y por hacerme sentir cerca aunque físicamente no sea así. También agradecimientos especiales para mis primos **Juan Miguel y Alvin** con quienes compartí mi niñez, cuando éramos todos hijos únicos y con quienes viví momentos inmejorables. En general gracias a TODA mi familia por el apoyo continuo y por aportar su grano de arena en mi formación académica y personal.

A nivel personal y profesional quiero darle mi más sincero agradecimiento a mi directora de tesis, la **Dr. Elisabeth Engel**. Gracias a Eli por haber creído en mí desde el inicio, por su apoyo, por guiarme, por dejarme trabajar a mis anchas, exigiendo en su justa medida y porque a nivel personal ha sido muy agradable trabajar a su lado. Otra mención especial merece **Aitor Aguirre** con quien compartí codo a codo el primer año de este proyecto y quien me regalo parte de su tiempo y conocimientos. A **Melba** por su ayuda con la fabricación de los andamios. Al **Dr. Josep Planell** por aceptarme como parte de su grupo de investigación y la colaboración brindada. A mis compañeros de batalla **Riccardo, Nad, Aitor S, Tiziano, Xavi, Zaida, Claudia y Joan** por el apoyo en momentos de dudas, por las discusiones de trabajo, la mano amiga, las cervezas, tapas, laser tags, partidas de bowling, cenas internacionales, cumpleaños y festejos varios. Gracias a **Belén González** y a toda la infraestructura administrativa, mantenimiento y de soporte científico técnico del IBEC y del Parc Cientific de Barcelona, quienes ayudaron a hacer más sencillo este proyecto doctoral.

Asimismo he de agradecer a la **Dr. Joelle Amedee** por recibirme en su laboratorio, prestarme su ayuda a nivel personal, académico y profesional en todo el desarrollo de los experimentos que realicé en su laboratorio. De igual forma, agradezco a **Sylvain, Chantal, Reine, Robin**, y en general al todo el grupo de investigación de **BIOTIS U1026** del INSERM quienes me brindaron toda su colaboración en el desarrollo del proyecto.

Por último, el mayor de mis agradecimientos a **Claudia Müller**, quien ha sido mi hermana, mi amiga, mi compañera de aventuras y desventuras, mi apoyo y a veces hasta la voz de mi consciencia, **GRACIAS TOTALES AMIGA**. Por supuesto en estas líneas no puedo dejar fuera a mis **CATAZOLANOS (Laura, Pep, Juan Carlos, Núria, Clau, Carlos y Jennifer)** quienes han hecho de mi vida en Barcelona una aventura súper divertida, con quienes he compartido momentos inolvidables. Especial mención a **Dobryna** y **Soledad** con quienes he compartido las comidas, diálogos súper divertidos sobre la vida aquí y en Latinoamérica, sobre ciencia y sobre cotilleos varios.

Seguramente me dejo a alguien por fuera, así que mis disculpas de antemano, y **MUCHISIMAS GRACIAS** a todo aquel que de una u otra forma haya colaborado en el proceso de elaboración de este proyecto.

“In biology, nothing is clear, everything is too complicated, everything is a mess, and just when you think you understand something, you peel off a layer and find deeper complications beneath. Nature is anything but simple.”

Richard Preston

And that is the reason causes I love Biology

Arlyng González Vázquez

Science is like sex

Sometimes something useful comes out,

But that is not the reason we are doing it

Richard P. Feynman

Abstract

Bone injury is a major health problem nowadays. Bone tissue engineering is a promising strategy to solve it. In this field many reports pointed out the role of scaffolds containing a calcium phosphate glass, such as G5, in the promotion of bone regeneration. These kinds of biomaterials release Ca^{2+} during degradation. Moreover, extracellular calcium (Ca^{2+}_0) is able to activate a special extracellular receptor called Calcium Sensing Receptor (CaSR), which can modulate migration, chemotaxis and differentiation. In that sense, present work aims to evaluate the role of extracellular calcium and CaSR as key factor in the induction of bone regeneration. We isolated endothelial progenitor cells (EPCs) and Mesenchymal Stromal cells (MSCs) from young rat's bone marrow and they were stimulated with 10 mM Ca^{2+}_0 . Results provided strong evidences about the role of Ca^{2+}_0 and CaSR in the modulation of chemotaxis, and angiogenic differentiation on EPCs, whilst on MSCs calcium exerted osteoinduction and proliferation through the CaSR. Furthermore, using biodegradable releasing calcium composite (PLA/G5) was measured the ability of that kind of biomaterials in the induction of bone and blood vessels formation *in vivo*. Finally, using a shell-less chick embryo model was compared the effect of the Ca^{2+}_0 and the ionic compound released by PLA/G5, demonstrating that the released Ca^{2+}_0 is the key factor in the promotion of angiogenesis and bone formation *in vivo*. The knowledge developed during this project will be a valuable tool to enhance the efficiency of biomaterials used in bone tissue engineering.

Keywords: extracellular calcium, bone regeneration, angiogenesis, calcium sensing receptor, tissue engineering, osteoinduction, endothelial progenitor cells and mesenchymal stromal cells.

Prologue

Current PhD thesis owes to the necessity of discover the mechanism of action of calcium phosphates glasses currently used in bone tissue engineering. It is widely known that bone damage and bone loss is a major health problem in developed countries. Just in United States of America more than 6.2 million fractures occur per year and there are more than 10 million people diagnosed for osteoporosis. Current clinical strategies such as titanium implants and bone transplants are not capable to restore bone functions. In this sense, the most promising strategy to restore, maintain and enhance the bone tissue functions is bone tissue engineering (BTE). Nowadays many approaches are being evaluated in this field; however techniques that involve calcium phosphate glasses are the most tested and promising techniques. Calcium phosphate glasses (CaP glasses) are highly biodegradable biomaterials that release calcium and phosphates among other ions during degradation. Moreover, CaP glasses mimic the extracellular bone matrix composition and they have been successfully used as bone substitutes *in vitro* and *in vivo*. However, there are no clear evidences about how these biomaterials acts on bone tissue regeneration.

In this sense, there are three main hypotheses about the mechanism of action of scaffolds used to restore the bone tissue: 1) the physical properties -such as, topography, roughness, stiffness, among others- are the responsible of induce the regeneration. 2) The chemical properties -such as the ions release, proteins adhesion and growth factors release, among others- are the key signal to promote new tissue formation. 3) Physical and chemical properties work synergistically to induce the adequate cellular and tissue responses. From our point of view, there are very little evidences about the effect of the released ions in the induction of bone and blood vessels formation. Furthermore, even though calcium is a very relevant cation in the intracellular signal transduction and the mineralization of bone extracellular matrix, there is no clear evidence about the role of this ion in the bone regeneration after CaP glasses implantation. Based in this arguments, current project owe to face with the challenge to study the role of

extracellular calcium in osteoinduction and angiogenesis in order to provide new knowledge that could help to understand the CaP glasses actions and in this way go to develop better biomaterials with enhanced properties. Due to the key role of calcium in biology, his relation in the regulation of multiple intracellular signaling pathways and the presence of the Calcium Sensing Receptor (CaSR) –this receptor is in charge of sense narrow differences in the extracellular calcium concentration- the present PhD thesis was focused in the evaluation of extracellular calcium effects related with bone regeneration.

In order to evaluate the role of extracellular calcium on bone regeneration the first aim was to isolate and characterize cells with strong ability to regenerate bone and vascular tissue. In this sense it was selected two cells populations from bone marrow: Endothelial progenitor cells (EPCs) and Mesenchymal Stromal Cells (MSCs). The EPCs were selected due to their capacity to promote blood vessels formation and the necessity of blood supply in bone tissue. While MSCs selection was based in their strong ability to become in bone forming cells. The second objective was to evaluate the role of extracellular calcium and CaSR in the regulation of angiogenesis and osteogenesis *in vitro*. Third objective, it was to test the cellular and tissue responses *in vivo* upon implantation of PLA/G5 scaffolds containing 50 % G5. G5 was used as an example of CaP glass with known release of extracellular calcium. Finally, in order to establish the relation between the effects of extracellular calcium and PLA/G5 in angiogenesis and bone formation *in vivo* we used the shell less chick embryo culture. These PhD thesis findings revealed new knowledge about the cellular and tissue responses involved in the mechanism of action of CaP glasses *in vitro* e *in vivo*. Therefore that knowledge could be used in the fabrication of biomaterials that enhances the calcium release activating the CaSR and the signaling pathways associated in bone regeneration.

Índice de Contenido

1. Introducción	2
1.1. Biología e histología del hueso.....	2
1.1.1. Características generales del tejido óseo	2
1.1.2. Estructura del hueso	3
1.1.3. Fisiología del hueso.....	5
1.2. Patologías óseas y su relevancia.....	7
1.2.1. Osteoporosis	7
1.2.2. Pérdida de piezas óseas	9
1.3. Estrategias para solventar patologías óseas	10
1.4. Ingeniería de Tejidos	11
1.4.1. Células formadoras de tejido.....	12
1.4.2. Andamios	15
1.4.3. Moléculas con actividad biológica.....	16
1.5. Estrategias utilizadas en la ingeniería de tejidos óseos	17
1.6. Vidrios de Fosfato de Calcio y la liberación de iones	21
1.7. Calcio y su Relevancia en Biología.....	24
1.8. Receptor Sensor de Calcio (CaSR): Estructura y Funciones.....	25
2. Metodología	29
2.1. Aislamiento de Células Mesenquimales (MSCs).....	29
2.2. Aislamiento de Células Endoteliales Progenitoras (EPCs)	30
2.3. Caracterización de MSCs	31
2.4. Caracterización de EPCs	33
2.5. Composición de los medios de Cultivo utilizados	35
2.5.1. Medios de cultivo para las MSCs:.....	35
2.5.2. Medios de cultivo para las EPCs	36
2.6. Viabilidad y Proliferación	37
2.7. Ensayos de Migración	38
2.7.1. Tratamientos aplicados a las Células Mesenquimales.....	39
2.7.2. Tratamientos aplicados a las Progenitoras Endoteliales:.....	39
2.8. Aislamiento de ARN	39
2.9. Reacción en cadena de la Polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR).....	40
2.10. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Real Time PCR).	40
2.10.1. Cebadores usados con las Células Mesenquimales	41
2.10.2. Cebadores usados con las Células Progenitoras Endoteliales	41
2.11. Análisis genético de múltiples marcadores angiogénicos	42

2.12.	Ensayo de Formación de túbulos en Matrigel	43
2.13.	Expresión Proteica de Marcadores Osteoblásticos.....	44
2.14.	Actividad de Fosfatasa Alcalina.....	44
2.15.	Rojo de Alizarina (AR)	45
2.16.	Ensayos de Bloqueo del Receptor Sensor de Calcio	46
2.17.	Fabricación de Andamios de PLA y PLA/G5	47
2.17.1.	Fabricación del G5	47
2.17.2.	Fabricación de andamios de PLA y PLA/G5	48
2.18.	Implantación de andamios de PLA y PLA/G5 en cóndilos femorales de rata	48
2.18.1.	Cirugía.....	49
2.18.2.	Plan experimental.....	50
2.19.	Extracción de ARN a partir de andamios implantados en cóndilos femorales de rata	51
2.20.	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa del ensayo in vivo	51
2.21.	Análisis genético de múltiples marcadores osteogénicos in vivo	52
		53
2.22.	Análisis genético de múltiples marcadores angiogénicos in vivo	53
2.23.	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de muestras in vivo	54
2.24.	μCT Ex vivo	55
2.25.	Cultivo de embriones de pollo Ex-Ovo	56
2.25.1.	Condiciones experimentales evaluadas	58
2.25.2.	Ensayo de angiogénesis ex ovo	59
2.25.3.	Ensayo de formación de hueso	59
2.26.	Análisis Estadístico	60
3.	Aislamiento y caracterización de células progenitoras	62
3.1.	Introducción.....	62
3.1.1.	Células Progenitoras Endoteliales y sus características	62
3.1.2.	Células Madre Mesenquimales y sus características.....	64
3.1.3.	Potencial de las EPCs y las MSCs en la reparación de tejidos dañados.....	66
3.2.	Objetivos	69
3.3.	Resultados	70
3.3.1.	Células Progenitoras Endoteliales	70
3.3.2.	Células Mesenquimales	72
3.4.	Discusión.....	76
3.5.	Conclusiones	78

4. Papel del calcio extracelular y el CaSR en la diferenciación de EPCs	80
4.1.Introducción.....	80
4.1.1. Importancia de la angiogénesis en Ingeniería de Tejidos.....	80
4.1.2. Calcio extracelular en vasos sanguíneos	82
4.1.3. CaSR como modulador de los efectos del calcio extracelular en vasos sanguíneos	83
4.2.Objetivos	86
4.3.Resultados	87
4.3.1. Expresión del receptor sensor de calcio (CaSR) en EPCs.....	87
4.3.2. Efectos del Calcio Extracelular en la proliferación y viabilidad de las EPCs	88
4.3.3. Efecto quimiotáctico del calcio extracelular y el papel del CaSR.....	89
4.3.4. El calcio extracelular estimula la expresión genética de marcadores angiogénicos.	91
4.3.5. El calcio extracelular estimula la formación de microcapilares en matrigel a través del CaSR	94
4.4.Discusión.....	96
4.5.Conclusiones	100
5. Papel del calcio extracelular y el CaSR en la diferenciación de las MSCs.....	102
5.1.Introducción.....	102
5.1.1. Variación de la concentración de calcio extracelular en el hueso	102
5.1.2. Expresión del CaSR en células formadoras de hueso	104
5.1.3. Papel del calcio extracelular y el CaSR en células del linaje óseo.....	105
5.2.Objetivos	106
5.3.Resultados	107
5.3.1. Expresión del receptor sensor de calcio (CaSR) en MSCs.....	107
5.3.2. Efectos del Ca ²⁺ sobre la viabilidad y proliferación de las MSCs.....	109
5.3.3. Papel del Calcio extracelular y del CaSR en la movilización de MSCs.....	110
5.3.4. Papel del calcio extracelular y del CaSR en la diferenciación osteogénica de las MSCs	112
5.3.5. El calcio extracelular induce la expresión proteica y funcional de marcadores osteogénicos.....	114
5.4.Discusión.....	120
5.5.Conclusiones	125
6. Papel del PLA/G5 y el calcio extracelular en la regeneración y formación de hueso in vivo.....	127
6.1.Introducción.....	127
6.1.1. Vidrios bioactivos en la Ingeniería de Tejidos Ósea	127
6.1.2. Vidrios bioactivos como sustitutos óseos in vivo	129

6.1.3.	Embrión de pollo como modelo para evaluar angiogénesis	132
6.1.4.	Desarrollo embrionario del pollo	134
6.1.5.	Uso del modelo de embrión de pollo para la evaluación de biomateriales in vivo	136
6.2.	Objetivos	138
6.3.	Resultados	139
6.3.1.	Extracción y verificación de la integridad del ARN	139
6.3.2.	Análisis genético de múltiples marcadores osteogénicos in vivo	141
6.3.3.	Análisis genético de múltiples marcadores angiogénicos in vivo	143
6.3.4.	PCR en tiempo real in vivo	145
6.3.5.	μCT Ex vivo.....	146
6.3.6.	El calcio extracelular como factor angiogénico in vivo	149
6.3.7.	Efecto de la liberación de calcio extracelular sobre la formación de hueso in vivo	151
6.4.	Discusión.....	153
6.5.	Conclusiones	160
7.	General Conclusions	162
7.1.	General Conclusions.....	162
8.	Anexos	i
8.1.	Publicaciones asociadas a este proyecto.....	i
8.2.	Participaciones en Congresos Internacionales.....	i
8.3.	Estancias en el Exterior	ii
8.4.	Financiación	ii
8.5.	Índice de Figuras y Leyendas	iii
8.6.	Índice de Tablas.....	ix
8.7.	Abreviaciones.....	x
9.	Referencias	xvii

Capítulo I: Introducción

1. Introducción

1.1. Biología e histología del hueso

Los huesos son órganos del sistema esquelético cuyas principales funciones son la de servir de soporte estructural y la de proteger los órganos blandos vitales. Sin embargo, los huesos no solo son estructuras de soporte y protección. Este apartado, tiene como objetivo resumir las características principales de este órgano, así como resaltar la relevancia del mismo en la homeostasis del organismo.

1.1.1. Características generales del tejido óseo

Desde el punto de vista histológico el hueso es un órgano constituido por diversos tejidos, entre ellos, el tejido adiposo, el tejido hematopoyético, los vasos sanguíneos, los nervios y el tejido óseo propiamente dicho. Siendo este último el tejido que le confiere al hueso su dureza característica. En particular, el óseo es un tejido conjuntivo especializado cuya matriz extracelular se encuentra altamente mineralizada con fosfatos de calcio $[Ca_{10} (PO_4)_6(OH)_2]$ (Ross, Kaye e Pawlina, 2005). Debido a la alta concentración de iones calcio y fosfato en su matriz extracelular, el tejido óseo es el reservorio más importante de dichos iones en el organismo. Asimismo, la matriz extracelular ósea está constituida en un 90 % de colágeno tipo I y en menor medida colágeno tipo V. Otros constituyentes minoritarios son los glucosaminoglucanos (hialurano, condroitinsulfato y queratansulfato), las glicoproteínas (osteocalcina, osteonectina y osteopontina), y los diferentes tipos de sialoproteínas óseas. Estos componentes orgánicos del tejido son de gran relevancia en el proceso de mineralización de la matriz extracelular, ya que son los encargados de la fijación del calcio en el proceso de mineralización. Dentro de la matriz extracelular ósea se encuentran numerosas cavidades llamadas lagunas en donde se sitúan los osteocitos. Los cuales son células óseas especializadas

que tienen como función principal ayudar a la regulación de la concentración de calcio en la sangre así como la eventual secreción de una nueva matriz extracelular. Un segundo tipo celular lo constituyen las células osteoprogenitoras, las cuales son células indiferenciadas con la capacidad de mantener largos períodos de latencia, ser altamente proliferativas o de diferenciarse otro tipo celular óseo. Los osteoblastos son las células formadoras del tejido óseo, debido a que tienen la capacidad de diferenciarse hacia osteocitos y de secretar grandes cantidades de colágeno, glucosaminoglucanos y glicoproteínas. Por último, los osteoclastos están compuestos por células multinucleadas producto de la fusión de múltiples células mononucleares. Su función principal es la de segregar hidrolasas ácidas que degradan la matriz extracelular ósea. Están presentes en las zonas donde el hueso ha sido lesionado o se encuentra en remodelación (Johnson, 1991).

1.1.2. Estructura del hueso

El hueso, según su estructura, se clasifica en hueso esponjoso o trabecular y hueso cortical o compacto. En primer lugar el hueso esponjoso localizado en la región interna, tiene aspecto reticular, compuesto por numerosas trabéculas fusionadas y cuyos espacios intertrabeculares están altamente comunicados. Dentro de estos espacios se encuentran la médula ósea -la cual es una de las mayores reservas de células progenitoras en el adulto- y numerosos vasos sanguíneos. Mientras que el hueso compacto está localizado en la región externa de los huesos, posee un aspecto denso, sin espacios, con una organización caracterizada por laminillas concéntricas de matriz ósea alrededor de un conducto central (conducto de Havers), denominadas osteonas.

Las osteonas, tal y como se ilustra en la Fig. 1, son las unidades estructurales del hueso compacto. Están compuestas por numerosas láminas concéntricas de matriz ósea mineralizada, dentro de la cual se encuentran los osteocitos en sus respectivas lagunas. En el centro se localiza el conducto de Havers, dentro del cual está la arteria osteónica. También es de destacar que

existe otro tipo de conductos que comunica una osteona con la contigua, el cual es conocido como conducto de Volkmann.

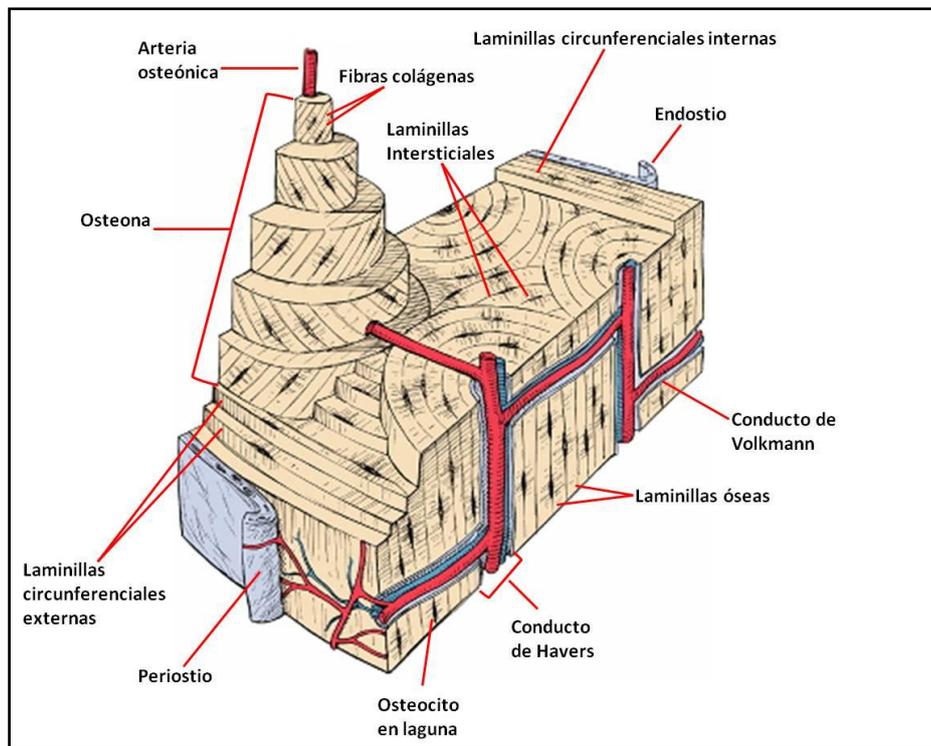


Fig. 1: Diagrama 3D de la estructura de un hueso compacto (Ross, Kaye e Pawlina, 2005).

En este contexto, el hueso es un órgano compuesto por tejidos vivos y que como tal, requiere de una red de vasos sanguíneos capaces de cubrir sus necesidades nutricionales. En este sentido, el hueso posee una serie de cavidades conocidas como agujeros nutricios, a través de las cuales los vasos sanguíneos lo atraviesan hasta llegar a la médula ósea (Ross, Kaye e Pawlina, 2005). Los conductos de Volkmann, así como las arteriolas y/o vénulas localizadas en los conductos de Havers también constituyen la vía de entrada de los nutrientes en el hueso compacto, mientras que los vasos periósticos se encargan de irrigar la porción más externa del hueso compacto. En la Fig. 2 se puede observar un diagrama en el que se ilustran las diferentes vías de irrigación sanguínea del hueso.

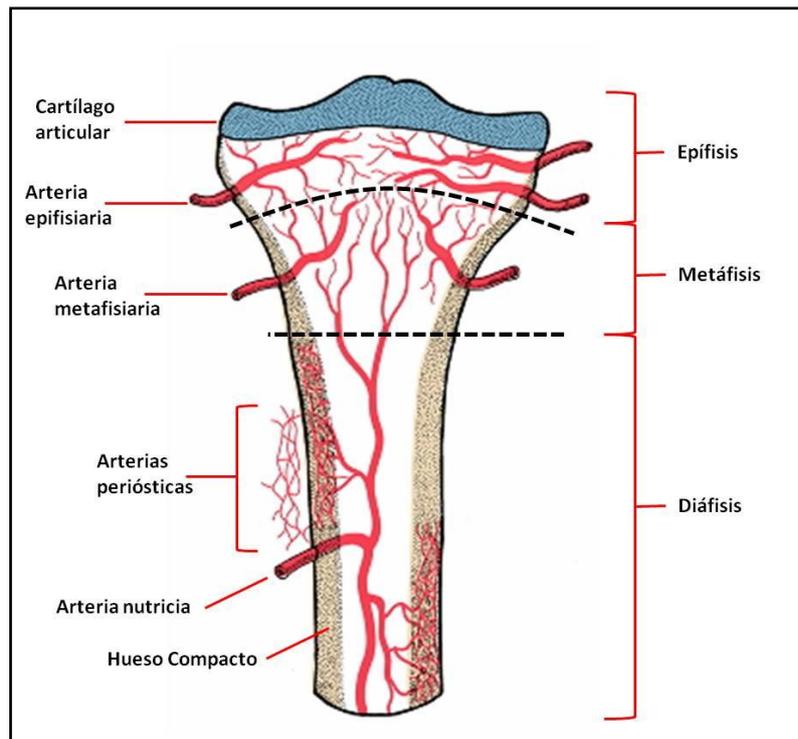


Fig. 2: Vascularización de un hueso largo (Ross, Kaye e Pawlina, 2005).

1.1.3. Fisiología del hueso

El hueso es un órgano altamente dinámico, que está en un constante proceso de resorción y formación. Se estima que el 10 % del sistema esquelético es renovado en un período de un año, siendo ésta renovación 5 veces mayor en el hueso esponjoso respecto al hueso compacto (Mccauley e Nohutcu, 2002). Este proceso de renovación es comúnmente conocido como el ciclo de la remodelación ósea, tiene una duración aproximada de 6 meses y está dividido en 5 fases (Fig. 3): a) Activación de precursores osteoclasticos, que se fusionan para dar origen a los osteoclastos maduros y funcionales. b) Resorción, en la cual los osteoclastos se encargan de crear una cavidad conocida como laguna de resorción a través de la degradación de la matriz extracelular mineralizada, liberando así grandes cantidades de iones calcio y fosfato que pueden incrementar la concentración de dichos iones hasta alcanzar valores entre los 8-40 mM (Silver, Murrills e Etherington, 1988). c) Reversión de las señales de resorción. d) Formación del hueso nuevo. Este proceso es llevado a cabo a través de la actividad de los osteoblastos, cuya función

es restablecer el tejido óseo en la laguna de resorción previamente formada. e) Mineralización, fase en la cual los osteoblastos se diferencian a osteocitos maduros, internalizándose en sus respectivas lagunas y liberando pequeñas vesículas matriciales que contienen fosfatasa alcalina y pirofosfatasa. La acción de estas enzimas produce la cristalización del Ca^{2+} y PO_4^- que posteriormente mineralizan la matriz ósea (Ross, Kaye e Pawlina, 2005; Gallagher e Sai, 2010).

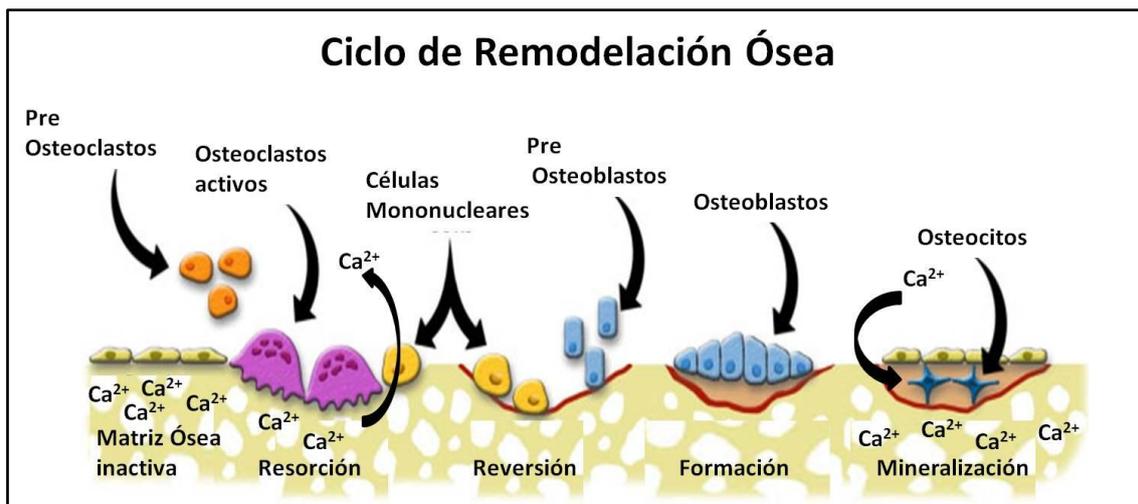


Fig. 3 Ciclo de Remodelación Ósea. Imagen modificada a partir de la siguiente página web <http://www.ns.umich.edu/Releases/2005/Feb05/bone.html>

Asimismo, el proceso de remodelación ósea provee al hueso de una función muy importante en el control de la concentración de calcio en la sangre (calcemia). Ya que, a través de la resorción de la matriz ósea el calcio puede ser transportado hacia la sangre cuando la calcemia se encuentra por debajo de sus niveles fisiológicos (concentración fisiológica en el humano oscila entre 89-101 mg/L) (Ross, Kaye e Pawlina, 2005). Análogamente, cuando la calcemia es muy alta, el calcio puede ser almacenado nuevamente en el hueso. Esta homeostasis de la concentración sanguínea de calcio, está controlada principalmente por dos hormonas: a) La hormona paratiroidea (PTH) que se encarga de estimular la actividad de resorción de los osteoclastos, reduce la excreción del calcio a través de los riñones y estimula la reabsorción intestinal de dicho ión. b) La calcitonina, que es producida por las células parafoliculares de la tiroides y se encarga de inhibir el efecto de la PTH sobre los osteoclastos (Johnson, 1991).

1.2. Patologías óseas y su relevancia

Debido a que las funciones del hueso son vitales para la homeostasis del organismo, cualquier desequilibrio en este órgano tiene una gran relevancia. Son innumerables las patologías que afectan el hueso. Sin embargo, el presente trabajo de investigación se limitará a hablar de la osteoporosis y la pérdida de piezas óseas como consecuencia de traumas, enfermedades de mal formación, tumores, etc. Debido a que estas son las patologías de mayor incidencia en la población.

1.2.1. Osteoporosis

La osteoporosis es una enfermedad del tejido óseo caracterizada por la desorganización de la microarquitectura del tejido y la reducción de la densidad ósea, lo que a su vez aumenta el riesgo a sufrir fracturas (Fauci *et al.*, 2008). En Estados Unidos más de 10 millones de personas mayores de 50 años sufren osteoporosis y se estima que en el 2020 la cifra supere los 14 millones, motivo por el cual esta enfermedad tiene un alto impacto a nivel económico (Burge *et al.*, 2007). Una evidencia de esto, es que en 2005 se gastaron 19 mil millones de dólares en el tratamiento de fracturas causadas por osteoporosis, solo en Estados Unidos, (Gallagher e Sai, 2010). Pese a que, las principales causas de esta enfermedad son la vejez y la menopausia, también puede desarrollarse la osteoporosis como enfermedad secundaria debida a osteogénesis imperfecta, mielomas, leucemias, hipertiroidismos, hiperparatiroidismo, artritis reumatoide, diabetes, entre otros (Rozman, 2009). Por tanto, las cifras de la incidencia y el impacto de esta enfermedad pueden ser aún mayores. En este sentido, el desarrollo de tratamientos efectivos, tanto en la prevención como en la sanación, es de gran importancia a nivel clínico.

Durante la evolución de la osteoporosis, se pierde el equilibrio entre la resorción y la formación ósea, debido a perturbaciones en la producción de alguno de los factores, moléculas y células involucrados en el proceso de remodelación ósea. En la Fig. 4 se muestra un diagrama

de la trama de señalización involucrada en la regulación de la velocidad y la frecuencia de activación de centros de resorción ósea. En este proceso actúan sincronizadamente osteoblastos, osteoclastos, células del sistema inmunitario, el Factor de Necrosis tumoral (TNF), la Osteoprotegerina (OPG), las interleucinas 1 y 6, el ligando activador del receptor de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (RANKL), el receptor del RANKL (RANK), el factor crecimiento transformante (TGF), el factor de crecimiento insulínico tipo I y tipo II, entre otros.

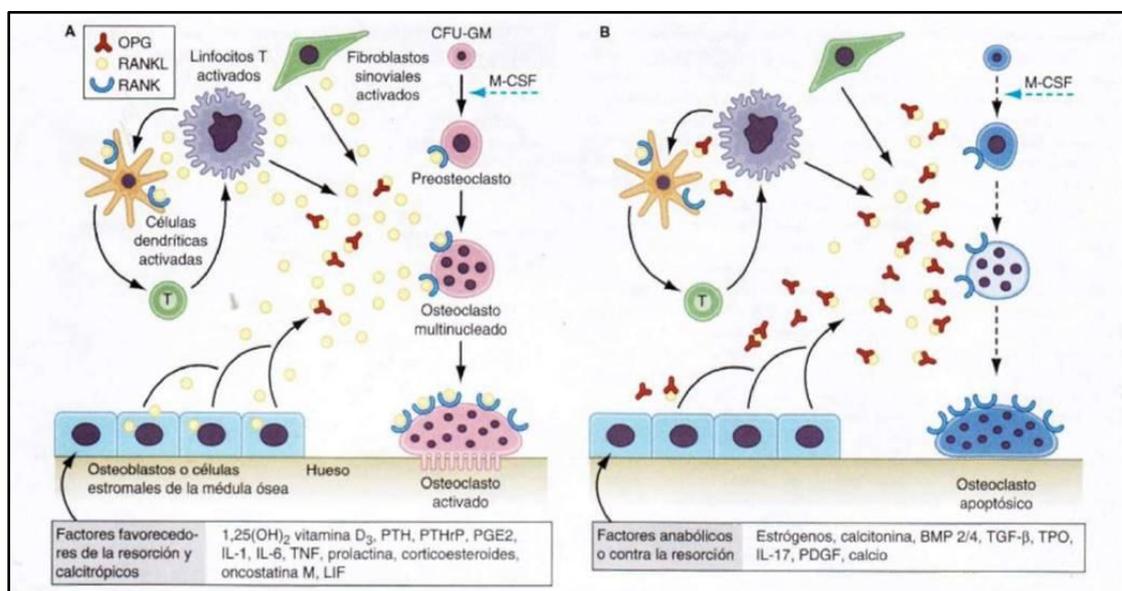


Fig. 4 Factores involucrados en el proceso de remodelación ósea (Fauci *et al.*, 2008)

El desequilibrio de la remodelación ósea se debe a un desacoplamiento de la reabsorción y la formación, lo cual puede deberse a dos causas: 1) Incremento de la absorción manteniéndose constante la formación. 2) Disminución de la formación. Como consecuencia del desequilibrio de la remodelación se desencadena la disminución del tejido óseo, un aumento de la porosidad del hueso compacto, disminuyendo así la fortaleza mecánica de los huesos. Mientras que, en los huesos esponjosos la acción de los osteoclastos conduce a la pérdida del molde para la formación de nuevo hueso y por ende se afecta la conectividad de las trabéculas (Fauci *et al.*, 2008). Todas estas características de la osteoporosis explican el incremento del riesgo a sufrir

fracturas en los individuos afectados, así como la pérdida de la resistencia mecánica y la reducción de la funcionalidad de los huesos.

1.2.2. Pérdida de piezas óseas

Cuando la ruptura o la pérdida de piezas óseas es pequeña la alta capacidad regenerativa del hueso logra solventar el problema siguiendo un proceso similar al que ocurre después de cualquier lesión. En primer lugar se forma un hematoma, que genera una respuesta pro-inflamatoria, con secreción de IL-1b, IL-6 y TNF- α , lo cual atrae quimotácticamente a los neutrófilos y los macrófagos hacia la zona de la lesión para encargarse de limpiar el tejido afectado. El siguiente paso es la invasión por parte de los vasos sanguíneos (capilares) y fibroblastos, los cuales forman un tejido fibroso, conocido como tejido de granulación. Este tejido da origen a pequeños núcleos de tejido cartilaginoso, que proliferan junto con el tejido fibroso hasta cubrir la zona afectada, estabilizando la estructura ósea y formándose así lo que se conoce como callo fibro-cartilaginoso. Paralelamente a la formación del callo, las células osteoprogenitoras se diferencian en osteoblastos, los cuales comienzan a formar un nuevo tejido óseo en la zona externa cercana a la fractura. Ésta neo-osificación avanza hasta cubrir externamente el callo fibro-cartilaginoso. Poco a poco, el nuevo tejido óseo invade el callo fibro-cartilaginoso hasta transformarlo en un callo óseo, donde el cartílago se osifica en un proceso similar al del crecimiento endocondral. En la región interna, la cavidad medular crece a ambos extremos de la fractura hasta fusionarse en la zona central de la misma, conformando un tejido óseo esponjoso que será paulatinamente reemplazado por tejido óseo compacto. Por último, a través de procesos de remodelación ósea sucesivos se alcanza la restauración de la forma original del hueso (Dimitriou, Tsiridis e Giannoudis, 2005; Ross, Kaye e Pawlina, 2005) (Fig. 5).



Fig. 5 Proceso de restauración del hueso fracturado (Marieb e Bostwick-Taylor, 2009).

Por el contrario, cuando las rupturas del hueso superan el tamaño crítico o cuando se pierden piezas óseas completas, el hueso es incapaz de restablecer su estructura y función por sí solo. Las pérdidas de piezas óseas pueden ser causadas por los accidentes de tráfico, accidentes deportivos, catástrofes naturales, enfermedades tales como las osteoporosis, mal formaciones óseas, tumores, entre otras.

Según la Academia Americana de Cirujanos Ortopédicos, solo en Estados Unidos ocurren alrededor de 6,2 millones de fracturas anuales y un 10 % de esas fracturas evolucionan como fracturas no consolidadas o pseudoartrosis, convirtiéndose así en un problema de salud pública importante.

1.3. Estrategias para solventar patologías óseas

El procedimiento clínico para solventar una fractura osteoporótica o accidental es semejante. Siendo el objetivo principal del tratamiento la fijación, la unión y el restablecimiento del funcionamiento del hueso o los huesos afectados. Dependiendo del nivel de gravedad de la fractura el tratamiento puede implicar procedimientos quirúrgicos aunados a la implantación de prótesis artificiales que puedan estabilizar o reemplazar la zona afectada. Sin embargo, en los casos que es necesario reemplazar piezas óseas por componentes artificiales es frecuente que la

funcionalidad de esa región sea mucho menor, o que se observen complicaciones a largo plazo que incluso pueden conllevar a nuevas cirugías para reemplazar o extraer la pieza artificial.

Actualmente, los tratamientos aplicados clínicamente tienen un alcance muy limitado, y son poco eficientes en el restablecimiento de la funcionalidad del hueso afectado. En este sentido, diversos campos científicos han estado desarrollando nuevas estrategias que logren incrementar la eficiencia en el tratamiento de dichas patologías óseas. Siendo la ingeniería de tejidos una de las estrategias más prometedoras.

1.4. Ingeniería de Tejidos

La ingeniería de tejidos es una estrategia multidisciplinaria cuyo principal objetivo es el de crear sustitutos biológicos que reemplacen estructural y funcionalmente el tejido perdido o dañado (Vunjak-Novakovic e Freshney, 2006). Para ello, en la mayoría de los casos se requieren 3 componentes esenciales: a) Células que se encarguen de construir el tejido perdido. b) materiales que funcionen como soporte estructural para el desarrollo del nuevo tejido (andamios) (Ringe *et al.*, 2002). c) compuestos tales como factores de crecimiento, proteínas de anclaje, péptidos, entre otros, que tengan la capacidad de inducir proliferación, quimotaxis, transporte o liberación de moléculas. Siendo posible acoplar estas moléculas a los andamios o estimular a su expresión en las células formadoras. Basados en esos 3 componentes básicos en la actualidad existe una enorme variedad de opciones, algunas de las cuales están siendo utilizadas a nivel clínico. Sin embargo, aún hay grandes limitaciones para alcanzar el objetivo principal de reconstruir tejidos funcionales iguales a los tejidos biológicos originales. A continuación, se detallarán las opciones que se pueden seleccionar de cada uno de los componentes básicos.

1.4.1. Células formadoras de tejido

Uno de los factores determinantes del éxito o fracaso de una técnica basada en ingeniería de tejidos es la selección de la fuente a partir de la cual se obtienen las células formadoras. En general, las células utilizadas con fines regenerativos son tipos celulares con una alta tasa de proliferación y con la capacidad para diferenciarse en el tipo celular deseado (Vunjak-Novakovic e Freshney, 2006). Algunos de los tipos celulares utilizados son (Fig. 6): células madre embrionarias, células madre provenientes de adultos, células progenitoras del tejido de interés, y células madre inducidas (iPS) (Badylak e Nerem, 2010).

Las células madre embrionarias (ESC) poseen dos propiedades determinantes: 1) pueden diferenciarse en cualquier tipo de célula o incluso formar un individuo nuevo, es decir, son totipotentes. 2) Alta tasa de proliferación. Sin embargo, se ha reportado que estas células tienen una alta tendencia a formar teratomas benignos post-implantación, debido a que son altamente inestables genéticamente, por lo que comúnmente sufren modificaciones cromosómicas y epigenéticas que pueden derivar en una diferenciación celular no deseada. Si las células embrionarias son producto de óvulos fecundados sobrantes de procedimientos de fertilización *in vitro* las células resultantes serán alogénicas para el paciente, por lo que pueden ocasionar problemas de compatibilidad, adicionales a los problemas ético religiosos involucrados en el uso de este tipo de células (Vunjak-Novakovic e Freshney, 2006; Stocum e Zupanc, 2008).

Las iPS son células somáticas diferenciadas -principalmente fibroblastos- inducidas a revertir su diferenciación a través de la transfección de genes exógenos tales como Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc (Zhou *et al.*, 2009). A través de este mecanismo las células son transformadas en células madre pluripotentes (células con el potencial de diferenciarse en cualquier tipo celular del organismo, pero incapaces de formar un individuo) o multipotentes (células con el potencial de diferenciarse en varios tipos celulares provenientes de una misma capa germinal). Debido a que las células primarias son células somáticas diferenciadas que pueden ser extraídas desde el paciente, se evitarían los problemas de histocompatibilidad y los problemas éticos derivados del

uso de ESC. Otra ventaja de las iPS, es que se ha demostrado que pueden ser obtenidas a partir de individuos de la tercera edad y son capaces de re-diferenciarse en células pertenecientes a cualquier capa germinal (pluripotentes) (Stocum e Zupanc, 2008). Demostrando así su potencial utilidad en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. Sin embargo, muchas son las incógnitas planteadas hasta la fecha y que hacen desconfiar acerca del uso de este procedimiento a nivel clínico. Por ejemplo, se desconoce si las iPS una vez diferenciadas e implantadas en el individuo pueden mantener ese nivel de funcionalidad a lo largo de la vida del paciente. Asimismo se desconoce si la progenie de las iPS puede o no causar teratomas o si su ciclo de vida es más corto comparado con las células no provenientes de una reprogramación. Por otra parte, en algunos países se ha prohibido el uso de este tipo de programación genética debido al riesgo de que sean usados con finalidades poco éticas, tales como la clonación humana. Desde el punto de vista práctico, la baja eficiencia de la reprogramación genética (alrededor de 0,3 %), así como el alto costo de producción y la larga duración del proceso de obtención de una línea celular diferenciada hacen poco probable el uso de las iPS en el tratamiento de pacientes en un futuro cercano (Stocum e Zupanc, 2008).

Una tercera opción son las células madre provenientes de individuos adultos. Estas células no requieren una reprogramación genética y pueden ser extraídas desde el mismo paciente, por lo que se evita el problema de las posibles incompatibilidades y los problemas éticos-religiosos relacionados con el uso de seres vivos o manipulaciones genéticas. Al igual que las ESC y las iPS, las células madre adultas son altamente proliferativas y tienen la capacidad de diferenciarse en un gran número de tipos celulares, aunque su potencial de diferenciación es menor al de las ESCs. Han sido encontradas células madre en todos los tejidos del individuo adulto. Debido a que tienen una menor potencialidad, las células madre adultas tienen una menor inestabilidad genética, disminuyendo la probabilidad de la formación de tumores o mutaciones no deseadas. Estas características aunadas a la reducción de problemas éticos, y a la facilidad relativa de obtención, purificación y diferenciación, las células madre adultas son las células con mayor aplicabilidad a nivel clínico en la actualidad. Sin embargo, es importante tomar en cuenta el

incremento de la morbilidad en el paciente debido a que tiene que ser sometido a procedimientos altamente dolorosos para la extracción de la población celular deseada. Otra desventaja es que la cantidad de células madre que se obtiene suele ser baja, por lo que es necesario realizar procesos de expansión *in vitro* que pueden a su vez generar problemas de contaminación al usar medios suplementados con sueros de animal, o al usar monocapas de otros tipos celulares como suplemento alimenticio, entre otros (Ikada, 2006; Vunjak-Novakovic e Freshney, 2006; Stocum e Zupanc, 2008).

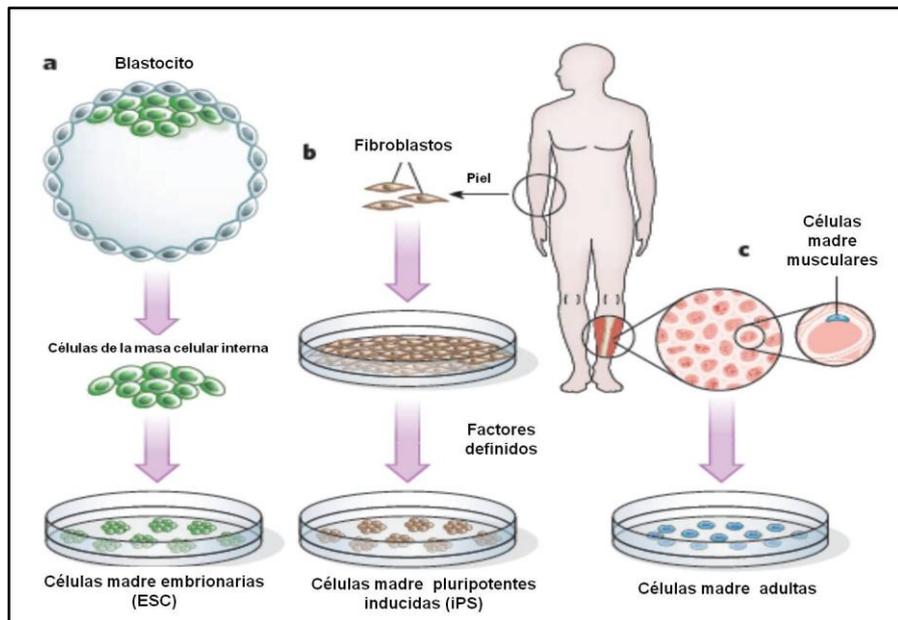


Fig. 6 Diferentes tipos de células madre. Tomada de (Lutolf, Gilbert e Blau, 2009)

Aunada a la potencial capacidad que tienen todas las células descritas en formar parte del nuevo tejido se ha descrito que estas células pueden ejercer un efecto inmunoregulador que reduce la respuesta inflamatoria excesiva que impide la adecuada regeneración del tejido de interés. Asimismo una vez estas células se encuentran en la zona de interés, pueden liberar factores que generen un efecto quimiotáctico a otras células formadoras del nuevo tejido (Da Silva M *et al.*, 2009; Seebach *et al.*, 2012). Sin embargo, las técnicas de ingeniería de tejidos son deficientes en la optimización de las señales que promuevan la movilización celular hacia la zona de interés y/o en la adecuada perfusión de nutrientes que permitan la supervivencia de las células.

1.4.2. Andamios

Los andamios utilizados en ingeniería de tejidos, proveen a las células de una estructura de soporte sobre la cual podrán formar el nuevo tejido. Idealmente, los andamios deben estar compuestos por materiales biodegradables y biocompatibles, preferiblemente aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos estadounidense ("Food and Drugs Administration" FDA) y/o su análogo europeo la Agencia de Medicinas Europeas. La degradación de los andamios debe llevarse a cabo a una velocidad que permita la deposición de una nueva matriz extracelular por parte de las células formadoras del tejido. Asimismo los compuestos resultantes de la degradación no pueden ser tóxicos ni inhibir la formación del nuevo tejido (Vunjak-Novakovic e Freshney, 2006).

Existe una gran variedad de andamios que se diferencian principalmente en: el material a partir del cual son fabricados (polímeros, geles, etc), la geometría (esponjas, fibras, micropartículas, etc), la estructura (porosidad, conectividad, tamaño de los poros, etc), las propiedades mecánicas (dureza, permeabilidad, flexibilidad, etc) y las propiedades superficiales (topografía, etc) (Salgado, Coutinho e Reis, 2004). La selección de una serie de características u otras dependerá del tejido que se desee generar, así como las características funcionales que se deseen imitar (Fig. 7).

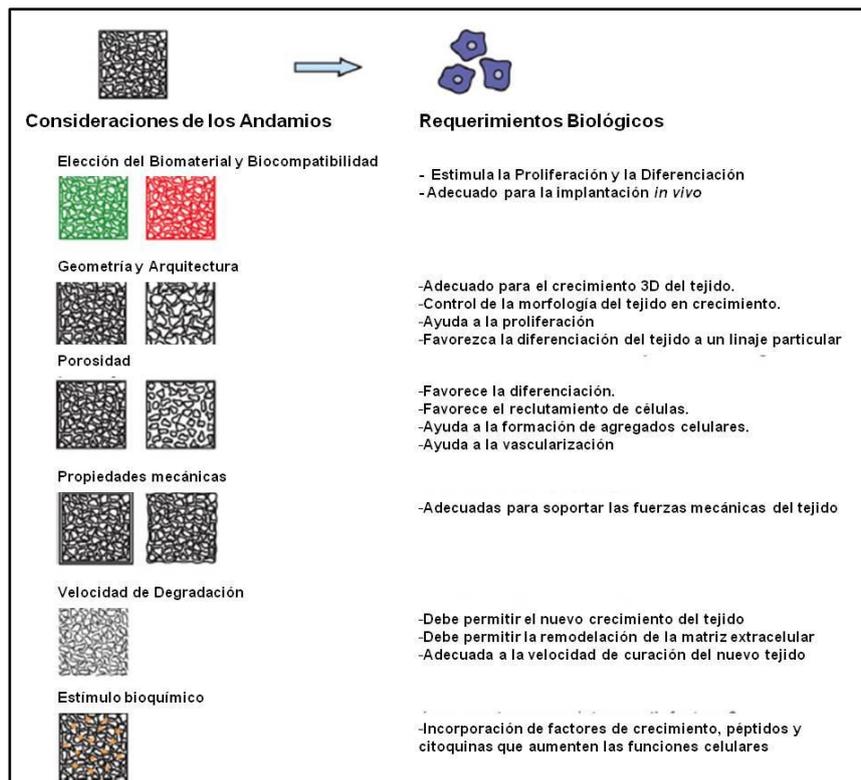


Fig. 7 Diferentes propiedades a considerar en un andamio. Tomado de (Sundelacruz e Kaplan, 2009)

1.4.3. Moléculas con actividad biológica

La adición de moléculas bioactivas, tales como los factores de crecimiento, puede ser de gran ayuda para alcanzar el éxito en la construcción de un nuevo tejido. Debido a que las moléculas con actividad biológica pueden mimetizar la composición de la matriz extracelular y estimular respuestas deseadas tales como proliferación, adhesión, migración, entre otros (Ikada, 2006). Algunas de las moléculas más utilizadas son: morfoproteínas óseas (BMPs), factor de crecimiento fibroblástico -2 (FGF-2), factor de crecimiento epidérmico vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), polipéptidos de adhesión conformados por Arginina, Glicina y Ácido Aspártico (RGDs), polímeros similares a la elastina (ELPs), fibronectina, colágeno, entre otros (Salgado, Coutinho e Reis, 2004).

Pese a lo anteriormente descrito, la adición de estas moléculas añade un nuevo reto en la ingeniería de tejidos y son muchas las incógnitas que han de ser resueltas. Ya que deben

desarrollarse estrategias para la encapsulación y posterior liberación controlada de dichas moléculas (Ikada, 2006). Otro punto controversial es la selección de la molécula y la concentración óptima para ejercer la respuesta biológica deseada. En este sentido, existen múltiples grupos de investigación que están intentando resolver dichas incógnitas. Siendo una de las estrategias más utilizadas es la funcionalización de los andamios, que consiste en unir moléculas bioactivas a la superficie del andamio o del material transportador (Lovett *et al.*, 2009). De esta forma, las moléculas adheridas al material del andamio, son liberadas a medida que este se degrada.

1.5. Estrategias utilizadas en la ingeniería de tejidos óseos

Debido a las características del hueso y a su relevancia en múltiples aspectos de la homeostasis del organismo en la ingeniería de tejidos óseos, no solo hay que restablecer el órgano desde el punto de vista meramente estructural, sino que además hay que restablecer la vascularización y la funcionalidad del tejido en todos los sentidos.

Muchas son las estrategias que se están estudiando con la finalidad de crear un sustituto óseo que mimetice al hueso biológico. Desde el punto de vista estructural, actualmente la mayoría de las técnicas usan materiales biodegradables que se asemejen al hueso en su forma, propiedades mecánicas, propiedades superficiales, etc. En este sentido, los andamios utilizados con el fin de regenerar el hueso son: cementos y cerámicas principalmente compuestos de fosfatos de calcio o hidroxapatita, vidrios de fosfato de calcio, vitrocerámicas, andamios compuestos por biopolímeros y fosfatos de calcio, entre otros (Rauh *et al.*, 2011). Todos ellos con la característica común de imitar alguna de las características de la composición de la matriz extracelular del hueso. Sin embargo, hasta la fecha no se ha desarrollado un material ideal que logre mimetizar todas las características del hueso. En la Tabla 1 se muestran algunos de los materiales más utilizados en la ingeniería de tejidos óseos y sus características.

Material del Andamio	Composición	Tasa de degradación	Dureza
β - Fosfato Tricálcico	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Muy Lenta (>3 años)	Rígido
Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Muy Lenta (~años)	Rígido
Fosfato Bicálcico	Variable	Rápida (~días-semanas)	Rígido
Fosfato Octacálcico	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Lenta (~6-12 meses)	Rígido
Sulfatos de Calcio	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Rápida (4-12 semanas)	Flexible

Tabla 1 Principales Materiales utilizados en Ingeniería de Tejidos Óseos y sus características. Extraída de (Szpalski, Wetterau, *et al.*, 2012).

Desde el punto de vista celular, se considera que las células con mayor potencial para formar un nuevo tejido óseo vascularizado son las células mesenquimales (MSCs) y las células progenitoras endoteliales (EPCs). Debido a que tanto las MSCs como las EPCs tienen una alta tasa de proliferación, son capaces de diferenciarse hacia osteoblastos y células endoteliales maduras respectivamente, ambas son atraídas a la zona dañada *in vivo*, y ambas poseen grandes reservorios en la médula ósea (Murasawa e Asahara, 2004; Wu *et al.*, 2004; Coreli *et al.*, 2010; Parekkadan e Milwid, 2010; Stephan *et al.*, 2010). Las mayores discrepancias en el uso de estas células radican en la necesidad o no de utilizar mono o co-cultivos pre-implantación, o si se deben usar andamios capaces de generar señales al organismo que atraigan las células progenitoras del individuo afectado.

En este sentido, las estrategias existentes para generar nuevos equivalentes biológicos del hueso se pueden dividir en dos grandes grupos:

1) Uso de andamios que estimulen la regeneración *in situ*. Esta estrategia tiene la ventaja de que se pueden producir andamios en grandes cantidades, que pueden ser implantados en el momento que lo requiera el paciente, no hay incompatibilidad debido a que las células formadoras del nuevo tejido son las del paciente, entre otras. Sin embargo, un factor en contra

es la baja eficiencia, que poseen algunos materiales para inducir la regeneración del tejido en un tiempo corto. En este sentido, el desarrollo de andamios para la ingeniería de tejidos óseos ha ido evolucionando con el tiempo.

Los primeros andamios utilizados en hueso estaban compuestos a base de titanio. Fueron desarrollados en los años 1960-1970s con el objetivo de sustituir el hueso desde el punto de vista estructural sin causar efectos tóxicos, tenían muy baja bioactividad, e incluso eran considerados inertes (Hench, 1980). Esta baja bioactividad se traduce en una muy baja capacidad para atraer células, las células que logran colonizar dichos los andamios muchas veces se encuentran solo superficialmente, el crecimiento del nuevo tejido en los casos de que se produzca es muy lento, entre otros. Con el objetivo de superar esos problemas, se desarrolló una segunda generación de andamios compuestos por vidrios de fosfatos de calcio, cerámicas de hidroxiapatita, vitrocerámicas, entre otros. Cuyo uso a nivel clínico ha demostrado ser exitoso en la inducción de respuestas biológicas positivas en el organismo que conllevan a la integración de los andamios a la estructura ósea y a la neo formación del hueso en la zona afectada (Hench e Polak, 2002; Rezwan *et al.*, 2006).

Con la finalidad de aumentar la bioactividad de los andamios los investigadores comenzaron a desarrollar una serie de modificaciones en los polímeros, vidrios y cerámicas utilizadas como andamios. En particular, se modificó la composición y la técnica de fabricación de los materiales con el objetivo de aumentar la velocidad de degradación y se funcionalizaron los polímeros para transformarlos en agentes con mayor bioactividad. De forma tal que esta nueva serie de andamios son capaces de activar respuestas biológicas específicas en el paciente, estimulando más eficientemente la formación del nuevo tejido *in situ* (Hench e Polak, 2002; Schroeder e Mosheiff, 2011).

2) Un segundo tipo de estrategia es el uso de andamios tridimensionales como estructura para cultivar *in vitro* las células madre formadoras del nuevo tejido. Con el objetivo de generar un tejido tridimensional inmaduro que pueda acelerar el proceso de formación del nuevo tejido, así como la restauración de la funcionalidad (Meijer *et al.*, 2007; Szpalski, Barbaro, *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha demostrado que esta aproximación es poco eficiente. Debido a que la distribución de las células no es uniforme y a que la oxigenación en las regiones internas del andamio es reducida. Lo cual ocasionalmente produce la muerte de los grupos celulares internalizados en el andamio. Pese a que el cultivo dinámico es una solución a dichos problemas técnicos, una vez los equivalentes tisulares son implantados, no se produce una rápida anastomosis entre los vasos sanguíneos del paciente y el implante, produciéndose la muerte celular por necrosis del nuevo tejido, debida a la deficiencia de nutrientes y la baja oxigenación (Santos e Reis, 2010). Actualmente, algunos investigadores sugieren el diseño de estructuras que permitan una mejor penetración de los vasos sanguíneos hacia el andamio. Tales como los que se muestran en la Fig. 8: 1) la funcionalización con factores con un alto poder angiogénico y quimiotáctico como por ejemplo el VEGF, 2) microcirugías para unir los vasos sanguíneos del paciente al andamio, 3) uso de técnicas de modificación genética en las células con la finalidad de que produzcan VEGF, entre otros (Meijer *et al.*, 2007; Place, Evans e Stevens, 2009; Santos e Reis, 2010).

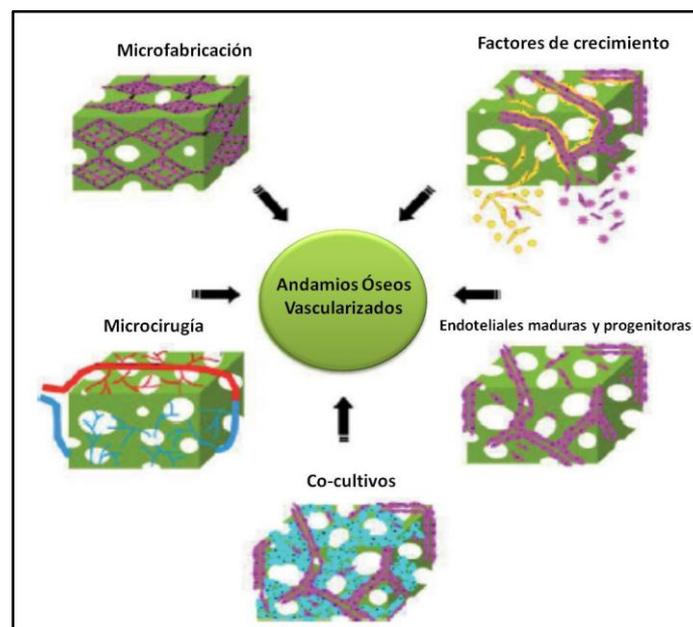


Fig. 8 Técnicas de vascularización en Andamios pre-celularizados. Tomada de (Santos e Reis, 2010)

En consecuencia, la aplicación de esta técnica en la práctica clínica es compleja y con escasas ventajas en comparación al uso de las nuevas prótesis biodegradables y bioactivas de 2da y 3era generación, que tienen un alto potencial de inducir regeneración tisular *in situ*.

1.6. Vidrios de Fosfato de Calcio y la liberación de iones

Existe una gran variedad de materiales biomiméticos, biodegradables y bioactivos compuestos de fosfatos de calcio, entre los que se encuentran los vidrios de fosfatos de calcio, pertenecientes a la segunda generación de biomateriales. Basados en las respuestas biológicas observadas *in vivo* los materiales bioactivos se clasificaron en dos tipos: Bioactivos de Clase A y los Bioactivos de Clase B. Los primeros son aquellos que producen una serie de reacciones en su superficie, así como una liberación de iones sodio, calcio, silicio y fósforo que promueven procesos de osteoinducción (diferenciación de MSCs hacia el linaje óseo que posteriormente conducirá a la formación de tejido óseo *de novo*), osteoconducción (facilitación de la penetración de nutrientes en una estructura tridimensional que conduce a la posterior infiltración del tejido óseo) y osteointegración (la integración del tejido desarrollado por ingeniería de tejidos con el hueso), permitiendo así la rápida regeneración del hueso (Habibovic e De Groot, 2007). Mientras, que en los materiales Bioactivos de Clase B la bioactividad es más reducida, la liberación de iones y la reactividad de la superficie son muy bajas, y solo se observan procesos de osteoconducción o osteointegración (Hench, Xynos e Polak, 2004).

Los vidrios de fosfato de calcio pertenecen a la 2da generación de materiales bioactivos de clase A, siendo el ejemplo más conocido el Bioglass[®] 45S5 desarrollado en los años 1970s. La composición del Bioglass[®] 45S5 es Na₂O- CaO- P₂O₅-SiO₂. Diferentes estudios experimentales han revelado que este material es particularmente favorable para la regeneración del tejido óseo, causando una fuerte adhesión del implante al hueso (osteointegración) y una serie de reacciones

en el microambiente cercano al implante que favorecen la colonización del andamio y la formación de un nuevo tejido óseo que exhibe las mismas propiedades mecánicas que el tejido óseo sano (Wilson *et al.*, 1981; Hench, Xynos e Polak, 2004). En el año 2000, fue demostrada la relación que tiene la liberación de iones al espacio extracelular (causada como consecuencia de la degradación del Bioglass[®] 45S5) con la expresión de genes involucrados en procesos de formación de tejido óseo. En particular, se demostró que la expresión del factor de crecimiento insulínico tipo II (IGF-II) y la proteína de anclaje del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-3) fueron mayores al 200 % respecto a las células que no fueron estimuladas con el medio condicionado de Bioglass[®] 45S5 (Xynos *et al.*, 2000). Esta respuesta biológica fue relacionada, por los autores, con aumento de iones silicio observado en el medio condicionado.

Un segundo ejemplo de vidrio bioactivo de clase A es el vidrio G5 cuya composición es P_2O_5 -CaO-Na₂O-TiO₂. El G5 debe su nombre a que posee un 5% de titanio, siendo este el encargado de la estabilización de las cadenas, al contrario del Bioglass[®] donde es el silicio el estabilizador. Particularmente en el G5, es de destacar que al variar la proporción de titanio en el material se cambia la velocidad de degradación del mismo. En trabajos de investigación previos se implantaron partículas de G5 en defectos óseos del cóndilo femoral de conejos demostrándose que las partículas de G5 favorecen la osteoconducción, la osteointegración y la invasión de vasos sanguíneos hacia el centro del defecto óseo mientras que se lleva a cabo la degradación de las partículas del vidrio (Sanzana *et al.*, 2008). La degradación del G5, se ha atribuido a la formación de una capa de hidratación creada como consecuencia de la interacción de las cadenas de PO_4^- con las moléculas de agua. Lo cual concuerda con la cadena de reacciones superficiales que fueron descritas en el Bioglass[®] 45S5 (Hench, Xynos e Polak, 2004). Análogamente, estudios *in vitro* demostraron que el G5 durante su degradación libera iones calcio, sodio, fósforo y titanio, siendo de particular interés, el incremento gradual de la concentración de iones calcio y fósforo en el medio extracelular (Navarro *et al.*, 2003). De igual manera, a través de ensayos *in vitro* usando fibroblastos se demostró que el G5 promueve la adhesión y la proliferación de estas células. Mientras que a través de un ensayo usando células

MG63 se demostró que el contacto directo de estas células con el G5 promueve la adhesión, la proliferación y la expresión de la fosfatasa alcalina (ALP) (Navarro, Ginebra e Planell, 2003; Navarro *et al.*, 2008). En este contexto, es posible que al igual que en el Bioglass[®] 45S5, los productos iónicos liberados por el G5 ejerzan un efecto positivo en las respuestas biológicas observadas.

Además del G5 y el Bioglass[®] 45S5 hay un gran número de tipos de vidrios bioactivos, con diferentes propiedades físicas, químicas, y diferente liberación de iones. En la Fig. 9 se muestra un resumen de los iones que son liberados por este tipo de materiales, así como las respuestas celulares que se han reportado.

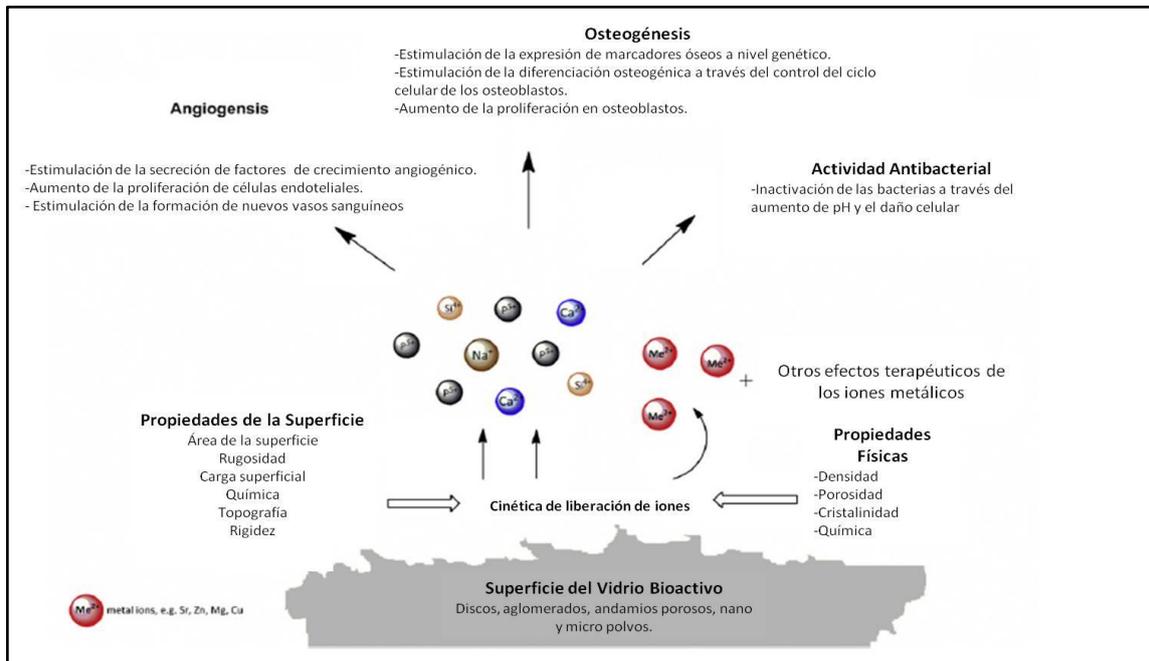


Fig. 9 Respuestas celulares a la liberación de iones de los vidrios bioactivos. Tomado de (Hoppe, Gueldal e Boccaccini, 2011).

Es de destacar que iones inorgánicos tales como el boro, el silicio, el estroncio, el calcio, los fosfatos, el magnesio, el zinc, entre otros, tienen conocidas funciones en el control del metabolismo del hueso y la angiogénesis (Hoppe, Gueldal e Boccaccini, 2011). Debido a que la matriz extracelular mineralizada del hueso contiene el 90% del calcio total del organismo, es

lógico pensar que una variación en la concentración extracelular pueda influir en el ciclo de remodelación ósea.

1.7. Calcio y su Relevancia en Biología

Desde el punto de vista químico el calcio es un metal alcalinotérreo, cuyo símbolo es "Ca" y de número atómico 20. En los sistemas biológicos, el calcio se puede encontrar en forma de ión Ca^{2+} o formando parte de moléculas más complejas, tales como las sales de hidroxiapatita, entre otros. Desde el punto de vista biológico, el calcio es uno de los iones más importantes en la regulación de múltiples respuestas celulares y tisulares. Se estima que la concentración citoplasmática del calcio es de 10^{-7} M, mientras que la concentración extracelular es 10^{-3} M (1 mM). Siendo estas concentraciones altamente controladas a través del funcionamiento de bombas y canales iónicos que regulan el paso de los iones hacia el interior y el exterior celular (Alberts *et al.*, 2010). Sin embargo, la concentración de calcio puede variar puntualmente durante ciertos procesos fisiológicos de forma rápida, generando así respuestas celulares tales como (Fig. 10): la despolarización de las células, la apertura de canales iónicos, la activación de vías de señalización acopladas a la fosfolipasa C (PLC), la vía de las quinasas MAPK o la vía del fosfatidil-inositol 4 quinasa (PI4K) (Alberts *et al.*, 2010), la activación o desactivación de la resorción ósea, entre otros.

A pesar de que es ampliamente conocido el papel del calcio como molécula de señalización intracelular, los efectos de variaciones de la concentración de calcio a nivel extracelular, se desconocían hasta el descubrimiento en los años 80 de un receptor extracelular sensible a variaciones de la concentración extracelular de calcio (Smajilovic e Tfelt-Hansen, 2007). Este receptor se conoce como Receptor Sensor de Calcio (CaSR) y fue descubierto en células paratiroideas de rata (Brown e Macleod, 2001).

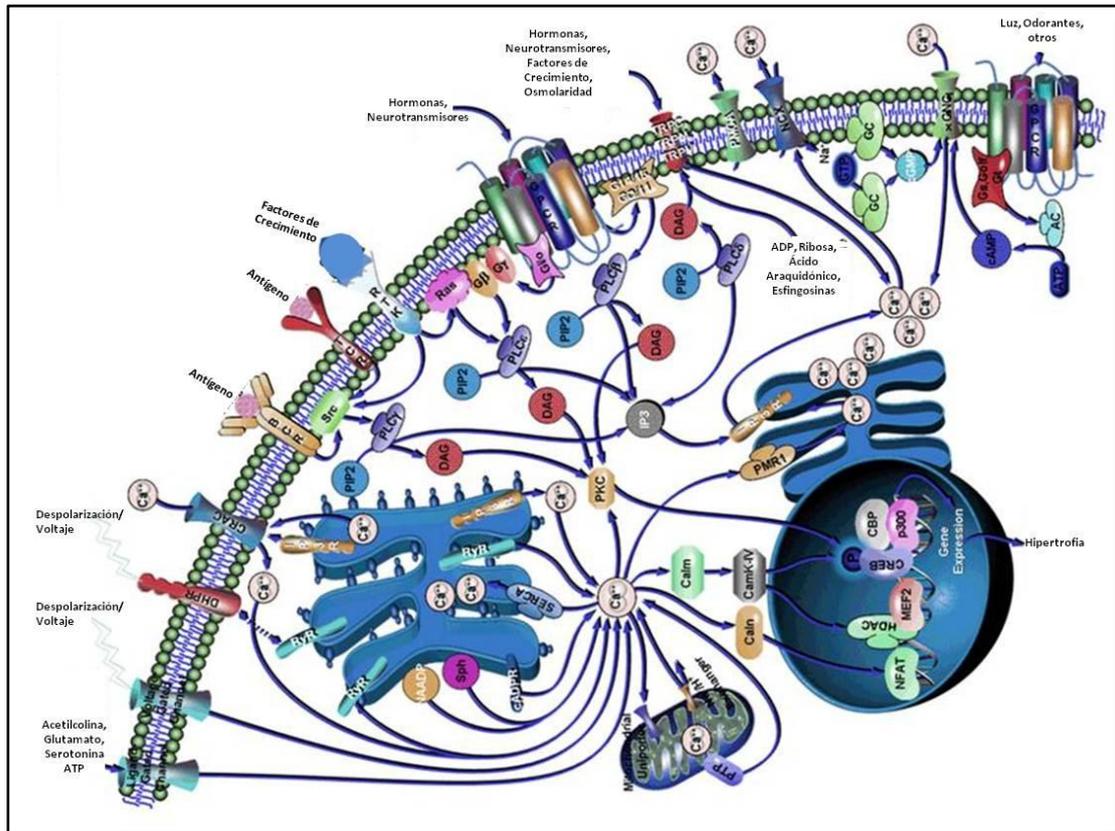


Fig. 10 Vías de señalización intracelulares donde está involucrado el calcio. Tomado de (Www.Sabiosciences.Com).

1.8. Receptor Sensor de Calcio (CaSR): Estructura y Funciones

Numerosos procesos celulares, tales como la migración y la diferenciación, dependen de la interacción con el microambiente, lo cual hace relevante el papel de los receptores de membrana sobre el comportamiento celular. Dentro de los receptores de membrana se encuentra el receptor sensor de calcio o como es conocido por su nombre en inglés “Calcium Sensing Receptor” (CaSR). El descubrimiento de este receptor demostró que dicho ión no solo puede actuar como segundo mensajero intracelularmente, sino que también extracelularmente es capaz de ejercer la función de primer mensajero (Smajilovic e Tfelt-Hansen, 2007).

El CaSR (Fig. 11 y Fig. 12), pertenece a la familia C de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y está compuesto por tres dominios: 1) dominio extracelular de

612 aminoácidos, en el cual se encuentra el sitio de acoplamiento al Calcio, 2) dominio 7 hélices transmembrana de 250 aminoácidos, en donde se acoplan los moduladores alostéricos y 3) dominio intracelular de 216 aminoácidos, que posee 5 sitios de fosforilación para PKC, dos dominios de fosforilación para PKA, múltiples sitios de acoplamiento para las MAPKs y otras moléculas de señalización intracelular (Smajilovic e Tfelt-Hansen, 2007; Bu *et al.*, 2008).

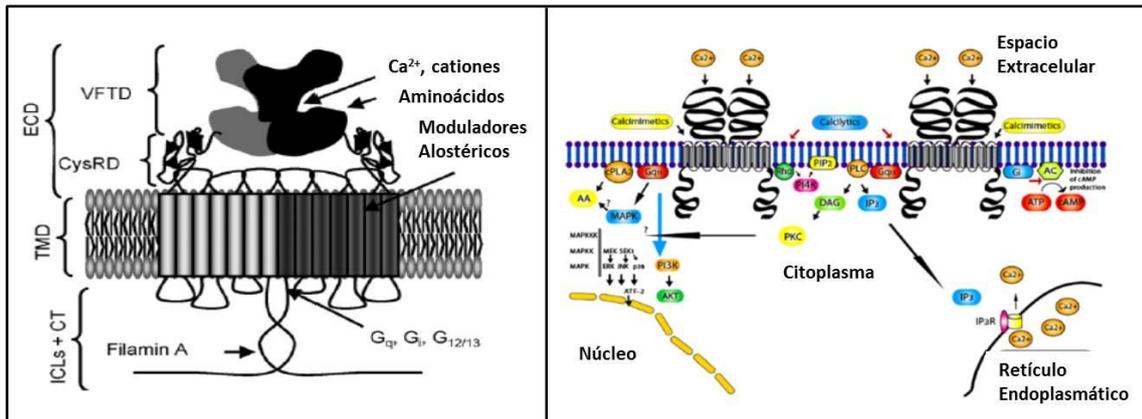


Fig. 11 Modelo de la estructura del CaSR (Breitwieser, 2008).

Fig. 12 Resumen de las vías de señalización en las que está involucrado el CaSR (Smajilovic e Tfelt-Hansen, 2007)

Aunque el CaSR haya sido descrito como un receptor sensor de calcio, hoy en día se conoce que no solo es capaz de activarse a través de su unión con el mencionado ión, sino que también se activa al unirse a otros como: La³⁺, Gd³⁺, Be²⁺, Ba²⁺, Sr²⁺, Fe²⁺, Pb²⁺, Ni²⁺, Co²⁺ y Mg²⁺ y a múltiples moléculas polivalentes tales como poliaminas, polilisinias, antibióticos y el péptido amiloide β (Hofer e Brown, 2003; Smajilovic e Tfelt-Hansen, 2007).

Actualmente, existe un número creciente de evidencias de que el CaSR está presente en células de tejidos involucrados en la homeostasis de calcio (paratiroides, riñón, intestino, osteocitos, osteoclastos y osteoblastos, entre otras) como en células de otros tejidos, como por ejemplo en tejidos del sistema cardiovascular (Brown e Macleod, 2001). Son diversos los procesos en los que está involucrado el CaSR. Por ejemplo en las células paratiroides la activación del receptor suprime la secreción de PTH, regulando indirectamente la concentración de calcio en sangre. Análogamente en el tejido óseo los osteoclastos se activan cuando existen

bajas concentraciones de calcio extracelular, mientras que los osteoblastos proliferan y se diferencian a osteocitos maduros cuando el CaSR detecta altos niveles de calcio extracelular (Chattopadhyay *et al.*, 2004; Ahlstrom *et al.*, 2008). A nivel sistémico, se ha demostrado que el CaSR está íntimamente implicado en el desarrollo y maduración del hueso y el cartílago, así como su relevancia en el adecuado funcionamiento de diferentes órganos (Wenhan *et al.*, 2008). Asimismo, este receptor parece tener importantes funciones en la regulación de la presión sanguínea, así como en la sobreexpresión de VEGF, lo que podría promover la proliferación de células endoteliales, estimular la angiogénesis y aumentar la permeabilidad vascular (Tfelt-Hansen *et al.*, 2003; Smajilovic e Tfelt-Hansen, 2008).

En este sentido, cada vez existen más evidencias de la importancia del CaSR como modulador de respuestas celulares ante variaciones de los niveles de calcio extracelular. Aunado a esto, es conocido que los biomateriales basados en fosfatos de calcio (carbonatos de calcio, vidrios, cerámicas, etc.) que son utilizados en ingeniería de tejidos óseos liberan iones al medio extracelular, entre los que destaca el calcio. Por tanto, es particularmente importante analizar el papel del calcio extracelular como potencial modulador de las respuestas desencadenadas por las células en la interacción con el biomaterial.

Capítulo II: Metodología

2. Metodología

2.1. Aislamiento de Células Mesenquimales (MSCs)

Las MSCs fueron extraídas en condiciones estériles a partir de médula ósea de las tibias y los fémures de ratas Lewis de 10 días de vida (Fig. 13). La médula ósea se obtuvo perfundiendo el interior de los huesos con 10 mL de medio de adhesión (Advanced DMEM (GIBCO) suplementado con 15% de SFB (Gibco), 1% Penicilina/Estreptomicina (Gibco), 1% L-Glutamina (Gibco) y 22,5 µg/mL de Heparina (Sigma)) con ayuda de una jeringa de 2 mL acoplada a una aguja 21G.

La médula ósea fue homogeneizada usando una jeringa de 2 mL acoplada a una aguja de 20G con la finalidad de disgregar al máximo las células, cultivada en placas de Petri (Nunclon) e incubadas a 37 °C, 5 % CO₂ durante 24 horas. Una vez transcurridas las 24h se retiró el sobrenadante (que contiene mayoritariamente glóbulos rojos y células no adherentes) y se reservó para el aislamiento de las células progenitoras endoteliales (más adelante se detallará el protocolo de aislamiento de las EPCs); mientras que la fracción adherente, es la fracción altamente enriquecida con células madre mesenquimales (MSC).

Seguidamente se realizaron dos lavados con PBS estéril y se cultivaron las células con medio de cultivo control para células mesenquimales (Advanced DMEM (GIBCO) suplementado con 15% de SFB (Gibco), 1% Penicilina/Estreptomicina (Gibco), 1% L-Glutamina (Gibco)). Al alcanzar la confluencia en las placas de Petri, las células fueron disgregadas usando TrypLE™ Express (Gibco) a 37 °C durante 1-2 min, fueron sembradas 400.000-500.000 células (P1) en frascos de cultivo T75 (Nunclon) y cultivadas en medio control hasta alcanzar la confluencia. Las células en P2 fueron criopreservadas en nitrógeno líquido usando medio de congelación (90 % SFB + 10% DMSO). Todos los ensayos fueron realizados con células de pasajes en un rango de 4-6.

2.2. Aislamiento de Células Endoteliales Progenitoras (EPCs)

Las EPCs al igual que las MSCs son aisladas a partir de la médula ósea de las tibias y fémures de ratas Lewis de 10 días. Tanto para el cultivo como el aislamiento de las EPCs se utilizaron placas y frascos de cultivo recubiertos con Fibronectina (FN) (Sigma). Para realizar los recubrimientos se diluye la FN a una concentración de 1 µg/mL y se incuba la placa o el frasco de cultivo durante 1 hora a 37°C ó 24h a 4°C. Posteriormente se retira el sobrenadante teniendo cuidado de no romper el recubrimiento.

A continuación, la fracción no adherente de la médula ósea, obtenida durante el aislamiento de las MSCs (ver aislamiento de MSC), se transfiere a placas (Nunclon) de 6 pozos recubiertas con fibronectina (FN) y se incuban durante 24 horas en medio de cultivo de adhesión (Fig. 13). Posteriormente, se repitió el proceso de transferencia, y la fracción no adherente fue cultivada durante 3-4 días a 37 °C en medio control de células endoteliales (M199, 20 % SFB, 1 % Penicilina/estreptomicina, 1% L-Glutamina, 1% Piruvato, 20 ng/mL VEGF (Peprotech), 5 ng/mL de FGFb (Peprotech), 22,5 µg/mL de Heparina, 1 µg/mL de Ascorbato (Sigma), 20 ng/mL de IGF-I (Sigma) y 5 ng/mL EGF (Sigma)). Transcurrido el tiempo, se descarta el sobrenadante, se realizan dos lavados con PBS estéril y se agrega medio control endotelial. La población celular obtenida es fusiforme, altamente proliferativa y está mayoritariamente compuesta de EPCs. Una vez se alcanza la confluencia, las células son disgregadas y se siembran 500.000 - 600.000 células por cada frasco de cultivo T75 previamente recubierto con FN. Las células en P2 fueron criopreservadas en nitrógeno líquido usando medio de congelación (90 % SFB + 10% DMSO). Todos los ensayos fueron realizados con células de pasajes en un rango de 4-6.

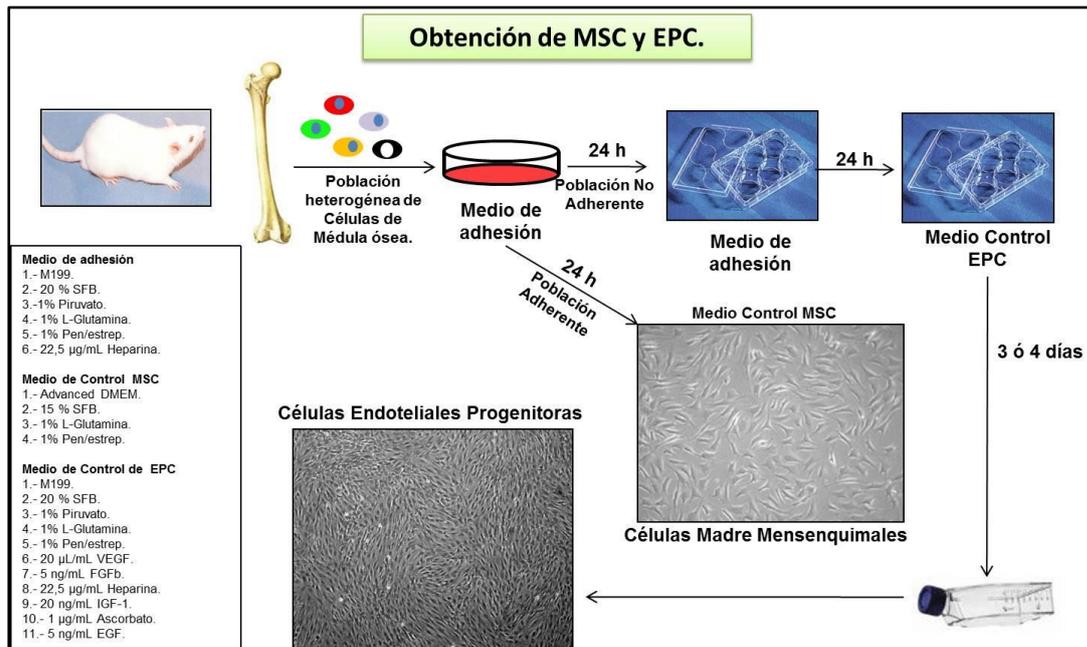


Fig. 13 Diagrama del protocolo de obtención de MSCs y EPCs

2.3. Caracterización de MSCs

Con la finalidad de confirmar la identidad de la población de MSCs se realizaron ensayos de inmunofluorescencia, donde se determinó la presencia de una serie de marcadores característicos de MSCs. A continuación se describe detalladamente el procedimiento realizado.

MSCs de P2 y P4 fueron cultivadas sobre cubreobjetos de 15 mm de diámetro colocados dentro de una placa de 24 pocillos (Nunclon) a una densidad de 10.000 células/pocillo. Pasadas 24 horas de incubación a 37°C con medio de cultivo control de MSCs, las células fueron fijadas con paraformaldehido al 3 % durante 15 min. Seguidamente, se realizaron 3 lavados con PBS-Glicina 1,5 g/L (PBS-Gli), se incubaron las muestras con PBS-Gli- 3% Albumina sérica bovina (PBS-Gli-BSA) durante una hora a 37 °C con la finalidad de bloquear las uniones inespecíficas. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-Gli y se incubaron las muestras con el anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche. Los anticuerpos utilizados y sus concentraciones se detallan en la Tabla 2. En el caso del control negativo en lugar de anticuerpo primario se añadió PBS-Gli-BSA.

Anticuerpo Primario	Origen	Dilución	Proveedor
Stro 1	Monoclonal de Ratón	1:100	Invitrogen
CD105	Policlonal Conejo	1:50	Santa Cruz
CD44	Policlonal Conejo	1:250	Life SPAN Biosciences
CD34	Monoclonal de Ratón	1:50	Santa Cruz
CD45	Monoclonal de Ratón	1:50	Santa Cruz
CaSR	Monoclonal de Ratón	1:100	Affinity Bioreagents

Tabla 2 Anticuerpos primarios utilizados en la caracterización de las MSCs. Las diluciones fueron preparadas usando PBS-Gli-BSA como solvente.

Posteriormente, fueron realizados 3 lavados con PBS-Gli y fueron añadidos los anticuerpos secundarios correspondientes. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó durante 1 hora a 37 °C protegido de la luz (Tabla 3). Durante los últimos 10 min de incubación con el anticuerpo secundario fueron añadidos 8 µg/mL de DAPI (Sigma). Seguidamente, fueron realizados 3 lavados de 1 min con PBS-Gli, usando una pinza de relojero se tomaron los cubreobjetos y se realizó el montaje con Mowiol. Por último, las muestras fueron almacenadas a 4 °C por al menos 24h, protegidas de la luz y fueron observadas a través de un microscopio confocal Leica SPE.

Anticuerpo secundario	Origen	Dilución	Proveedor
AlexaFluor 488	Policlonal de Cabra anti Ratón	1:300	Invitrogen
AlexaFluor 635	Policlonal de Cabra anti Conejo	1:300	Invitrogen

Tabla 3 Anticuerpos secundarios. Las diluciones fueron preparadas usando PBS-Gli-BSA como solvente.

2.4. Caracterización de EPCs

Las células progenitoras endoteliales aisladas siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, ya habían sido caracterizadas en nuestro grupo de investigación mediante inmunofluorescencia y se demostró que son: VEGFR -2⁺ (receptor del VEGF tipo 2), CD34⁺, vWF⁺ (Factor de vonWillebrand), CD31⁺, todos ellos marcadores característicos de EPCs (Aguirre *et al.*, 2010). Con la finalidad de profundizar en la caracterización de esta población celular, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia para revelar la expresión de CaSR en dicha población. El ensayo de inmunofluorescencia se realizó siguiendo el protocolo detallado para la caracterización de las MSCs. El análisis por citometría de flujo también fue empleado con la finalidad de determinar la pureza de la población celular. El procedimiento aplicado para la citometría de flujo se detalla a continuación.

En primer lugar las EPCs se cultivaron hasta alcanzar la confluencia en frascos de cultivo T75 usando medio de cultivo control de EPCs. Seguidamente, se procedió a disgregar las células usando TrypLE Express a 37°C durante 1-2 min. En este punto, es importante controlar el tiempo de tripsinización, debido a que puede afectar la estructura de los marcadores extracelulares que se desea analizar. Una vez disgregadas, el TrypLE fue inactivado añadiendo medio control de EPCs y las células fueron centrifugadas a 300 g durante 5 min. A continuación, fue descartado el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en la solución tampón de bloqueo (PBS + 6 % p/v de BSA) y se realizaron 2 lavados en solución de bloqueo. Posteriormente, se bloquearon las uniones inespecíficas incubando 10 min a temperatura ambiente en solución de bloqueo. Se realizaron 2 lavados con PBS y se procedió a fijar las células agregando 1 mL de solución de PBS + 1 % PFA por cada millón de células. Las células fueron incubadas en la solución de fijación durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación continua. Al finalizar la fijación, se realizaron 2 lavados con PBS, y fueron colocadas 500.000 células en cada tubo Eppendorf de 1,5 mL. Una vez separadas las muestras, se agregó 1 µg de cada uno de los diferentes anticuerpos primarios (Tabla 4) y se incubaron las muestras durante

30 min a 37 °C con agitación continua. A continuación se realizaron 2 lavados con PBS y se añadió 1 µg del anticuerpo secundario. La incubación con el secundario se realizó a 4°C, con agitación constante, durante 30 min. Finalmente, se realizaron 2 lavados con PBS, y se resuspendieron las células en un volumen de 500 µL de una solución tampón de pH 7.4 compuesta por PBS + 1 mM EDTA + 25mM de HEPES + 1 % SFB.

Anticuerpos		Origen	Proveedor
Primario	Secundario		
CD45		Monoclonal Ratón	SantaCruz
CD11b		Monoclonal Ratón	SantaCruz
	AlexaFluor 488	Policlonal de Cabra anti Ratón	Invitrogen

Tabla 4 Anticuerpos utilizados en la Citometría de flujo

Una vez finalizado el marcaje se procedió a analizar las muestras en un citómetro de flujo FC500-MPL (Beckman Coulter).

2.5. Composición de los medios de Cultivo utilizados

2.5.1. Medios de cultivo para las MSCs:

Medio Control MSCs	Contenido (100 mL)	Proveedor
Advanced DMEM	83 mL	Gibco
SFB	15 % v/v	Invitrogen
L-Glutamina (L-Glu)	1 % v/v	Gibco
Penicilina/Estreptomicina (P/E)	1 % v/v	Gibco
Medio Mínimo MSCs	Contenido (100 mL)	Proveedor
Advanced DMEM	95 mL	Gibco
SFB	3 % v/v	Invitrogen
L-Glutamina (L-Glu)	1 % v/v	Gibco
Penicilina/Estreptomicina (P/E)	1 % v/v	Gibco
Medio Osteogénico	Contenido (100 mL)	Proveedor
Advanced DMEM	81 mL	Gibco
SFB	15 % v/v	Invitrogen
L-Glu	1 % v/v	Gibco
P/E	1 % v/v	Gibco
Ácido Ascórbico (AA)	50µg/mL	Sigma
B-Glicerolfosfato (βGP)	10 mM	Sigma
Dexametasona (Dex)	10 nM	Sigma
Medios Suplementados con Ca ²⁺	Contenido	
EGTA (0 mM Ca ²⁺)	Medio control o mínimo MSC + 1,8 mM EGTA	
3 mM Ca ²⁺	Medio control o mínimo MSC + 1,2 mM CaCl ₂	
10 mM Ca ²⁺	Medio control o mínimo MSC + 8,2 mM CaCl ₂	
20 mM Ca ²⁺	Medio control o mínimo MSC + 18,2 mM CaCl ₂	
10 mM Ca ²⁺ + Ost	Medio osteogénico + 8,2 mM CaCl ₂	
10 mM Ca ²⁺ + AntiCaSR	Medio 10 mM Ca ²⁺ + 10 ng/mL AntiCaSR (Affinity Bioreagents)	

Tabla 5 Composición de los medios usados para el cultivo de MSCs

2.5.2. Medios de cultivo para las EPCs

Medio Control EPCs	Contenido (100 mL)	Proveedor
M199	77 mL	Invitrogen
SFB	20 % v/v	Invitrogen
P/E	1 % v/v	Gibco
L-Glu	1 % v/v	Gibco
Piruvato	1 % v/v	Gibco
VEGF	20 ng/mL	Peptotech
FGFb	5 ng/mL	Peptotech
Heparina	22,5 µg/mL	Sigma
IGF-I	20 ng/mL	Sigma
AA	1 µg/mL	Sigma
EGF	5 ng/mL	Sigma

Medio Mínimo EPCs	Contenido (100 mL)	Proveedor
M199	96 mL	Invitrogen
SFB	1 % v/v	Invitrogen
P/E	1 % v/v	Gibco
L-Glu	1 % v/v	Gibco
Piruvato	1 % v/v	Gibco

Medios suplementados EPCs	Contenido
EGTA	Medio Control o mínimo EPC + 1,5 mM EGTA
3 mM Ca ²⁺	Medio Control o mínimo EPC + 1,5 mM CaCl ₂
10 mM Ca ²⁺	Medio Control o mínimo EPC + 8,5 mM CaCl ₂
20 mM Ca ²⁺	Medio Control o mínimo EPC + 8,5 mM CaCl ₂
VEGF	Medio Control o mínimo EPC + 40 ng/mL VEGF
10 mM Ca ²⁺ + VEGF	Medio VEGF + 8,5 mM CaCl ₂
10 mM Ca ²⁺ + AntiCaSR	Medio Ca ²⁺ + 10 ng/mL AntiCaSR

Tabla 6 Composición de los medios usados para el cultivo de EPCs

2.6. Viabilidad y Proliferación

La viabilidad de MSCs y de EPCs se midió a través de la estimación de la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales. Para ello se cuantificó la formación del formazán a partir del WST-1 (Roche). De esta forma se obtuvo una estimación de la viabilidad de las células y se pudieron hacer estimaciones de la cantidad de células presentes en el cultivo.

Para llevar a cabo este ensayo se sembraron 40.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos recubiertas con FN, en el caso de las EPCs, y sin FN para las MSCs, en el medio de cultivo control correspondiente al tipo celular. Al producirse la adhesión celular, fue cambiado el medio de cultivo por el medio de tratamiento. Los tratamientos aplicados a las células se muestran en la Tabla 7:

Células	Tratamientos				
MSC	Control	EGTA	10 mM Ca ²⁺	20 mM Ca ²⁺	
EPC	Control	EGTA	3 mM Ca ²⁺	10 mM Ca ²⁺	20 mM Ca ²⁺

Tabla 7 Tratamientos evaluados en los ensayos de viabilidad y proliferación

Las células se cultivaron con los medios de tratamiento durante los siguientes tiempos: 24 horas, 72 horas y 7 días. Transcurridos cada uno de los tiempos, fue suministrado a cada pozo la cantidad de WST-1 (Roche) necesaria para que el reactivo estuviese 10 veces diluido. Al cabo de 60 min a 37 °C el sobrenadante fue transferido a una placa de 96 pozos, por triplicado, y se determinó la absorbancia en un lector de placas ELISA a una longitud de onda de 450 nm usando como referencia la absorbancia a 630 nm. En cada ensayo se utilizaron 2 réplicas por cada tratamiento y el experimento fue repetido tres veces de forma independiente.

2.7. Ensayos de Migración

La migración se cuantificó utilizando el método de la cámara de Boyden con membranas de policarbonato con poros de 8 μm (Corning). Las membranas de las cámaras fueron previamente recubiertas con FN a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a ambos lados, posteriormente 10.000 células resuspendidas en medio mínimo (ver Tabla 8 y Tabla 9) fueron sembradas en el compartimiento superior de las cámaras. Mientras que en el compartimiento inferior de cada cámara se colocaron las condiciones de tratamiento con la finalidad de crear gradientes de concentración. Transcurridas 24 horas las células fueron fijadas con formalina al 10 % (Sigma) durante 1 hora, marcadas con 5 mM DAPI durante 10-15 min y los núcleos en la cara inferior de la membrana de cuatro campos diferentes fueron contados para cada una de las membranas utilizando un microscopio invertido *Leica* con lámpara fluorescente (Fig. 14). En cada ensayo se utilizaron 2 réplicas por condición, y fue repetido cuatro veces de forma independiente. Los datos de cada condición fueron promediados y expresados relativos al control.

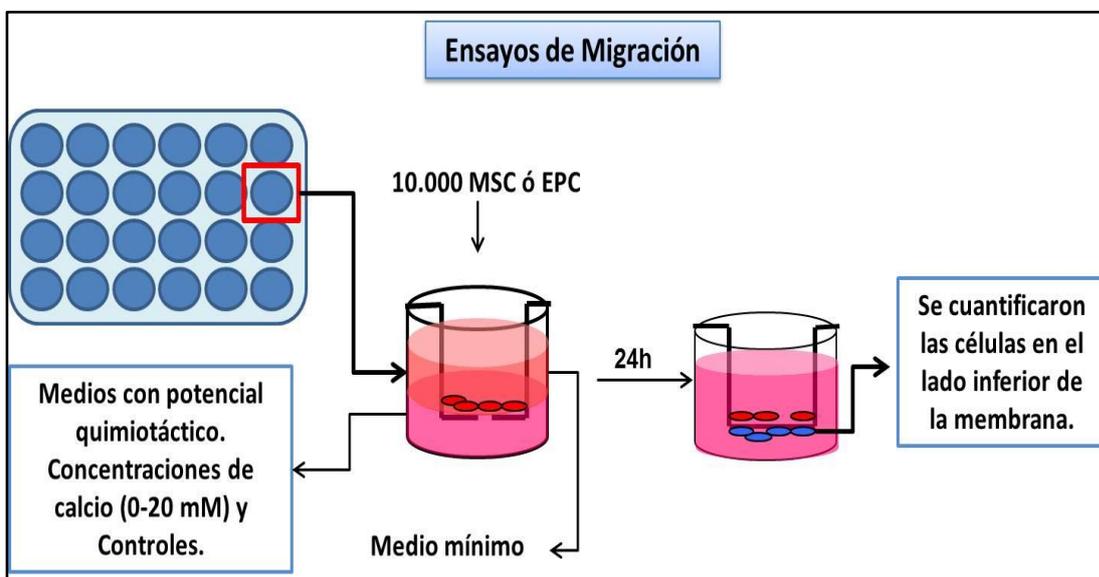


Fig. 14 Diagrama del procedimiento que se utilizó en los ensayos de migración

2.7.1. Tratamientos aplicados a las Células Mesenquimales

Medio Mínimo MSC (Control)	VEGF (Control Positivo)	EGTA (0 mM Ca ²⁺)	3 mM Ca ²⁺	10 mM Ca ²⁺	20 mM Ca ²⁺
Advanced DMEM + 3 % SFB + 1 % P/E + 1% L-Glu.	Medio Mínimo MSC + 60 ng/mL VEGF	Medio Mínimo MSC + 1,8 mM EGTA	Medio Mínimo MSC + 1,2 mM Ca ²⁺	Medio Mínimo MSC + 8,2 mM Ca ²⁺	Medio Mínimo MSC + 18,2 mM Ca ²⁺

Tabla 8 Detalle de los tratamientos evaluados en los ensayos de Migración con MSCs

2.7.2. Tratamientos aplicados a las Progenitoras Endoteliales:

Medio Mínimo EPC (Control)	VEGF (Control Positivo)	EGTA (0 mM Ca ²⁺)	3 mM Ca ²⁺	10 mM Ca ²⁺	20 mM Ca ²⁺
M199 + 1 % SFB + 1 % P/E + 1% L-Glu + 1% Piruvato	Medio Mínimo EPC + 40 ng/mL VEGF	Medio Mínimo EPC + 1,5 mM EGTA	Medio Mínimo EPC + 1,5 mM Ca ²⁺	Medio Mínimo EPC + 8,5 mM Ca ²⁺	Medio Mínimo EPC + 18,5 mM Ca ²⁺

Tabla 9 Detalle de los tratamientos evaluados en los ensayos de Migración con EPCs

2.8. Aislamiento de ARN

Con la finalidad de cuantificar los efectos de la estimulación a nivel genético, se procedió a aislar el ARN de células previamente cultivadas con medios ricos en calcio. En particular, se escogió la concentración de 10 mM de Ca²⁺ debido a los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad y migración.

En este ensayo fueron sembradas 40.000 células en cada pozo de placas de 24 pozos. Transcurridas 24 horas de incubación a 37°C en el medio control correspondiente, las células fueron sometidas a los diferentes tratamientos. La Tabla 10 ilustra los tratamientos y los períodos de tiempo empleados en cada tipo celular.

Células	Tratamientos		Tiempos	
MSC	Control MSC	10 mM Ca ²⁺	Ost	30 min, 24h, 72h, 7d, 10d, 15 d y 21d.
EPC	Control EPC	10 mM Ca ²⁺		30 min, 6 h, 24h, 72h y 7d.

Tabla 10 Detalle de los tratamientos evaluados en los ensayos de expresión genética

El ARN fue extraído utilizando el Kit de extracción de ARN comercial “RNeasy Mini Kit” (Qiagen) y se realizó siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial. Seguidamente se procedió a cuantificar la cantidad y calidad del ARN obtenido a través de un espectrofotómetro Nanodrop modelo ND 1000 (Nanodrop Technologies).

2.9. Reacción en cadena de la Polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)

El ADNc fue obtenido por medio de la aplicación de la reacción de la transcriptasa reversa utilizando el Kit de transcripción reversa “Quantitect Reverse Transcription Kit” (Qiagen), y se empleó siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial.

2.10. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Real Time PCR).

Este procedimiento se realizó a través de la reacción en cadena de la polimerasa y de cebadores o “primers” específicos para los genes de interés. Para ello se utilizó el kit comercial para PCR “Quantitect SYBR Green PCR Kit” (Qiagen). Los primers específicos utilizados para cada tipo celular se describen más adelante (Tabla 11). La amplificación se realizó siguiendo la recomendación de la casa comercial y cuyas condiciones son: un paso de activación de la Polimerasa de 15 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de denaturalización (15 s 94 °C), hibridación (30s a 55 °C) y extensión (30s a 72°C); se realizó en un termociclador en tiempo real Applied

Biosystems Step One Plus. Los datos fueron analizados a través del método de comparación de Ct. Este ensayo se realizó de forma independiente 4 veces y cada una de ellas poseía 2 réplicas de las condiciones de interés.

2.10.1. Cebadores usados con las Células Mesenquimales

Gen	Secuencias	Proveedor
GAPDH	5'-agaaggtggtgaagcaggcgg -3' 5'-atccttgctgggctgggtgg-3'	Biomers.net
ALP	5'-actgctggcccttgaccct-3' 5'-atccggagggccacctccac-3'	Biomers.net
Sialoproteína Ósea (BSP)	5'-ctgctttaatcttgctctg-3' 5'-ccatctccattttctcc -3'	Biomers.net
Colágeno I (Col Ia1)	5'-gacctccggctcctgctcct-3' 5'-tcgcacacagccgtgccatt-3'	Biomers.net
Osteocalcina (OC)	Nº de Catálogo: QT01084573	Qiagen

Tabla 11 Detalle de los cebadores específicos utilizados para revelar la expresión genética de marcadores

2.10.2. Cebadores usados con las Células Progenitoras Endoteliales

Gen	Nº de Catálogo	Proveedor
β -Actina	QT00193473	Qiagen
VEGF-A	QT00198954	Qiagen
IGF-2	QT00195594	Qiagen
vWF	QT00403095	Qiagen
CD31	QT01289939	Qiagen

Tabla 12 Detalle de los cebadores específicos utilizados para revelar la expresión genética de marcadores

angiogénicos

2.11. Análisis genético de múltiples marcadores angiogénicos

Fueron sembradas 100.000 EPCs/pozo en placas de cultivo de 6 pocillos recubiertas con FN. Basados en los resultados previos las células se cultivaron con medio control de EPC o con medio 10 mM Ca²⁺ durante 3 días. Cada condición poseía 3 réplicas. Una vez culminado el período de incubación, el ARN fue obtenido a través del protocolo de extracción de ARN detallado previamente en este mismo capítulo. Posteriormente se añadió un paso de eliminación del ADN genómico, el cual es recomendado por la casa comercial del kit del *array* y se realizó la retro transcripción del ARN hacia ADNc. En particular, se utilizaron 0,2 µg de ARN por reacción y se siguió el protocolo recomendado por la casa comercial del *kit RT² First Strand Kit* (SABiosciences). A continuación, se mezclaron 0,2 µg de ADNc con la mezcla de SYBR Green -reactivo fluorescente que se utiliza para medir la cantidad de ADN durante la reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real (Real Time PCR)- contenida en el kit RT² qPCR SYBR Green Master Mix (SA Biosciences). Seguidamente, 10 µL de la mezcla de reacción fueron cargados en los pocillos de las placas de *PCR array* contenidas en el kit de *rat Angiogenesis PCR Array* (SA Biosciences). Las placas de 384 pocillos utilizadas están cargadas con 4 copias de cada gen: 1) los cebadores específicos de 86 genes relacionados con angiogénesis, 2) 5 genes constitutivos que son utilizados como control (housekeeping), 3) un control negativo de retrotranscripción y 4) control de contaminación por ADN genómico (Fig. 15). La amplificación fue realizada siguiendo las indicaciones de la casa comercial, 1) Activación: 10 min 95 °C, 2) 40 ciclos de: 15 s a 95 °C (denaturalización) y 1 min a 60°C (extensión). Cada gen fue analizado por cuadruplicado y la expresión genética fue evaluada utilizando el método de comparación de CT.

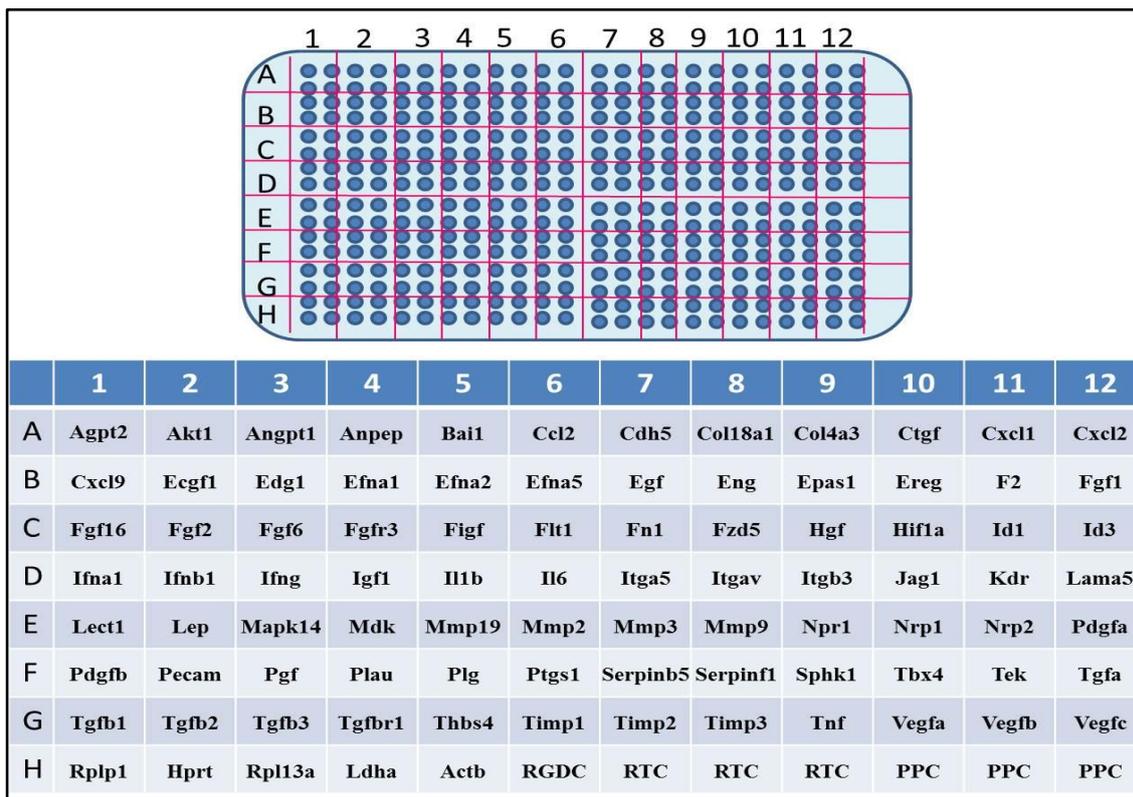


Fig. 15 Listado de genes evaluados en el ensayo de Angiogenesis PCR Array

2.12. Ensayo de Formación de túbulos en Matrigel

Con la finalidad de evaluar funcionalmente el efecto del calcio como agente promotor de procesos angiogénicos, se procedió a realizar el ensayo de formación de túbulos en Matrigel (Sigma). Para ello, se diluyó el matrigel 1:1 en medio mínimo de EPC. La solución de matrigel fue homogenizada y gelificada en placas de 48 pozos a 37°C durante 45 min. Después de la gelificación del matrigel las células resuspendidas en las condiciones de tratamiento fueron sembradas a una densidad de 30.000 células por pozo. Transcurridas 20 horas fueron tomadas 4 imágenes por cada condición a través de un microscopio invertido acoplado a una cámara CCD, sólo los túbulos mayores a 100 µm de cada tratamiento fueron contabilizados, promediados y expresados relativos a la condición control (medio mínimo). Cada ensayo contenía 2 réplicas por condición, y fue repetido cuatro veces de forma independiente. Los tratamientos aplicados fueron: 1) medio mínimo

de EPC, 2) **10 mM Ca²⁺**: medio mínimo + 8,5 mM CaCl₂, 3) **VEGF**: medio mínimo + 40 ng/mL VEGF, 4) **EGTA**: medio mínimo + 1,5 mM EGTA, 5) **10 mM Ca²⁺ + VEGF**: medio VEGF + 8,5 mM Ca²⁺.

2.13. Expresión Proteica de Marcadores Osteoblásticos

La expresión a nivel proteico de marcadores de diferenciación osteoblástica fue revelada usando la técnica de la inmunofluorescencia. Para ello se cultivaron MSCs que fueron sometidas a los siguientes tratamientos: 1) Control, 2) 10 mM Ca²⁺ y 3) Ost. Los tiempos evaluados fueron 7 y 15 días. El protocolo seguido para realizar el marcaje fue análogo al descrito previamente en la sección de caracterización, con la diferencia de que los marcadores evaluados fueron los que se muestran en la Tabla 13:

Anticuerpos		Origen	Proveedor
Primario	Secundario		
ALP		Monoclonal Ratón	SantaCruz
OC		Policlonal Conejo	ABBIOTEC
Osteopontina (OPN)		Policlonal Conejo	Abcam
	AlexaFluor 488	Policlonal de Cabra anti Ratón	Invitrogen
	AlexaFluor 635	Policlonal de Cabra anti Conejo	Invitrogen

Tabla 13 Anticuerpos usados para revelar la expresión a nivel proteico de marcadores osteoblasticos

2.14. Actividad de Fosfatasa Alcalina

La actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), fue cuantificada midiendo la cantidad de *p*-Nitrofenil fosfato que es desfosforilado en cada muestra, en un período de tiempo determinado. Para ello, se cultivaron 30.000 MSCs por pocillo en placas de 12 pozos. Las células fueron sometidas a las siguientes condiciones: Control MSC, 10 mM Ca²⁺, Ost y 10

mM Ca²⁺ + Ost. Los períodos de tiempo evaluados fueron: 24h, 3 d, 7 d, 10d y 15d. Seguidamente, las células fueron disgregadas y resuspendidas en 1 mL de PBS. A continuación se siguió el protocolo sugerido por la casa comercial del kit *Sensolyte pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit* (ANASPEC).

Los datos fueron expresados como cantidad de ALP/min.cél. La cantidad de células se estimó cuantificando la cantidad de ADN genómico en cada muestra y comparando con una curva de calibración cantidad células vs cantidad de ADN genómico. Las mediciones de la cantidad de ADN genómico se realizó empleando el Nanodrop modelo ND 1000 (Nanodrop Technologies).

2.15. Rojo de Alizarina (AR)

La capacidad de mineralizar la matriz extracelular es una característica funcional de las células pertenecientes al linaje osteoblástico. Por ello, se utilizó la tinción del Rojo de Alizarina para determinar el grado de mineralización de la matriz extracelular de las MSC cultivadas bajo diferentes condiciones. El protocolo seguido fue el que se describe a continuación.

20.000 MSCs por pocillo fueron cultivadas en placas de 12 pozos y fueron sometidas a los siguientes tratamientos: 1) **Control MSC**, 2) **10 mM Ca²⁺**, c) **Ost**, d) **10 mM Ca²⁺ + Ost**. Los períodos evaluados fueron: 3, 7, 10, 15 y 21 días. Una vez culminados los tratamientos, las células fueron lavadas, muy cuidadosamente, 2 veces con PBS y 2 veces con agua MilliQ. Seguidamente se añadieron 300 µL por cada pocillo de la solución de Rojo de Alizarina (Sigma) previamente preparada a 40 mM (pH 4.2). Las placas fueron incubadas durante 5 min en agitación suave y constante a temperatura ambiente. La AR no incorporada en la matriz extracelular fue descartada y se procedió a realizar 4 lavados de 2 min con agua MilliQ en agitación constante. Una vez retirado el excedente de solución AR, se adquirieron las imágenes usando un microscopio invertido (Leica) acoplado a una cámara digital (muestras de 3 días), o a

través de una cámara digital Sony CyberShot TX1 de 10,2 megapixels (muestras de 7, 10, 15 y 21 días).

Finalmente, las muestras fueron incubadas durante 20 min con una solución tampón de Solución de cloruro de Cetilpiridinio (CPC) a temperatura ambiente y en agitación constante. Este tratamiento se encarga de disolver el AR que reaccionó con la matriz mineralizada. Seguidamente, fueron tomadas alícuotas de 100 μ L de cada muestra y fueron trasvasadas a una placa de 96 pocillos. Posteriormente, se midió la absorbancia de la solución a 570 nm usando el lector de ELISA *Infinite M200 Pro ELISA multiplate reader*. Haciendo uso de una curva de calibración mM de AR vs absorbancia se estimó la cantidad de calcio en la matriz extracelular mineralizada que contenía cada muestra. La conversión de cantidad de AR a cantidad de calcio se realizó siguiendo el manual del proveedor (cantidad de calcio = 2 X cantidad de AR).

2.16. Ensayos de Bloqueo del Receptor Sensor de Calcio

Con el objetivo de determinar el grado de implicación del receptor sensor de calcio en la modulación de las respuestas celulares obtenidas en EPCs y MSCs se procedió a bloquear dicho receptor. Para ello se incubaron las muestras con 20 ng/mL de antiCaSR, debido a que el epítotope de dicho anticuerpo está localizado en la zona de unión del calcio al receptor, por lo que impide la interacción del CaSR con el calcio extracelular. Los ensayos en los cuales se empleó el bloqueo del CaSR fueron elegidos usando como base los resultados previos en MSCs y EPCs. En particular, se realizaron los siguientes ensayos especificados en la Tabla 14.

Células Madre Mesenquimales		Células Progenitoras Endoteliales	
Ensayo	Tratamientos	Ensayo	Tratamientos
Migración	Control, 10 mM Ca ²⁺ , 10mM Mg ²⁺ y AntiCaSR	Migración	Control, 10 mM Ca ²⁺ , 10mM Mg ²⁺ y AntiCaSR
PCR Tiempo Real	Control, Ost, 10 mM Ca ²⁺ y AntiCaSR	Formación de Túbulos	Control, 10 mM Ca ²⁺ y AntiCaSR
Rojo de Alizarina	Control, Ost, 10 mM Ca ²⁺ y AntiCaSR		

Tabla 14 Ensayos en los que se evaluó el papel del CaSR

Los protocolos aplicados, así como la composición detallada de cada uno de los tratamientos aplicados fueron análogos a los descritos previamente en este capítulo.

2.17. Fabricación de Andamios de PLA y PLA/G5

Los andamios utilizados en el presente proyecto de investigación están compuestos por ácido poliláctico (PLA) 95L/5DL (casa comercial PURAC) y partículas del vidrio bioactivo llamado G5 que fue desarrollado previamente en nuestro grupo de investigación. La fabricación de los andamios estuvo a cargo de la Dra. Melba Navarro.

2.17.1. Fabricación del G5

El G5 es un vidrio bioactivo altamente soluble de fosfato de calcio en el sistema P₂O₅-CaO-Na₂O-TiO₂. Tiene una composición equimolar de P₂O₅ y CaO (44,5%), 6 % de Na₂O y 5 % de TiO₂. Para la fabricación del G5 se realizó una mezcla homogénea de NH₄H₂PO₄, Na₂CO₃, CaCO₃ y TiO₂ que fue fundida en un crisol de platino a 1350 °C durante 3 horas. Seguidamente, el vidrio fue colocado en su temperatura de transición a 530 °C.

2.17.2. **Fabricación de andamios de PLA y PLA/G5**

Los andamios biodegradables fueron fabricados utilizando el método del “*solvent casting*” usando el NaCl como agente porógeno (Navarro *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2008). El PLA fue disuelto en cloroformo (5 % p/v) en un agitador orbital a 200 rpm a temperatura ambiente. Seguidamente la solución de PLA fue mezclada con partículas de NaCl de 80-120 μm a una concentración del 94 % p/v. En el caso de los andamios de PLA/G5 a la mezcla de PLA-Cloroformo-NaCl se le añadió un 50 % p/v de partículas de G5 < 40 μm hasta obtener una masa homogénea (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). La mezcla fue colocada en moldes cilíndricos de teflón del tamaño deseado (3 mm diámetro y 5 mm largo). Durante 24-48 horas se dejó evaporar el cloroformo a temperatura ambiente, se procedió a desmoldar los andamios y se colocaron dentro de un vaso de precipitado con agua MilliQ (3 cambios por día) durante 2 días, para eliminar el NaCl. Por último los andamios se dejaron secar a temperatura ambiente. Los andamios obtenidos poseen 95% de porosidad con un tamaño de poro de 80-210 μm y un alto grado de interconexión de poros (Navarro *et al.*, 2004).

	PLA	PLA/G5
PLA	100 %	50 %
G5	-----	50 %

Tabla 15 Composición de los andamios utilizados en los ensayos *in vivo*

2.18. **Implantación de andamios de PLA y PLA/G5 en cóndilos femorales de rata**

Previos análisis realizados por nuestro grupo de investigación determinaron que el PLA/G5 es capaz de inducir respuestas pro-angiogénicas *in vitro* (Aguirre *et al.*, 2012). Asimismo se ha demostrado que el PLA/G5 podría tener efectos positivos en la regeneración del hueso (Sanzana *et al.*, 2008). Por ello, en el presente proyecto de investigación se procedió a realizar pruebas *in*

vivo con la finalidad de evaluar el potencial uso de andamios de PLA/G5 en la regeneración ósea *in situ*. Estos experimentos fueron realizados durante una estancia de 4 meses y 3 semanas en la unidad U1026 del INSERM dirigido por la Dra. Joëlle Amédée-Vilamitjana, en Burdeos, Francia.

Para determinar el potencial del PLA/G5 se escogió el modelo del defecto de cóndilo femoral de rata, modelo ampliamente utilizado en la ingeniería de tejidos óseos. Particularmente se utilizaron 40 ratas hembra Wistar de 12 semanas de edad. Los procedimientos aplicados se realizaron siguiendo la normativa vigente y bajo la supervisión de personal calificado para garantizar la adecuada manipulación de los especímenes.

2.18.1. Cirugía

Previo a la cirugía las extremidades posteriores de las ratas fueron afeitadas, con la finalidad de reducir la probabilidad de infecciones. Durante la cirugía las ratas fueron anestesiadas con gas de isoflurano. Seguidamente se procedió a exponer los cóndilos femorales y se realizaron perforaciones bilaterales de 3 mm de diámetro. Dentro del defecto femoral infringido fue aplicado uno de los siguientes tratamientos: 1) Sin implante (Control), PLA, PLA/G5. Seguidamente, las extremidades inferiores fueron suturadas y una solución antibiótica de absorción cutánea fue aplicada sobre las heridas, con la finalidad de reducir el riesgo de infecciones. En la Fig. 16 se ilustra el procedimiento realizado durante la cirugía.

Al transcurrir los períodos de implantación las ratas fueron sacrificadas en cámaras de gas, y se procedió a realizar la disección de las extremidades posteriores.

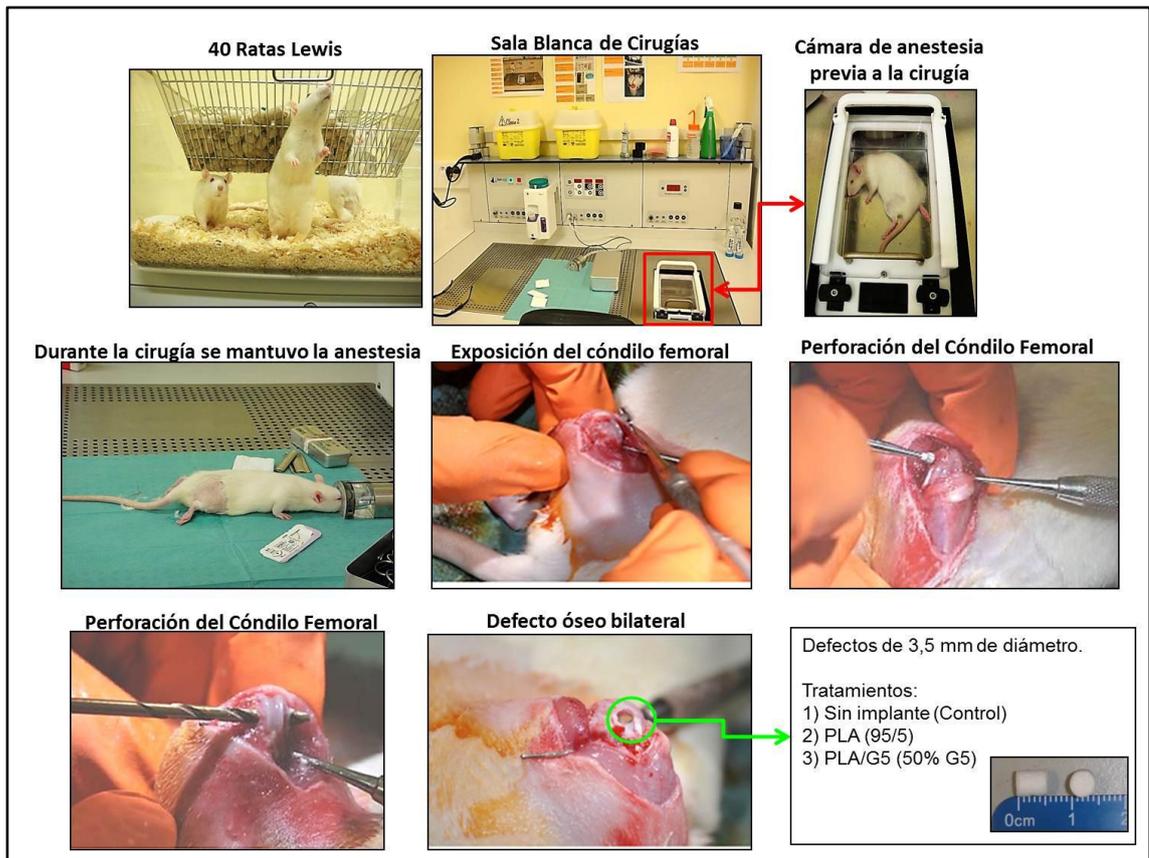


Fig. 16 Cirugía e implantación de andamios de PLA, PLA/G5 en cóndilos femorales de rata.

2.18.2. Plan experimental

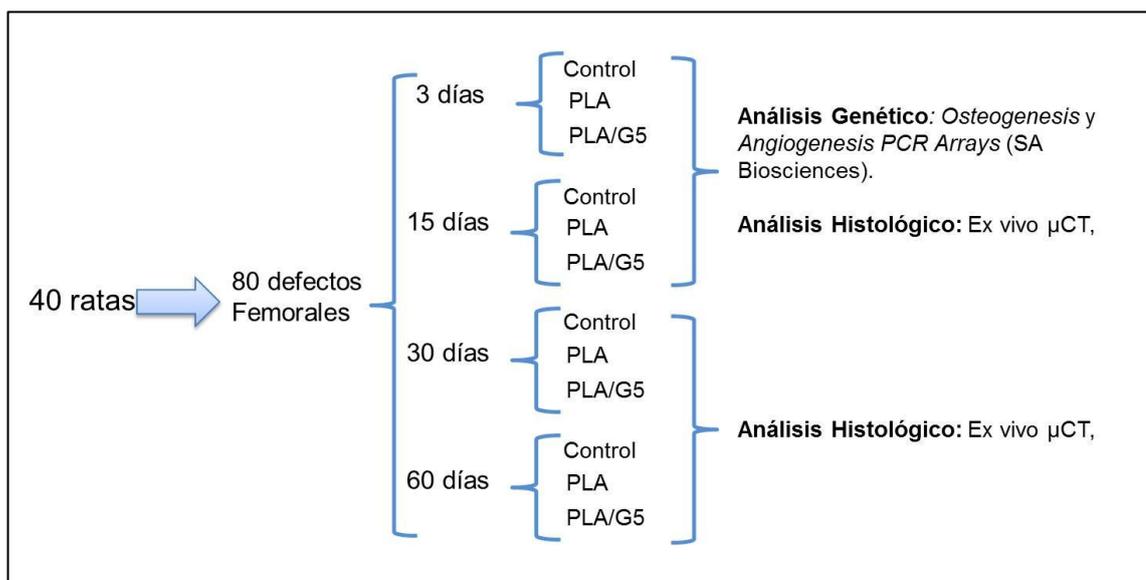


Fig. 17 Períodos de implantación y ensayos aplicados a las muestras *in vivo*.

2.19. Extracción de ARN a partir de andamios implantados en cóndilos femorales de rata

Una vez obtenido el tejido de interés a partir del defecto óseo infringido, se introdujo la muestra en un criotubo debidamente rotulado y se congeló la muestra en nitrógeno líquido, con la finalidad de reducir al máximo la degradación del tejido y como consecuencia del ARN. Seguidamente, se procedió a macerar las muestras a -180 °C hasta obtener un polvo homogéneo. Una vez maceradas, las muestras fueron resuspendidas en TRIzol[®] en tubos cónicos de 1,5 mL, y fueron centrifugadas a 12.000 g a 4°C durante 10 min. El sobrenadante fue transferido a otro tubo cónico, se mezcló con cloroformo hasta obtener una solución homogénea y se realizó otro paso de centrifugación a 12.000g a 4 °C durante 15 min. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo, se añadió isopropanol, se incubó la muestra durante 15 min a temperatura ambiente y la mezcla fue centrifugada a 12.000 g a 4°C durante 10 min. El sobrenadante fue descartado, mientras que el precipitado fue resuspendido en etanol absoluto y se procedió a realizar otro paso de centrifugación con las mismas características que el anterior. El sobrenadante fue descartado, mientras que el precipitado obtenido fue resuspendido en agua MilliQ previamente esterilizada. La concentración de ARN así como la calidad fue determinada con la ayuda del *NanophotometerTM* y el analizador *Agilent*. Finalmente, el ARN fue almacenado a -80°C hasta su uso.

2.20. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa del ensayo in vivo

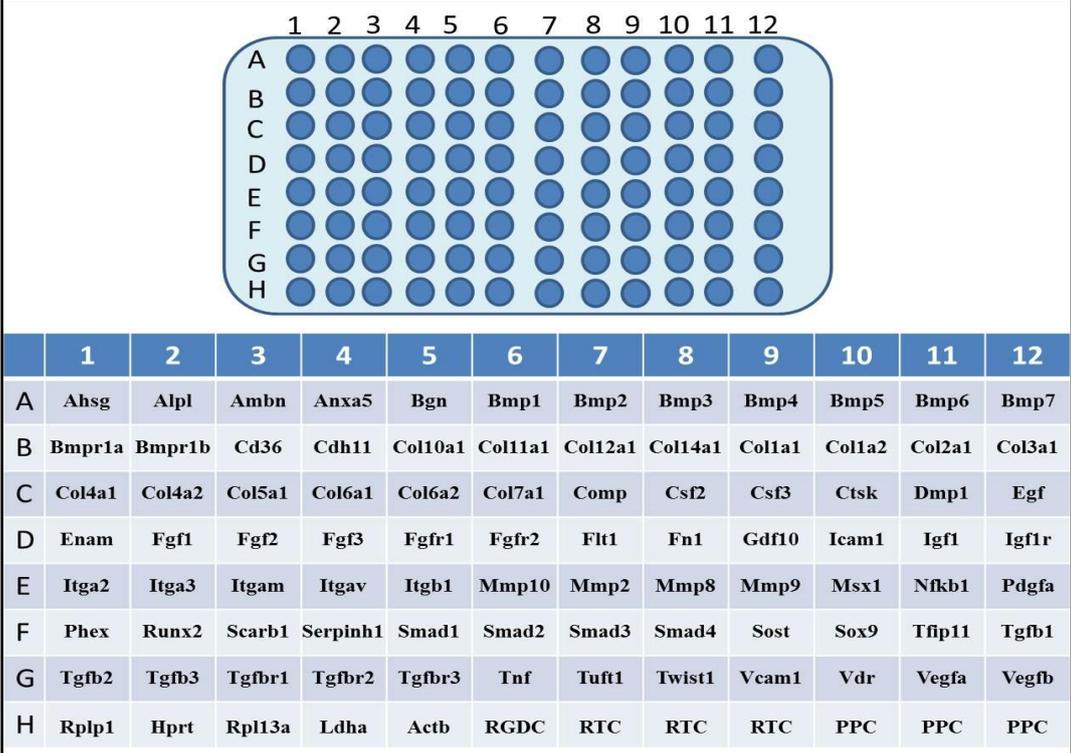
Se tomaron 4 µg de ARN de cada tratamiento para sintetizar el ADNc. El primer paso fue la eliminación del ADN genómico, para lo cual se añadió 1 µL de DNase I 1 unidad/µL (Thermo Scientific), 2 µL de la solución tampón de la *DNase 10X* y agua MilliQ estéril hasta completar un volumen final de 10 µL. Se homogenizó la mezcla y se incubaron las muestras durante 15

min a temperatura ambiente. 0,5 μ L de una solución de EDTA 0,5 mM fue utilizada para detener la reacción.

Seguidamente se realizó la reacción de síntesis del ADNc con el *Superscript system* (Fisher Scientific). El volumen final de la reacción fue de 40 μ L y contenía 20 mM de tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,1 mg/mL de BSA, 10 mM DTT, 0,5 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 0,5 μ g de oligo(dT) 12-18 (usado como cebador de la reacción) y 50 Unidades de transcriptasa reversa. La solución fue cuidadosamente homogenizada y se procedió a realizar la incubación a 42°C durante 50 min. La reacción se detuvo incubando 15 min a 70 °C.

2.21. Análisis genético de múltiples marcadores osteogénicos in vivo

Se mezclaron 2 μ g de ADNc con la mezcla de SYBR Green contenida en el kit RT² qPCR SYBR Green Master Mix (SA Biosciences). Seguidamente, 25 μ L de la mezcla de reacción fueron cargados en los pocillos de las placas de *PCR array* contenidas en el kit de *Osteogenesis PCR Array* (SA Biosciences). Las placas de 96 pocillos utilizadas están cargadas con 1 copia de cada gen: 1) los cebadores específicos de 86 genes relacionados con osteogénesis, 2) 5 genes constitutivos que son utilizados como control (housekeeping), 3) un control negativo de retrotranscripción y 4) control de contaminación por ADN genómico (Fig. 18). La amplificación fue realizada siguiendo las indicaciones de la casa comercial, 1) Activación: 10 min 95 °C, 2) 40 ciclos de: 15 s a 95 °C (denaturalización) y 1 min a 60°C (extensión). La expresión genética fue evaluada a través del método de comparación de Ct.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ahsg	Alpl	Ambn	Anxa5	Bgn	Bmp1	Bmp2	Bmp3	Bmp4	Bmp5	Bmp6	Bmp7
B	Bmpr1a	Bmpr1b	Cd36	Cdh11	Col10a1	Col11a1	Col12a1	Col14a1	Col1a1	Col1a2	Col2a1	Col3a1
C	Col4a1	Col4a2	Col5a1	Col6a1	Col6a2	Col7a1	Comp	Csf2	Csf3	Ctsk	Dmp1	Egf
D	Enam	Fgf1	Fgf2	Fgf3	Fgfr1	Fgfr2	Flt1	Fn1	Gdf10	Icam1	Igf1	Igf1r
E	Itga2	Itga3	Itgam	Itgav	Itgb1	Mmp10	Mmp2	Mmp8	Mmp9	Msx1	Nfkb1	Pdgfa
F	Phex	Runx2	Scarb1	Serpinh1	Smad1	Smad2	Smad3	Smad4	Sost	Sox9	Tfip11	Tgfb1
G	Tgfb2	Tgfb3	Tgfb1	Tgfb2	Tgfb3	Tnf	Tuft1	Twist1	Vcam1	Vdr	Vegfa	Vegfb
H	Rplp1	Hprt	Rpl13a	Ldha	Actb	RGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Fig. 18 Listado de genes evaluados en el Osteogénesis PCR Array *in vivo*

2.22. Análisis genético de múltiples marcadores angiogénicos *in vivo*

Se mezclaron 2 μ g de ADNc con la mezcla de SYBR Green contenida en el kit RT² qPCR SYBR Green Master Mix (SA Biosciences). Seguidamente, 25 μ L de la mezcla de reacción fueron cargados en los pocillos de las placas de *PCR array* contenidas en el kit de *Angiogenesis PCR Array* (SA Biosciences). Las placas de 96 pocillos utilizadas están cargadas con 1 copia de cada gen: 1) los cebadores específicos de 86 genes relacionados con angiogénesis, 2) 5 genes constitutivos que son utilizados como control (housekeeping), 3) un control negativo de retrotranscripción y 4) control de contaminación por ADN genómico (Fig. 19). La amplificación fue realizada siguiendo las indicaciones de la casa comercial, 1) Activación: 10 min 95 °C, 2) 40

ciclos de: 15 s a 95 °C (denaturalización) y 1 min a 60°C (extensión). La expresión genética fue evaluada a través del método de comparación de Ct.

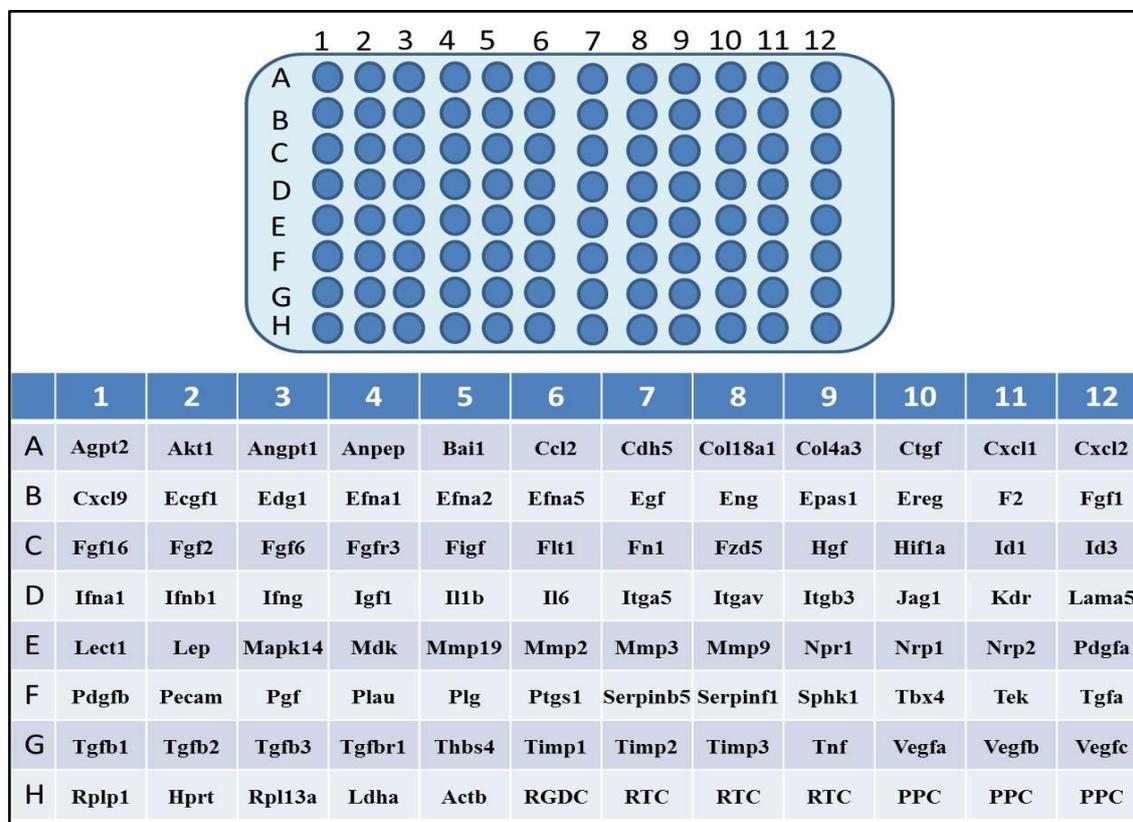


Fig. 19 Listado de genes evaluados en el Angiogenesis PCR array *in vivo*.

2.23. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de muestras *in vivo*

Con la finalidad de ratificar los resultados obtenidos en los PCR arrays *in vivo*, se decidió evaluar individualmente la expresión de algunos de los genes involucrados en angiogénesis y osteogénesis a partir de las muestras obtenidas *in vivo*. Para ello se tomaron 25 ng de ADNc por reacción que fueron diluidos en una solución de reacción de SYBR Green que contiene 2X iQ: 50mM KCl, 20mM Tris-HCl (pH 8,4), 0,2mM de cada dNTP, 25U/mL iTaq DNA polimerasa,

3mM MgCl₂, SYBR-Green, 200 nM de los cebadores listados en la Tabla 16, y agua MilliQ estéril hasta completar un volumen final de 25 µL.

Gen	Secuencias
Proteína Ribosómica L9 (control)	5'-gggcttcggttacaagatga-3'
	5'-catcctctgggcttgagag-3'
BMP-2	5'-cggaagcgtcttagccag-3'
	5'-catgccttagggattttgga3'
MMP-2	5'-agctcccggaaaagattgat-3'
	5'-tccagttaaaggcagcgtct-3'
MMP-9	5'-ccaccgagctatccactcat-3'
	5'-gtccggtttcagcatgtttt-3'
VEGF-a	5'-gcctcaggacatggcactat-3'
	5'-cttctccaccactgtgtct-3'

Tabla 16 Listado de cebadores utilizados en la PCR tiempo real de muestras *in vivo*

Las reacciones fueron realizadas en un termociclador iCycler iQ (Biorad) y los resultados fueron analizados a través del método de comparación de Ct. Cada reacción de PCR fue realizada por triplicado para su validación.

2.24. µCT *Ex vivo*

Una vez cumplidos los períodos de implantación, las ratas fueron sacrificadas y las extremidades inferiores fueron diseccionadas, y fijadas en paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 4 días. Seguidamente se descartó el PFA, se realizó un lavado con PBS y las muestras fueron almacenadas a 4 °C hasta su uso.

La cantidad de tejido óseo formado en los defectos óseos fue cuantificado a través del método del μ CT *Ex vivo*. La adquisición de las imágenes fue realizada en el *Microscanner Locus SP ex vivo* (GE Healthcare), usando el filtro número 3. El equipo fue programado para adquirir 900 imágenes por cada muestra, se utilizó la herramienta de escaneo de *360 Degree* del equipo a un tiempo de exposición de 3000 ms y un tamaño de píxeles efectivos de 14 μ m. Las reconstrucciones 3D de la muestra fueron realizadas con el software proporcionado por la casa comercial *GE Healthcare*. En cada una de las imágenes reconstruidas se procedió a seleccionar la región donde se localizó el defecto óseo y con la ayuda del software se determinó el volumen total (VT) del defecto, y el volumen de tejido óseo mineralizado (VO), con la finalidad de determinar qué tratamientos indujeron una mayor regeneración del tejido óseo en la zona del defecto.

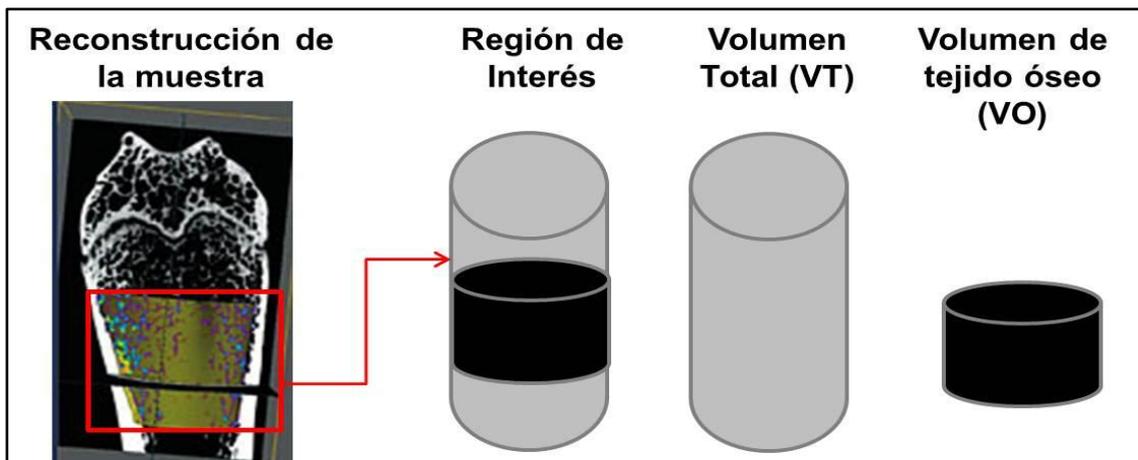


Fig. 20 Procedimiento de selección de la región de interés en la muestra, el volumen total y el volumen óseo.

2.25. Cultivo de embriones de pollo Ex-Ovo

El cultivo de embriones de pollo *ex ovo* consiste en la incubación de embriones de *Gallus gallus* (gallina común), fuera del huevo. El sistema *ex ovo* fue elegido con la finalidad de eliminar cualquier fuente de calcio endógena que pudiera interferir con los resultados. Otro

aspecto a considerar es que la elección de este sistema permite una fácil visualización de los vasos sanguíneos, asimismo es un buen modelo para realizar ensayos de angiogénesis en biomateriales. A continuación se describirá detalladamente el procedimiento aplicado para el establecimiento de este sistema.

Los huevos fecundados de *Gallus gallus* de 0 días de desarrollo, fueron adquiridos de la Granja Gibert. Previo a la incubación los huevos fueron lavados con etanol al 70 % incubados en su cascara durante 3 días en una estufa con ventilación constante que permite la circulación del aire a 37 °C a 80-90 % de humedad (Fig. 21). Una vez cumplido el primer período de incubación, los huevos fueron abiertos en condiciones estériles y la totalidad del contenido del huevo fue transferido a una placa de Petri de 90 mm (Corning). El punto de transferencia del embrión es un paso crítico. El embrión debe quedar situado en el centro del vitelo (yema) y en la cara superior, de lo contrario el embrión no se desarrollará adecuadamente. La placa de Petri fue colocada dentro de una segunda placa de Petri de 150 mm (Corning) donde se añadieron previamente 20 mL de PBS estéril. Este sistema de doble placa permite crear una cámara húmeda que reduce al mínimo el riesgo de deshidratación del embrión. Seguidamente, los embriones fueron incubados a 37 °C a 80-90 % de humedad hasta alcanzar los 8 días de desarrollo. Los diferentes materiales y condiciones experimentales fueron colocados en condiciones estériles sobre la membrana corioalantoidea (CAM) de los embriones de 8 días de desarrollo hasta que alcanzaron los 13 días de desarrollo (5 días de tratamiento).

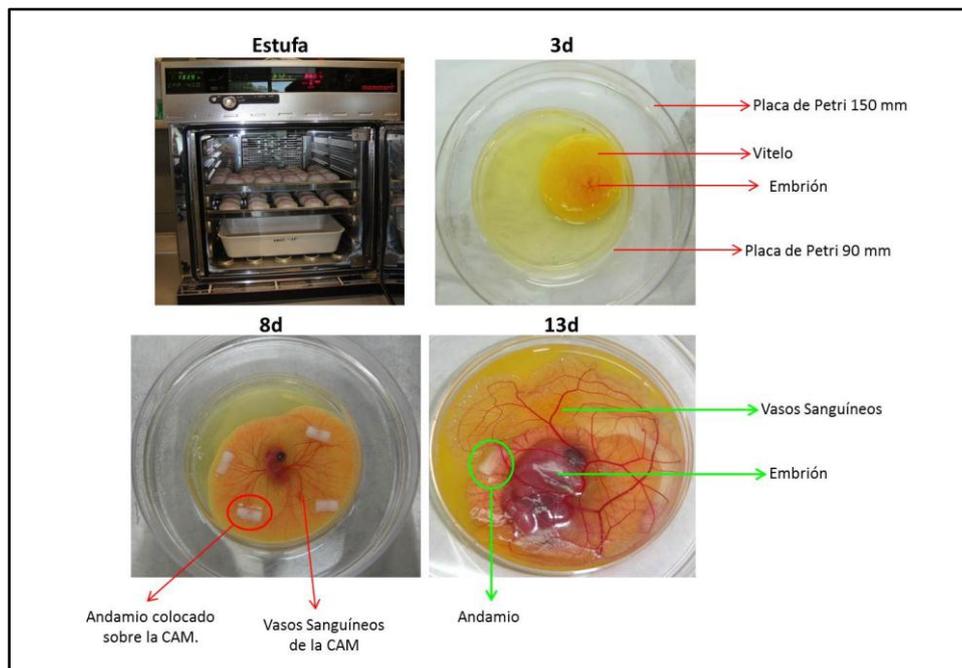


Fig. 21 Sistema de cultivo de embriones *Ex ovo*.

2.25.1. Condiciones experimentales evaluadas

Cada una de las condiciones experimentales mostradas en la Tabla 17 fue colocada sobre la CAM por cuadruplicado en cada embrión, tal y como se ilustró en la Fig. 21.

Condiciones Experimentales			
Controles	Control (sin implante)	GFR Matrigel (Matrigel con reducción de factores, BD Biosystems)	GFR Matrigel + VEGF (Control positivo, 100 ng/mL)
Andamios	PLA	PLA/G5	
Calcio	GFR Matrigel + Ca²⁺ (100 mM CaCl ₂)		

Tabla 17 Condiciones experimentales evaluadas en el sistema *Ex ovo*.

2.25.2. *Ensayo de angiogénesis ex ovo*

El efecto angiogénico fue evaluado cuantificando la cantidad de vasos sanguíneos alrededor de cada uno de los implantes colocados en la CAM de los embriones. Para ello, se adquirieron imágenes el día de la implantación de los tratamientos y al cumplirse los 5 días de tratamiento. Las imágenes fueron adquiridas con una cámara digital CyberShot TX1 de 10.2 Megapixels (Sony). Una vez obtenidas las imágenes, se estimó la densidad de vasos sanguíneos alrededor de cada implante, haciendo uso de herramientas de procesamiento de imagen que permitieron calcular la cantidad de píxeles que ocupan los vasos sanguíneos que rodean los implantes.

2.25.3. *Ensayo de formación de hueso*

El esqueleto de los embriones de pollo, en condiciones *ex ovo*, está compuesto principalmente de cartílago en los estadios de desarrollo utilizados en el presente proyecto de investigación. Por ello, con la finalidad de evidenciar el efecto de los diferentes tratamientos sobre la formación del hueso en los embriones se aplicó una doble tinción de Azul de Alcian-Rojo de Alizarina.

Una vez cumplidos los tiempos de incubación, los embriones fueron decapitados, se extrajeron las extremidades posteriores y se fijaron en una solución de formalina al 10 % (Sigma) durante 48 horas a temperatura ambiente. Seguidamente, se realizaron 3 lavados de 8 horas en agua MilliQ. Posteriormente se retiró la mayor cantidad de tejido no deseado (tejido epidérmico y muscular) y se sumergieron los fémures en una la solución de Azul de alcian (9 mg de *Alcian Blue 8GX* (Fluka) disueltos en 60 mL de EtOH absoluto y 40 mL Ácido Acético glacial) durante 24 horas en agitación constante a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron lavados de 12 horas cada uno, durante 4 días con agitación constante en EtOH

absoluto. Al culminar los lavados, se sumergieron las muestras durante 48 horas en una solución de Rojo de Alizarina (Sigma) al 1% en una solución al 0,5 % de KOH a pH 4,2. Finalmente, se realizaron lavados de 12 horas en agua MilliQ durante 24 horas para eliminar la tinción no específica. Una vez culminada la tinción se puede distinguir en color azul el tejido cartilaginoso y en rojo el tejido osificado.

2.26. Análisis Estadístico

Todos los ensayos se realizaron, como mínimo, por triplicado con la finalidad de aplicar el análisis estadístico correspondiente. Los resultados cuantitativos fueron expresados en función de la Media \pm Error estándar, las diferencias entre las medias fueron evaluadas a través del análisis de varianza de dos vías ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni y fueron realizados con la ayuda de un programa computarizado conocido como Graphpad Prism versión 6.0.

Capítulo III: Aislamiento y Caracterización de Células Progenitoras

3. Aislamiento y caracterización de células progenitoras

3.1. Introducción

3.1.1. Células Progenitoras Endoteliales y sus características

Numerosas fuentes de células endoteliales han sido utilizadas por los investigadores para desarrollar vasos sanguíneos y/o estimular su formación, algunas de ellas son: células endoteliales maduras, células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), células madre embrionarias, células progenitoras endoteliales (EPCs), entre otras. En los últimos años se ha incrementado el uso de las EPCs respecto al de otras fuentes de células endoteliales, no obstante, existe gran controversia sobre su origen y caracterización. Los primeros investigadores en aislar estas células las describieron como una población celular que expresa la proteína de adhesión célula-célula CD34, provenientes de sangre periférica y que son capaces de formar vasos sanguíneos *de novo* en adultos (vasculogénesis). El cual era un proceso descrito únicamente durante el desarrollo embrionario (Asahara *et al.*, 1997). Posteriormente, otros estudios reportaron que las EPCs poseen un reservorio importante en la médula ósea, que también expresan la glicoproteína CD133 y el receptor tipo 2 del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR2), siendo esos tres marcadores los más aceptados como característicos de las EPCs tempranas.

Al transcurrir varios días en cultivo o al llegar a la sangre periférica las EPCs pierden la expresión de CD133 y expresan marcadores de células endoteliales, tales como: el receptor de la Angiopoyetina 1 (Tie-2 también conocido como TEK), la glicoproteína conocida como factor de Von Willebrand (vWF), expresan la proteína de adhesión conocida como Cadherina de endotelio vascular (VE-Cadherina) y la proteína llamada CD31 (Hristov, Erl e Weber, 2003; Ingram, Caplice e Yoder, 2005). Debido a que cada una de estas características se puede

encontrar en otras fuentes de células endoteliales y a que las EPCs han demostrado poseer un perfil de marcadores celulares poco estable aún no existe unanimidad en su caracterización.

Pese a dicha controversia, existen numerosas evidencias que hacen a las EPCs un excelente modelo para formar vasos sanguíneos en ingeniería tisular. En este sentido, se ha demostrado que son capaces de migrar desde sus reservorios en la médula ósea a través de la circulación periférica hasta el tejido dañado, incorporarse en los vasos sanguíneos y/o formar nuevos vasos en respuesta a señales quimotácticas (factores inducibles por hipoxia, citocinas, etc) (Murasawa e Asahara, 2004). Asimismo las EPCs son usadas en ingeniería tisular debido a que: 1) pueden ser obtenidas por aspirado de médula ósea o sangre periférica en individuos adultos, 2) son capaces de diferenciarse *in vitro* de forma estable hacia células endoteliales maduras, 3) forman microcapilares *in vitro* usando andamios y técnicas de cultivo 3D y 4) en condiciones adecuadas la viabilidad de los micro capilares se mantiene por largos períodos de tiempo (Wu *et al.*, 2004).

Aunado a lo descrito anteriormente, estudios realizados *in vivo* han demostrado que las EPCs están involucradas en la inducción de la vasculogénesis y esta capacidad puede ser usada para la formación de redes vasculares. Experimentalmente se demostró que las nuevas redes vasculares formadas por las EPC son capaces de interconectarse con las redes vasculares del individuo receptor del implante (Melero-Martin *et al.*, 2007). No obstante, los mecanismos de estimulación e inhibición a través de los cuales las EPCs migran, se adhieren, diferencian y forman nuevos vasos sanguíneos no están completamente descritos (Hristov, Erl e Weber, 2003).

En base a estos argumentos, en el presente trabajo de investigación se decidió utilizar las EPCs como modelo de estudio para analizar aspectos que puedan mejorar la angiogénesis en la ingeniería tisular.

3.1.2. Células Madre Mesenquimales y sus características

Las células madre mesenquimales o como se conocen por su nombre en inglés “Mesenchymal Stromal Cells” (MSCs) son células adherentes no hematopoyéticas indiferenciadas con una alta capacidad proliferativa y con la habilidad de dar origen a células especializadas de diversos tejidos (potencialidad), como por ejemplo, osteoblastos, condrocitos, miocitos y adipocitos, entre otros (Tae *et al.*, 2006). En los años 70s las MSCs fueron aisladas por primera vez a partir de médula ósea de rata, y desde entonces se han llevado a cabo diversos estudios para evaluar su capacidad regenerativa, de diferenciación, y terapéutica en animales y en humanos (Friedenstein, Chailakhjan e Lalykina, 1970; Da Silva M *et al.*, 2009). Se ha demostrado que la principal fuente de MSCs está localizada en la médula ósea, sin embargo también han sido aisladas de otros tejidos, tales como, el adiposo, la sangre de cordón umbilical, el músculo esquelético, la piel, la pulpa dental, los vasos sanguíneos, entre otros (Coreli *et al.*, 2010). Aunque existen algunas diferencias en el perfil de expresión de las MSCs obtenidas desde cada una de las fuentes, según el Comité Internacional de Tejidos y Células Madre Mesenquimales hoy en día se consideran MSCs las células que tengan las siguientes características: 1) las células aisladas son capaces de adherirse en placas de plástico sin el uso de recubrimientos especiales. 2) Al menos el 95% de las células expresan CD105 (Endoglina), la ectonucleotidasa CD73 y la glicoproteína de superficie celular CD90. Además, el 95 % de las células no deben expresar la fosfatasa de tirosinas conocida como CD45, la proteína de adhesión célula-célula CD34, y la integrina conocida como CD11b, el antígeno de linfocitos B (CD19), ni el complejo de histocompatibilidad tipo II (HLA-DR). 3) Son capaces de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos *in vitro* al ser cultivadas con los respectivos medios de diferenciación (Arthur, Zannettino e Gronthos, 2009). Por otra parte, múltiples autores y casas comerciales utilizan los siguientes marcadores como característicos de MSCs: la proteína de superficie STRO-1⁺, CD105⁺ (Endoglina), la glicoproteína de superficie celular CD44⁺ (H-

CAM), la molécula de adhesión celular CD166⁺ (ALCAM), CD29⁺ (Integrina β1), CD34, CD11b⁻ y CD45⁻ (Simmons e Torok-Storb, 1991; Rojewski, Weber e Schrezenmeier, 2008).

La potencialidad de las MSCs ha sido evaluada por múltiples autores tanto *in vitro* como *in vivo*. Específicamente, se ha reportado que las MSCs sometidas a un microambiente adecuado son capaces de diferenciarse hacia células óseas, cartilaginosas, musculares, células estromales de médula ósea, tenocitos, células adiposas y de tejido conectivo. En la Fig. 22 se muestra un esquema que describe la alta capacidad de las MSC para dar origen a diferentes tipos celulares.

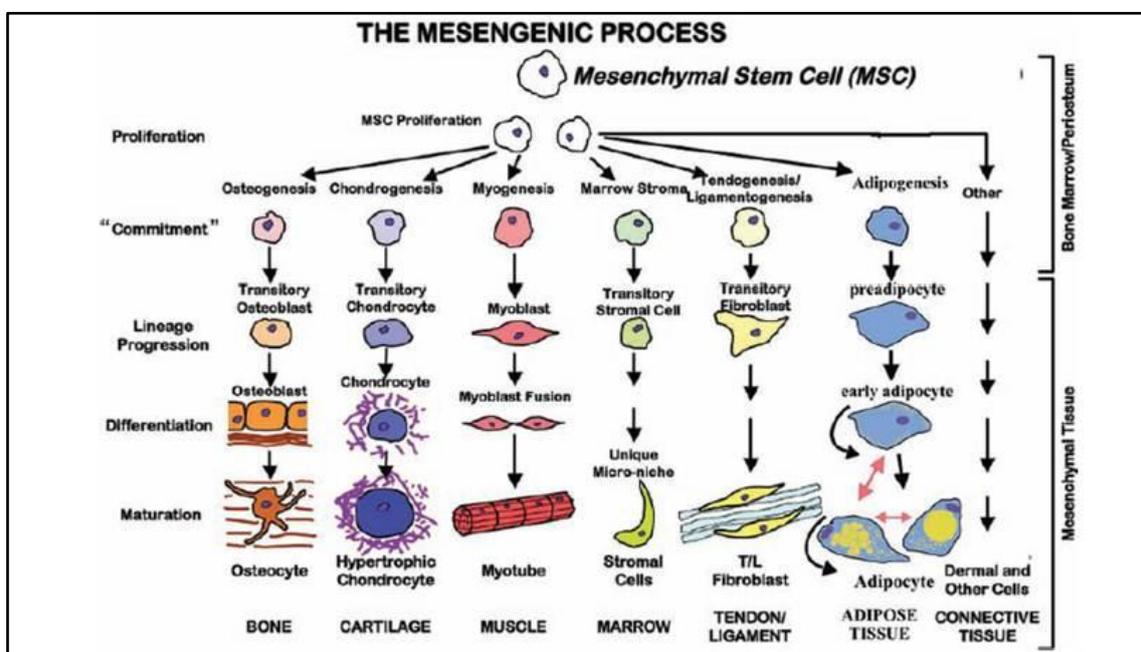


Fig. 22 Esquema que describe la alta potencialidad de las Células Madre Mesenquimales. Imagen extraída de (Caplan,

La alta potencialidad de las MSCs, aunada a la posibilidad de extraerlas a partir de tejidos adultos ha hecho que las MSCs sean hoy en día el tipo celular más utilizado en aplicaciones terapéuticas relacionadas con la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos (Parekkadan e Milwid, 2010).

3.1.3. Potencial de las EPCs y las MSCs en la reparación de tejidos dañados

Desde su descubrimiento, las EPCs se han convertido en una de las fuentes celulares ideales para la formación de vasos sanguíneos *in vitro* e *in vivo*. Esto se debe a que las EPCs son capaces de migrar hacia zonas isquémicas en condiciones fisiológicas y patológicas, así como su habilidad de promover la neovascularización al diferenciarse *in situ* y formar parte de los nuevos vasos sanguíneos (forma directa) y/o al liberar al medio extracelular factores proangiogénicos y quimiotácticos (forma indirecta). En este sentido, es importante resaltar algunas de las aplicaciones a nivel experimental y clínico que permitieron demostrar el potencial de las EPCs en la formación de vasos sanguíneos.

Uno de los primeros experimentos que demostraron la aplicabilidad terapéutica de las EPCs fue la inoculación intracardíaca de EPCs de sangre periférica humanas en ratones inmunodeficientes con isquemia en una de las extremidades posteriores. Al transcurrir 28 días del trasplante los ratones inoculados con EPCs presentaron un significativo aumento de la vascularización y el flujo sanguíneo en la extremidad afectada. En el mismo estudio también demostraron que el tratamiento con EPCs redujo un 50 % la presencia de necrosis y autoamputaciones de la extremidad afectada, observándose además que las EPCs fueron capaces de formar parte de los nuevos vasos sanguíneos. Demostrando así que las EPCs son capaces de migrar hacia las zonas isquémicas e incrementar la vascularización de la zona afectada de forma directa (Kalka *et al.*, 2000). Otro estudio realizado en humanos demostró que la terapia con EPCs autólogas en pacientes con isquemia en sus extremidades inferiores incrementa la presión parcial de oxígeno transcutánea, reduce el tamaño de la ulcera, aumenta la distancia recorrida total y la distancia recorrida sin dolor a partir de los 12 días post tratamiento (Asahara, Kawamoto e Masuda, 2011). Similares resultados han sido obtenidos al inocular EPCs humanas en un modelo de isquemia de miocardio en ratones inmunodeficientes, en el cual se observó que el tratamiento con EPCs logró reducir la fibrosis del miocardio e incrementó la funcionalidad

del ventrículo izquierdo (Kawamoto *et al.*, 2001). Otros investigadores han demostrado que el cultivo previo de EPCs de médula ósea en injertos artificiales aórticos promueve una mayor endotelización que el tratamiento sin el uso de EPCs (Bhattacharya *et al.*, 2000). Análogamente, en un estudio realizado en ratones ha sido demostrado que la aplicación tópica de EPCs favorece el cierre de heridas en la piel y aumenta la vascularización en la zona afectada (Asai *et al.*, 2012). Por otra parte, fue reportado que la implantación de EPCs co-cultivadas con MSCs sobre andamios de β -TCP incrementa la vascularización de fracturas óseas críticas en comparación con los andamios cultivados solo con MSCs. Particularmente, fue demostrado que las EPCs son capaces de promover la neovascularización directamente al formar parte de los nuevos vasos sanguíneos así como de forma indirecta al incrementar la cantidad de VEGF liberado en la zona (Seebach *et al.*, 2012). En este sentido, la cantidad de pruebas que demuestran la potencial aplicabilidad terapéutica de las EPCs, tanto exógenas como endógenas, junto a las características descritas previamente, confirman a las EPCs como la mejor fuente celular para la formación de tejidos vasculares, siendo este el motivo por el cual las EPCs fueron escogidas en el presente proyecto.

Por otra parte el uso de las MSCs con fines terapéuticos es muy amplio. Esto se debe principalmente a las siguientes características: 1) su potencialidad, 2) su baja capacidad de producir reacciones inmunitarias y 3) la liberación de factores que ayudan a la reparación de los tejidos (Da Silva M *et al.*, 2009).

En diversos estudios ha sido demostrado que las MSCs tienen la capacidad de migrar y anclarse en sitios donde se haya producido algún daño tisular. Una vez las MSCs han sido ancladas en la zona de interés estas células cumplen una importante función como secretoras paracrinas de factores antiapoptóticos, pro-angiogénicos, inmunomoduladores, quimiotácticos, etc (Da Silva M *et al.*, 2009). Todos estos procesos generan un microambiente favorable para la regeneración del tejido dañado. Estas características han sido ampliamente evaluadas *in vitro* e *in vivo* con la finalidad de comprobar la capacidad terapéutica de las MSCs. Un ejemplo de ello son los estudios desarrollados *in vivo* en los cuales observaron que las MSCs autólogas y

heterólogas trasplantadas en médula ósea de pacientes con osteogénesis imperfecta fueron capaces de migrar hacia los tejidos óseos, se aumentó la densidad ósea de los pacientes y no fueron observadas reacciones de rechazo inmunitario en ningún caso (Horwitz *et al.*, 1999). Análogamente, otros investigadores implantaron MSCs humanas en ovejas, demostrando que estas células son capaces de anclarse en los tejidos sin generar rechazo en el huésped (Liechty *et al.*, 2000). Asimismo fue demostrado que la inoculación gradual de MSCs ejerce un efecto inmunosupresor sobre los linfocitos T, lo que aumenta la probabilidad de éxito de implantes de piel en babuinos (Bartholomew *et al.*, 2002).

La capacidad de las MSCs de migrar hacia los tejidos dañados ha sido demostrada claramente por estudios como el realizado en babuinos con daño multiorgánico causado por la irradiación gamma con 8 Gy. Al transcurrir 82 días de la implantación, los babuinos irradiados e inoculados con MSCs presentaron MSCs localizadas en el músculo, la médula ósea, la piel y el intestino. Análogamente, fue demostrado que el uso de radiación localizada produce un efecto quimiotáctico para las MSCs (Chapel *et al.*, 2003; Devine *et al.*, 2003).

Debido a esta habilidad, así como a la alta tasa de replicación y su potencialidad, hoy en día las MSC están siendo utilizadas en un amplio espectro de terapias regenerativas. Como por ejemplo, el uso de MSCs para reparar los daños en el miocardio tras un infarto (Joggerst e Hatzopoulos, 2009). Asimismo se ha demostrado que estas células tienen una alta capacidad de diferenciación hacia tipos celulares óseos, motivo por el cual han sido probadas a nivel clínico y experimental en la reparación de daños en dicho tejido (Stephan *et al.*, 2010). Sin embargo, la regeneración de tejidos con estructuras complejas, tales como el hueso, es complicada. En consecuencia, las estrategias más exitosas en la regeneración del tejido óseo involucran el uso de andamios que proveen una estructura temporal para el desarrollo del nuevo tejido. Un ejemplo del efecto positivo del uso de MSCs en combinación con andamios porosos de hidroxiapatita (HA) es el estudio clínico realizado en pacientes de 16-41 años que presentaban fracturas de tamaño crítico (4-7 cm) no consolidadas. Durante el tiempo del estudio (15-27 meses) los pacientes recuperaron la funcionalidad de las extremidades afectadas. Una evidente

integración del implante fue observada al cabo de dos meses post-implantación, lo cual contrasta con los 12-18 meses de recuperación observados con los tratamientos que no involucran el uso de técnicas de ingeniería de tejidos (Quarto *et al.*, 2001). Pese a los indicios que sugerían que los andamios de HA son capaces de favorecer la regeneración del tejido óseo, actualmente se conoce que el HA posee una muy baja tasa de degradación por lo que se han reportado efectos adversos en los estudios a largo plazo. En este sentido, durante los últimos 10 años han sido evaluados una serie de biomateriales, tales como cerámicas compuestas de fosfatos de calcio, polímeros biodegradables como ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), fibrina, siliconas, colágenos, entre otros (Arthur, Zannettino e Gronthos, 2009).

Basados en todos los argumentos antes detallados, en el presente estudio decidimos utilizar las MSCs y a las EPCs como las células formadoras de los tejidos óseos mineralizados y vasculares necesarios para la regeneración del hueso.

3.2. Objetivos

-Aislar y establecer líneas celulares primarias de células progenitoras endoteliales (EPCs) y células madre Mesenquimales (MSCs) a partir de médula ósea de rata.

-Caracterizar las EPCs y las MSCs obtenidas a partir de médula ósea de rata.

3.3. Resultados

3.3.1. Células Progenitoras Endoteliales

Las EPCs de médula ósea de rata fueron obtenidas siguiendo el procedimiento descrito previamente en el Capítulo II. A través del mencionado procedimiento, se obtuvo una población celular heterogénea entre las cuales se encontró una subpoblación altamente proliferativa, adherente, con morfología fusiforme y capaz de reorganizarse en forma de adoquines al alcanzar una alta densidad en el frasco de cultivo. Como se muestra en la Fig. 23 inicialmente las EPCs se encuentran mezcladas con células contaminantes de morfología redondeada. Sin embargo, debido a su alta tasa de proliferación y al uso de un medio de cultivo que favorece la expansión de las EPCs, en los pasajes 2-4 (P2-P4) se logra obtener una población celular donde las EPCs son mayoritarias.

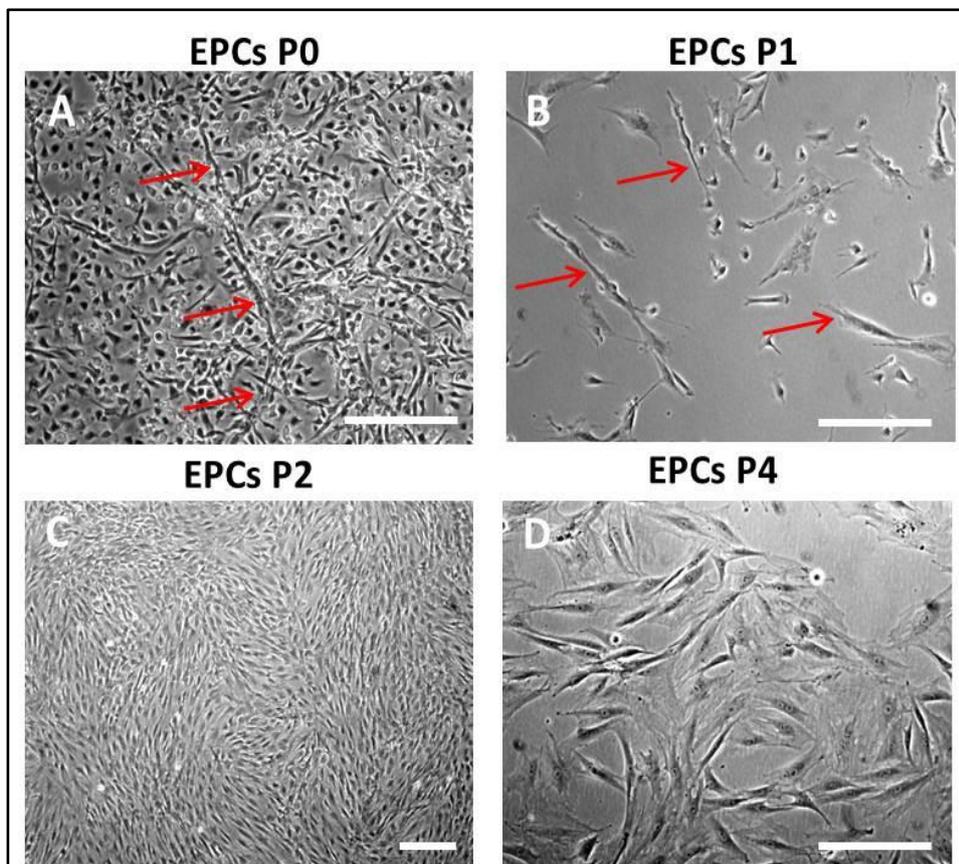


Fig. 23 Imágenes en contraste de fases de Células Progenitoras Endoteliales (EPCs) de P0 (A), P1 (B), P2 (C) y P4 (D). En las imágenes A-B se puede observar la presencia de células contaminantes redondeadas, junto con las EPCs de forma alargada y fusiforme, capaces de alinearse unas con otras (flechas rojas). Asimismo en las imágenes C-D se muestra la presencia mayoritaria de las EPCs. También se muestra la distribución en forma de adoquines que presentan las EPCs P2 al alcanzar la confluencia. Las barras blancas representan 100 μm .

Otros investigadores de nuestro grupo demostraron que esta población mayoritaria de células es positiva para VEGFR-2 (también conocido como FIK-1 o Kdr), CD34, CD31, vWF y UEA-1 (*Ulex europaeusaglutinin-1*). Sin embargo, en los primeros pasajes (P0-P1) se observó la presencia de células contaminantes tipo monocitos, entre otras. Por este motivo, dentro del marco del presente proyecto de investigación, se decidió evaluar la presencia de células positivas para CD45 (marcador de células hematopoyéticas) y CD11b (característico de leucocitos) en la población celular de EPCs de p2-p4, debido a que esos marcadores representan a dos de las poblaciones contaminantes más comunes en un cultivo proveniente de médula ósea. Para ello, se utilizó la técnica de la citometría de flujo. En este sentido, en la Fig. 24 se puede observar que el porcentaje de células positivas para CD11b es solo de un 2,12%, mientras que para CD45 el porcentaje es del 2,19%, por lo que las EPCs de pasajes 2-4 se pueden ser consideradas como una población celular con bajo nivel de contaminación de células hematopoyéticas y leucocitos.

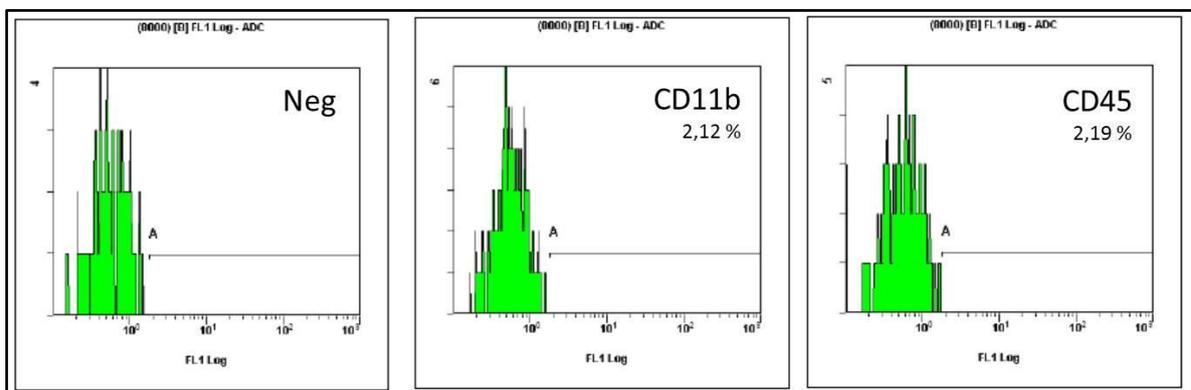


Fig. 24 Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD11b (marcador de leucocitos) y CD45 (marcador hematopoyético) en EPCs de pasajes 2-4. Como se puede observar el bajo porcentaje de células contaminantes, permite afirmar que la población celular obtenida no está contaminada con células hematopoyéticas ni leucocitos.

En consecuencia, el perfil de expresión de la población celular es: CD34⁺, CD45⁻, CD11b⁻, vWF⁺, CD31⁺, VEGFR-2⁺ y UEA-1⁺. Por otra parte, una de las características funcionales más importantes de las células progenitoras endoteliales es la capacidad de madurar, reorganizarse y formar estructuras similares a microcapilares cuando están sometidas a las condiciones apropiadas. En este sentido, con la finalidad de evaluar la capacidad de formar microcapilares

de las EPCs obtenidas se realizó el ensayo de formación de túbulos en matrigel. En la Fig. 25 se observa que las EPCs tanto en condiciones control (A) como estimuladas con VEGF (B) son capaces de reorganizarse rápidamente (6 horas) y formar estructuras similares a microcapilares, tales como las señaladas con las flechas rojas en la figura.

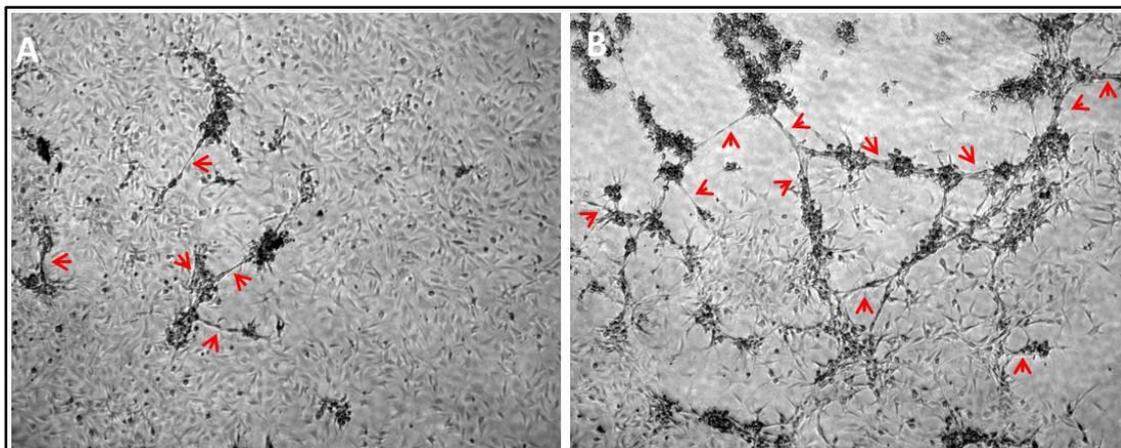


Fig. 25 Ensayo de formación de túbulos en Matrigel. A la izquierda se pueden observar células progenitoras endoteliales cultivadas sobre matrigel durante 6 horas en medio mínimo de células endoteliales (A). A la derecha se muestran EPCs cultivadas sobre matrigel durante 6 horas en medio mínimo suplementado con 40 ng/mL de VEGF (B). Las cabezas de flecha señalizan algunos de los túbulos formados por las células endoteliales. Objetivo 4X.

3.3.2. *Células Mesenquimales*

Al aplicar el protocolo de aislamiento de MSCs descrito en el Capítulo II, se obtuvo una población altamente heterogénea. Debido a que las células hematopoyéticas son la población mayoritaria en la médula ósea, la composición de la población celular de MSCs entre P0-P2 está compuesta por diversos tipos celulares hematopoyéticos, así como una población de células adherentes, con forma fusiforme y con una alta tasa de proliferación. Esta última población celular tiende a ser la población mayoritaria del cultivo entre los pases P2-P4 (Fig. 26). La población celular de MSCs P4 posee muy pocas células contaminantes del tipo hematopoyético, o algún otro tipo, por lo que se considera una población celular homogénea.

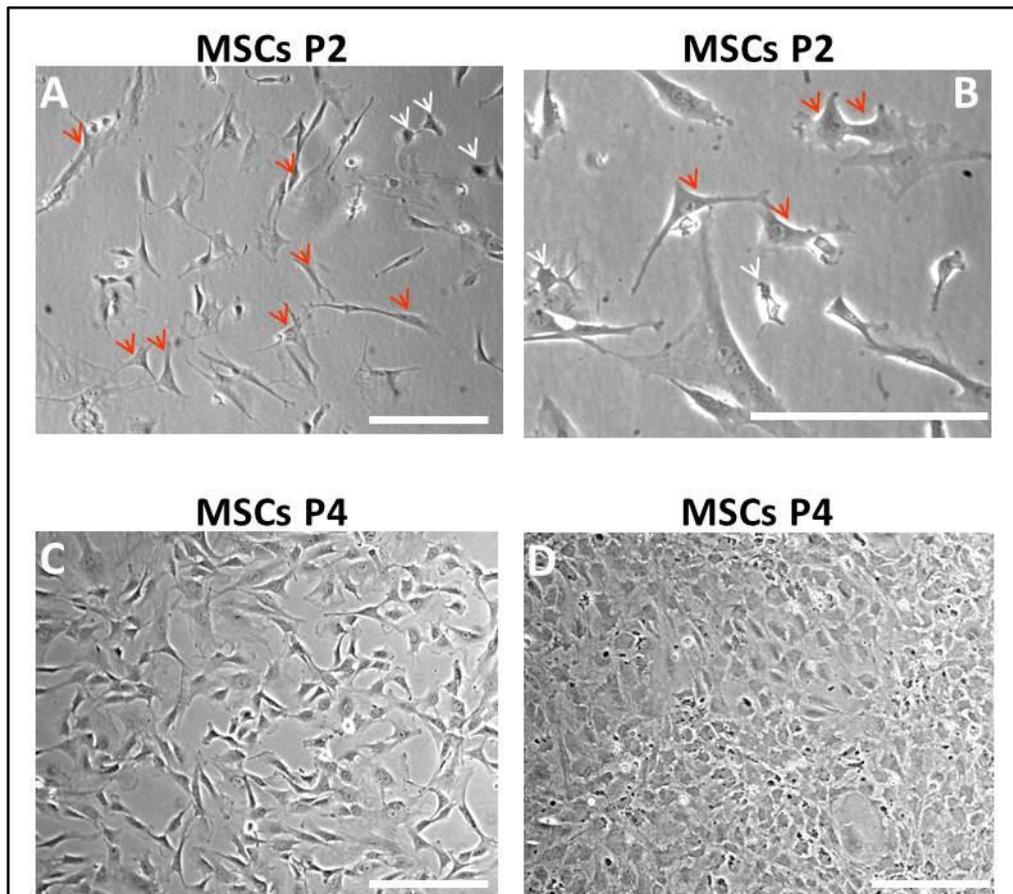


Fig. 26 Imágenes de contraste de fases de células madre mesenquimales (MSCs). En las imágenes superiores (**A-B**) se muestran MSC de pasaje 2 donde se puede apreciar la presencia de células fusiformes (cabezas de flecha rojas) y otra población minoritaria de células redondeadas (cabezas de flecha blanca) posiblemente correspondientes a células contaminantes del tipo hematopoyético (cabeza de flechas blancas). Las MSCs de P4 (**C-D**) están compuestas casi exclusivamente por células fusiformes. En la imagen **C** se muestran MSCs P4 tras 24 horas de cultivo en condiciones control, mientras que en **D** se puede observar que al cabo de 3 días en cultivo las células han alcanzado la confluencia, por lo que se muestra su alta tasa de proliferación en condiciones control. Las barras de escala corresponden a 100 μm .

Con la finalidad de determinar si las MSCs aisladas realmente expresan un perfil de marcadores característico de células madre mesenquimales, se realizaron diferentes tinciones de inmunofluorescencia. En particular, en la Fig. 27 se puede observar que las MSCs de P2-P4 están compuestas por una población celular cuyo perfil de expresión es Stro-1⁺, CD44⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD45⁻. Este perfil de expresión es ampliamente aceptado como característico de MSCs.

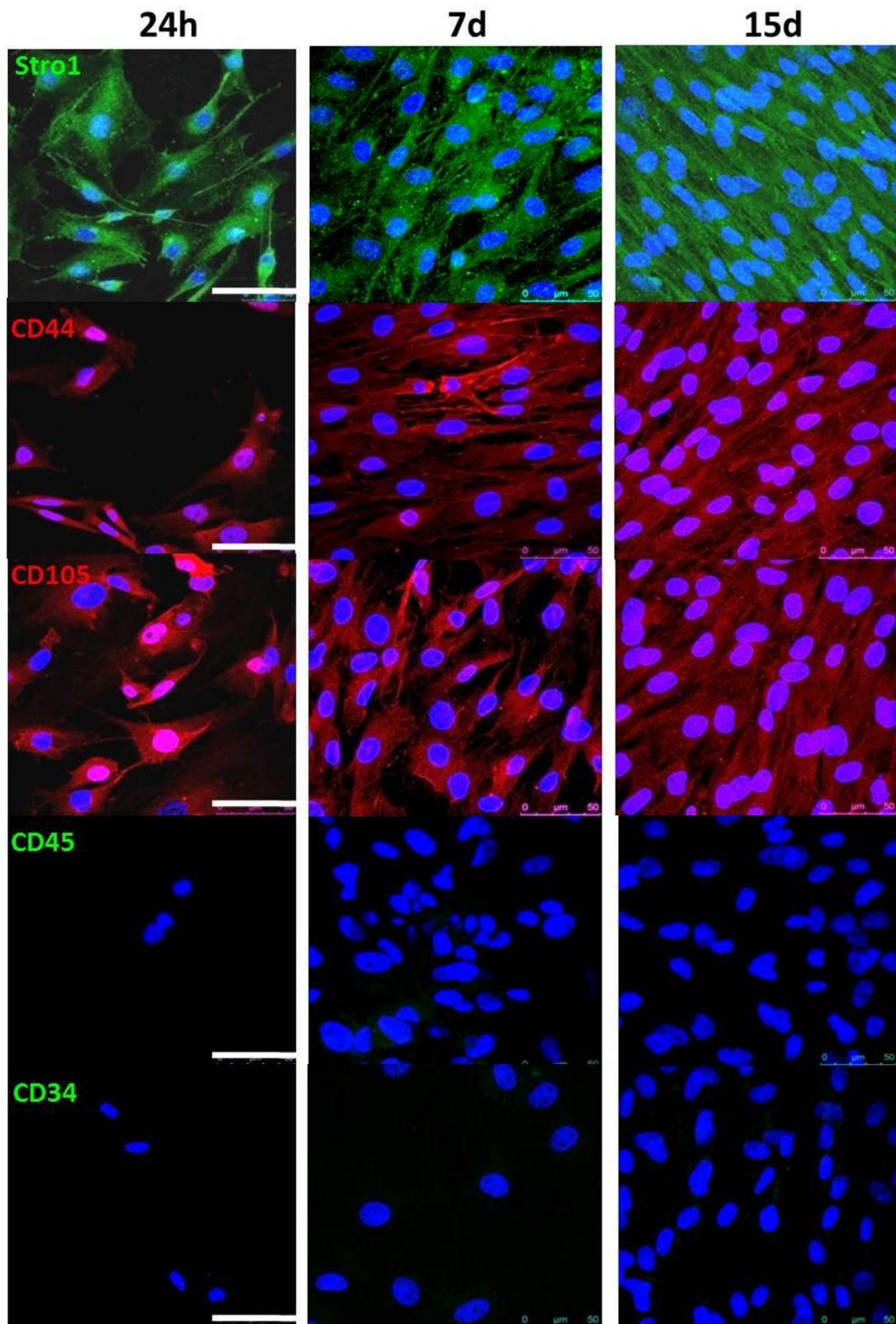


Fig. 27 Perfil de expresión de las MSCs. Las imágenes muestran que las MSCs de P2-P4 son Stro 1⁺, CD105⁺, CD44⁺, CD34⁻ y CD45⁻, siendo este es un perfil de expresión característico de MSCs. También se puede observar que las células en condiciones control mantienen dicho perfil de expresión en el tiempo (24h-15d). Las barras de escala corresponden a 50 μm.

Por último, con la finalidad de comprobar la potencialidad de las MSCs se realizó una prueba de diferenciación hacia osteoblastos, usando medio osteogénico y el rojo de alizarina para revelar la presencia de matriz extracelular mineralizada. En este sentido, en la Fig. 28 se muestra que las MSCs cultivadas con medio de diferenciación osteogénica son capaces de mineralizar la matriz extracelular. Particularmente, se muestra que a partir de los 10 días de cultivo en condiciones osteogénicas la matriz extracelular de las MSCs expresa una coloración roja intensa en algunas regiones, lo que demuestra la capacidad de estas células de formar depósitos de calcio en la matriz extracelular.

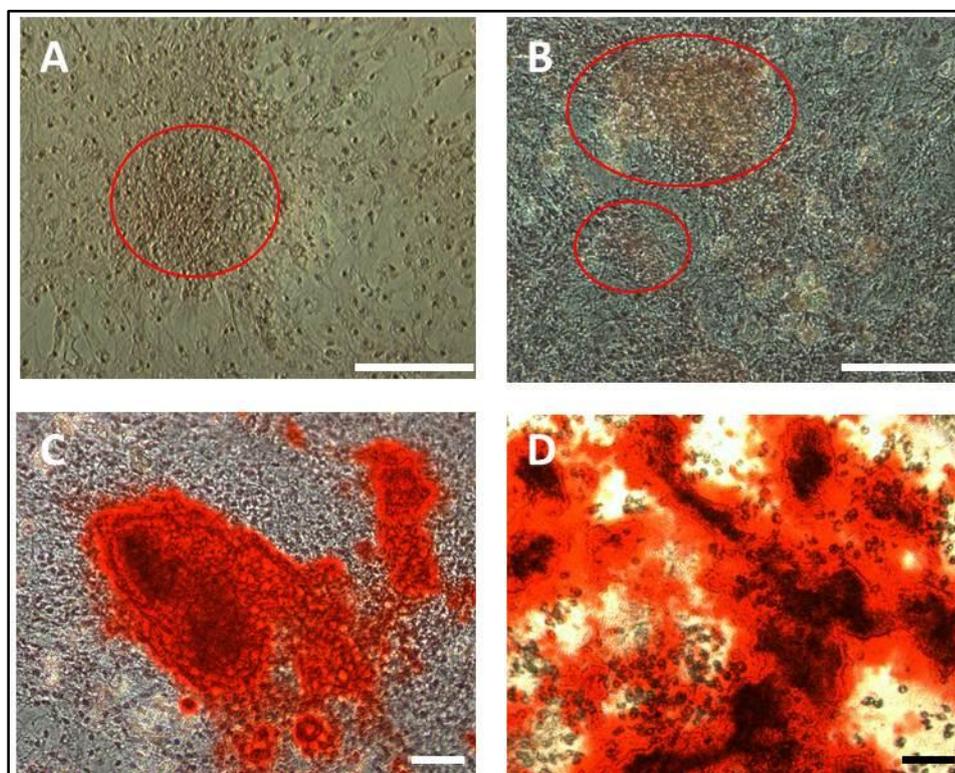


Fig. 28 Tinción del Rojo de Alizarina para evaluar la diferenciación de MSCs. En la imagen superior izquierda (**A**) se pueden observar MSCs cultivadas durante 3 días con medio osteogénico. Se muestran algunos nódulos ligeramente mineralizados (círculo rojo). La imagen superior derecha (**B**) muestra MSCs cultivadas en medio osteogénico durante 7 días. En particular se observa una mayor cantidad de nódulos ligeramente mineralizados (círculos rojos). (**C**) corresponde a MSCs cultivadas durante 10 días con medio osteogénico en el cuál se observan regiones altamente mineralizadas marcadas de color rojo intenso. Al cabo de 15 días en cultivo en condiciones osteogénicas (**D**) se observan amplias regiones mineralizadas marcadas de color rojo intenso. Las barras de escala representan 100 μm .

3.4. Discusión

Las EPCs fueron aisladas por primera vez a partir de sangre periférica en 1997, e inicialmente fueron descritas como una población celular CD34⁺, VEGFR-2⁺, CD45⁻, CD31⁺, Tie-2⁺ y Selectina E⁺ (Asahara *et al.*, 1997). Sin embargo, muchos de los mencionados marcadores son también marcadores de células hematopoyéticas, por lo que su caracterización ha sido motivo de controversia. Otros investigadores han aislado poblaciones de células progenitoras endoteliales a partir de médula ósea, sangre periférica, sangre de cordón umbilical, entre otros. Estas poblaciones celulares han sido caracterizadas con diferentes perfiles de marcadores. No obstante, diferentes grupos de investigación coinciden en que las EPCs son descendientes de un progenitor común con las células madre hematopoyéticas, conocido como hemangioblasto. Dichos estudios sugieren que las EPCs se caracterizan por presentar el siguiente perfil de expresión CD34⁺, CD133⁺ y VEGFR-2⁺ (Boyer *et al.*, 2000; Hristov, Erl e Weber, 2003; Walenta *et al.*, 2005). Otro estudio publicado recientemente, reveló que estas células CD34⁺, CD133⁺ y VEGFR-2⁺ son células progenitoras hematopoyéticas que no dan origen a células endoteliales, mientras que las células caracterizadas como CD34⁺, CD45⁻ expresan el comportamiento característico de las células endoteliales en cultivo (Case *et al.*, 2007). Actualmente, otros autores han propuesto un modelo en el cual se diferencian EPCs de origen hematopoyético y las EPCs no hematopoyéticas cada una de ellas con diferentes características y comportamientos lo cual puede explicar la discrepancia entre los diferentes autores en cuanto a la caracterización de este tipo celular (Asahara e Kawamoto, 2004; Asahara, Kawamoto e Masuda, 2011).

Los resultados mostrados en el presente capítulo prueban que las células EPCs de médula ósea de rata tienen el siguiente perfil de expresión: CD34⁺, CD45⁻, CD11b⁻, vWF⁺, CD31⁺, VEGFR-2⁺, UEA-1⁺ y que son capaces de formar estructuras semejantes a microcapilares al ser cultivadas en matrigel. Este perfil concuerda con las características de las células progenitoras endoteliales no hematopoyéticas, debido a que son positivas para CD34, VEGFR-2 y negativas

para los marcadores CD45 y CD11b y con que son capaces de formar microcapilares. En este sentido, los resultados plasmados en este capítulo demuestran que el protocolo aplicado es exitoso en el aislamiento de una población celular altamente enriquecida con EPCs. Asimismo, los resultados reportados en la literatura demuestran que las EPCs no hematopoyéticas tienen un gran potencial para promover la formación de nuevos vasos sanguíneos en las zonas isquémicas al ser capaces de movilizarse a la zona afectada, formar parte de los nuevos vasos sanguíneos y/o liberar factores angiogénicos en las zonas requeridas (Kovacic *et al.*, 2008; Zampetaki, Kirton e Xu, 2008; Asahara, Kawamoto e Masuda, 2011).

Análogamente, la caracterización de las MSCs sigue siendo controvertida, debido a que la expresión de marcadores depende en muchos casos del tejido a partir del cual fueron extraídas. Sin embargo, como fue mencionado previamente, existe cierto consenso en cuanto a la expresión positiva de CD105, CD73, CD90, Stro-1, CD44, CD166 y CD29 y la no expresión de ciertos marcadores tales como: CD45, CD34, CD11b, CD19 y HLA-DR, asociada a la capacidad de adherirse en placas de cultivo plásticas sin recubrimientos especiales, a la habilidad de diferenciarse hacia diversos tipos celulares bajo las condiciones adecuadas (Simmons e Torok-Storb, 1991; Rojewski, Weber e Schrezenmeier, 2008; Arthur, Zannettino e Gronthos, 2009). Tomando en cuenta ese consenso, en el presente trabajo de investigación se decidió evaluar la expresión de algunos de estos marcadores en la población celular adherente en plástico obtenida a partir de médula ósea. En particular, los resultados demuestran que la población celular presenta el siguiente perfil de expresión CD105⁺, Stro-1⁺, CD44⁺, CD45⁻ y CD34⁻ (Fig. 27), siendo este perfil de expresión concordante con lo reportado por otros investigadores que caracterizaron ampliamente las MSCs de médula ósea de rata (Harting *et al.*, 2008; Karaoz *et al.*, 2009). Pese a que este perfil coincide con lo esperado para MSCs de médula ósea, se decidió comprobar la capacidad de nuestras MSCs de diferenciarse hacia células óseas maduras. Debido a que la formación de tejido óseo mineralizado posee una alta relevancia en el presente trabajo de investigación. Las MSCs fueron cultivadas en medio osteogénico y se realizó la tinción de rojo de alizarina con la finalidad de detectar la presencia

de matriz extracelular mineralizada. En la Fig. 28 se puede observar claramente la expresión de extensos nódulos positivos para la reacción del rojo de alizarina a partir de los 10 días de tratamiento, evidenciándose así la capacidad de las MSCs provenientes de médula ósea de rata de diferenciarse hacia osteoblastos maduros. Este comportamiento es análogo al observado en MSCs humanas, en las que se ha demostrado que la mineralización de la matriz extracelular tiene lugar a partir del día 10 de estimulación osteogénica (Kulterer *et al.*, 2007). En consecuencia, el protocolo de aislamiento es eficiente para la obtención de MSCs que presentan un perfil mesenquimal estable en el tiempo bajo condiciones de cultivo con medio de control (ver capítulo II para más detalles del procedimiento de extracción y/o medios de cultivo). Aunado a lo anterior, nuestras MSCs son capaces de expresar el fenotipo característico de osteoblastos maduros al ser cultivadas en condiciones osteogénicas.

3.5. Conclusiones

Los procedimientos aplicados para el aislamiento y establecimiento de las líneas primarias de células progenitoras endoteliales y células madre mesenquimales demostraron ser exitosos y sencillos. Las células obtenidas presentaron perfiles de expresión estables bajo condiciones control de cultivo, mientras que al ser estimuladas con factores angiogénicos y osteogénicos, las EPCs y MSCs expresaron características funcionales características de células endoteliales y osteoblastos maduros respectivamente.

Capítulo IV: Papel del Calcio extracelular y el CaSR en la diferenciación de las EPCs

4. Papel del calcio extracelular y el CaSR en la diferenciación de EPCs

4.1. Introducción

4.1.1. Importancia de la angiogénesis en Ingeniería de Tejidos

En los tejidos diseñados mediante la ingeniería tisular, entre ellos los óseos, la vascularización es imprescindible, debido a que las células localizadas a una distancia mayor a 200 μm de un vaso sanguíneo sufren deficiencias de oxígeno y nutrientes, produciéndose así la muerte celular por necrosis. Por este motivo, actualmente los sustitutos biológicos diseñados en ingeniería de tejidos se encuentran limitados a tejidos no vascularizados, delgados o pequeños (Rivron *et al.*, 2008). Sin embargo, a medida que se ha incrementado el conocimiento de los parámetros y mecanismos de formación de nuevos vasos sanguíneos, se han desarrollado y aplicado numerosas estrategias que pretenden solventar el problema de la vascularización en estos nuevos tejidos. Estas estrategias se pueden resumir en las siguientes: a) diseño de andamios biodegradables, b) diseño de andamios biodegradables capaces de liberar factores de crecimiento y/o quimiotácticos de forma controlada, c) Cocultivo de células Endoteliales con las células que conforman el tejido de interés *in vitro*, d) Técnicas que utilicen matrices descelularizadas o prevascularizadas *in vivo* (Kaully *et al.*, 2009). En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se puede observar un listado de ventajas y desventajas de algunas de estas estrategias.

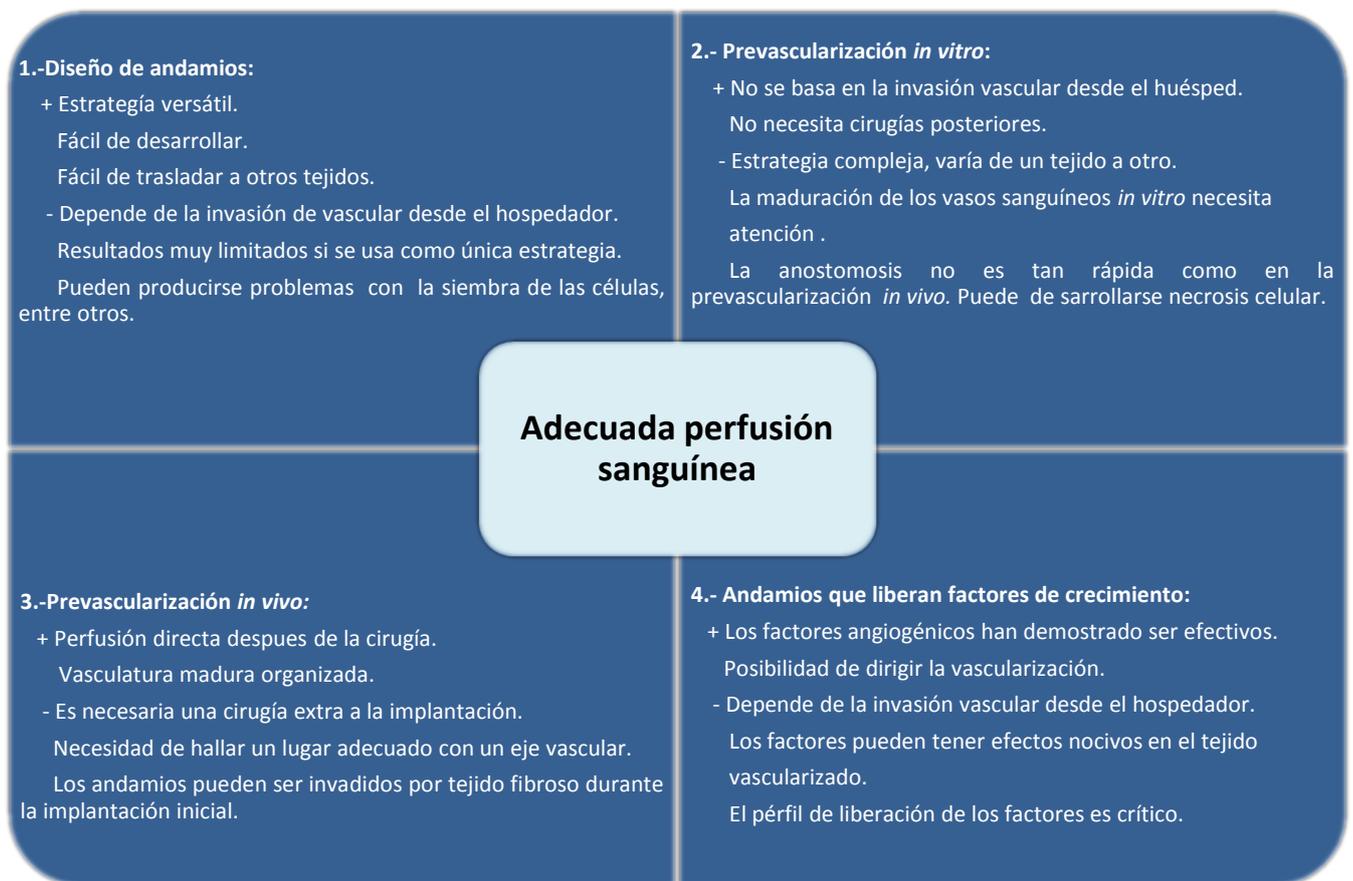


Fig. 29 Ventajas y desventajas de cada una de las estrategias utilizadas en ingeniería tisular (Rouwkema, Rivron e Van Blitterswijk, 2008)

El uso de cualquiera de estas estrategias, en la práctica clínica dependerá de diversos factores, como por ejemplo, la facilidad de su aplicación, la mayor velocidad de interconexión entre los vasos sanguíneos del implante y los del receptor (anastomosis), la probabilidad de éxito de la intervención quirúrgica, etc. Considerando los factores descritos, las estrategias de mayor aplicabilidad son: 1) la prevascularización *in vitro* debido a que esta técnica reduciría el tiempo de anastomosis, ya que no requiere la invasión de la vasculatura hacia el interior del implante, y no se necesitan dos cirugías como en la prevascularización *in vivo*. 2) el desarrollo de andamios capaces de liberar factores o señales que induzcan el anclaje, la proliferación y la diferenciación de las células. Debido a que este método hace uso de las células del huésped para formar nuevos vasos sanguíneos se evita el problema de la inmunocompatibilidad entre el implante y el huésped. Sin embargo, este campo aún se encuentra en desarrollo científico. Se debe tener en cuenta que el proceso de migración, anclaje, proliferación y diferenciación suele

ser relativamente lento, por lo que es probable que se desarrollen procesos de necrosis, o podría fallar la anastomosis entre los nuevos vasos sanguíneos y los del paciente. En este sentido, se hace imprescindible conocer profundamente las condiciones idóneas para lograr obtener vasos sanguíneos funcionales y estables de la forma más eficiente.

4.1.2. Calcio extracelular en vasos sanguíneos

La relevancia del ión calcio en la biología es conocida desde finales del siglo XIX, cuando fue descubierta su importancia en la contracción muscular. Mientras que a principios del siglo XX se reportó el efecto del $[Ca^{2+}]_0$ en la contracción de los vasos sanguíneos (Weston *et al.*, 2011), a mediados del siglo XX se demostró que el aumento en la $[Ca^{2+}]_0$ inhibe la respuesta a la epinefrina en la aorta, sugiriendo que este efecto es consecuencia de la inducción de un efecto de vasorelajante en la aorta (Holloway e Bohr, 1973). En este sentido, durante décadas fue evaluado el efecto del calcio extracelular en la modulación de la contracción de los vasos sanguíneos, así como sus efectos en sobre la presión sanguínea. Por ejemplo, entre los años 80 y 90 fueron publicados numerosos estudios en ratas y humanos hipertensos en los que se encontró una relación inversa entre los niveles de calcio en la dieta y la disminución de la presión sanguínea (Weston *et al.*, 2011). Además se ha demostrado recientemente que el calcio extracelular tiene un efecto dual sobre la contracción y relajación vascular, el cual es dependiente de la concentración del calcio extracelular. Particularmente, fue reportado que las concentraciones de $[Ca^{2+}]_0$ que se encuentran en el rango de 0,5-2 mM inducen vasoconstricción, mientras que concentraciones de $[Ca^{2+}]_0$ alrededor de 3-10 mM inducen vasorelajación. Los investigadores que realizaron este estudio sugirieron que este efecto dual está vinculado con la activación del receptor sensor de calcio, debido a que encontraron efectos similares utilizando agonistas del CaSR (Mg^{2+} y la neomicina) (Ohanian *et al.*, 2005).

4.1.3. CaSR como modulador de los efectos del calcio extracelular en vasos sanguíneos

En la sección anterior se mencionaron algunos de los efectos del incremento del calcio extracelular sobre los vasos sanguíneos, los cuales han sido descritos desde finales del siglo XIX. Pese a que dichos efectos son conocidos desde hace más de un siglo, el mecanismo por medio del cual el calcio extracelular podía inducir dichos cambios en la contracción vascular no estaba claro. En este sentido, con el descubrimiento del CaSR, algunos investigadores comenzaron a evaluar la expresión y el papel de este receptor en la regulación de la presión arterial y/o la contracción vascular.

Algunos autores han propuesto al calcio extracelular como primer mensajero en las vías de señalización celular, ya que este ión es capaz de activar directamente un receptor de membrana y desarrollar así una respuesta celular (Smajilovic e Tfelt-Hansen, 2007). Actualmente, existe una creciente cantidad de evidencias que prueban la presencia del CaSR en diferentes tipos celulares encontrados en venas y arterias. Por ejemplo, ha sido demostrada la presencia del CaSR en células vasculares de músculo liso, en los nervios periféricos de los vasos sanguíneos, así como en las células endoteliales de diferentes tipos de vasos sanguíneos (Smajilovic e Tfelt-Hansen, 2008).

Algunos de los efectos del calcio sobre la contracción vascular pueden ser explicados mediante el efecto vasorelajante que induce el calcio extracelular sobre los nervios periféricos a los vasos sanguíneos. Este efecto vasorelajante se produce por medio del siguiente proceso: el $[Ca^{2+}]_0$ activa el CaSR en los nervios periféricos, el cual modula la liberación de un poderoso vasodilatador hiperpolarizante derivado de los nervios, promoviéndose así un efecto vasorelajante (Bukoski *et al.*, 1997). Por otra parte, se ha demostrado que un activador del CaSR es capaz de inducir la hiperpolarización de las células de músculo liso vasculares (VSMCs), lo cual puede estar relacionado con la apertura de canales de potasio modulada por el CaSR (Edwards e Weston, 2004; Weston *et al.*, 2005). Por otra parte, estudios clínicos demostraron

que el aumento de la concentración de Ca^{2+} o de agonistas de este ión (calcimiméticos) induce la disminución de la presión sanguínea a través de la inducción de la producción de óxido nítrico (NO) por parte de las células endoteliales (Ziegelstein *et al.*, 2006). Asimismo, se ha logrado establecer un vínculo directo entre la activación del CaSR y la sobre-expresión de VEGF, lo que a su vez podría estar relacionado con procesos como la proliferación, diferenciación y angiogénesis (Tfelt-Hansen *et al.*, 2003). Basados en todas estas evidencias se ha construido un modelo que explica la relación inversa entre la concentración de calcio extracelular y la contracción vascular (Fig. 30).

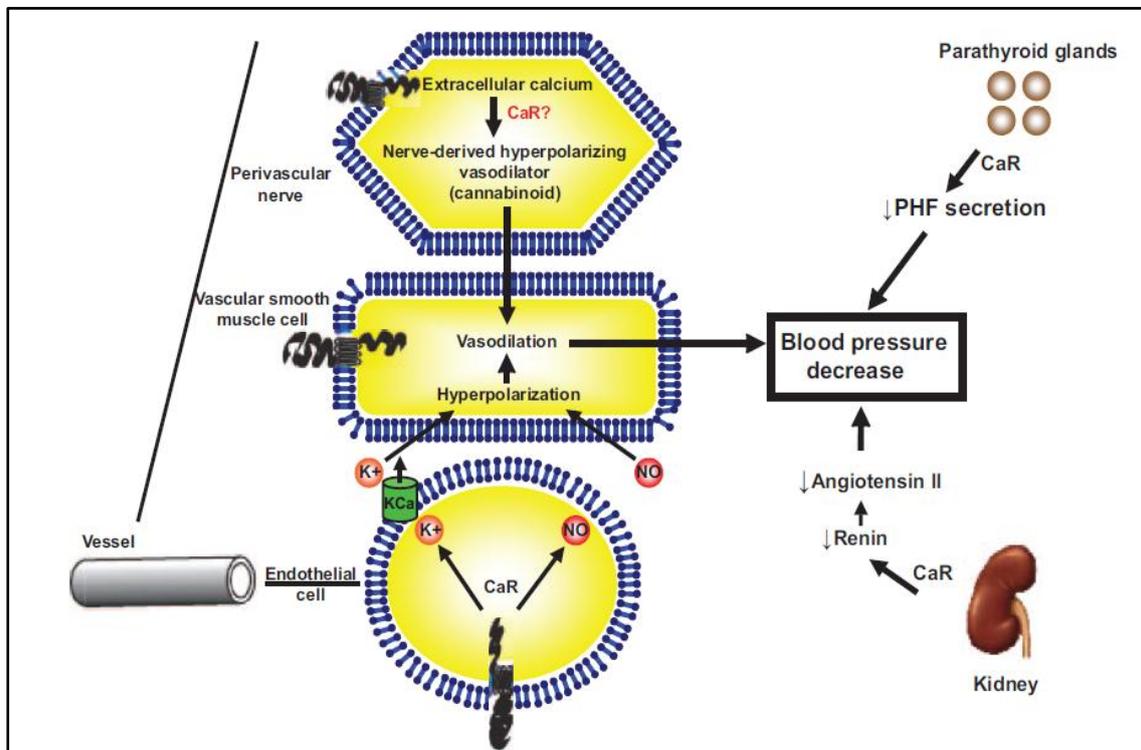


Fig. 30 Mecanismo de acción a través del cual el incremento en la concentración extracelular de Ca^{2+} activa el CaSR, controlándose así la contracción vascular y disminuyendo la presión sanguínea (Smajilovic e Tfelt-Hansen, 2008).

Tomando en cuenta todos los hallazgos previamente descritos, parece clara la importancia del CaSR y del calcio extracelular en el control de la vasodilatación, así como su potencial efecto en la formación de vasos sanguíneos, al estimular la producción de VEGF. Sin embargo,

no existen evidencias claras que vinculen al CaSR y/o al calcio extracelular en la inducción de procesos angiogénicos.

Como fue mencionado en secciones anteriores, en la ingeniería de tejidos se requiere la formación de nuevos vasos sanguíneos que suministren al nuevo tejido oxígeno, nutrientes y permitan la fácil liberación de desechos. En este sentido, uno de los procedimientos con mayor potencial de éxito es la inducción de vascularización *in situ*. En consecuencia, los materiales que se utilicen deberán promover la movilización y la colonización de las células formadoras de tejido. En este orden de ideas, recientemente fueron publicados los resultados de un interesante experimento, en el cual se reveló la capacidad quimotáctica que ejercen los andamios de celulosa recubiertos con vidrio bioactivo (S53P4, Vivoxid Ltd) sobre células CD34⁺ (marcador de células endoteliales progenitoras) y células Stro-1⁺ (marcador de MSCs). Además fue encontrado que la cantidad de células que colonizaron el andamio fue significativamente mayor en los andamios recubiertos con el vidrio bioactivo (Fig. 31), siendo especialmente relevante que la población de las células encontradas en los andamios recubiertos es CaSR⁺.

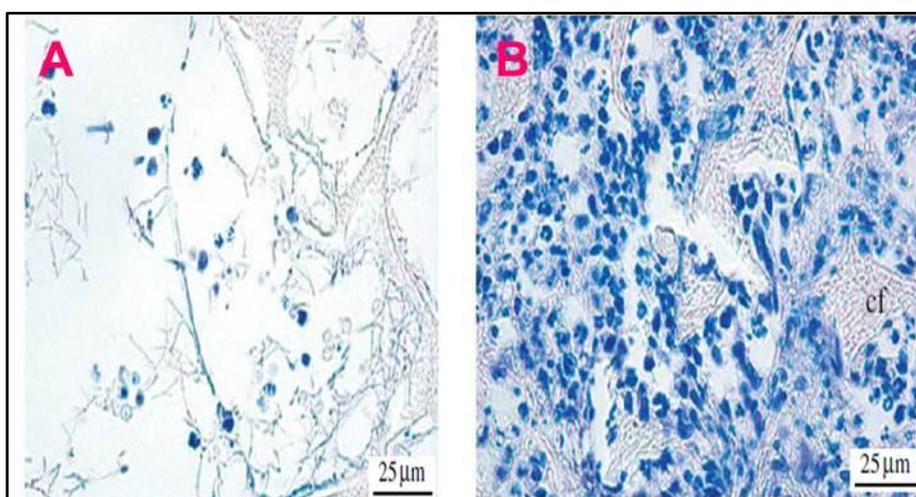


Fig. 31 El vidrio bioactivo S53P4 (Vivoxid Ltd) promueve la movilización y colonización de células. Andamio sin vidrio bioactivo (A) y recubierto con vidrio bioactivo (B) luego de 7 días de implantación en el espacio subepidérmico de ratones. (Tommila *et al.*, 2009)

Estos resultados sugieren la existencia de factores liberados a partir del vidrio bioactivo, como agentes clave en la inducción de movilización de células formadoras de tejidos hacia los andamios *in situ*. Además, debido a que las células que colonizaron el andamio eran CaSR⁺ es

posible que este receptor esté involucrado en el desarrollo de la mencionada respuesta biológica. Lo cual, implicaría una posible vía para aumentar la eficiencia de los biomateriales utilizados en ingeniería tisular ósea.

4.2. Objetivos

-Evaluar los efectos del Calcio Extracelular sobre la viabilidad y la proliferación de células endoteliales progenitoras (EPCs).

-Medir la expresión del CaSR en las EPCs.

-Evaluar el poder quimiotáctico del calcio extracelular sobre EPCs. Establecer el papel del CaSR en esta respuesta biológica.

-Medir la expresión de marcadores genéticos y funcionales de la diferenciación endotelial y pro-angiogénicos en EPCs estimuladas con calcio extracelular. Establecer la implicación del CaSR en el desarrollo de estas repuestas biológicas.

4.3. Resultados

4.3.1. Expresión del receptor sensor de calcio (CaSR) en EPCs

Una vez demostrada la identidad de la población celular extraída de la médula ósea, se procedió a evaluar la expresión del receptor sensor de calcio en dicha población celular. En este sentido, se utilizó un anticuerpo específico contra CaSR, y la presencia de dicho receptor fue revelada con un anticuerpo secundario acoplado a una molécula fluorescente. En la Fig. 32 se demuestra que las EPCs son positivas para CaSR.

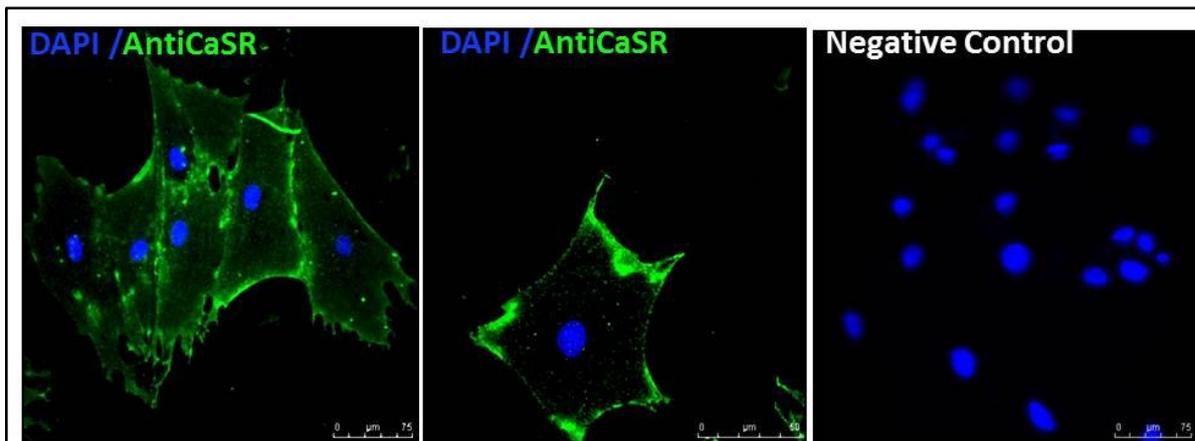


Fig. 32. En la imagen se observan Células progenitoras endoteliales (EPCs) marcadas con un anticuerpo monoclonal contra CaSR (verde), los núcleos fueron marcados con DAPI (azul). Las fotografías muestran la intensa expresión del CaSR en la membrana celular. En el control negativo (sin anticuerpo primario) demuestra la alta especificidad de la señal.

En particular, se puede observar que las EPCs, expresan intensamente el CaSR en su membrana plasmática. Mientras que en el control negativo se puede apreciar la alta especificidad del marcaje utilizado. Sin embargo, con la finalidad de comprobar la presencia de este receptor en las EPCs, se aplicaron técnicas para revelar la expresión genética de dicho receptor. La Fig. 33 muestra la cinética de expresión del CaSR en EPCs cultivadas con el medio control y con medio suplementado con 10 mM Ca^{2+} (esta concentración fue seleccionada en

base al rango de activación del CaSR). Particularmente, se puede observar que tanto las EPCs cultivadas en medio control, como cultivadas con 10 mM Ca²⁺ expresan genéticamente el CaSR y ambas poblaciones celulares presentan un comportamiento similar en cuanto a los ritmos de expresión del gen de interés. El gráfico también revela que la estimulación con 10 mM Ca²⁺ promueve la sobre-expresión del CaSR respecto al control.

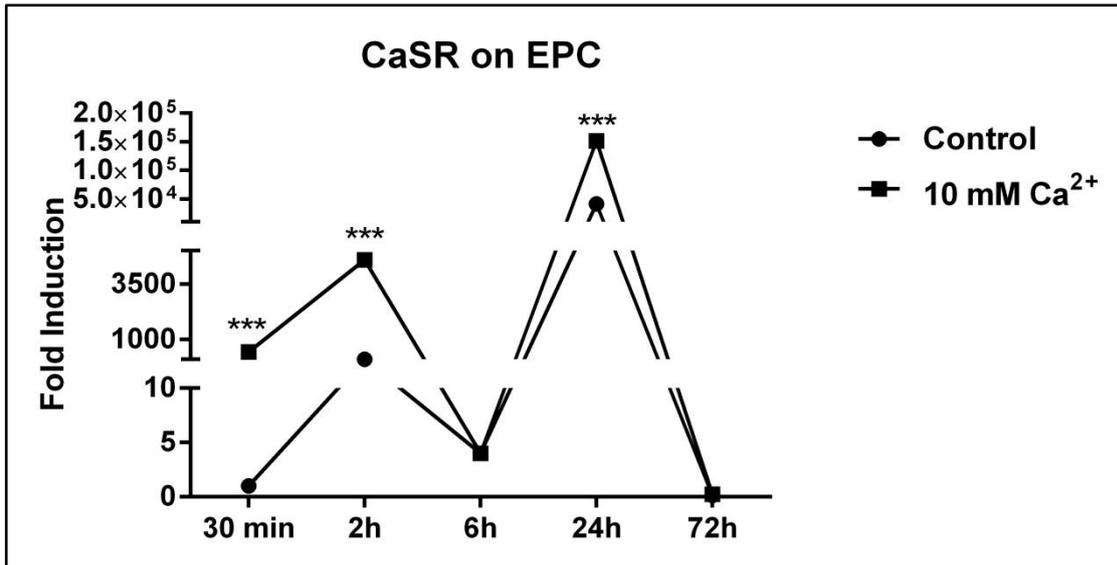


Fig. 33 Expresión genética de CaSR en EPCs. La expresión genética fue calculada utilizando el método del $\Delta\Delta\text{CT}$, utilizando como referencia la expresión del CaSR en el tratamiento **Ctrl** a los 30 min. ***= $p < 0,001$. Las barras de error pese a estar graficadas, no es posible observarlas debido a que los valores son pequeños para la escala del gráfico.

4.3.2. Efectos del Calcio Extracelular en la proliferación y viabilidad de las EPCs

Una vez comprobada la expresión del CaSR en las EPCs, el siguiente paso fue evaluar los efectos que tienen diferentes concentraciones de calcio extracelular sobre la viabilidad y proliferación de las EPCs. En la Fig. 34 se muestran los resultados del ensayo de WST-1, a través del cual se estimó la viabilidad y proliferación de las EPCs.

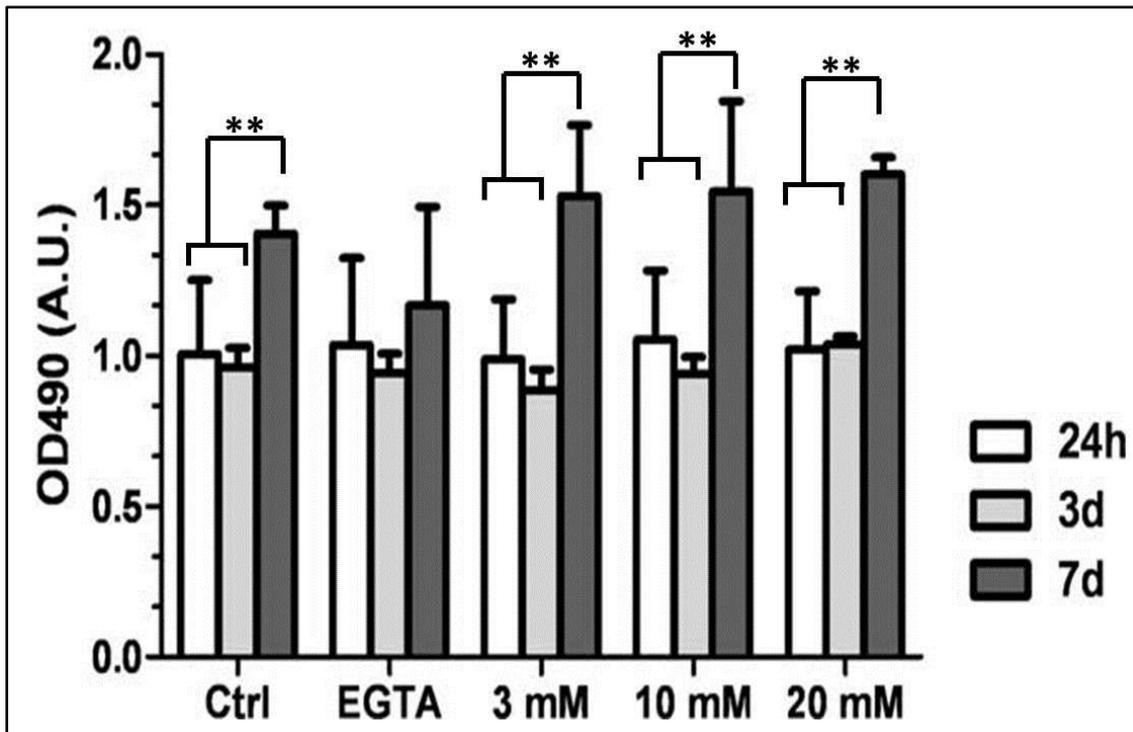


Fig. 34 Efecto del tratamiento con altas concentraciones de calcio extracelular sobre la viabilidad y proliferación de las EPCs. La viabilidad fue medida usando el reactivo WST-1. Las EPCs fueron cultivadas con medio control (Ctrl = contiene 1,5 mM Ca^{2+}), EGTA = 0 mM Ca^{2+} , o medios suplementados con la cantidad de Ca^{2+} para alcanzar concentraciones de 3mM, 10 mM y 20 mM. No se observaron efectos en la proliferación y/o viabilidad de las EPCs. $p < 0,01 = **$.

Los resultados indican que no existen diferencias significativas en la viabilidad de las EPCs sometidas a concentraciones crecientes de calcio extracelular. También se observó que las células cultivadas en medio control (1,5 mM Ca^{2+}), 3 mM, 10 mM y 20 mM de calcio extracelular presentaron patrones de proliferación similares en los que la cantidad de células aumentó durante el período de 3-7 días. Sin embargo, en el caso de las células tratadas con EGTA (0 mM Ca^{2+}) la proliferación no fue significativa en ninguno de los períodos de tiempo evaluados.

4.3.3. Efecto quimiotáctico del calcio extracelular y el papel del CaSR.

En la sección anterior fue demostrado que las concentraciones crecientes de calcio extracelular no afectan la viabilidad de las EPCs. El objetivo principal del ensayo de quimiotaxis fue evaluar si los gradientes crecientes de calcio extracelular son capaces de

ejercer un efecto quimiotáctico sobre las EPCs. En este sentido, en la Fig. 35 se muestra un gráfico de barras que representa el índice de migración de cada tratamiento respecto al control. En particular, se observa que las concentraciones crecientes de calcio extracelular (0-20 mM) ejercen un efecto quimiotáctico directamente proporcional al aumento de la concentración. El máximo efecto fue observado en las células estimuladas con 10-20 mM. Asimismo es de destacar que el índice de migración de las EPCs tratadas con 10-20 mM es estadísticamente igual al índice obtenido en las células tratadas con VEGF (control positivo). Por otra parte, los tratamientos con 10 mM Mg^{2+} (agonista del calcio) y el bloqueo del CaSR (AntiCaSR + 10 mM Ca^{2+}) demostraron la importante implicación del CaSR en la modulación de esta respuesta biológica.

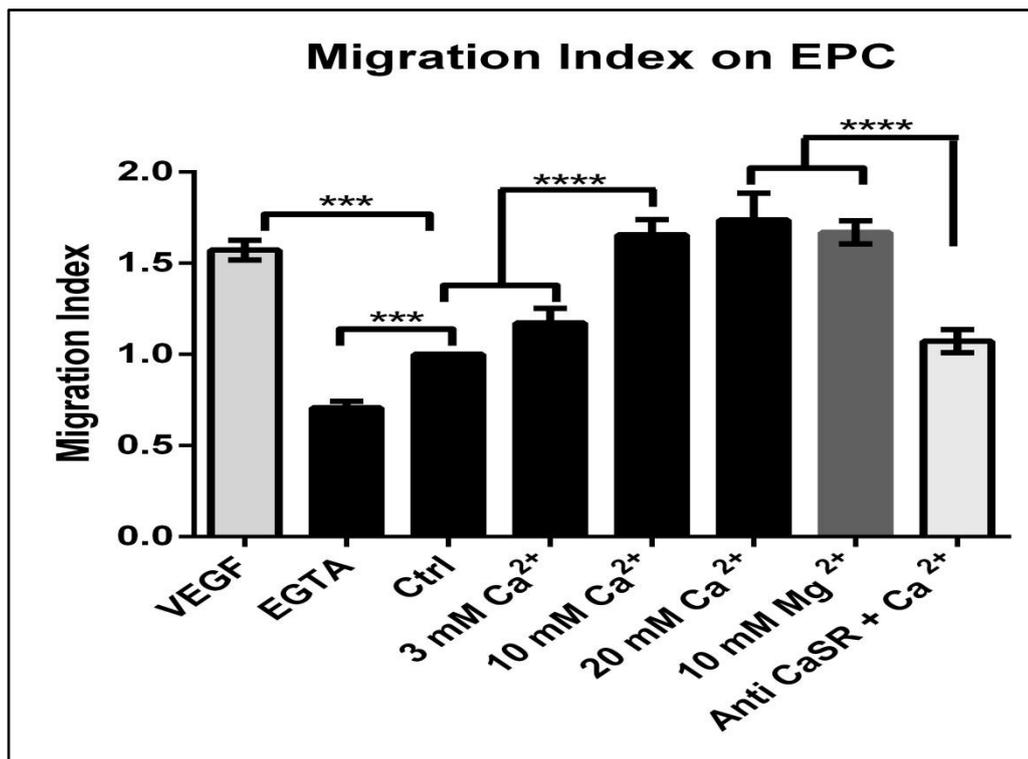


Fig. 35 El gráfico muestra el efecto quimiotáctico que ejerce el calcio extracelular sobre las EPCs. En particular se observa una quimiotaxis dependiente de la concentración de calcio. Observándose un pico a los 10 mM. El VEGF fue utilizado como control positivo, mientras que el medio suplementado con 10 mM de Mg^{2+} (agonista del calcio) aunado a la inhibición de la quimiotaxis al bloquear el CaSR (AntiCaSR + 10 mM Ca^{2+}) demuestran el relevante papel del CaSR en la modulación de dicha respuesta biológica. *** = $p < 0,001$. **** = $p < 0,0001$.

4.3.4. El calcio extracelular estimula la expresión genética de marcadores angiogénicos.

En las secciones anteriores se ha demostrado que el uso de concentraciones elevadas de calcio en el medio extracelular no ocasiona efectos negativos en la viabilidad celular. Asimismo, fue observado un efecto quimiotáctico proporcional al incremento de la concentración de calcio, siendo 10 y 20 mM Ca^{2+} las concentraciones a las cuales se obtuvo el máximo índice de migración. En base a que la concentración de 10 mM Ca^{2+} produjo buenos resultados en migración y proliferación, fue seleccionada para evaluar la capacidad del calcio como inductor de la expresión de genes asociados con procesos de angiogénesis. En este sentido, fue evaluada la expresión de vWF (Factor de von Willebrand), CD31, VEGF-A e IGF-2 en células progenitoras endoteliales cultivadas con medio control o medio suplementado con 10 mM Ca^{2+} (Fig. 36).

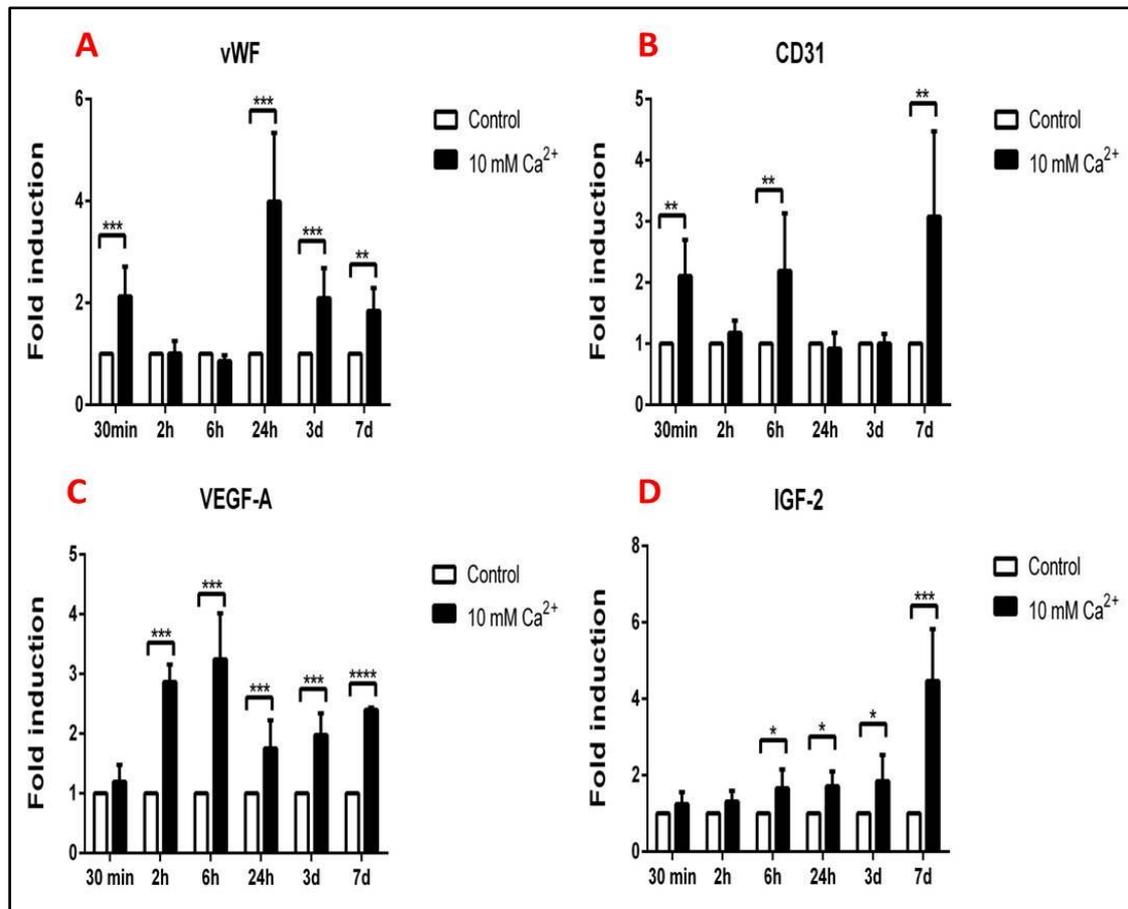


Fig. 36 Expresión genética de vWF (A), CD31 (B), VEGF-A (C) e IGF-2 (D) en EPCs. Los gráficos indican claramente que el calcio extracelular induce la sobre-expresión de los diferentes genes evaluados. * = $p < 0,05$. ** = $p < 0,01$. *** = $p < 0,001$.

Los resultados revelan la alta capacidad del calcio para inducir la expresión genética de los marcadores evaluados. En particular, se puede observar que el tratamiento con 10 mM Ca²⁺ durante 30 min induce una rápida respuesta celular activando la transcripción de los genes que codifican para vWF y CD31 (característicos de células endoteliales maduras). Mientras que al transcurrir 2-6 horas de tratamiento se observó que el calcio indujo la sobre-expresión de VEGF-A, IGF-2 y CD31, todos ellos involucrados en las rutas de señalización de la angiogénesis. Análogamente, la expresión genética de VEGF e IGF-2 en las células estimuladas durante 24h-7días fue aumentando progresivamente en comparación con la expresión de las células cultivadas con medio control. Estos resultados sugieren que el calcio extracelular tiene un efecto positivo en la inducción de señales pro-angiogénicas sobre las EPCs. En consecuencia, se decidió evaluar la expresión genética de un amplio rango de genes involucrados en angiogénesis a través de un ensayo de PCR array sobre células progenitoras endoteliales estimuladas durante 3 días con 10 mM Ca²⁺ (Fig. 37 y Tabla 18).

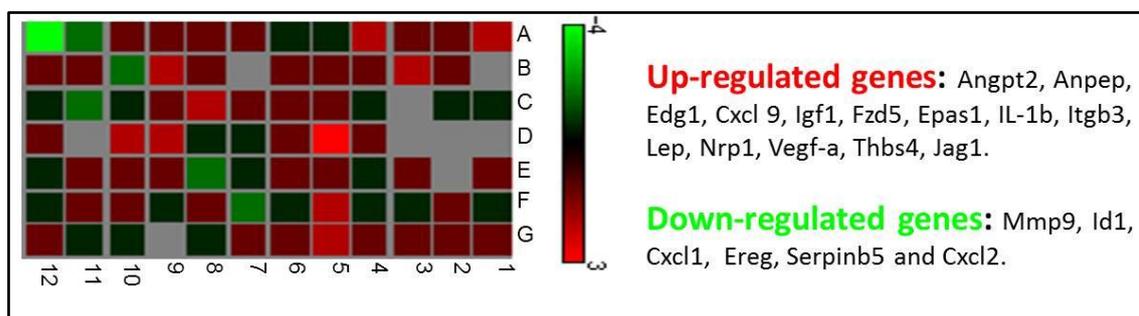


Fig. 37 *Angiogenesis PCR Array*. La imagen representa la expresión genética de 96 genes involucrados en rutas angiogénicas. Particularmente, se muestra la expresión de las EPCs estimuladas con 10 mM Ca²⁺ durante 3 días en comparación con la expresión de EPCs cultivadas en condición control durante el mismo período de tiempo. Los cuadros en rojo representan genes sobre expresados, mientras que los cuadros marcados en verde representan genes reprimidos en comparación con el control.

Símbolo	Nombre del Gen	Función	Índice de Inducción
Sobre-Expresados			
Edg1 (S1PR1)	Gen de diferenciación Endotelial 1	Receptor acoplado a Proteínas G. Induce adhesión célula-célula y diferenciación endotelial.	2,76
Fzd5	Homologo 5 de <i>Frizzled</i>	Receptor en la vía de señalización Wnt.	2,99

Jag1	<i>Jagged 1</i>	Receptor de la vía Notch 1	2,52
Itgb3	Integrina β 3	Molécula de adhesión a la matriz extracelular	2,42
Epas1 (HIF-2 α)	Dominio PAS Endotelial 1	Factor de transcripción	2,15
Thbs4	Trombospondina 4	Molécula de adhesión	2,37
Anpep	Alanil Amilopeptidasa	Remodelación de la matriz extracelular	2,61
Angpt2	Angiopoyetina 2	Molécula de señalización	2,47
Igf1	Factor de crecimiento similar a la Insulina I	Factor de crecimiento	1,95
Vegf A	Factor de crecimiento vascular endotelial A	Factor de crecimiento, inductor de diferenciación endotelial, y quimiotáctico	1,74
IL-1	Interleucina 1	Citocina quimotáctica	3,93
Nrp1	Neuropilina 1	Receptor involucrado migración, supervivencia, formación del sistema cardiovascular	25,02
Lep	Leptina	Involucrada en la regulación del sistema inmune	2,63
Sub-Expresados			
Cxcl2	Ligando 2 de la Citocina (C-X-C)	Molécula de señalización	-4,31
Cxcl1	Ligando 1 de la Citocina (C-X-C)	Molécula de señalización	-2,16
Id1	Inhibidor de diferenciación 1	Factor de transcripción	-2,33
Ereg	Epiregulina	Ligando del EGF	-2,01
Serpib5	Serpib5	Inhibidor de la actividad de la serin-proteasa	-2,59
Mmp9	Metaloproteinasas 9	Remodelación de la matriz extracelular	-2,59

Tabla 18 Resumen de la regulación de genes ocasionada por el tratamiento de EPCs con calcio extracelular durante 3 días.

De los 96 genes evaluados, 84 están directamente relacionados con la regulación de la angiogénesis (Fig. 15). Dentro de estos 84 genes, se encuentran factores de crecimiento, factores de transcripción, proteasas de matriz extracelular, citocinas, receptores, proteínas de matriz extracelular, proteínas de adhesión, entre otros. En este sentido, los resultados mostraron que el 15 % de los genes presentan una sobre-expresión de 2 o más veces la expresión en las EPCs control: Angiopoyetina 2 (Angpt 2), Amilopeptidasa (Anpep), Ligando 9 de las citocinas C-X-C (Cxcl 9), Gen de diferenciación endotelial 1 (Edg1), Dominio 1 de la proteína Pas endotelial (Epas 1), Fzd5, Igf1 (sobre-expresado 1,95) IL-1b, Integrina b3 (Itgb3), Jag 1, Leptina (Lep), Neuropilina 1 (Nrp 1), Plasminógeno (Plg), Trombospondina (Thbs4), Vegf-A (sobre-expresado 1,74). Todos ellos relacionados con rutas de señalización pro-angiogénicas. Mientras que solo un 7 % de los genes fueron reprimidos: Ligando 2 de las citosinas C-X-C (Cxcl 2), Epiregulina (Ereg), Inhibidor de diferenciación 1 (Id-1), Metaloproteinasa 9 (Mmp-9), y el Inhibidor de la actividad de la serin-proteasa (Serpib5).

4.3.5. El calcio extracelular estimula la formación de microcapilares en matrigel a través del CaSR

La formación de microcapilares en matrigel es un comportamiento característico de las células endoteliales, que está relacionado con la formación de nuevos vasos sanguíneos. Considerando esto, y aunado a los resultados anteriores donde se evidenciaron los efectos tempranos de la estimulación con calcio extracelular a nivel genético, se procedió a analizar el efecto del calcio extracelular en la formación de nuevos vasos sanguíneos, así como el papel que juega el CaSR en dicha respuesta biológica. En la Fig. 38 se puede observar claramente como las células cuyo medio fue suplementado con calcio extracelular y/o VEGF expresaron un significativo incremento de la cantidad de microcapilares y ramificaciones, en comparación con los observados en las células cultivados con el medio control. En particular, en la imagen correspondiente a las células estimuladas con 10 mM Ca²⁺ se puede observar que tanto la

cantidad de microcapilares, como las ramificaciones e interconexiones entre los mismos es mucho mayor a los observados en el tratamiento control. De la misma manera, las células estimuladas con VEGF (control positivo) mostraron un comportamiento similar al observado en las células estimuladas con 10 mM Ca^{2+} . Asimismo, es de destacar que el mayor índice de ramificaciones en los microcapilares fue encontrado en las células estimuladas con VEGF + 10 mM Ca^{2+} evidenciando un efecto sinérgico entre ambos tratamientos. En contraste, las células estimuladas con 10 mM Ca^{2+} a las cuales les fue bloqueado el CaSR (AntiCaSR + Ca^{2+}) presentaron un índice de ramificaciones semejante al obtenido en las células control. Demostrándose así, que el CaSR es el principal modulador de esta respuesta biológica promovida por el calcio extracelular.

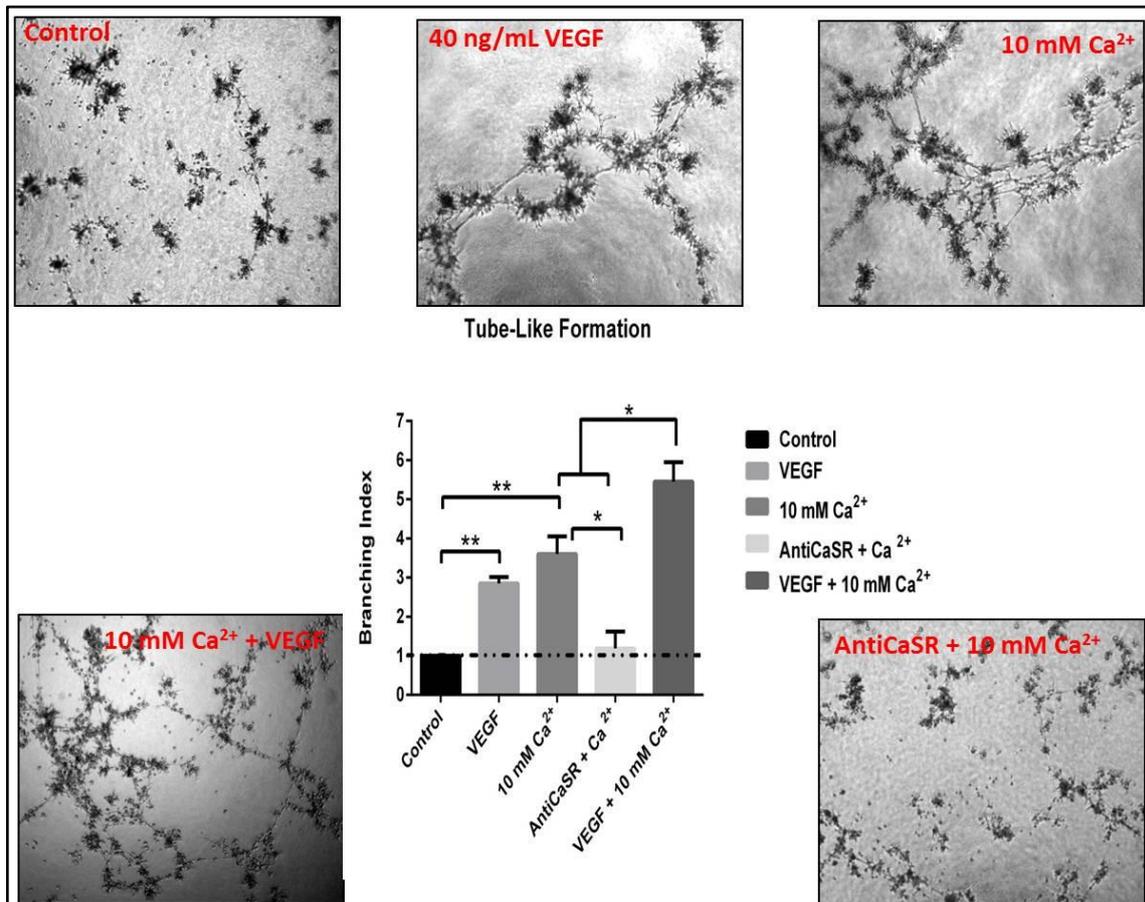


Fig. 38 Formación de microcapilares en matrigel. En la figura se muestran capturas representativas de cada uno de los tratamientos aplicados. Tanto en las fotos como en el gráfico de barras se puede apreciar claramente el aumento de la cantidad de ramificaciones y microcapilares en los tratamientos que contienen VEGF y Ca^{2+} , observándose el máximo índice de ramificación en el tratamiento de VEGF + 10 mM Ca^{2+} . Mientras que el bloqueo del CaSR (AntiCaSR + Ca^{2+}) inhibió completamente dicha respuesta celular.

4.4. Discusión

En la actualidad, existen numerosas publicaciones que demuestran la posibilidad de construir tejidos *in vitro* con una adecuada perfusión de oxígeno y nutrientes a través del uso de sistemas avanzados de perfusión en bioreactores que simulan algunos aspectos de las condiciones *in vivo* (Rouwkema, Rivron e Van Blitterswijk, 2008). Sin embargo, en la mayoría de los casos al ser implantados en el huésped esos tejidos sufren problemas de difusión por tener una insuficiente irrigación sanguínea (Janssen *et al.*, 2006; Novosel, Kleinhans e Kluger, 2011). En este sentido, la adecuada vascularización es la mayor limitación del tamaño de los tejidos diseñados a través de la ingeniería de tejidos. Una potencial solución a este problema es la inducción de angiogénesis *in situ* por parte del andamio implantado (Murphy e Atala, 2013). Diversas estrategias han sido propuestas. Entre ellas, se encuentra la liberación de moléculas o factores de crecimiento con actividad pro-angiogénica por parte del andamio.

En el presente capítulo se presentan una serie de evidencias que revelan un nuevo papel del calcio extracelular como inductor de respuestas pro-angiogénicas por parte de células progenitoras endoteliales. Lo cual es un hallazgo altamente relevante, debido a que la liberación de adecuadas cantidades de calcio extracelular en un sistema de ingeniería de tejidos es una estrategia relativamente fácil de llevar a cabo y que conllevaría un costo muy reducido en comparación con otras estrategias.

Tal y como fue comentado en la introducción de este capítulo, el efecto vasodilatador del calcio extracelular se conoce desde el siglo XIX. Siendo posteriormente vinculada esa respuesta biológica a la activación de rutas relacionadas con el CaSR de las células endoteliales, células nerviosas perivasculares y el de las VSMCs. Además ha sido reportada la relación entre la activación del CaSR y la producción de VEGF (Tfelt-Hansen *et al.*, 2003; Smajilovic e Tfelt-Hansen, 2008). En este sentido, los resultados mostrados en el presente trabajo de investigación no solo demuestran la presencia del CaSR en las células endoteliales progenitoras (Fig. 32 y Fig. 33) sino que también revelan el importante papel del CaSR como modulador de procesos

pro-angiogénicos. En particular, se demostró que el calcio extracelular a una concentración de 10 mM ejerce un poderoso efecto quimiotáctico sobre las EPCs. En este punto es importante destacar que el rango de activación del CaSR se encuentra entre 0,5-10 mM, siendo capaz de detectar variaciones de solo 200 μ M en la concentración de calcio extracelular (Hofer e Brown, 2003). En consecuencia, este rango de activación explica el hecho de que no se encuentren diferencias significativas al aumentar la concentración de calcio por encima de los 10 mM (Fig. 35). Asimismo mediante el uso de agonistas y del bloqueo del receptor, fue comprobado que el CaSR es el principal mediador de dicha respuesta. Este hallazgo no solo desvela un nuevo papel del CaSR y el calcio extracelular como agentes quimiotácticos en las EPCs, sino que además tiene una potencial implicación desde el punto de vista de la inducción de vascularización en la ingeniería de tejidos. Específicamente, los resultados aquí presentados podrían ser una explicación a los hallazgos de Tommila *et al.*, 2009; quienes reportaron una mayor colonización de células en andamios recubiertos con vidrio bioactivo, siendo estas células mayoritariamente CaSR⁺. A la luz de los nuevos resultados, es posible que el calcio extracelular liberado por los andamios recubiertos por vidrio bioactivo active el CaSR y sea uno de los agentes quimiotácticos responsables de la movilización y adhesión de células hacia los andamios implantados.

Análogamente, se ha demostrado que la estimulación con calcio extracelular promueve la sobre-expresión de una serie de genes involucrados con el desarrollo de procesos angiogénicos. Por ejemplo, se encontró sobre-expresión de genes tales como: VEGF, IGF-1, IGF-2, vWF, Nrp-1, Angpt2, Edg1, Epas1, Jag1, entre otros (Tabla 18, Fig. 36, Fig. 37). Todos estos genes están íntimamente involucrados en el desarrollo de procesos angiogénicos, demostrándose que el calcio extracelular ejerce un papel inductor de la expresión de una serie de genes involucrados en rutas de señalización tales como Notch, Wnt/ β -catenina, la ruta de las tirosinas quinasas y proteínas Gs, de forma tal que la activación del CaSR puede causar un amplio rango de efectos en las EPCs, lo cual no había sido descrito previamente.

Es particularmente interesante que el calcio extracelular sea capaz de promover la expresión del IGF-1, IGF-2 y el VEGF. Debido a que ha sido demostrado que el IGF -1 es un importante inductor de la expresión del HIF y tanto el HIF como el IGF-1 aumentan significativamente la expresión del VEGF lo cual es a su vez un poderoso inductor de la angiogénesis (Fukuda *et al.*, 2002). Por otra parte, ha sido reportado que el IGF-2 promueve la colonización de las EPCs en regiones isquémicas (Maeng *et al.*, 2009). Aunado a esto, previamente ha sido descrita una estrecha relación entre el CaSR y la expresión del IGF-1, debido a que animales cuya expresión del CaSR ha sido suprimida (*knockouts*) presentan deficiencias en las vías de señalización del IGF-1 (Wenhan *et al.*, 2008).

El incremento de la producción de moléculas tales como la IL-1b y la Angpt 2 en un organismo corresponde a la activación de las células endoteliales, como consecuencia de hipoxia, agresiones físicas, infecciones, etc. Aunado a lo antes descrito, es ampliamente conocido que durante procesos de angiogénesis el primer paso es la desestabilización de los vasos sanguíneos pre-existentes, seguido que la reestructuración, y ramificación de los vasos sanguíneos. En este sentido, ha sido demostrado que la Angpt 2 es un importante agente promotor de la desestabilización de los vasos sanguíneos, observándose altos niveles de inducción de este gen durante procesos de angiogénesis y vasculogénesis. Análogamente, la expresión de citocinas quimotácticas tales como la IL-1b pueden ayudar al reclutamiento de células involucradas en la formación de nuevos vasos sanguíneos (Fiedler e Augustin, 2006). Otros genes sobre-expresados por las EPCs al ser tratadas con $[Ca^{2+}]_0$ fueron Jag1, Edg1 y Fzd5, todos ellos representantes de diferentes rutas de señalización que están íntimamente involucrados en la activación de respuestas, tales como migración, formación de microcapilares, vasculogénesis, producción de VEGF y supervivencia en células endoteliales (Pyne e Pyne, 2000; Ishikawa *et al.*, 2001; Masckauchán e Kitajewski, 2006; Zerlin, Julius e Kitajewski, 2008; Sakurai e Kudo, 2011).

En contraste, los genes inhibidos tales como Cxcl-1 y el Cxcl-2 están involucrados en la activación de células del sistema inmune, como por ejemplo monocitos y neutrófilos. Los cuales

desencadenan procesos inflamatorios nocivos para el tejido y contrarios a la formación de vasos sanguíneos. Otros genes sub-expresados fueron el Id1 y el Serpinb5 los cuales están íntimamente vinculados a la regulación del desarrollo de tumores. Particularmente, el Id1 ha sido descrito como un poderoso oncogen relacionado al desarrollo de tumores (Sikder *et al.*, 2003). Mientras que Serpinb5 es un gen antitumoral, cuya principal función es la de ejercer un poderoso efecto anti-angiogénico sobre las células endoteliales (Qin e Zhang, 2010). En contraste, la sub-expresión del Mmp-9 en las EPCs estimuladas con calcio extracelular es una señal contradictoria respecto a las señales claramente pro-angiogénicas encontradas en las diferentes pruebas genéticas. Debido a que esta proteína está ampliamente descrita como una molécula involucrada en procesos de desestabilización del endotelio, lo cual es uno de los procesos relacionados con el desarrollo de procesos angiogénicos. Sin embargo, este hallazgo pudiera ser consecuencia de que 3 días es un período de tiempo muy temprano para ver dicha respuesta.

En general, el análisis de la expresión genética de las EPCs estimuladas con calcio revela una potente inducción de señales pro-angiogénicas características de células endoteliales durante la formación de nuevos vasos sanguíneos. Así como el aumento de la producción de factores quimotácticos capaces de reclutar células formadoras de vasos sanguíneos a distancia, siendo este efecto muy positivo desde el punto de vista de la ingeniería de tejidos.

Por su parte, los resultados obtenidos en los ensayos funcionales de la formación de microcapilares en matrigel (Fig. 38) corroboran los resultados obtenidos a partir del análisis de la expresión genética. En particular, concuerdan con el hecho de que el calcio extracelular es capaz de inducir una respuesta temprana (la máxima expresión fue observada a las 6 horas de estimulación) en la sobre-expresión del VEGF. En este sentido, los resultados sugieren una clara inducción de la formación de vasos sanguíneos primitivos como consecuencia de la estimulación con calcio extracelular. Este hallazgo puede estar relacionado con la sobre-expresión de genes tales como Jag1, Fzd5 o Edg1, debido a que su expresión está vinculada a una mayor expresión del VEGF y una mayor formación de capilares y ramificaciones de vasos

sanguíneos (Sakurai e Kudo, 2011). Lo cual es una posible explicación al efecto sinérgico entre el Ca^{2+} y el VEGF, observado en el tratamiento de VEGF + 10 mM de Ca^{2+} en la Fig. 38, donde se produjo la mayor cantidad de microcapilares y ramificaciones. Asimismo, fue corroborado el importante papel que juega el CaSR en la modulación de esta respuesta biológica, debido a que el efecto del Ca^{2+} fue completamente inhibido al bloquear el CaSR a través del uso de un anticuerpo específico (AntiCaSR + 10 mM Ca^{2+}). Sugiriéndose así que el CaSR es el principal modulador de la respuesta genética y funcional involucrada en la inducción de procesos angiogénicos por parte del calcio extracelular.

4.5. Conclusiones

En resumen los resultados aquí presentados demuestran claramente que el calcio extracelular es capaz de ejercer un poderoso efecto quimiotáctico sobre las EPCs semejante al efecto quimiotáctico del VEGF. Siendo esta quimiotaxis dependiente de la activación del CaSR. Los resultados también revelan un nuevo papel del calcio extracelular y su receptor en membrana como agentes inductores de señales pro-angiogénicas a nivel genético y funcional en EPCs. Siendo ambos descubrimientos novedosos y relevantes desde el punto de vista de la ingeniería de tejidos, ya que señalan al CaSR como un posible blanco terapéutico para la inducción de procesos angiogénicos en los sistemas de ingeniería tisular.

Capítulo V: Papel del Calcio Extracelular y el CaSR en la diferenciación de las MSCs

5. Papel del calcio extracelular y el CaSR en la diferenciación de las MSCs

5.1. Introducción

5.1.1. Variación de la concentración de calcio extracelular en el hueso

El hueso es el principal reservorio de calcio en el organismo. De los 1-2Kg de calcio que se encuentran en un ser humano adulto, el 99% están almacenados en el esqueleto (Fauci *et al.*, 2008). Por otra parte, la concentración de calcio extracelular en sangre se encuentra en un rango de 2,2-2,6 mM de los cuales cerca del 50% está en forma iónica. Sin embargo, la ingesta de alimentos y bebidas ricos en calcio, así como la activación de la remodelación ósea pueden afectar la concentración del calcio en sangre puntualmente (Fauci *et al.*, 2008).

En general, el control de la concentración sistémica del calcio se logra por medio del ajuste de las tasas de absorción y excreción del calcio a través de los epitelios intestinales y renales, así como la activación de procesos de remodelado óseo. Dichos ajustes están controlados principalmente por la secreción de la hormona paratiroidea (PTH) y la vitamina D, siendo a su vez la secreción de PTH regulada por el CaSR paratiroideo que detecta la concentración de calcio en sangre (Brown, 2013). En este sentido el CaSR posee una función clave en la regulación de la concentración de calcio extracelular a nivel sistémico.

Específicamente en lo que se refiere al hueso, es ampliamente conocido que la secreción de la PTH es indirectamente proporcional a la concentración de calcio en sangre. Asimismo, se sabe que la PTH de forma directa e indirecta promueve la resorción ósea y la osteoclastogénesis (Brown, 2013). Una vez activada la resorción ósea los osteoclastos degradan la matriz extracelular ósea, liberando así grandes cantidades de iones calcio (8-40 mM), fosfatos,

proteínas acopladas a la matriz extracelular, tales como TGF β , Osteocalcina, BMPs, BSP, entre otras (Freemont, 1993).

Sin embargo, debido a que el proceso de remodelación ósea es un proceso relativamente lento (meses), ha sido propuesto que el control rápido de la concentración de calcio se lleva a cabo por medio de un proceso de intercambio de iones calcio a través de la membrana plasmática de las células quiescentes del hueso independiente de la concentración de PTH en sangre (Parfitt, 1989). Esta afirmación está basada en observaciones experimentales tales como las realizadas en 1961 donde se demostró que los niveles de calcio extracelular en animales a los que les fue inyectado EDTA y suprimida la glándula paratiroidea, se ajustan rápidamente y a la misma velocidad que los animales a los que no les fue suprimida dicha glándula (Dvorak e Riccardi, 2004). Análogamente, se ha demostrado *in vitro* que el tratamiento con altas concentraciones de calcio extracelular promueve la proliferación y la activación de los receptores sensores de calcio en osteoblastos (Ye *et al.*, 2000; Yamaguchi *et al.*, 2001; Dvorak *et al.*, 2004). Pese a que se conoce que el CaSR está involucrado en esta respuesta independiente a la acción de la PTH, aún está pobremente descrito el mecanismo a través del cual se lleva a cabo el flujo de calcio desde el hueso hacia el exterior celular sin la intervención de la resorción ósea.

En base a los argumentos previamente descritos se puede afirmar que aunque la concentración sistémica del calcio extracelular permanece relativamente constante, la concentración local en el hueso se encuentra en permanente variación. Asimismo, estos cambios locales de la concentración de calcio extracelular son capaces de regular el funcionamiento de diferentes tipos celulares, tales como los osteoblastos y los osteoclastos, a través de la activación de receptores sensores al calcio.

5.1.2. Expresión del CaSR en células formadoras de hueso

La expresión del CaSR en las células del linaje óseo ha sido materia de controversia durante los últimos años, debido a que existe un gran número de investigadores que han demostrado la presencia de este receptor en líneas celulares osteoblásticas, mientras que otros grupos fueron incapaces de demostrar la presencia de este receptor en osteoblastos (Tfelt-Hansen e Brown, 2005). Sin embargo, lo que sí parece estar claro es que el incremento de la concentración extracelular de calcio induce proliferación y quimiotaxis en dicho tipo celular (Sharan *et al.*, 2008). A continuación serán descritas algunas de las evidencias de la presencia del CaSR en las células formadoras del tejido óseo.

Una de las primeras evidencias de la presencia del CaSR en células óseas fue la reportada por (House *et al.*, 1997), quienes demostraron la presencia del CaSR a través de PCR e inmunohistoquímica en la fracción de células mononucleares adherentes de la médula ósea. En el mismo año, otros investigadores usando osteoblastos de la línea celular MC3T3-E1 sugirieron la presencia de otro receptor sensor de calcio con funciones similares a las del CaSR (Quarles *et al.*, 1997). Estos investigadores reportaron que pese a ser un receptor similar al CaSR, no podía ser el mismo receptor debido a que sus resultados demostraron una serie de propiedades diferentes en el receptor sensor de calcio encontrado en las MC3T3-E1 respecto al CaSR paratiroideo. Posteriormente, fueron reportados otros artículos en los que los autores demostraron la presencia de otro receptor sensor de calcio que denominaron GPRC6A en osteoblastos cuya función y características es muy similar al CaSR (Pi, Hinson e Quarles, 1999; Pi *et al.*, 2005; Pi *et al.*, 2010).

Por otra parte, estudios más refinados y detallados fueron desarrollados por múltiples grupos de investigación con la finalidad de evaluar la presencia del CaSR en osteoblastos. En este sentido, los primeros en encontrar evidencias sobre la presencia del CaSR en las células MC3T3-E1 fueron (Yamaguchi *et al.*, 1998), quienes reportaron que el cultivo de este tipo

celular con 4,8 mM Ca^{2+} o alguno de sus agonistas induce quimiotaxis y proliferación, sugiriendo la presencia del CaSR en dichas células. Un año más tarde fue publicado el primer artículo en el cual fue demostrada claramente la expresión del CaSR en osteoblastos y condroblastos tanto en cultivos celulares como en tejidos (Chang *et al.*, 1999). Además, en el mencionado estudio los investigadores encontraron una interesante distribución del CaSR, ya que el receptor se expresa con mayor intensidad en los osteoblastos y condroblastos más inmaduros.

Gracias a estos estudios y a muchos otros, en la actualidad se considera que los osteoblastos expresan el CaSR, así como receptores semejantes al CaSR (tales como el GPRC6A) capaces de detectar variaciones en la concentración extracelular de calcio (Marie, 2010; Brown, 2013). Tal y como fue comentado en capítulos previos, las MSCs son otro tipo celular capaz de diferenciarse hacia el linaje osteoblastico. En este sentido, recientemente fue demostrada la presencia del CaSR en MSCs humanas (Barradas *et al.*, 2012). Sin embargo, muy poco se conoce acerca del papel que juega el calcio extracelular y el CaSR en este tipo celular.

5.1.3. *Papel del calcio extracelular y el CaSR en células del linaje óseo.*

Como ha sido descrito anteriormente el calcio es un ión altamente controlado en los sistemas biológicos. Este ión es especialmente importante debido a que los cambios de concentración a nivel intracelular y extracelular pueden ejercer una gran cantidad de efectos en el comportamiento celular y tisular. Particularmente en el hueso, las variaciones de la concentración de calcio extracelular a nivel local son constantes, sin embargo el conocimiento de los efectos que pueden tener esas variaciones sobre el comportamiento de las células óseas es muy reducido. A continuación se describirán algunos de los resultados publicados que están relacionados con los efectos del calcio extracelular y la implicación del CaSR en dichas respuestas celulares.

Una vez demostrado que diversas células óseas expresan el CaSR, han sido realizados diferentes estudios con la finalidad de evaluar el efecto del calcio extracelular sobre el comportamiento de estas células. Uno de estos estudios demostró que el tratamiento con altas concentraciones de $[Ca^{2+}]_0$ induce proliferación en osteoblastos de manera dosis dependiente a través del CaSR (Chattopadhyay *et al.*, 2004). Otros investigadores han corroborado el efecto mitótico que ejercen las altas concentraciones de $[Ca^{2+}]_0$ sobre los osteoblastos. Asimismo demostraron que concentraciones 6-10 mM de calcio podían inducir a los osteoblastos a proliferar mientras que reducen la resorción del hueso en los osteoclastos (Maeno *et al.*, 2005). Por otra parte, ha sido descrito que las altas concentraciones de calcio en el medio extracelular inducen la apoptosis en los osteoclastos maduros e inhiben la osteoclastogénesis (Lorget *et al.*, 2000; Shalhoub *et al.*, 2003). Pese a que los efectos del calcio extracelular sobre las células óseas *in vitro* sugieren que el calcio extracelular ejerce una función clave en la sincronización de la remodelación ósea *in vivo*, hasta el momento se desconoce si la variación de Ca^{2+} *in vivo* logra ejercer los mismos efectos (Brown, 2008). Análogamente, el papel que juegan esos cambios en la concentración local de calcio extracelular sobre la movilización, proliferación y diferenciación, de células madre formadoras de hueso, tales como las MSCs sigue siendo una incógnita hasta el presente.

5.2. Objetivos

-Evaluar los efectos del Calcio Extracelular sobre la viabilidad y la proliferación de células madre mesenquimales (MSCs).

-Medir la expresión del CaSR en las MSCs.

***-Evaluar el poder quimiotáctico del calcio extracelular sobre MSCs.
Establecer el papel del CaSR en esta respuesta biológica.***

-Medir la expresión de marcadores genéticos y funcionales de la diferenciación osteogénica en MSCs estimuladas con calcio extracelular. Establecer la implicación del CaSR en el desarrollo de estas repuestas biológicas.

5.3. Resultados

En el capítulo previo se estableció la estrecha relación entre la expresión del CaSR y los efectos pro-angiogénicos del tratamiento con calcio extracelular sobre las EPCs. Sin embargo, en el ámbito de la ingeniería de tejidos óseos también es importante que se promueva la osteogénesis en la zona de interés. En este sentido, el presente capítulo presenta una serie de resultados que demuestran el papel que juega el calcio extracelular y el CaSR en la inducción de osteogénesis en las MSCs.

5.3.1. Expresión del receptor sensor de calcio (CaSR) en MSCs

El primer paso fue evaluar la presencia del CaSR en las células mesenquimales bajo condiciones control de cultivo. En la Fig. 39 se puede observar el resultado de una doble tinción de fluorescencia realizada con faloidina (rojo) que revela la presencia de las fibras de actina (fibras de estrés), un anticuerpo específico contra el CaSR (verde) y los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las imágenes muestran claramente la presencia del CaSR en las MSCs. Específicamente, se observa que el CaSR se encuentra localizado en la membrana plasmática, siendo particularmente fuerte el marcaje en las regiones cercanas a las fibras de estrés y en las uniones intercelulares. El uso de un control negativo (marcaje en ausencia del anticuerpo primario) permitió verificar la autenticidad de la señal, debido a que de esta manera

se puede observar que la señal fluorescente es específica de la interacción entre el CaSR-AntiCaSR-Anticuerpo secundario (Alexa488).

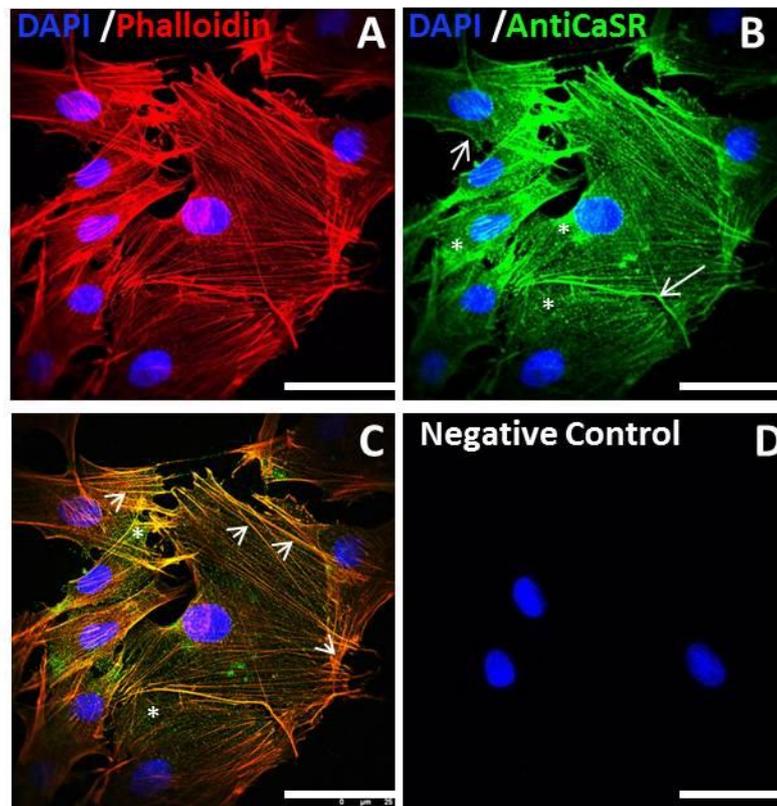


Fig. 39 Expresión del CaSR en células madre mesenquimales cultivadas en condiciones control. (A) Fibras de actina en las MSCs reveladas con faloidina (rojo), el DAPI (azul) revela la presencia de los núcleos. (B) El marcaje con AntiCaSR (verde) revela la presencia del CaSR en la membrana plasmática (asteriscos), siendo particularmente fuerte la expresión del CaSR en las regiones de unión intercelular (flechas blancas). (C) En esta imagen se muestra la colocalización del CaSR y las fibras de actina (cabezas de flecha). (D) Control negativo, MSCs teñidas en ausencia del AntiCaSR. La barra de escala corresponde a 50 μm .

Además, fue evaluada la expresión del CaSR a nivel genético en MSCs cultivadas en condiciones control, así como cultivadas con medio control enriquecido con 10 mM de Ca^{2+} . La concentración de 10 mM de calcio fue escogida en base a los resultados obtenidos en las EPCs, así como en el rango de activación del CaSR (0,5-10 mM Ca^{2+}) (Hofer e Brown, 2003).

En la Fig. 40 se muestra un gráfico de barras que representa el índice de expresión del CaSR en las células estimuladas con Ca^{2+} respecto a las MSCs cultivadas con medio control. En particular, el gráfico ilustra la sobreexpresión del CaSR en las células estimuladas con Ca^{2+} respecto a las células control. Cabe destacar que el máximo índice de expresión fue observado a los 30 min de tratamiento, observándose que el índice de expresión fue variable según el período de tiempo al cual fue evaluada la expresión del CaSR y siendo en la mayoría de los

períodos evaluados (excepto a las 6 horas y las 24 horas) estadísticamente mayor a la expresión de las MSCs cultivadas con Ca^{2+} .

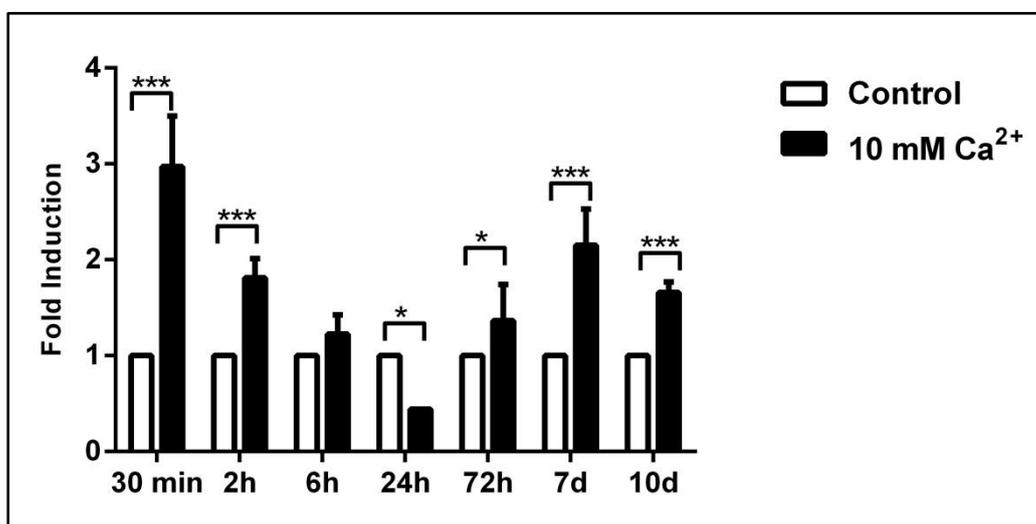


Fig. 40 Expresión genética del CaSR en MSCs cultivadas con medio de cultivo Control y medio con 10 mM Ca^{2+} . El $\Delta\Delta\text{Ct}$ fue calculado normalizando la expresión del CaSR en las células tratadas con Ca^{2+} con la expresión en las muestras Control de cada período de tiempo. * = $p < 0,05$. *** = $p < 0,001$

5.3.2. Efectos del Ca^{2+} sobre la viabilidad y proliferación de las MSCs

Una vez demostrado que las MSCs expresan el CaSR y que el tratamiento con Ca^{2+} estimula la expresión del mencionado receptor, se procedió a evaluar si el tratamiento con calcio extracelular induce algún efecto sobre la viabilidad y/o proliferación de las MSCs. En este sentido, la Fig. 41 presenta el gráfico de barras correspondiente al ensayo de WST-1 realizado en MSCs cultivadas con medios de cultivo suplementados con concentraciones crecientes en calcio extracelular (EGTA= 0 mM; Control = 1,8 mM; 10 mM y 20 mM).

En particular, se puede observar que el índice de proliferación fue estadísticamente igual al cabo de 24 horas en todos los tratamientos. Sin embargo, al transcurrir 3 días de estimulación se pudo observar un aumento significativo en el índice de proliferación de las células cultivadas con 10 mM Ca^{2+} respecto a los otros 3 tratamientos. Análogamente, a los 7 días se observó el mismo comportamiento. Pese a que el cultivo con 10 mM Ca^{2+} fue el tratamiento que indujo el

mayor efecto sobre la proliferación de las MSCs, es importante resaltar que el tratamiento con 20 mM de Ca^{2+} produjo un mayor índice de proliferación que los tratamientos Control y EGTA, por lo que esa alta concentración de Ca^{2+} ejerce también cierto efecto mitótico sobre las MSCs.

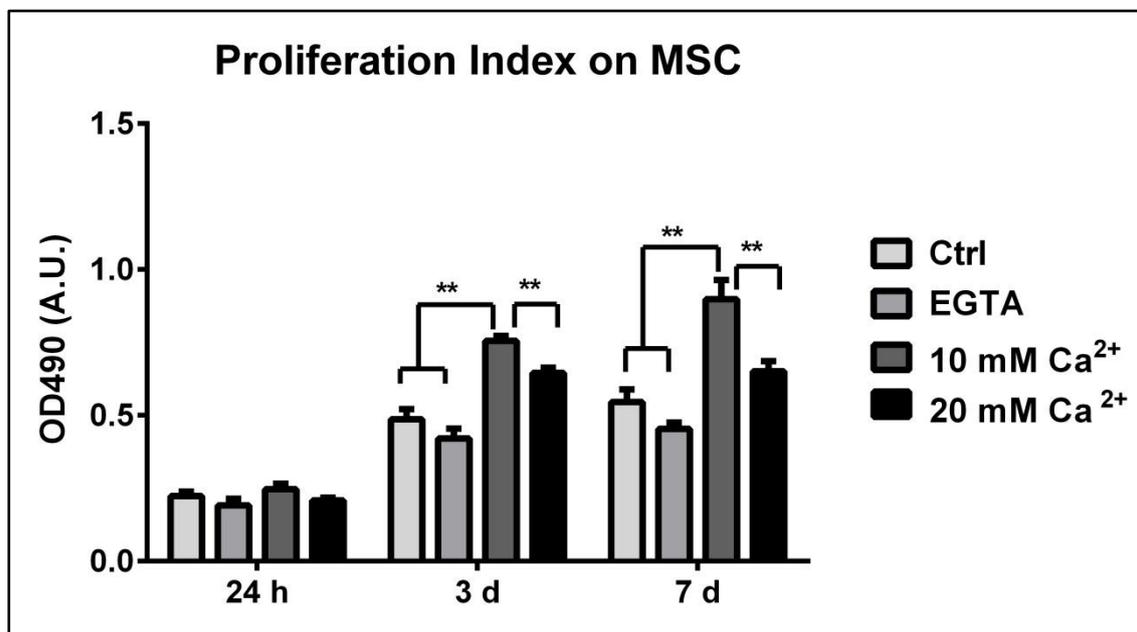


Fig. 41 Efecto del calcio extracelular sobre la proliferación y viabilidad de las MSCs. ** = $p < 0,01$.

5.3.3. *Papel del Calcio extracelular y del CaSR en la movilización de MSCs*

En el capítulo anterior se demostró que el calcio extracelular es capaz de ejercer un efecto quimiotáctico sobre las EPCs que está mediado a través de la activación del CaSR. En consecuencia, es interesante evaluar si las altas concentraciones de calcio ejercen un efecto quimiotáctico sobre las MSC y si este efecto es mediado por la activación del CaSR.

En este sentido, en la Fig. 42 se puede observar un gráfico de barras que representa el índice de migración de las MSCs sometidas a crecientes concentraciones de calcio extracelular. Particularmente, los resultados de este ensayo demostraron que el $[\text{Ca}^{2+}]_0$ ejerce un efecto quimiotáctico significativo sobre las MSCs, siendo observado el efecto máximo en las células

estimuladas con 10 mM Ca^{2+} . Aunado a esto, el índice de migración con 10 mM de Ca^{2+} es estadísticamente igual al índice observado con el tratamiento con VEGF (control positivo). En semejanza al experimento realizado en EPCs, fue evaluado el poder quimiotáctico de un agonista del CaSR (magnesio), demostrándose que no hay diferencias significativas entre el tratamiento con 10 mM Ca^{2+} y el de 10 mM Mg^{2+} . Mientras que al utilizar el antiCaSR como agente bloqueador del receptor las MSCs fueron incapaces de responder al efecto quimiotáctico del tratamiento con 10 mM Ca^{2+} , corroborándose así el relevante papel del CaSR como modulador de esta respuesta biológica en las MSCs.

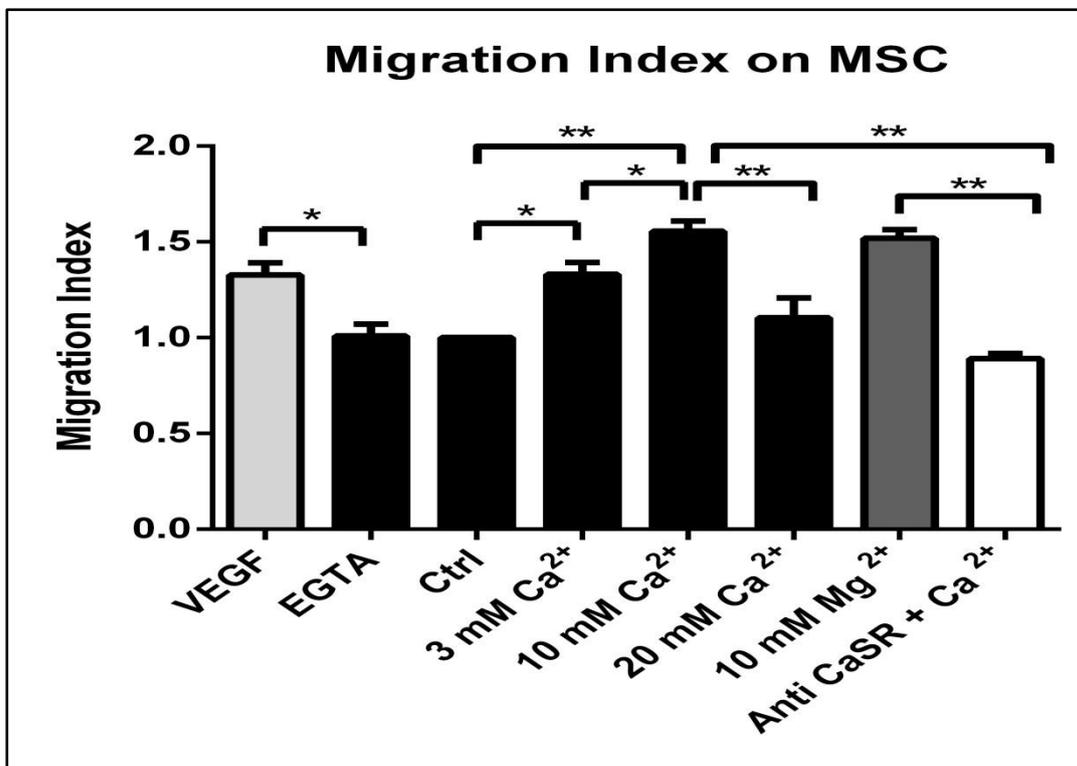


Fig. 42 Efecto del calcio extracelular y del CaSR en la quimiotáxis de MSCs. El gráfico muestra que el índice de migración en las células estimuladas con VEGF (control positivo) es estadísticamente igual al efecto observado con el tratamiento de 10 mM Ca^{2+} . Mientras que los tratamientos de EGTA (0 mM Ca^{2+}) y Ctrl (1,8 mM Ca^{2+}) fueron estadísticamente iguales. La estimulación con 10 mM Mg^{2+} (agonista del calcio) y AntiCaSR + Ca^{2+} (bloqueo del CaSR + 10 mM Ca^{2+}) demuestran que el CaSR está íntimamente involucrado en la respuesta quimiotáctica observada en las concentraciones de 3 mM y 10 mM Ca^{2+} . * = $p < 0,05$. ** = $p < 0,01$.

5.3.4. *Papel del calcio extracelular y del CaSR en la diferenciación osteogénica de las MSCs*

Los resultados que han sido presentados, hasta este punto, demuestran que el calcio extracelular promueve la proliferación y la quimiotaxis en las MSCs, siendo en ambos casos el tratamiento con 10 mM Ca²⁺ el que indujo el mayor efecto. En base a estos resultados, esta concentración de 10 mM de Ca²⁺ fue la seleccionada para realizar los posteriores ensayos para evaluar el papel del CaSR en las MSCs.

En la Fig. 43 se muestran 4 gráficos de barras que representan los índices de expresión de 4 marcadores de diferenciación osteogénica (ALP, BSP, OC y Col Ia1) en MSCs cultivadas con medio control, medio suplementado con 10 mM Ca²⁺ y medio suplementado con un coctel de factores osteogénicos (control positivo).

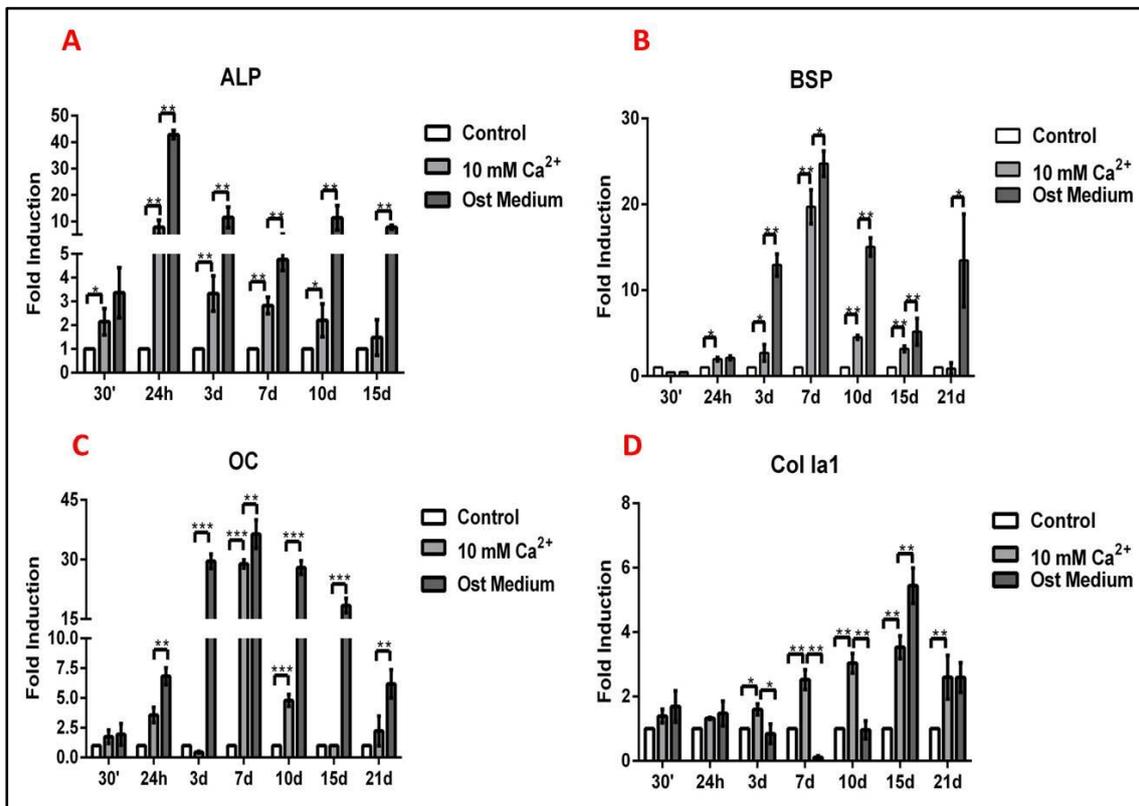


Fig. 43 Papel del calcio extracelular en la expresión de los siguientes marcadores osteogénicos: (A) Fosfatasa alcalina (ALP), (B) Sialoproteína ósea (BSP), (C) Osteocalcina (OC), (D) Colágeno I (Col Ia1). * = p<0,05. ** = p<0,01. *** = 0,001.

En general, a partir de los gráficos de barras mostrados se puede apreciar que el tratamiento con 10 mM Ca^{2+} induce la sobreexpresión de todos los genes en comparación con el nivel de expresión de las MSCs control. Aunque, el control positivo (medio osteogénico) generó la mayor expresión genética de cada uno de los marcadores evaluados en casi todos los casos, es relevante resaltar el efecto del tratamiento de 10 mM Ca^{2+} en la expresión del Col Ia1 y la ALP. En particular el Ca^{2+} produjo la mayor expresión de Col Ia1 a los 3, 7 y 10 días de tratamiento. En el caso de la ALP, se observó una expresión máxima de dicho gen a las 24h, siendo el índice de expresión de las células estimuladas con calcio $7,7 \pm 2,7$ veces mayor al del tratamiento control y manteniéndose dicha sobreexpresión por encima de las 2,5 veces hasta el día 10 de tratamiento. Por otra parte la máxima expresión de BSP y OC se observó a los 7 días de tratamiento, siendo la expresión de BSP en las células estimuladas con Ca^{2+} $45,2 \pm 2,3$ veces la expresión del control a los 7 días. Mientras que las MSCs tratadas con calcio expresaron $28,9 \pm 1,0$ veces más OC que el control. Como se mencionó previamente, la expresión del Col Ia1 en las células estimuladas con Ca^{2+} mostraron el máximo índice de expresión comparado con el resto de condiciones en el período de 3-10 días, siendo la máxima expresión durante ese período. A los 7 días de tratamiento las MSCs estimuladas con calcio alcanzaron un índice de expresión de $3 \pm 0,3$ veces la expresión del control. Manteniéndose dicho índice estable con tendencia ligeramente creciente desde los 7 días hasta los 21 días.

En base a los resultados mostrados, se seleccionaron los dos genes que mostraron una mayor expresión en las células tratadas con Ca^{2+} (ALP y Col Ia1) con la finalidad de revelar el papel del CaSR como modulador del efecto pro-osteogénico del catión a una concentración de 10 mM. Se utilizó el anticuerpo antiCaSR para bloquear el mencionado receptor y se analizó la expresión del Col Ia1 y la ALP en células estimuladas con 10 mM de Ca^{2+} . En la Fig. 44 se muestra un gráfico de barras que representa los índices de expresión de las MSCs cultivadas 3 días bajo las diferentes condiciones, 1) medio de cultivo control, 2) 10 mM Ca^{2+} , 3) Medio osteogénico (control positivo) y 4) AntiCaSR + Ca^{2+} (MSC cultivadas con 10 mM Ca^{2+} y el bloqueo del CaSR). Este experimento reveló que el bloqueo del CaSR inhibe por completo la

sobreexpresión de ALP y Col Ia1 inducida por la estimulación con calcio extracelular, hasta el punto de que las MSCs bloqueadas mostraron índices de expresión estadísticamente iguales al tratamiento control.

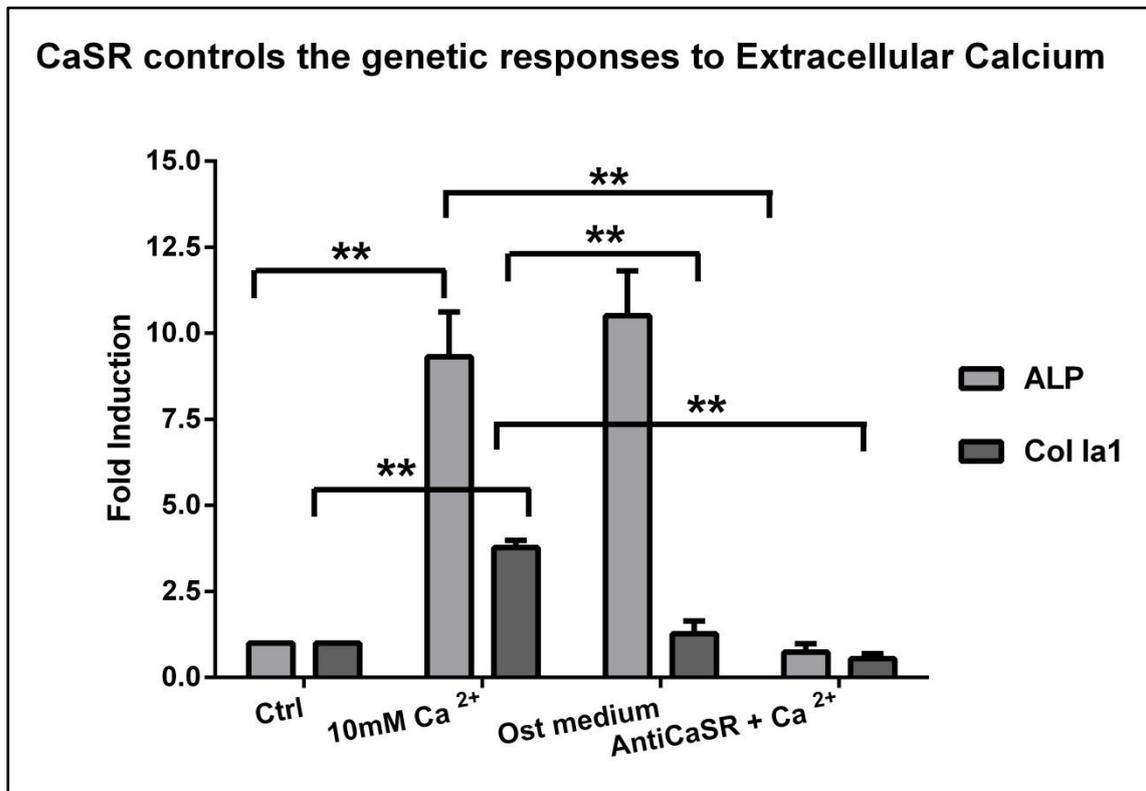


Fig. 44 Papel del CaSR en la expresión genética del ALP y el Col Ia1 inducida por el tratamiento con 10 mM Ca²⁺. ** = p<0,01.

5.3.5. *El calcio extracelular induce la expresión proteica y funcional de marcadores osteogénicos*

Debido a que la sobreexpresión genética no siempre conduce a una mayor expresión de la proteína funcional se procedió a evaluar el efecto del calcio en la expresión de marcadores óseos a nivel proteico y funcional. En la presente sección se muestra una serie de resultados que revelan el efecto del tratamiento con calcio extracelular en la expresión proteica y en el incremento de la actividad de algunos marcadores de la diferenciación de las MSCs hacia el linaje óseo. En la Fig. 45 se muestran imágenes de inmunofluorescencia donde se puede observar claramente que las MSCs cultivadas con 10 mM Ca²⁺ son ALP⁺, OC⁺ y OPN⁺.

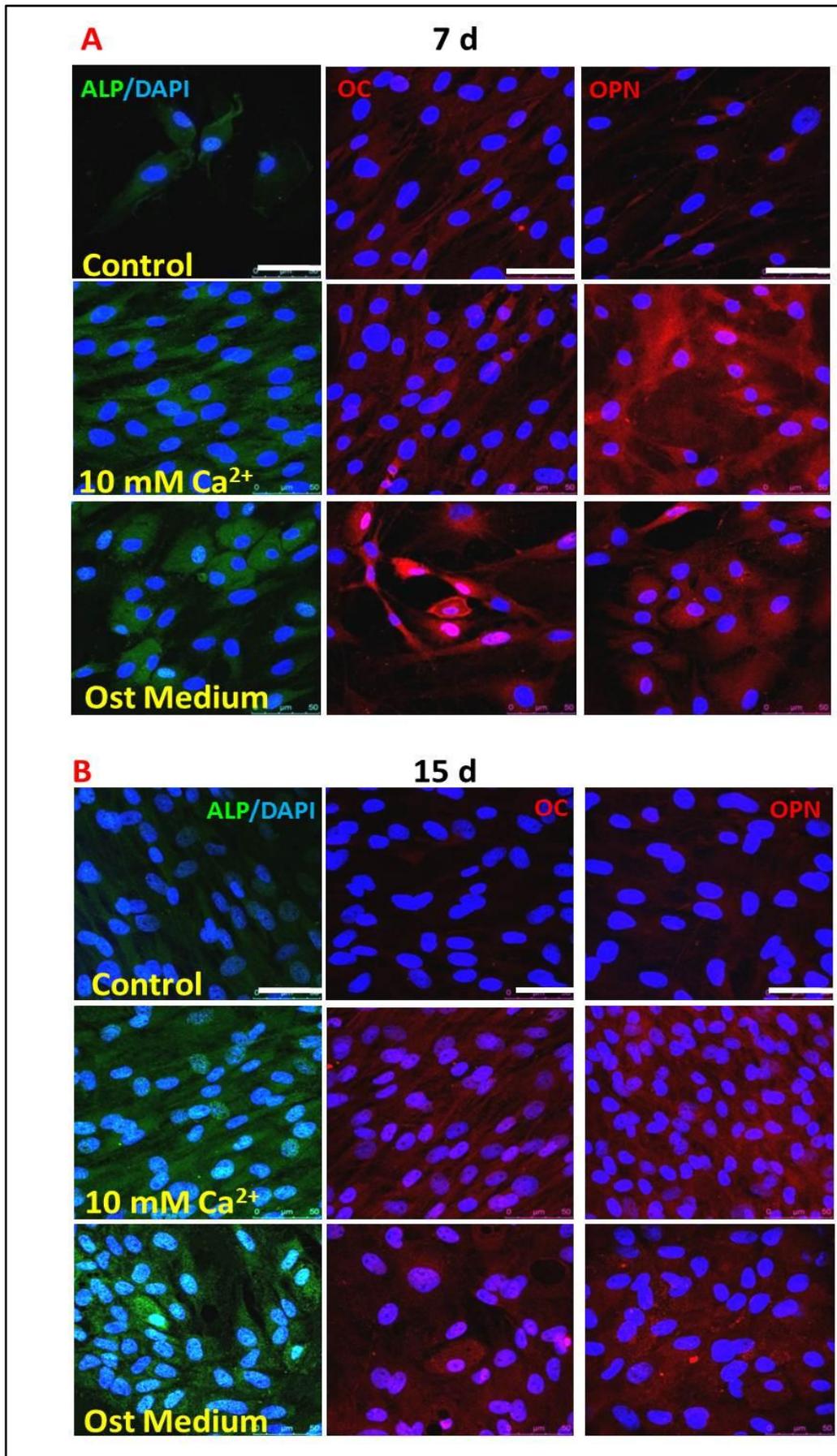


Fig. 45 Expresión a nivel proteico de la Fosfatasa Alcalina (ALP), Osteocalcina (OC), Osteopontina (OPN) en células madre mesenquimales cultivadas con medio control, 10 mM Ca²⁺ o medio osteogénico durante 7 días (A) o 15 días (B). Todas las imágenes fueron capturadas bajo las mismas condiciones de aumento e intensidad de los láseres. Las barras de escala representan 50 μm.

Particularmente, a partir de la Fig. 45 se confirma que el calcio extracelular es un agente osteoinductor en las MSCs. Debido a que las células estimuladas con el calcio extracelular presentaron un intenso marcaje para ALP, OC y OPN, que fue semejante al de las MSCs cultivadas con medio osteogénico (control positivo), mientras que las células control tanto a los 7 días como a los 15 días de cultivo presentaron un marcaje débil en comparación con los otros dos tratamientos.

Con la finalidad de analizar en profundidad la capacidad del calcio extracelular como agente osteoinductor, fue evaluado el efecto del catión sobre la actividad de la fosfatasa alcalina. En este sentido, las MSCs fueron cultivadas con medio control, 10 mM Ca^{2+} , medio osteogénico (control positivo) y el tratamiento conjunto de 10 mM Ca^{2+} + Medio Osteogénico, siendo medida la actividad de la fosfatasa alcalina a los 3, 7, 10 y 15 días de tratamiento. En la Fig. 46 se muestra el gráfico de barras que representa la actividad de la fosfatasa alcalina en cada uno de los tratamientos evaluados. Particularmente, se puede observar que a los 3 días con 10 mM de Ca^{2+} la actividad de la ALP alcanzó los $7,58 \times 10^{-6} \pm 2,01 \times 10^{-6}$ ng/min.cél siendo estadísticamente igual a la actividad en el control positivo (medio osteogénico) y significativamente mayor que en el control ($3,82 \times 10^{-6} \pm 1,45 \times 10^{-6}$ ng/min.cél).

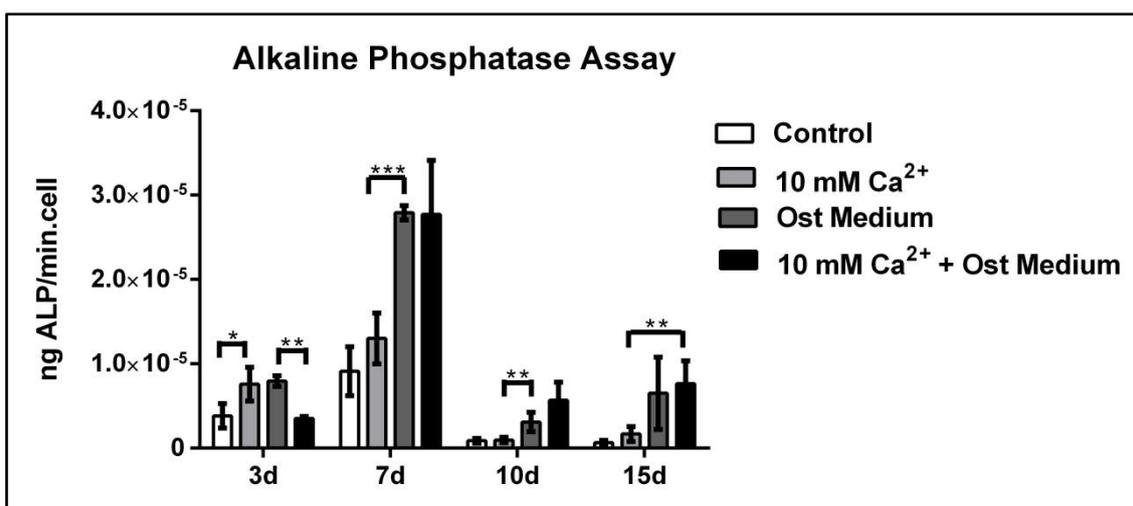


Fig. 46 Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en MSCs cultivadas en medio Control, 10 mM Ca^{2+} , Medio osteogénico y 10 mM Ca^{2+} + Medio Osteogénico. * = $p < 0,05$. ** = $p < 0,01$. *** = $p < 0,001$.

Otro aspecto importante a resaltar es que el gráfico muestra un pico máximo en la actividad de la ALP a los 7 días de cultivo en todos los tratamientos aplicados, siendo la actividad máxima la de las células cultivadas con medio osteogénico y 10 mM Ca^{2+} + medio osteogénico.

Teniendo en cuenta que la ALP es un modulador temprano de osteogénesis que está implicada en la mineralización de la matriz extracelular, se realizaron ensayos para evaluar los efectos del $[\text{Ca}^{2+}]_0$ en la mineralización de la matriz extracelular. En la Fig. 47 muestra una serie de imágenes correspondientes a la tinción con el rojo de alizarina, aplicada sobre MSCs cultivadas con medio Control, 10 mM Ca^{2+} , Medio Osteogénico y Medio osteogénico + 10 mM Ca^{2+} durante 7 (Fig. 47A), 10, 15 y 21 días (Fig. 47B). Particularmente, se puede observar que a partir de los 7 días en cultivo las células cultivadas con 10 mM Ca^{2+} presentan regiones marcadas de color rojo intenso que no fueron observadas en las células cultivadas con medio osteogénico (control positivo) ni en las células control. Mientras que el tratamiento conjunto con 10 mM Ca^{2+} + medio osteogénico presentó zonas más amplias de marcaje rojo intenso. Asimismo al observar las fotografías correspondientes a las células cultivadas durante 10, 15 y 21 días se puede notar un claro aumento en la mineralización en las células cultivadas con 10 mM Ca^{2+} respecto a las que fueron cultivadas con el medio control. Mientras que las células estimuladas con medio osteogénico (control positivo) a partir de los 10 días exhibieron una mayor mineralización respecto a las células cultivadas con 10 mM de calcio. Los resultados fueron evidentes, demostrando un efecto sinérgico del tratamiento conjunto de 10 mM Ca^{2+} + Medio Osteogénico. Estos resultados cualitativos fueron corroborados al realizar la cuantificación de la coloración del rojo de alizarina. En el gráfico de barras mostrado en la Fig. 47C se puede observar que el calcio extracelular induce una mayor mineralización de la matriz extracelular, respecto a las células control en todos los períodos de tiempo evaluados y mayor que el control positivo a los 7 días de tratamiento. Asimismo, se demuestra que el tratamiento conjunto de calcio extracelular y medio osteogénico ejerce el mayor efecto en la mineralización de la matriz extracelular en todos los períodos de tiempo.

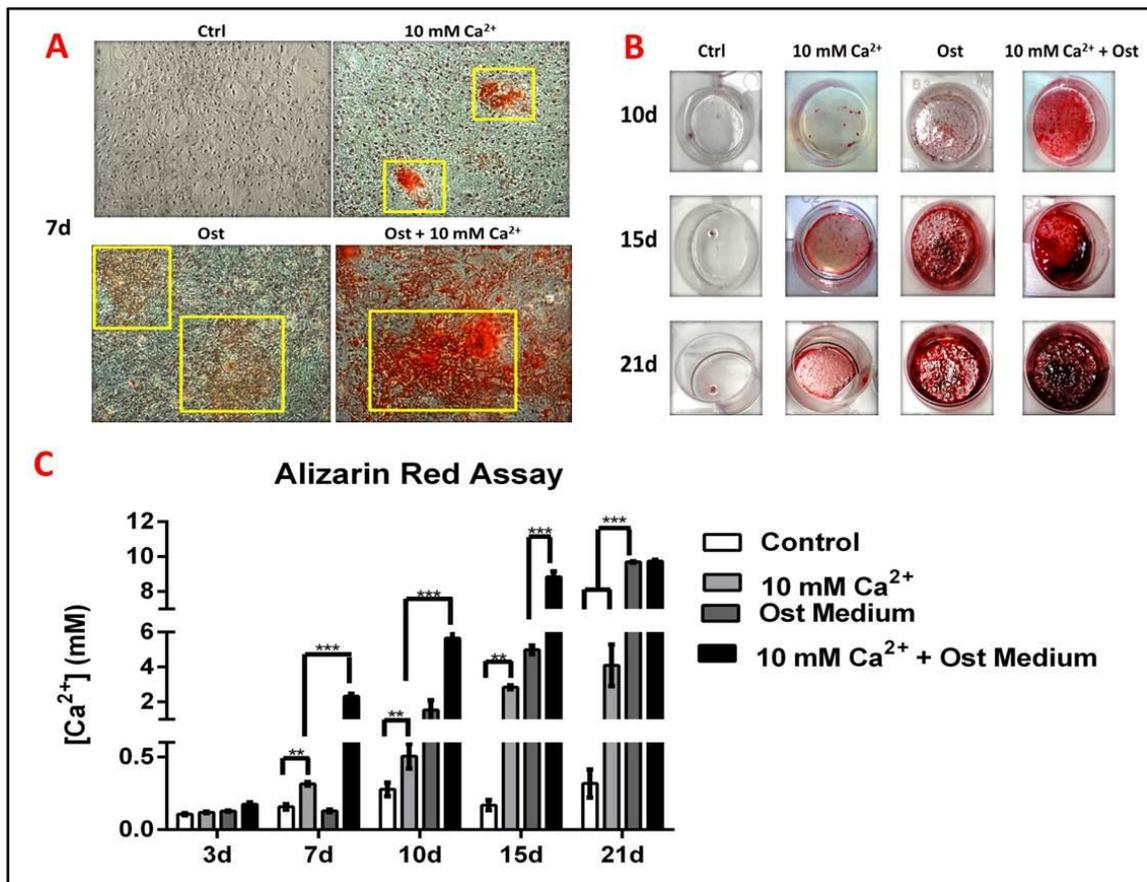


Fig. 47 Ensayo de mineralización. La tinción con rojo de alizarina reacciona con el calcio en forma de hidroxipatita o con los fosfatos de calcio, dando origen a un color rojo intenso. (A) se muestran imágenes de MSC cultivadas durante 7 días con medio control, 10 mM Ca²⁺, medio osteogénico (ost) y medio osteogénico + 10 mM Ca²⁺ (Ost + 10 mM Ca²⁺). Las imágenes fueron capturadas usando el Objetivo de 10X. (B) se muestran fotos macroscópicas correspondientes a la tinción con rojo de alizarina en cada uno de los tratamientos aplicados durante 10, 15 y 21 días. (C) Gráfico de barras que representa la concentración de Ca²⁺ en forma de fosfatos de calcio en la matriz extracelular en cada uno de los tratamientos. ** =p<0,01. *** =p<0,001.

Debido a que los resultados previos con el tratamiento del calcio extracelular podrían ser consecuencia de una mayor disponibilidad de dicho ión en el medio de cultivo y no a una mayor estimulación de la diferenciación, se realizó un ensayo en el cual se cultivaron células con 10 mM Ca²⁺ y se bloqueó el receptor con el anticuerpo. De esta manera, en la Fig. 48 se muestran los resultados del bloqueo del CaSR sobre la mineralización de la matriz extracelular. Particularmente, las imágenes de la Fig. 48A revelan una reducción notable de la intensidad y extensión del marcaje del rojo de alizarina en las células cultivadas con 10 mM Ca²⁺ a las que les fue bloqueado el CaSR (AntiCaSR + 10 mM Ca²⁺) respecto a las células no bloqueadas (10 mM Ca²⁺), siendo la intensidad de la tinción similar a la del control. Asimismo, en la Fig. 48B

se muestra el gráfico de barras de la cuantificación del calcio depositado en la matriz extracelular, siendo la cantidad de calcio encontrada en las MSCs bloqueadas estadísticamente igual a la encontrada en el tratamiento control a los 10 días. A los 15 días la cantidad de calcio se redujo un 50% en comparación con las células estimuladas con Ca^{2+} . Estos resultados confirman que el bloqueo del CaSR inhibe o reduce significativamente el efecto del tratamiento con 10 mM Ca^{2+} .

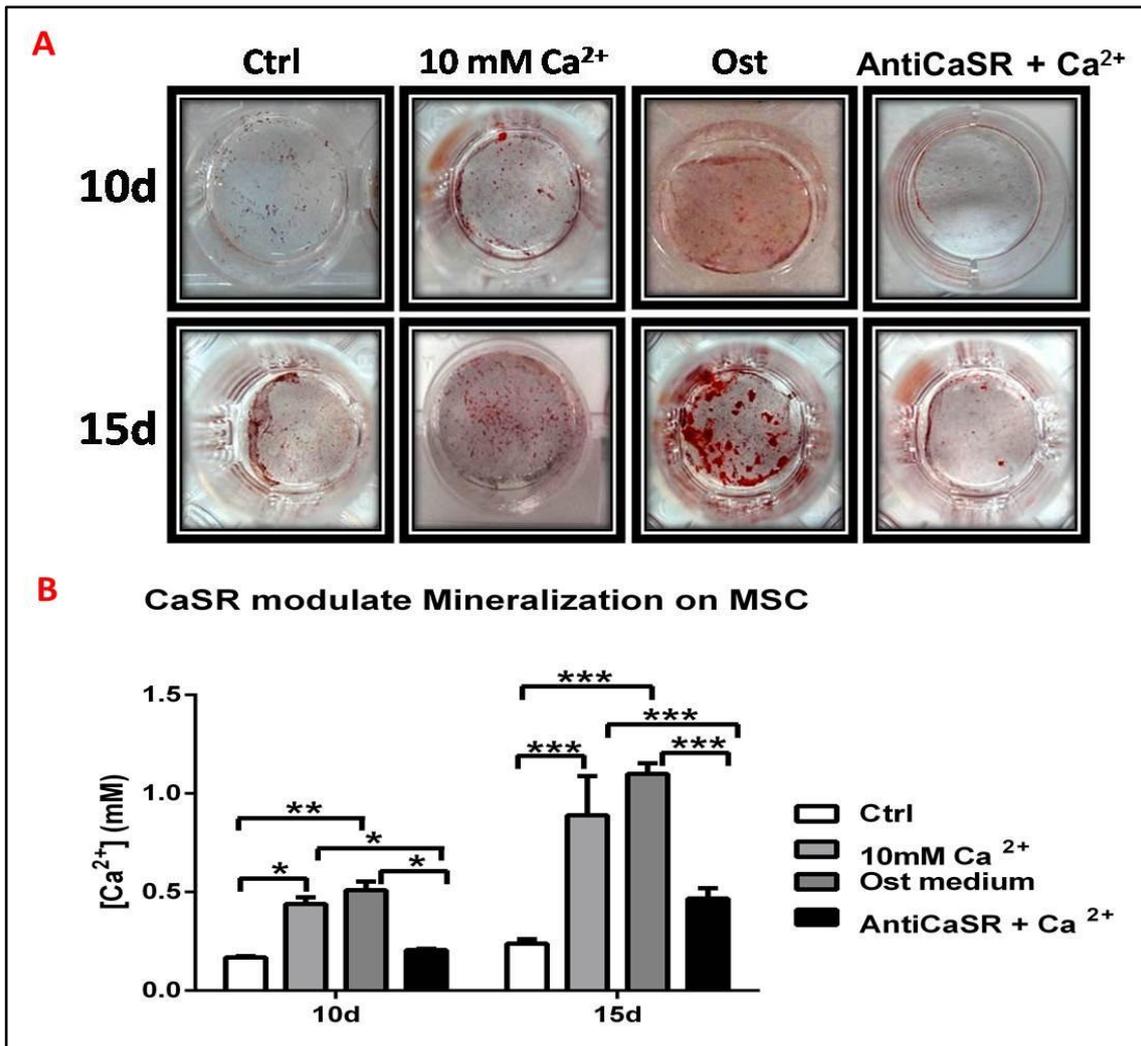


Fig. 48 El CaSR es el principal modulador del efecto del calcio extracelular en la mineralización. (A) Imágenes que muestran los resultados de la tinción con rojo de alizarina en MSCs cultivadas durante 10 y 15 días con medio control, 10 mM Ca^{2+} , medio osetogénico (Ost medium) y bloqueo del CaSR + 10 mM Ca^{2+} . Se observa una marcada reducción de la mineralización de la matriz extracelular en las muestras AntiCaSR + 10 mM Ca^{2+} . (B) gráfico de barras que representa la cantidad de calcio en la matriz extracelular de cada una de las muestras. Es de destacar que como consecuencia del bloqueo del CaSR la cantidad de calcio fue estadísticamente igual al control a los 10 días. Mientras que a los 15 días la cantidad de calcio fue la mitad de lo obtenido a partir de las MSCs cultivadas solo con 10 mM Ca^{2+} . * = $p < 0,05$. ** = $p < 0,01$. *** = $p < 0,001$.

5.4. *Discusión*

A partir de los resultados descritos en este capítulo se desprenden tres grandes conclusiones:

1) Las MSCs de médula ósea de rata expresan claramente el CaSR en condiciones basales y al ser estimuladas con Ca^{2+} . 2) el tratamiento con 10 mM Ca^{2+} sobre las MSCs ejerce un efecto mitótico, quimiotáctico e induce la diferenciación hacia el linaje osteoblástico. 3) Todos los efectos del calcio extracelular sobre las MSCs están modulados por la activación del CaSR.

En cuanto al primer punto, los resultados confirmaron la presencia del CaSR en las MSCs a nivel genético y proteico, lo cual también fue reportado recientemente por otros autores (Barradas *et al.*, 2012). Particularmente, el ensayo de expresión genética del CaSR reveló que 30 min de tratamiento con 10 mM de Ca^{2+} aumenta la expresión del receptor $2,97 \pm 0,52$ veces respecto a la expresión en las células control. Lo cual indica la rapidez del efecto del calcio sobre la expresión de dicho receptor en las MSCs.

Por otra parte, en los ensayos del WST-1 (Fig. 41) fue observado un aumento significativo de la proliferación en las MSCs cultivadas con 10 mM Ca^{2+} respecto a las células control. En contraste, el tratamiento con EGTA reveló que la ausencia de calcio extracelular disponible reduce la proliferación de las MSCs. Estos resultados concuerdan con un estudio realizado en MSCs de médula ósea de rata, donde se demostró que el calcio extracelular induce la mitosis a través de la activación del CaSR, que a su vez activa la fosforilación de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK $\frac{1}{2}$) (Xu *et al.*, 2012). Por tanto, es factible que el CaSR esté directamente vinculado al efecto mitótico observado en los resultados del presente capítulo. Este resultado en particular difiere de lo observado en el capítulo anterior, donde se demostró que el incremento de la concentración de calcio no ejerce un efecto mitótico sobre las EPCs. En consecuencia, los resultados sugieren que las EPCs y las MSCs son sensibles a las variaciones de calcio extracelular, sin embargo las respuestas celulares son diferentes en cada tipo celular.

Desde el punto de vista de la ingeniería de tejidos óseos la inducción de la quimiotaxis de células madre, así como la estimulación de la diferenciación de estas células hacia el linaje óseo son dos de los procesos de mayor importancia. Particularmente, en el ensayo de migración mostrado en la Fig. 42 se observa que existe un efecto quimiotáctico dependiente de la concentración de calcio, donde el mayor efecto quimiotáctico fue ejercido por el tratamiento con 10 mM de Ca^{2+} . Aunado a esto, el efecto quimiotáctico causado por un agonista del CaSR (10 mM Mg^{2+}), así como la inhibición del efecto quimiotáctico del calcio al bloquear dicho receptor, reveló el papel clave que juega el CaSR en esta respuesta celular. Estos resultados revelan un nuevo papel del CaSR y el Ca^{2+}_0 sobre las MSCs y también podrían explicar el efecto quimiotáctico ejercido por el vidrio bioactivo sobre células CD34^+ , Stro-1^+ y CaSR^+ (Tommila *et al.*, 2009). Sin embargo, en la ingeniería de tejidos, además de promover la movilización de las células hacia la zona de interés, es necesario que se induzca la formación de nuevo tejido (en este caso óseo). Por tanto, los resultados obtenidos en los diferentes ensayos de diferenciación realizados para comprobar la capacidad del calcio extracelular como agente inductor de diferenciación cobran una especial relevancia.

En particular, a nivel genético se encontró que el Ca^{2+} , en comparación con las células control, induce la sobreexpresión de los diferentes marcadores osteogénicos evaluados Fig. 43. Entre estos resultados fue especialmente relevante el hecho de que las MSCs tratadas con Ca^{2+} durante 3-10 días, mostraron el mayor índice de expresión de Col Ia1. Dado que el colágeno tipo I es una proteína mayoritaria en el tejido óseo que juega un papel importante en la nucleación de los cristales de hidroxapatita en la matriz ósea mineralizada. La sobreexpresión temprana y sostenida de este gen al estimular las MSCs con Ca^{2+} sugiere que el catión es capaz de activar la osteogénesis en las MSCs. Asimismo, la inhibición de la sobreexpresión del ALP y el Col Ia1 al bloquear el CaSR en las células tratadas con Ca^{2+} (Fig. 44), reveló un nuevo papel del CaSR como modulador de la osteogénesis en MSCs. La capacidad del calcio extracelular como promotor de la expresión de marcadores óseos, así como la del CaSR en la modulación de dicha respuesta en las MSCs, no había sido claramente demostrada hasta el presente estudio. Sin

embargo, algunos autores han publicado resultados en los cuales se señala que altas concentraciones de calcio extracelular (2,8-3,8 mM) en el medio induce a la maduración de células osteoblásticas MC3T3-E1 a través de la activación del CaSR, observándose la sobreexpresión de ciertos marcadores óseos, tales como, OPN, OC y Col Ia1 (Yamauchi *et al.*, 2005). En contraste, otros autores recientemente publicaron que el incremento de la expresión de ciertos marcadores osteogénicos, tales como BMP-2, en MSCs humanas cultivadas con altas concentraciones de calcio extracelular no eran moduladas por el CaSR, debido a que no pudieron demostrar la activación de dicho receptor bajo las condiciones experimentales escogidas (Barradas *et al.*, 2012). En este sentido, los resultados relacionados con el bloqueo del CaSR cobran mayor relevancia, dado que demuestran que la inactivación de dicha vía de señalización inhibe por completo el efecto del Ca^{2+} .

En este mismo sentido, los ensayos de inmunofluorescencia, actividad de ALP y la tinción con rojo de alizarina demostraron que el calcio extracelular no solo induce una mayor expresión génica, sino que el tratamiento continuo con Ca^{2+}_0 también incrementa la expresión de los marcadores óseos a nivel proteico y funcional (Fig. 45-47). Particularmente, los resultados aquí presentados mostraron una mayor expresión de proteínas relacionadas con la formación de matriz extracelular ósea (ALP, OPN y OC), así como una mayor mineralización en los tratamientos con presencia de 10 mM Ca^{2+} . En este último punto, es conveniente recordar que el calcio extracelular es uno de los componentes esenciales en la mineralización de la matriz extracelular ósea, en consecuencia cabe la posibilidad de que la mayor disponibilidad de dicho ión incremente la mineralización de la matriz, sin que esto esté relacionado con la activación específica de vías de señalización. Para demostrar que los resultados en mineralización se deben a un exceso de depósitos de Ca^{2+} en la matriz se bloqueó el receptor. Los resultados apoyaron la hipótesis de que existe una vía de señalización en las MSCs que es inhibida cuando se bloquea el receptor (Fig. 48). Estos resultados aunados a los anteriores demuestran que un novedoso papel del Ca^{2+} /CaSR en la osteoinducción que no había sido descrita previamente en MSCs. Sin embargo, en otros tipos celulares comprometidos con el linaje óseo tales como los osteoblastos,

se han reportado fenómenos similares. Específicamente, ha sido demostrado que el tratamiento de osteoblastos con 10 mM de calcio extracelular durante 7 días aumenta la mineralización de la matriz extracelular, así como la expresión genética de osteocalcina (Maeno *et al.*, 2005). De forma tal, que a la luz de los resultados presentados en este capítulo, sumados a los hallazgos de otros autores que encontraron efectos similares al medir la mineralización en osteoblastos cultivados con calcio y NPS89636 (agonista del CaSR) es posible que el CaSR también esté íntimamente involucrado en la modulación de la mineralización observada en osteoblastos (Dvorak *et al.*, 2004).

Basándonos en todos los argumentos anteriores, se puede afirmar que Ca^{2+} /CaSR juega un papel clave en la movilización, proliferación y diferenciación de MSCs hacia el linaje óseo. Estas evidencias proponen un nuevo blanco terapéutico que puede ser explotado para incrementar la eficiencia de las técnicas de ingeniería de tejidos óseos. En la Fig. 49 se muestra un esquema que permite explicar la relación directa que tienen los resultados mostrados en el presente proyecto de investigación con la ingeniería de tejidos. Específicamente, proponemos que los materiales compuestos de fosfatos de calcio, tales como, el vidrio bioactivo llamado G5 al degradarse, liberan al medio extracelular iones calcio, fosfatos, entre otros (Navarro, Ginebra e Planell, 2003; Navarro *et al.*, 2003). Estos iones calcio aumentan la concentración local de dicho catión, creando un gradiente capaz de activar el CaSR^+ . Una vez activado el CaSR, comienzan a producirse señales intracelulares relacionadas con la ruta de señalización de las proteínas G, lo cual genera la fosforilación de la fosfolipasa C (PLC), la tirosina quinasa y/o la adenilato ciclasa, siendo todas estas señales las que desencadenan el aumento de la actividad de la ERK $\frac{1}{2}$ (Kifor *et al.*, 2001; Ward, 2004; Dvorak-Ewell *et al.*, 2011; Tharmalingam *et al.*, 2011). Una vez ERK $\frac{1}{2}$ ha sido activada, en células del linaje osteoblastico puede conllevar al aumento de la transcripción del factor de transcripción específico de osteoblastos (cbfa1) (Xiao *et al.*, 2002). Esta serie de eventos, induce a la movilización de las MSCs hacia la zona afectada en donde ha sido implantado el andamio, se adhieren y comienza el proceso de diferenciación hacia el linaje osteoblastico. En consecuencia, crear biomateriales con una liberación de calcio

extracelular controlada y continua podría ser una estrategia que aumente la eficiencia de los materiales usados en la ingeniería de tejidos óseos.

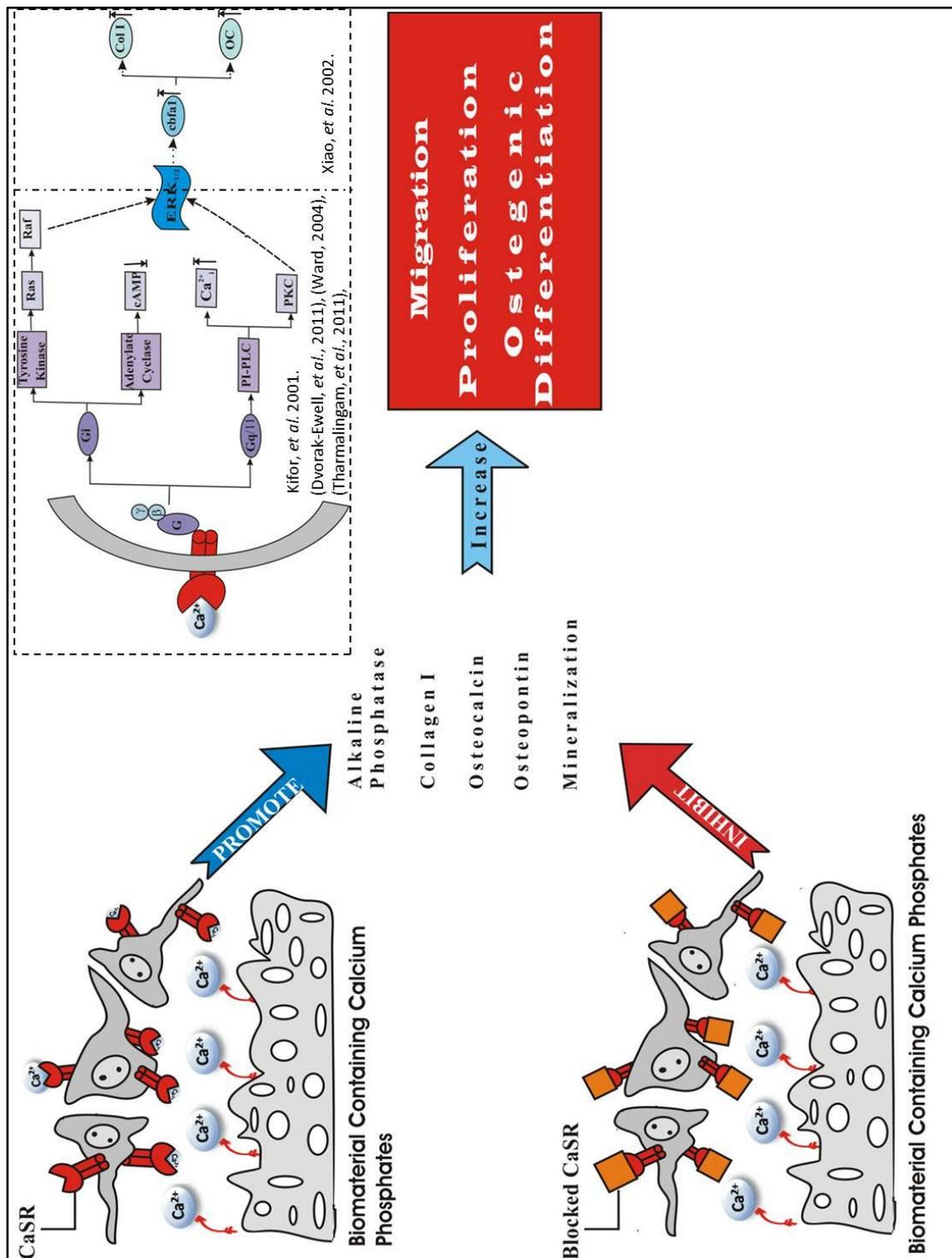


Fig. 49 Diagrama resumen de las implicaciones de los efectos del calcio extracelular en la ingeniería de tejidos, basado en los resultados mostrados en el presente trabajo de investigación, aunados a conocimientos previos reportados en la literatura.

5.5. Conclusiones

Las evidencias aquí presentadas demuestran claramente el papel del calcio extracelular en la promoción de quimiotaxis, proliferación y diferenciación osteogénica en células madre mesenquimales por medio de la activación del CaSR. Lo cual desvela el potencial uso terapéutico del calcio extracelular y del CaSR con la finalidad de incrementar la eficiencia de las estrategias utilizadas en ingeniería de tejidos. Asimismo, desde el punto de vista biológico, los resultados mostrados en este capítulo podrían explicar un mecanismo a través del cual se sincroniza el proceso de resorción y la formación de nuevo hueso durante la remodelación ósea. Mientras que desde el punto de vista de la ingeniería de tejidos óseos, han sido presentados argumentos que explican el posible mecanismo involucrado en la osteoinducción producida por biomateriales biodegradables compuestos por fosfatos de calcio.

***Capítulo VI: Papel del PLA/G5
y el calcio extracelular en la
regeneración y formación de
hueso in vivo***

6. Papel del PLA/G5 y el calcio extracelular en la regeneración y formación de hueso *in vivo*

6.1. Introducción

En los capítulos anteriores fueron presentados diferentes grupos de resultados que demuestran la capacidad que tiene el calcio extracelular de inducir respuestas angiogénicas y osteogénicas en EPCs y MSCs respectivamente. Asimismo, en el primer capítulo se describieron algunas de las características de los materiales biodegradables conocidos como vidrios bioactivos, así como las ventajas que poseen respecto a otros materiales basados en fosfatos de calcio, tales como las cerámicas y los cementos, entre otros. Basados en estos argumentos, se decidió utilizar el PLA/G5 como ejemplo de biomaterial biodegradable liberador de calcio al medio extracelular y con potencial aplicación terapéutica para promover la regeneración ósea *in vivo* (Aguirre *et al.*, 2012). En particular, fueron escogidos dos modelos *in vivo* que permitieron evaluar por una parte el poder del PLA/G5 como sustituto óseo *in vivo* al ser implantado en defectos óseos de cóndilo femoral, mientras que el modelo del embrión de pollo *ex ovo* permitió evaluar y comparar los efectos de los productos de la degradación del PLA/G5 y una concentración conocida de calcio extracelular sobre la formación de hueso y vasos sanguíneos.

6.1.1. Vidrios bioactivos en la Ingeniería de Tejidos Ósea

Un material es bioactivo cuando al ser implantado en el huésped es capaz de desencadenar una serie de reacciones químicas que promueven la formación de una capa semejante a la hidroxiapatita que le permite al material unirse firmemente al tejido óseo sin observarse tejido fibroso alrededor (Kokubo e Takadama, 2006). El primero en desarrollar un vidrio

biodegradable y bioactivo, capaz de mimetizar la composición de la matriz extracelular ósea y de integrarse de manera exitosa en el huésped fue el profesor Larry Hench en el año 1969 (Jones, 2013). El material creado por el profesor Hench es un vidrio biodegradable del sistema $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$, cuya composición es 46,1 mol% SiO_2 , 24,4 mol% Na_2O y 26,9 mol% CaO y que fue patentado con el nombre de “*Bioglass*®”. La bioactividad de este material se basa en la formación de una capa de carbonato de calcio, semejante a la hidroxiapatita que posee la capacidad de unirse firmemente al hueso del huésped (Rahaman *et al.*, 2011). A partir del *Bioglass*® inicial, son múltiples las modificaciones que han sido realizadas con la finalidad de adaptar dicho material a diferentes aplicaciones específicas, siendo este el vidrio bioactivo más ampliamente evaluado a nivel clínico y experimental (Rahaman *et al.*, 2011; Jones, 2013).

Un segundo tipo de vidrios bioactivos son los que han sustituido el SiO_2 del *Bioglass*® por B_2O_3 , creando vidrios con la siguiente estructura química: $2\text{Na}_2\text{O}-2\text{CaO}-5\text{B}_2\text{O}_3$ (Zhao *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2010). Este tipo de materiales tiene la ventaja de poseer una mayor velocidad de degradación y de formar más rápido la capa de hidroxiapatita que el *Bioglass*® (Rahaman *et al.*, 2011). Sin embargo, el mayor problema de este tipo de materiales es la toxicidad asociada a la liberación de iones boro durante la degradación del material, la cual ha sido observada durante algunas pruebas *in vitro* y en ensayos *in vivo* en ratones (Rahaman *et al.*, 2011).

El tercer tipo de vidrio bioactivo está basado en fosfatos de calcio, donde el P_2O_5 forma una red con el CaO y el Na_2O . Este tipo de biomateriales tienen un alto potencial en su aplicación en ingeniería de tejidos óseos, debido a que sus componentes mimetizan completamente la composición de la matriz extracelular ósea, además su velocidad de degradación puede ser controlada al modificar su composición (Navarro, Ginebra and Planell, 2003; Ahmed *et al.*, 2004a; b; Rahaman *et al.*, 2011).

6.1.2. Vidrios bioactivos como sustitutos óseos *in vivo*

Hoy en día son muchas las evidencias que apoyan los efectos beneficiosos de la implantación del vidrio bioactivo conocido como *Bioglass*[®] en la sustitución de piezas óseas. Un ejemplo fue la rápida regeneración del tejido óseo observada tras 6 semanas de la implantación de partículas de *Bioglass*[®] 100-300 μm en defectos femorales de 6 mm de conejo (ver Fig. 50) (Oonishi *et al.*, 1999).

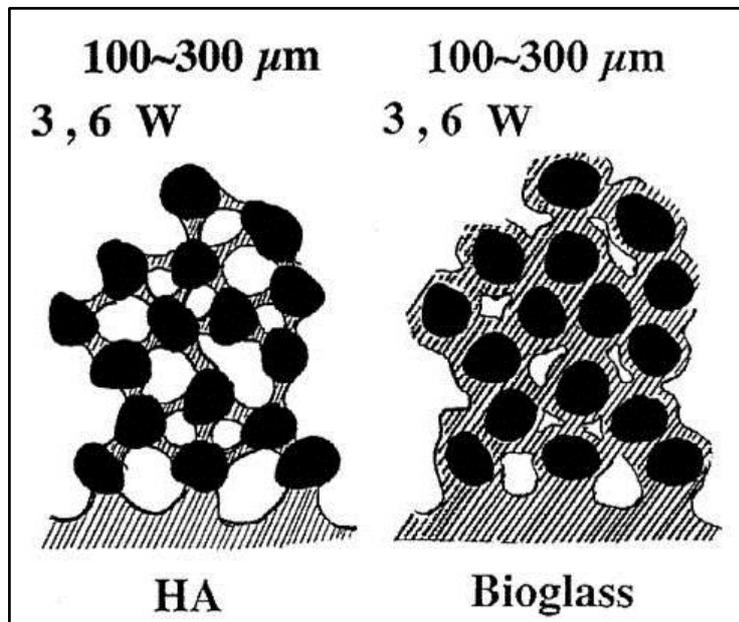


Fig. 50 Respuesta tisular a la implantación de hidroxapatita (izquierda) y el *Bioglass*[®] (derecha) con el mismo tamaño de partículas (100-300 μm). Figura modificada a partir de (Oonishi *et al.*, 1999).

Otro estudio utilizando partículas de *Bioglass*[®] de un rango de tamaños entre 300-355 μm demostró que el hueso del huésped es capaz de crecer entre las partículas con las que entra en contacto, pero también se encontró que al cabo de 2 meses de implantación el nuevo hueso se había formado entre las partículas aisladas. De esta manera, se probó que el *Bioglass*[®] no solo es capaz de inducir la osteointegración con el hueso del huésped, sino que además promueve la formación de hueso a través de la osteoinducción (Schepers e Ducheyne, 1997). Por otro lado, un estudio comparativo realizado en defectos femorales de conejo demostró que las partículas

de *Bioglass*[®] de 100-300 μm inducen un mayor y más rápido crecimiento del hueso que la vitrocerámica conocida como “A/W-glass-ceramic” y que las partículas de hidroxiapatita sintética de 100-300 μm (Oonishi *et al.*, 2000). Pese a todos los estudios experimentales que comprueban los efectos positivos de la implantación del *Bioglass*[®] como sustituto óseo, los resultados a nivel clínico no han sido tan exitosos como se esperaba (Jones, 2013). Algunas de las razones por las cuales este material no ha alcanzado el éxito esperado a nivel clínico es que en la práctica se requiere un material que sea fácilmente moldeable y adaptable al tamaño del defecto del paciente, y el *Bioglass*[®] no puede ser moldeado durante la cirugía. En consecuencia, se realizaron estudios clínicos con partículas de diferentes tamaños de un material basado en la composición del *Bioglass*[®], este nuevo material es conocido como S53P4. Al implantar el S53P4 en pequeños defectos óseos maxilares fueron encontradas mejoras en la aplicabilidad y en la formación de hueso, observándose una mayor y más rápida regeneración del hueso en los pacientes tratados con el S53P4 respecto a los que fueron tratados con hueso autólogo (ver Fig. 51) (Turunen *et al.*, 2004). Sin embargo, en los estudios clínicos realizados tanto con *Bioglass*[®] como con el S53P4, se ha reportado que tras 11 años de la implantación aún se encuentran partículas del biomaterial en el huésped, lo cual indica que la velocidad de degradación es muy lenta (Jones, 2013). En este sentido, una de las desventajas que tienen tanto el *Bioglass*[®] como el S53P4 es que no pueden ser producidos como vidrios bioactivos amorfos, debido a que cristalizan durante la síntesis, motivo por el cual tienen una menor velocidad de degradación a la requerida (Chen, Thompson e Boccaccini, 2006).

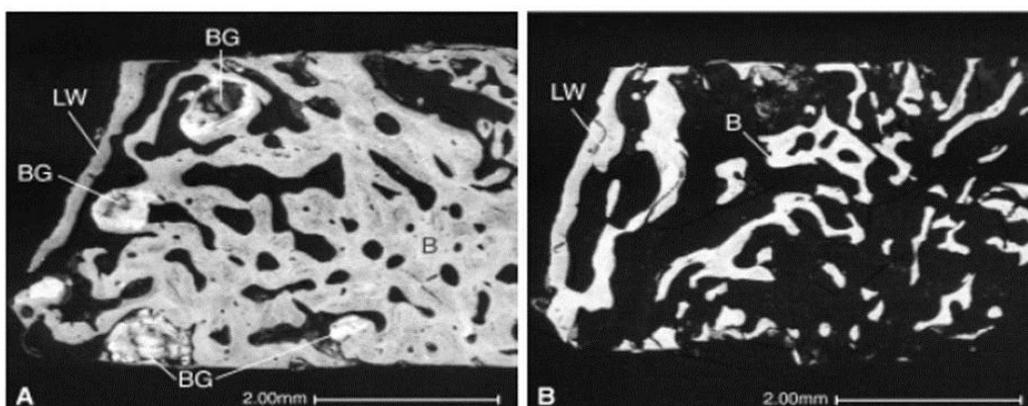


Fig. 51 Imágenes representativas de fotografías electrónicas del maxilar de pacientes tratados con partículas de S53P4 (A), y un paciente tratado con hueso autólogo (B), ambas fotografías fueron tomadas tras 62 semanas de la implantación. Imagen extraída de (Turunen *et al.*, 2004) . B: hueso. BG: vidrio bioactivo. LW: pared lateral del maxilar.

Un tercer tipo de vidrio bioactivo es el vidrio conocido como G5, el cual es un vidrio biodegradable del sistema 44,5 % P_2O_5 - 44,5 % CaO - 6% Na_2O - 5% TiO_2 cuyo nombre se debe a que posee un 5 % de óxido de titanio (Navarro *et al.*, 2003). El G5 posee una rápida tasa de degradación y por tanto una alta capacidad de liberar iones calcio y fosforo al medio extracelular, pudiendo ser modificada la velocidad de degradación al variar la concentración de titanio en la composición del vidrio (Navarro *et al.*, 2003). Diversas pruebas han sido realizadas para evaluar el potencial del G5 como sustituto óseo, la mayoría de estas pruebas han sido realizadas *in vitro*. Un ejemplo de ello, son los resultados publicados por nuestro grupo de investigación recientemente, donde se demostró que los andamios de PLA/G5 inducen señales pro-angiogénicas sobre EPCs mediante la activación del CaSR (Aguirre *et al.*, 2012). Particularmente, dichos resultados mostraron que tanto la interacción directa de las EPCs con el andamio de PLA/G5, como la interacción indirecta mediante la liberación de iones calcio al medio extracelular inducen quimiotáxis, sobreexpresión de VEGF, IGF-1, CD31, HIF (factor inducible por hipoxia), MMP2 (metaloproteinas tipo 2), VEGFR-2, entre otros genes involucrados en las rutas de señalización pro-angiogénicas, siendo además inhibidas todas estas señales al ser bloqueado el CaSR (ver Fig. 52).

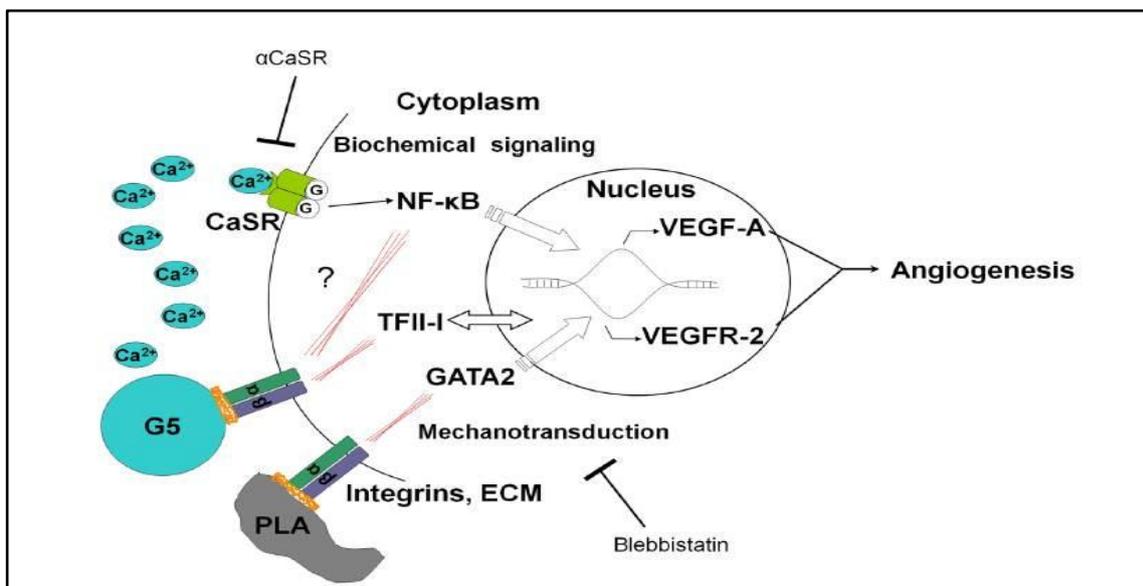


Fig. 52 Efectos proangiogénicos directos e indirectos del PLA/G5 sobre EPCs. Figura extraída de (Aguirre *et al.*, 2012).

En cuanto al efecto del G5 en la regeneración del hueso, fue realizado un estudio comparativo entre diferentes materiales basados en fosfatos de calcio, entre los que se

encontraban dos composiciones del vidrio bioactivo G0 (cuya composición es P_2O_5 -CaO- Na_2O) y el G5, ambos implantados en forma de partículas en un rango de 150-300 μm dentro de defectos femorales de conejo (Sanzana *et al.*, 2008). Los resultados del mencionado artículo sugieren que tanto el G5 como el G0 promueven la regeneración ósea en defectos femorales de conejo tras 12 semanas de implantación, sin observarse diferencias significativas entre el G0 y el G5. Basados en dichos hallazgos previos, y a la poca información respecto a la capacidad del G5 como inductor de la regeneración del tejido óseo y a los efectos angiogénicos *in vivo*, en el presente proyecto de investigación se decidió utilizar los andamios de PLA/G5 como modelo de un biomaterial poroso, capaz de liberar iones calcio al medio extracelular para el análisis *in vivo* de la regeneración del tejido óseo vascularizado (Navarro *et al.*, 2003; Aguirre *et al.*, 2012).

6.1.3. Embrión de pollo como modelo para evaluar angiogénesis

Uno de los mayores problemas en la evaluación de las señales angiogénicas es encontrar técnicas sencillas, reproducibles y cuantitativas que permitan llegar a conclusiones certeras acerca de los tratamientos aplicados (Auerbach, Auerbach e Polakowski, 1991). En este sentido, la membrana corioalantoidea (CAM) del embrión de pollo ha sido utilizada desde los años 50 como modelo para la evaluación de respuestas pro y anti angiogénicas *in vivo*, debido al rápido desarrollo de los vasos sanguíneos en el embrión de pollo, la fácil visualización de los mismos dentro (*in ovo*) y fuera del huevo (*ex ovo*), y a que se pueden aplicar con facilidad diferentes condiciones experimentales (Auerbach *et al.*, 1974). Pese a estos argumentos, este modelo posee la limitación de que los resultados obtenidos siguen siendo poco cuantitativos y por ello su interpretación complicada.

Sin embargo, son muchos los estudios que han utilizado la CAM como modelo experimental para la evaluación de factores con un potencial efecto sobre la angiogénesis (Ribatti *et al.*, 1996; Deryugina e Quigley, 2008). Un ejemplo de ello es la evaluación del efecto de factores pro-angiogénicos tales como el VEGF y el FGFb administrados por medio de matrices de fibrina sobre la CAM, encontrándose una mayor densidad de vasos sanguíneos alrededor de la región en la cual se colocaron las matrices cargadas con las sustancias angiogénicas (Vargas *et al.*, 2007). Otros autores publicaron un procedimiento para evaluar el efecto de factores pro o antiangiogénicos usando como vehículo matrices de gelatina en las cuales se diluye la sustancia que se desea probar. Una vez preparada la gelatina se coloca sobre la CAM de embriones de 8 días de desarrollo permitiendo la interacción de la gelatina con la CAM hasta el día 12 desarrollo, día en el cual se cuentan los vasos sanguíneos y las ramificaciones que se encuentren alrededor de la sustancia de prueba (Fig. 53) (Ribatti *et al.*, 2006). Por medio de éste procedimiento, los autores evaluaron el efecto proangiogénico ocasionado por la implantación de células tumorales sobre la CAM. Asimismo, la CAM es uno de los modelos de investigación más utilizados en la evaluación de metástasis tumoral y migración celular (Cimpean, Ribatti e Raica, 2008; Lokman *et al.*, 2012).

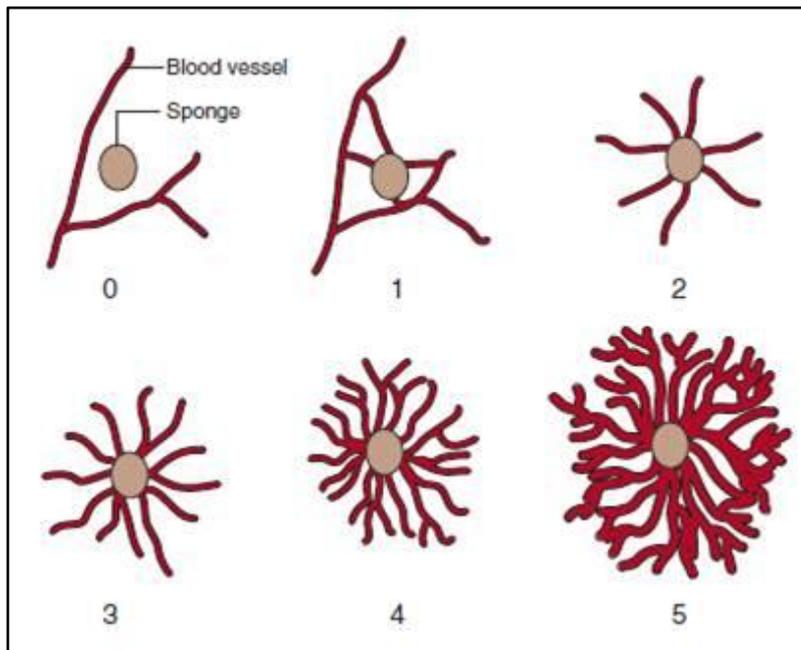


Fig. 53 Diagrama ilustrativo del procedimiento desarrollado por (Ribatti *et al.*, 2006) para la evaluación de factores angiogénicos. Las imágenes muestran una escala representativa para realizar la medición semicuantitativa de la formación de vasos sanguíneos alrededor del implante. Figura extraída de (Ribatti *et al.*, 2006).

6.1.4. *Desarrollo embrionario del pollo*

El pollo (*Gallus gallus*), al ser un ave, lleva a cabo su desarrollo embrionario dentro del huevo, protegido por una cáscara rígida permeable al gas y que está compuesta principalmente de carbonato de calcio. Dentro del huevo el embrión se encuentra recubierto por 3 membranas embrionarias: el amnios, el corion y la membrana corioalantoidea (CAM). Durante su desarrollo el embrión tiene acceso a todo lo necesario para cubrir sus necesidades. El vitelo provee los nutrientes, el amnios se encarga de proteger al embrión de la deshidratación, el alantoides es el reservorio del material de desecho y la CAM lleva a cabo el intercambio de gases del embrión con el exterior (Fig. 54) (Hamburger e Hamilton, 1992).

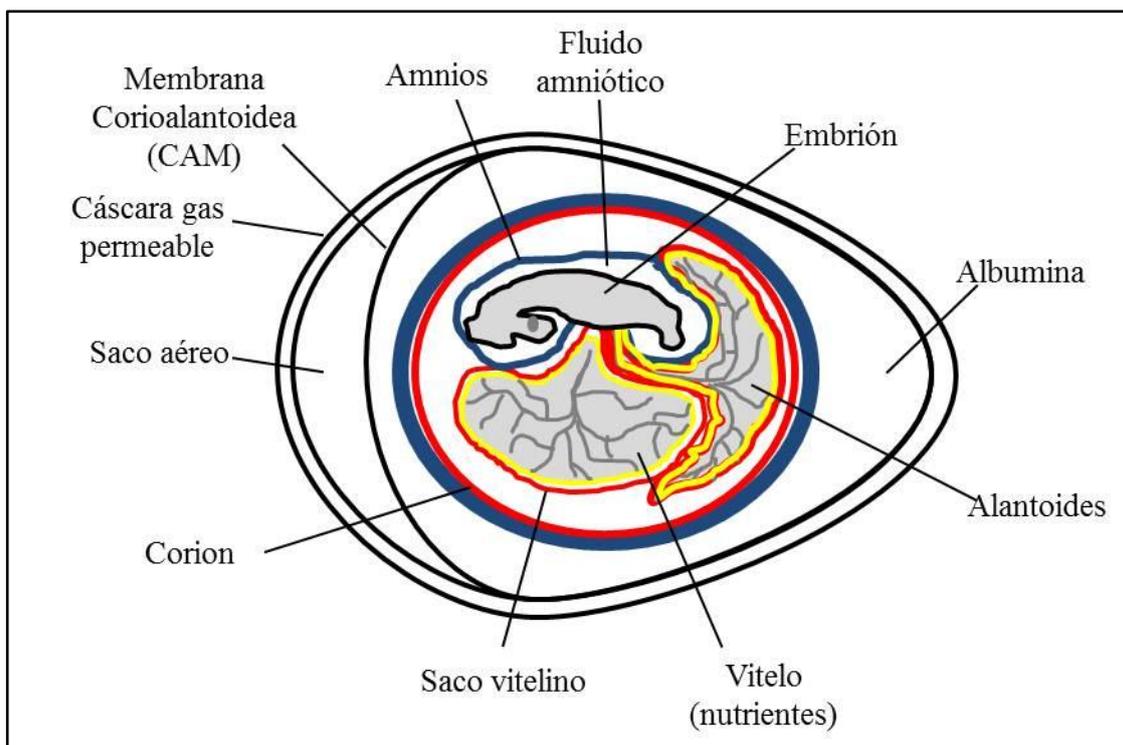


Fig. 54 Diagrama representativo del desarrollo de un embrión de pollo en el huevo, donde se muestra la posición del embrión, así como la de las diferentes membranas en las que se encuentra envuelto el embrión.

El desarrollo embrionario del pollo es un proceso relativamente rápido, ya que en 21 días de incubación a 37 °C y a una humedad relativa de 80-90% los embriones de pollo eclosionan del huevo. El primer paso en el desarrollo del embrión de pollo es la formación del sistema cardiovascular, pudiéndose observar a las 50 horas de desarrollo un sistema cardiovascular

cerrado, compuesto por una sencilla red de vasos sanguíneos y un órgano pulsátil tubular que dará lugar al corazón en las siguientes etapas del desarrollo (Fig. 55) (Hamburger e Hamilton, 1992).

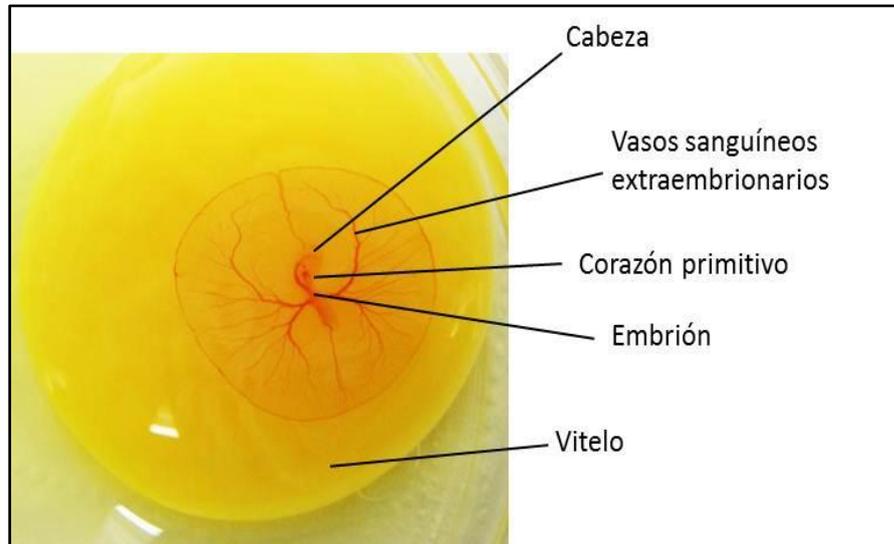


Fig. 55 Embrión de pollo de 3 días de desarrollo. Se observa el desarrollo de los vasos sanguíneos extraembrionarios, el órgano pulsátil (corazón primitivo), y el embrión en el estadio 17 (52-64 horas) según el manual de (Hamburger e Hamilton, 1992).

Hasta los días 11-12 de desarrollo los vasos sanguíneos extraembrionarios de la CAM se encuentran bajo un constante proceso de generación, anastomosis y maduración. Por ello, entre los días 8-10, el plexo vascular de la CAM es altamente sensible a los efectos de factores que estimulen o repriman la angiogénesis (Deryugina e Quigley, 2008).

Desde el punto de vista del sistema esquelético, el embrión de pollo desarrolla su sistema esquelético como un sistema cartilaginoso que mediante un proceso de osificación intramembranosa pasa a ser un sistema de soporte osificado (Thompson, Owens e Wilson, 1989). Según algunos autores el proceso de osificación de las extremidades del embrión en el huevo comienza alrededor de los 9 días de desarrollo (estadio 35), etapa en la cual comienzan los cambios morfológicos característicos de la formación del tejido óseo (Pechak, Kujawa e Caplan, 1986a). Sin embargo, es alrededor de los 18 días de desarrollo (estadio 44) cuando el tejido óseo está completamente formado, observándose incluso centros de resorción activos en las extremidades del embrión (Pechak, Kujawa e Caplan, 1986b).

6.1.5. Uso del modelo de embrión de pollo para la evaluación de biomateriales *in vivo*

Durante los últimos años diversos investigadores del campo de la ingeniería de tejidos han utilizado la CAM como modelo para la evaluación de la biocompatibilidad y la formación de vasos sanguíneos inducidos por biomateriales *in vivo*. Este hecho se debe en parte a los argumentos mencionados en la sección anterior respecto a las ventajas de la CAM como modelo para evaluar la formación de vasos sanguíneos *in vivo*, así como la importancia que tiene en la ingeniería de tejidos la inducción de la angiogénesis.

Un ejemplo del uso de la CAM en la ingeniería de tejidos son los resultados publicados en el año 2001, donde los autores evaluaron los efectos en angiogénesis e inflamación provocados por la implantación de dos polímeros de polivinilo PVC06 y PVC36, así como un polímero de poliuretano (*Tecoflex*®), una membrana de colágeno/elastina (*Bioplex Medical BV, NL*) y papel de filtro (*Whatman* N°1) sobre la membrana corioalantoidea de embriones de pollo (Zwadlo-Klarwasser *et al.*, 2001). En el estudio mencionado, los autores encontraron que los 3 polímeros evaluados poseen un claro efecto antiangiogénico, mientras que el papel de filtro y las membranas de colágeno/elastina inducen el aumento de la cantidad de vasos sanguíneos alrededor de la región donde fueron implantados. Sin embargo, dichos autores lograron determinar que la angiogénesis observada en el caso del papel de filtro está ocasionada por la inducción de una respuesta inflamatoria en la CAM (Zwadlo-Klarwasser *et al.*, 2001).

Otros investigadores, utilizaron la CAM del embrión de pollo para evaluar el efecto de la liberación de VEGF a partir de andamios de policaprolactona recubiertos con colágeno (Singh, Wu e Dunn, 2012). Particularmente, los autores demostraron que los andamios de policaprolactona recubiertos con colágeno por sí solos son incapaces de inducir angiogénesis *in vivo*, sin embargo, aquellos andamios que liberan VEGF promueven la formación de vasos sanguíneos alrededor del implante.

Recientemente fue publicado un artículo en el cual se utilizó el sistema de cultivo de embrión de pollo *ex ovo* (fuera del huevo), con la finalidad de evaluar la biocompatibilidad, el poder angiogénico y el efecto sobre la formación del hueso ejercida por los andamios de Bioglass[®]. Los hallazgos publicados en dicho artículo les permitieron a los investigadores demostrar la biocompatibilidad del material, debido a que no causó efectos nocivos en el desarrollo de los embriones (Fig. 56). Asimismo observaron que los andamios de Bioglass[®] indujeron una mayor formación de hueso en los embriones expuestos a dichos andamios, sin embargo no se observaron efectos significativos sobre la formación de vasos sanguíneos (Vargas *et al.*, 2009).

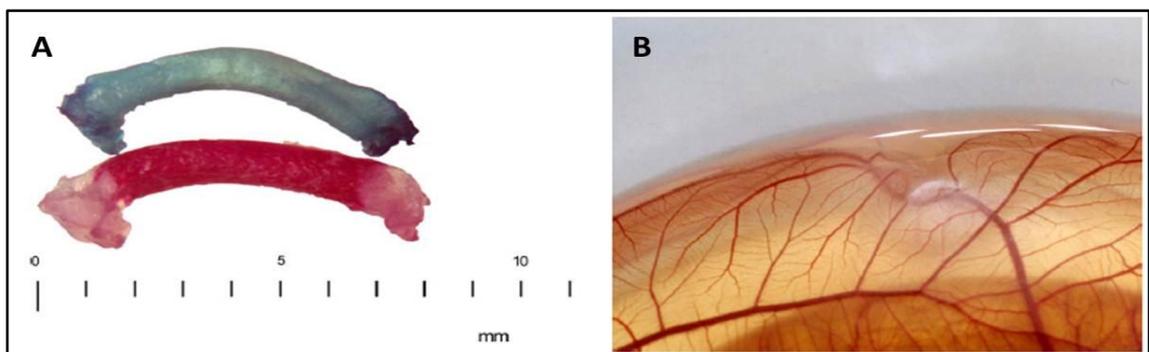


Fig. 56 Efecto de la implantación del Bioglass[®] en la formación de hueso y la angiogénesis *ex ovo*. A la izquierda (A) se observan dos huesos de la extremidad inferior de embriones de pollo. El hueso teñido de azul (cartílago) corresponde al control donde no se colocó implante, mientras que el hueso teñido de rojo (tejido óseo) corresponde a un embrión de pollo que se ha desarrollado con Bioglass[®]. A la derecha (B) se muestra que el andamio de Bioglass[®] no ejerce efectos sobre la formación de vasos sanguíneos, sugiriendo que es biocompatible e inerte desde el punto de vista de la formación de vasos sanguíneos. Imágenes extraídas de (Vargas *et al.*, 2009).

Basados en todos los argumentos descritos previamente, se decidió utilizar el embrión de pollo como modelo para la evaluación y comparación de los efectos que promueve el calcio extracelular, así como un biomaterial liberador de calcio (G5) en la formación de hueso y vasos sanguíneos *in vivo*.

6.2. Objetivos

- *Evaluar el efecto de la implantación de andamios de PLA y PLA/G5 (50 %) durante 3 y 15 días en defectos de cóndilo femoral de rata en la inducción de señales pro-angiogénicas y pro-osteogénicas in vivo.*
- *Evaluar el papel del PLA y el PLA/G5 (50%) en la regeneración del tejido óseo en defectos de cóndilo femoral de rata, tras 3, 15, 30 y 60 días de implantación.*
- *Comparar el efecto angiogénico del PLA/G5 y el calcio extracelular in vivo.*
- *Evaluar el efecto indirecto del PLA/G5 y el calcio extracelular sobre la inducción de la formación del tejido óseo en el embrión de pollo.*

6.3. Resultados

En el presente documento ha sido presentada una serie de resultados que demuestran la importancia del papel que juegan el CaSR y el calcio extracelular en la inducción de señales pro-angiogénicas y pro-osteogénicas en las EPCs y las MSCs respectivamente. Sin embargo, se desconoce si estas señales pueden ser observadas *in vivo* y si un material biodegradable compuesto de fosfatos de calcio, tal como el G5, puede ser capaz de ejercer señales similares a las observadas con el calcio extracelular *in vitro*. En este sentido, a continuación se muestran los resultados obtenidos tras la implantación de andamios porosos de PLA y PLA/G5 en defectos de cóndilo femoral de rata.

6.3.1. Extracción y verificación de la integridad del ARN

El ARN se aisló siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo II. Una vez obtenido, se realizó la cuantificación y la verificación de la integridad del ARN, con la finalidad de comprobar la cantidad, calidad y funcionalidad del mismo. En la Fig. 57 se encuentra una serie de imágenes correspondientes a la verificación de la integridad del ARN. Particularmente, se observa en la Fig. 57A que el ARN aislado a partir de las 6 condiciones experimentales conservó su integridad. Por otra parte, la cuantificación del ARN demostró que se obtuvo mayor cantidad de material genético a partir de las muestras provenientes de los tratamientos de 15 días (Fig. 57B). Por último, con la finalidad de corroborar la integridad y funcionalidad del ARN, se realizó un ensayo de PCR en el cual se midió la expresión del gen constitutivo conocido como P0 (Fig. 57C). En este sentido, los resultados de esta serie de pruebas demuestran que el ARN aislado es apto para realizar una evaluación detallada de la expresión genética.

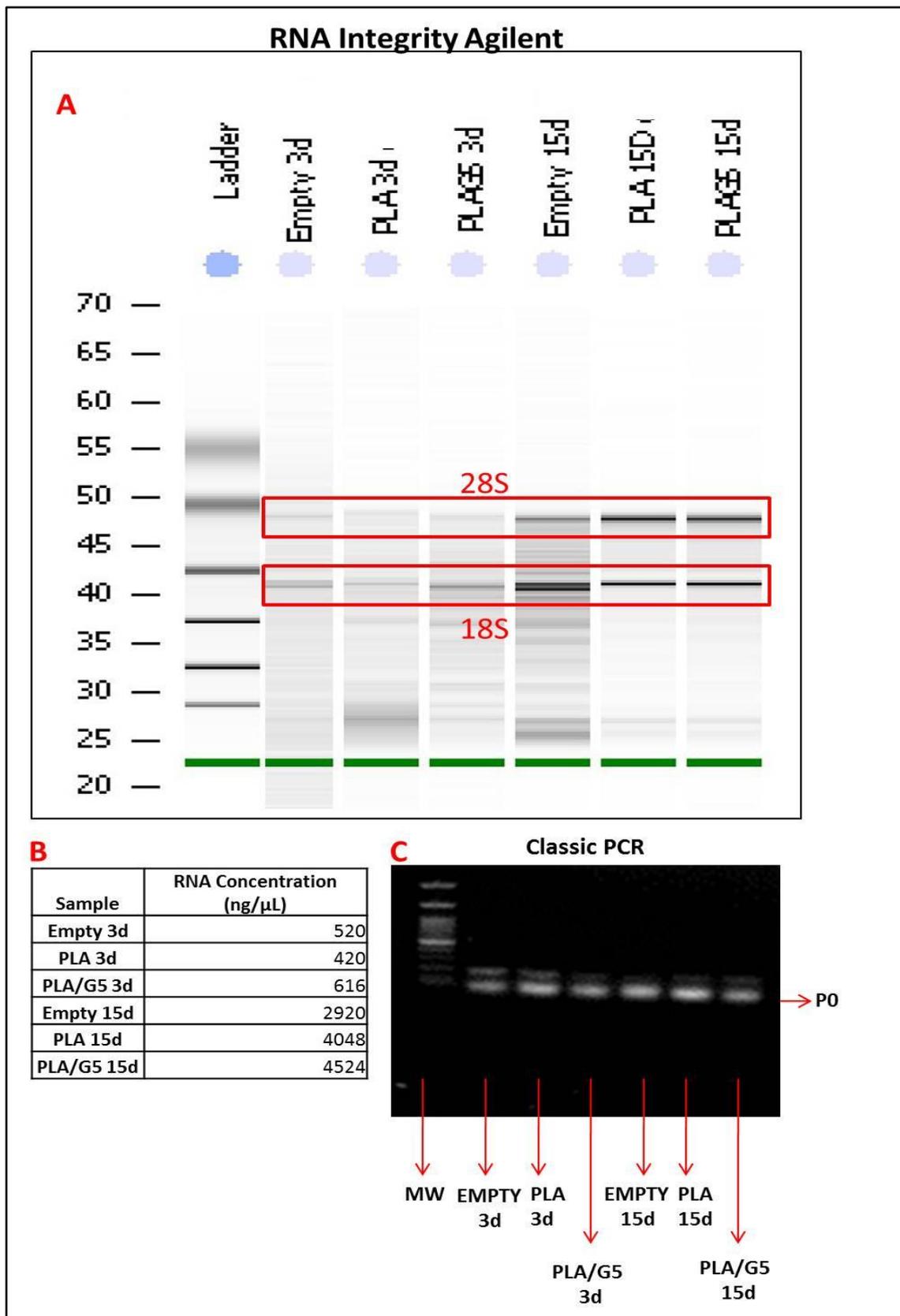


Fig. 57 Integridad del ARN. En la parte superior se encuentra la imagen correspondiente a la electroforesis del ARN, donde se puede observar que la mayor proporción del ARN, correspondiente a las 6 condiciones, se encuentra en buen estado (A). El cuadro mostrado en la esquina inferior izquierda se encuentra la tabla correspondiente a la concentración de ARN de cada una de las 6 condiciones experimentales (B). Por último en la esquina inferior derecha se observa el resultado de una PCR clásica donde se midió la expresión de un gen constitutivo (P0) que se realizó para verificar la funcionalidad del ARN (C).

6.3.2. Análisis genético de múltiples marcadores osteogénicos in vivo

Una vez realizada la comprobación de la integridad del ARN extraído, se procedió a realizar el análisis de la expresión de un amplio rango de genes involucrados en la formación del hueso. Este análisis fue realizado mediante el uso del kit de “*Osteogenesis PCR Array*” y siguiendo los procedimientos descritos en el capítulo II. En este sentido, en la Fig. 58 se observan los perfiles de expresión de las extremidades a las cuales les fue implantado el andamio de PLA/G5 relativo al perfil de expresión en las extremidades donde fue implantado el PLA. En este punto es importante resaltar que las muestras provenientes de los defectos femorales donde no se implantaron andamios, no pudieron ser evaluadas mediante esta técnica, debido a que la expresión de los genes evaluados estuvo por debajo del límite de detección tanto a los 3 días como a los 15 días. En consecuencia, fue imposible comparar los niveles de expresión de las muestras sin implante respecto a las muestras donde fue implantado el PLA y el PLA/G5.

Particularmente, en la Fig. 58 se observa que el 100 % de los genes evaluados a los 3 días post-implantación se encuentran fuertemente sobreexpresados en las muestras correspondientes a la implantación del PLA/G5 en relación con la expresión en los defectos femorales donde se implantó el PLA. Mientras que a los 15 días post-implantación, los perfiles de expresión cambian, observándose un 24 % de genes sobre-expresados y un 3 % de genes reprimidos en los defectos femorales tratados con PLA/G5, mientras que no se observaron diferencias significativas en la expresión del resto de genes evaluados. Dentro del 24 % de genes sobre-expresados se encuentran el receptor tipo I de la morfoproteína ósea (Bmpr1b), el colágeno I (Col 1a1), el colágeno II (Col 2a1), receptor tipo 1 y tipo 2 del factor de crecimiento fibroblástico (Fgfr1 y Fgfr2), la molécula de adhesión intracelular (Icam), la fibronectina (Fn1), integrina beta 1 (Itgb1), el factor de transcripción específico de osteoblastos (Runx2), el homólogo tipo 2 de la proteína “*MAD*” (Smad2), el homólogo de la proteína “*Twist*” de

Mientras que los genes reprimidos en las muestras de PLA/G5 fueron el colágeno tipo 4 (Col 4a1), el factor de estimulación de colonias de granulocitos (cfs3) y el receptor tipo 2 del factor de crecimiento transformante β (tgbr2). Los cuales son genes involucrados en la inhibición de la angiogénesis, activación y diferenciación de células inflamatorias (macrófagos y granulocitos), y la estimulación de procesos cancerígenos, disminución de la proliferación en células madre mesenquimales, entre otras funciones relacionadas con procesos contrarios a la formación de hueso. En consecuencia, los resultados del análisis del perfil de expresión asociado con la formación de hueso sugieren que el PLA/G5 es capaz de promover la expresión genética de múltiples genes involucrados con la formación de hueso en la zona.

6.3.3. *Análisis genético de múltiples marcadores angiogénicos in vivo*

Con el objetivo de determinar el perfil genético asociado a la expresión de genes angiogénicos, se utilizó el kit comercial de “*Angiogenesis PCR Array*”. En este sentido, en la Fig. 59 se observan los perfiles de expresión donde fue implantado el andamio de PLA/G5 relativo al perfil de expresión en las extremidades donde fue implantado un andamio de PLA. En este punto es importante resaltar que las muestras provenientes de los defectos femorales donde no se implantaron andamios no pudieron ser evaluadas mediante esta técnica, debido a que la expresión de los genes evaluados estuvo por debajo del límite de detección tanto a los 3 días como a los 15 días.

Particularmente, en la Fig. 59 se observa que a los 3 días de implantación el tejido en los defectos femorales tratados con PLA/G5 presentó la sobreexpresión de un 38 % de los genes evaluados, estando todos ellos íntimamente involucrados en la señalización temprana de la formación de nuevos vasos sanguíneos. Mientras que a los 15 días de tratamiento se observó un perfil genético complejo, donde hay un 41% de genes reprimidos y un 27% de genes sobreexpresados. Sin embargo, en este punto es relevante destacar que no todos los genes

reprimidos son genes pro-angiogénicos. En este sentido, se observaron genes reprimidos que están involucrados en procesos tumorales, inflamación e incluso la inhibición de la angiogénesis, tales como el proto-oncogen C-Akt (akt1), la proteína atrayente de monocitos (ccl2), la endostatina (col18a1), la cadena alfa3 del colágeno tipo 4 (col4a3), el interferón alfa y beta (ifna1 e ifnb1), entre otros.

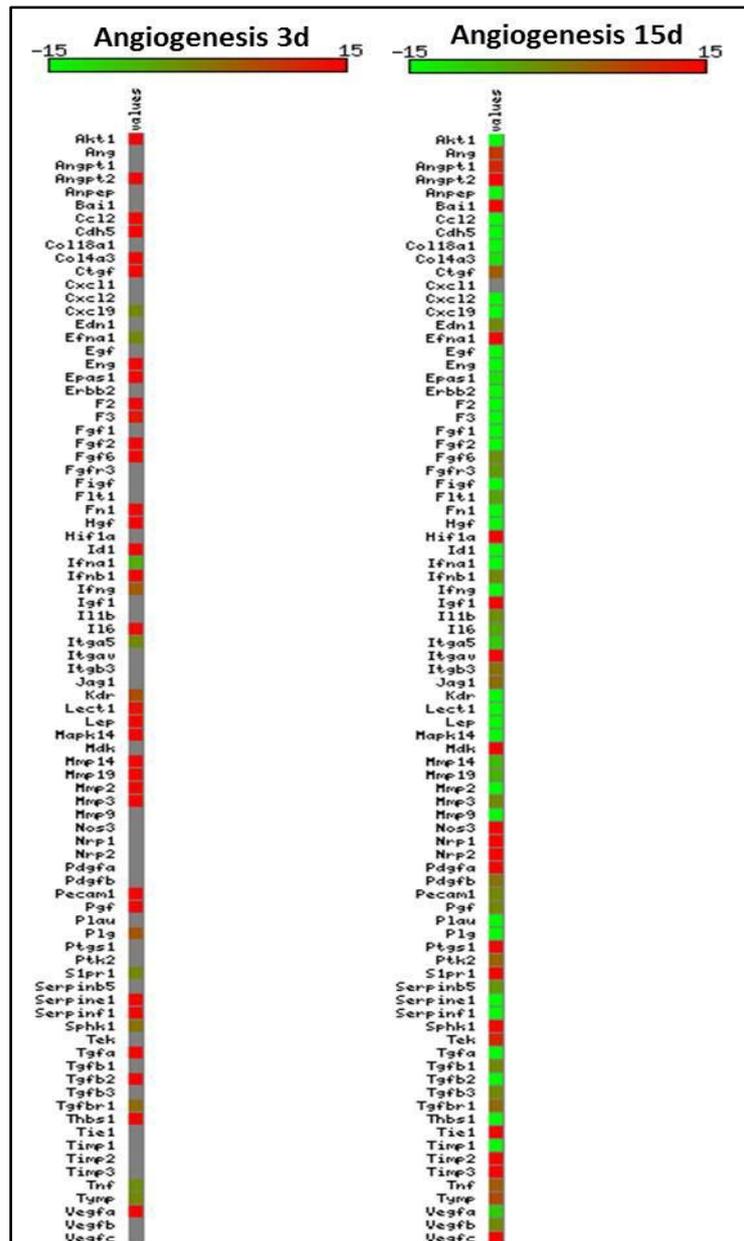


Fig. 59 Análisis genético múltiple de marcadores relacionados con la formación de vasos sanguíneos “Angiogenesis PCR Array”. En la imagen se puede observar el nivel de expresión de los diferentes marcadores relacionados con la formación de vasos sanguíneos en las muestras donde fueron implantados los andamios de PLA/G5 en comparación con las muestras donde fueron implantados los andamios de PLA. Los períodos de tiempo evaluados, fueron 3 y 15 días. Los cuadros en rojo representan genes sobre expresados, mientras que los cuadros marcados en verde representan genes reprimidos en comparación con el control.

Tomando en cuenta todos estos argumentos, al analizar la función de los genes sobre-expresados así como los genes reprimidos a los 15 días de tratamiento, se encontró que la expresión del 40% de los genes en las muestras de PLA/G5 promueve la angiogénesis. Lo cual es un indicativo de que el PLA/G5 estimula la formación de vasos sanguíneos. Sin embargo, es necesario realizar nuevos estudios para confirmar la formación de nuevos vasos sanguíneos en las zonas afectadas.

6.3.4. PCR en tiempo real in vivo

En la Fig. 60 se observan cuatro gráficos de barras que corresponden a la expresión genética en las zonas donde se implantaron andamios de PLA, PLA/G5 o donde no se colocó implante. Particularmente, se determinó que la expresión del VEGF-A a los 15 días post-implantación en los defectos óseos donde fueron implantados los andamios de PLA/G5 presentaron la mayor expresión de todos los tratamientos, siendo 4 veces mayor a la expresión en los tratamientos sin implante (Empty) (Fig. 60A). Del mismo modo, al analizar la expresión de la metaloproteínasa 2 (MMP2) (fig. 60B), se observó la mayor expresión de todos los tratamientos en los defectos óseos donde se implantó el PLA/G5, siendo esta expresión 4 veces mayor a la de las muestras sin implantes. En cuanto a la expresión de la morfoproteína ósea tipo 2 (BMP2), nuevamente la mayor expresión se observó en los tejidos donde fue implantado el PLA/G5 después de 15 días de implantación, siendo éste un indicador importante de la inducción de procesos de osteogénesis y formación de hueso en la zona de interés (Fig. 60C). El cuarto marcador evaluado fue la metaloproteínasa 9 (MMP9), la cual expresó un perfil especialmente interesante, dado a que tanto a los 3 como a los 15 días el tratamiento que indujo la mayor expresión fue el PLA/G5. Sin embargo, es importante resaltar que la expresión a los 15 días tanto en el PLA como en el PLA/G5 fue menor a los niveles de expresión observados a los 3 días. En consecuencia, estos resultados sugieren que la expresión de la MMP9 está disminuyendo (Fig. 60D).

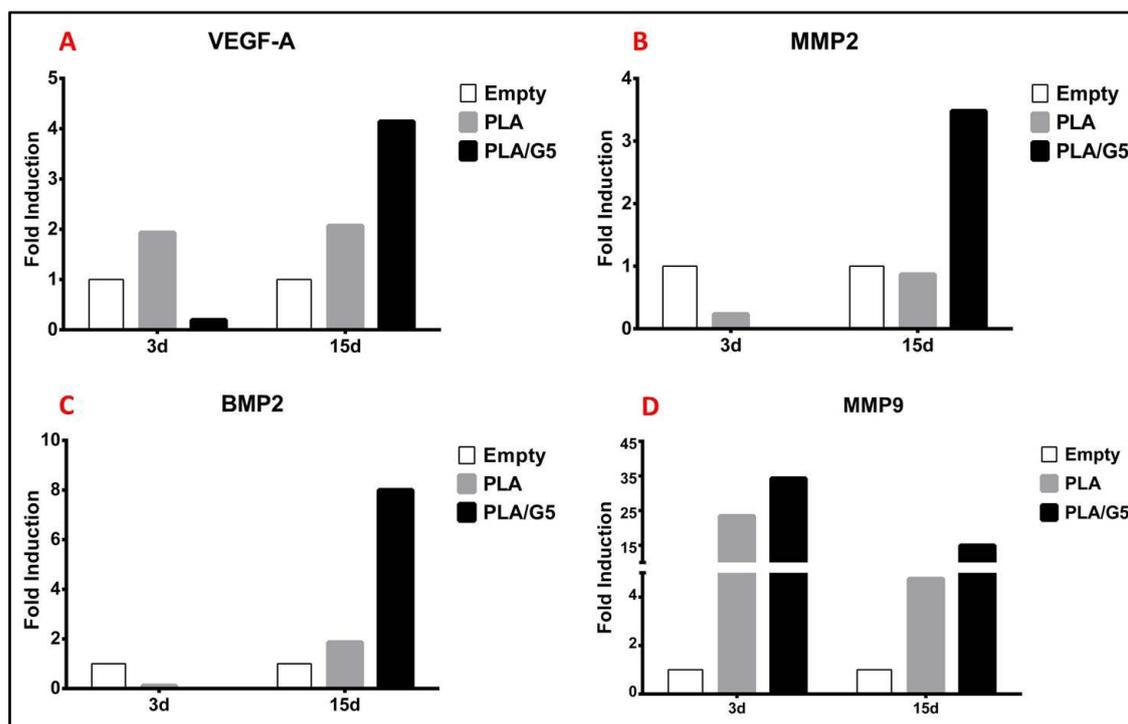


Fig. 60 PCR en tiempo real para medir la expresión de VEGF-A (A), metaloproteína 2 (MMP2) (B), morfoproteína ósea tipo 2 (BMP2) (C), y la metaloproteína 9 (MMP9) (D). La expresión génica fue evaluada en las muestras donde no se colocó implante (Empty), muestras donde se implantó PLA y PLA/G5. La expresión génica fue determinada por medio del método del $\Delta\Delta\text{CT}$ usando la expresión de las muestras sin implante (Empty) como referencia.

6.3.5. $\mu\text{CT Ex vivo}$

El análisis del $\mu\text{CT ex vivo}$ se utilizó con la finalidad de cuantificar la formación de hueso en la región donde fue realizado el defecto óseo. En este sentido, se realizó un seguimiento de la formación del hueso en 4 períodos de tiempo diferentes: 3 días, 15 días, 30 días y 60 días. En la Fig. 61 se observan imágenes correspondientes a las radiografías de rayos X realizadas en los fémures donde se implantaron los andamios de PLA y PLA/G5, y los fémures sin implantes (empty) a los 3 y 15 días posteriores a la cirugía. Particularmente, estas radiografías revelan que durante estos cortos períodos de tiempo no hubo formación de hueso significativa en ninguno de los defectos óseos.

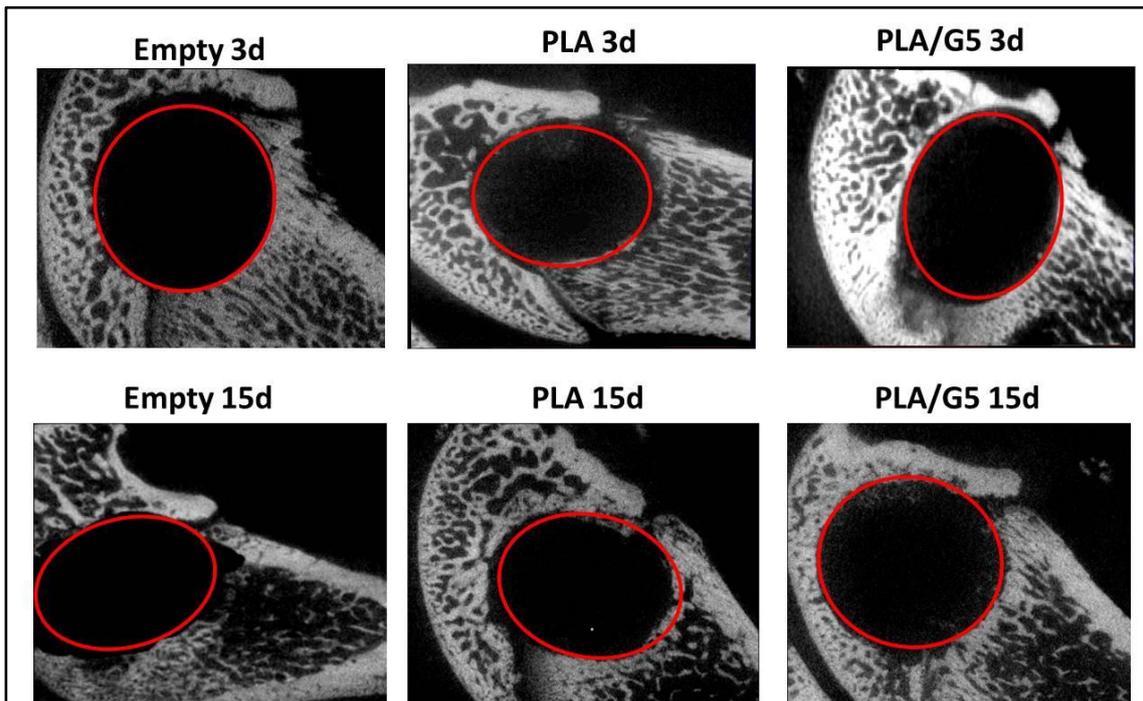


Fig. 61 Radiografías de rayos X realizadas mediante la técnica del μ CT ex vivo. Los círculos rojos señalan la región donde fue realizado el defecto femoral. Fémures sin implante (Empty), fémures donde se implantaron andamios de ácido poliláctico (PLA), fémures donde se implantaron andamios de PLA/G5 (PLA/G5).

Sin embargo, en la Fig. 62 se puede observar claramente que a partir de los 30 días posteriores a la cirugía todas las condiciones evaluadas expresan diferentes grados de formación de hueso en la región del fémur donde se realizó el defecto. Asimismo es de resaltar el hecho de que en los fémures donde se implantaron los andamios de PLA/G5 la formación de hueso fue mucho mayor a la observada con los andamios de PLA. Especialmente a los 60 días posteriores a la cirugía se observó que en los fémures donde se implantó el PLA/G5 el defecto óseo fue recubierto por nuevo tejido óseo. Demostrándose así la inducción de la regeneración ósea ejercida por los andamios que contienen G5.

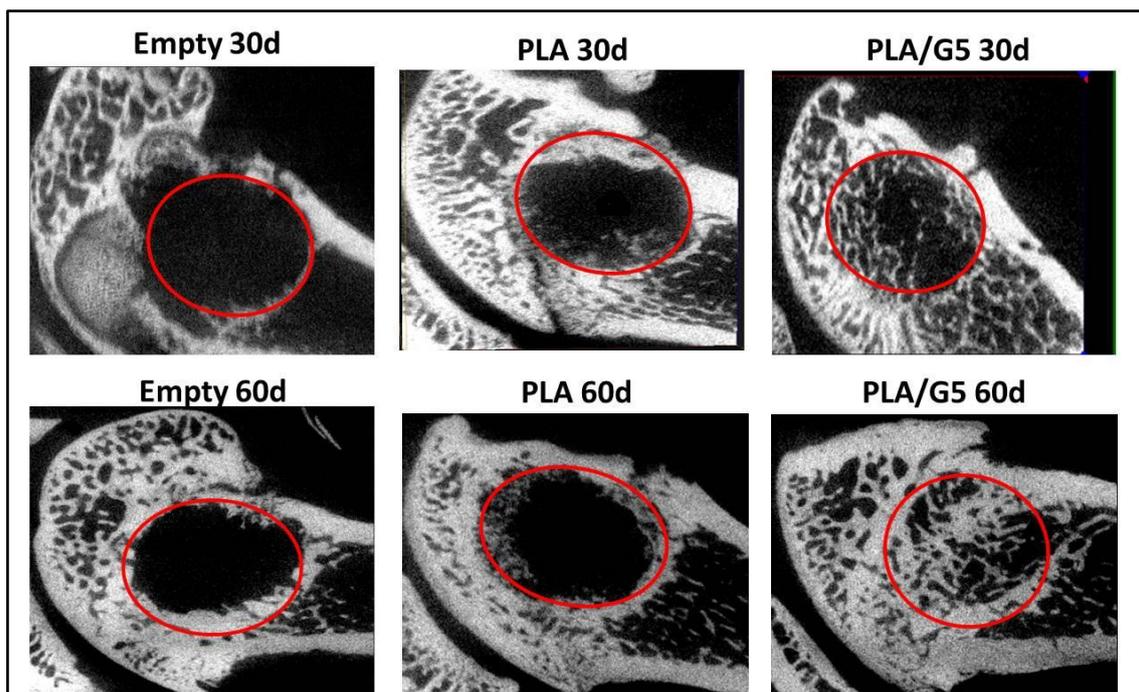


Fig. 62 Radiografías de rayos X realizadas mediante la técnica del μ CT ex vivo. Los círculos rojos señalan la región donde fue realizado el defecto femoral. Fémures sin implante (Empty), fémures donde se implantaron andamios de ácido poliláctico (PLA), fémures donde se implantaron andamios de PLA/G5 (PLA/G5).

Por último, con la finalidad de obtener datos cuantitativos acerca de la formación de nuevo tejido óseo se realizó la cuantificación de la densidad ósea, mediante el cálculo de la fracción ósea del volumen en el defecto del cóndilo femoral. Al cuantificar la cantidad de tejido óseo se obtuvo el gráfico de barras que se muestra en la Fig. 63. En dicha figura se observa claramente que la mayor fracción de tejido óseo fue inducida por los andamios de PLA/G5 al cabo de 30 y 60 días, siendo esta diferencia significativa respecto a la fracción de tejido óseo correspondiente a los fémures a los que se implantaron andamios de PLA y los fémures donde no hubo implante. Estos resultados, sugieren que el G5 contenido en los andamios de PLA/G5 ejerce un efecto positivo en la regeneración del tejido óseo dañado.

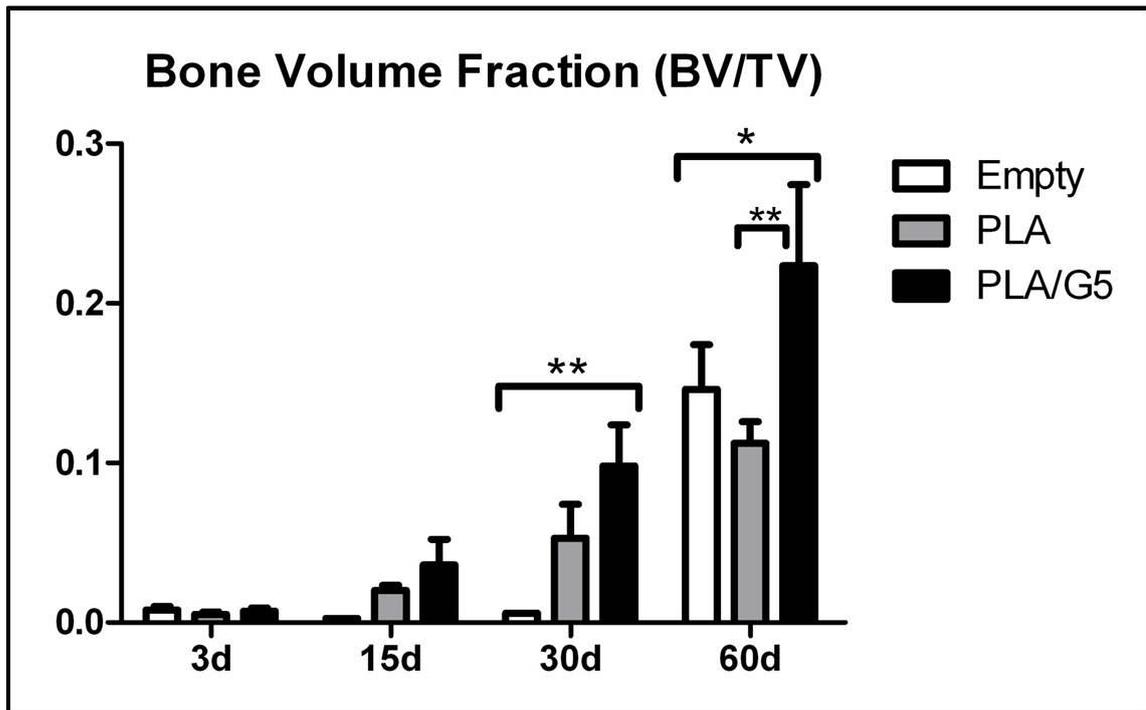


Fig. 63 Fracción ósea del volumen. La fracción ósea del volumen es la proporción de tejido óseo que se encuentra en el volumen correspondiente al defecto femoral. Volumen óseo (BV). Volumen Total (TV). Fémures sin implante (Empty), fémures donde se implantaron andamios de ácido poliláctico (PLA), fémures donde se implantaron andamios de PLA/G5 (PLA/G5). * = $p < 0,05$. ** = $p < 0,01$.

6.3.6. *El calcio extracelular como factor angiogénico in vivo*

Con la finalidad de evaluar el poder angiogénico del calcio extracelular se desarrolló un ensayo de angiogénesis sobre la CAM, en el cual se utilizaron 6 tipos de tratamientos (Fig. 64):

- 1) tratamiento **control**, en el cual no se colocó implante. En este tratamiento, se pudo observar el desarrollo normal del embrión de pollo, así como la vascularización normal de la CAM.
- 2) **Matrigel GFR**, el matrigel GFR es un gel comercial con una baja concentración de factores de crecimiento, que fue utilizado como vehículo del calcio extracelular. Por ello fue realizado un tratamiento donde se evaluó el poder angiogénico del Matrigel GFR (blanco), encontrándose que dicho gel no es capaz de ejercer efectos angiogénicos significativos sobre los vasos sanguíneos de la CAM.
- 3) **PLA**: los andamios de PLA tampoco fueron capaces de generar un

efecto significativo sobre la red vascular cercana al andamio, en consecuencia no poseen efectos angiogénicos. 4) **1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de VEGF** disuelto en matrigel GFR fue utilizado como control positivo. En este caso se pudo observar el crecimiento de vasos sanguíneos alrededor del implante, así como la ramificación de los vasos cercanos al mismo. 5) **PLA/G5**: los andamios que contienen 50 % de G5 al cabo de 5 días en contacto con la CAM fueron capaces de atraer numerosos vasos sanguíneos alrededor del andamio, observándose una alta densidad de vasos envolviendo el andamio. 6) Los implantes de matrigel GFR suplementados con **100 mM de Ca^{2+}** también generaron una potente acción angiogénica donde se pudo observar una amplia red vascular en la región cercana al implante, así como una densa ramificación de los vasos sanguíneos cercanos. Estos resultados sugieren que tanto los materiales liberadores de iones calcio (PLA/G5) como las altas concentraciones de calcio extracelular son capaces de ejercer un potente efecto proangiogénico *in vivo*.

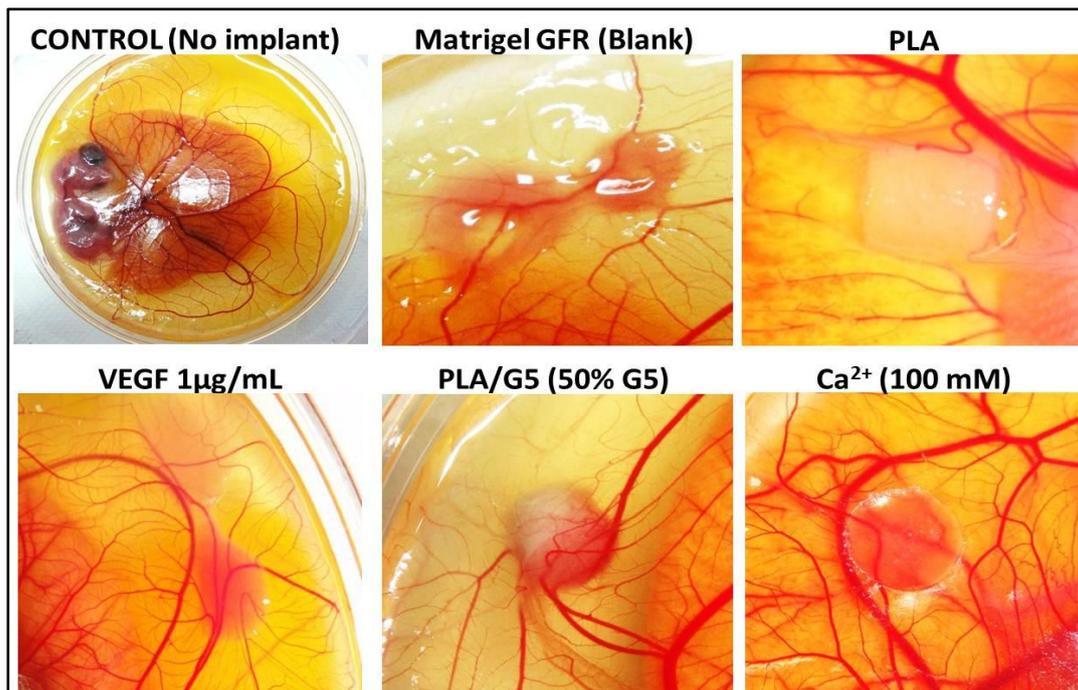


Fig. 64 Ensayo de angiogénesis sobre la CAM. En la figura se observa la apariencia normal de un embrión de pollo de 13 días de desarrollo (control) en el cual no se colocó implante. El matrigel GFR (matrigel con una reducida cantidad de factores de crecimiento) no generó ningún tipo de respuesta angiogénica. Asimismo, los andamios de PLA no indujeron efectos pro-angiogénicos. En contraste la liberación de VEGF por parte de Matrigel GFR cargado con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de VEGF (control positivo) indujo la formación y ramificación de vasos sanguíneos alrededor del implante. Similarmente, los implantes de PLA/G5 indujeron la formación de vasos sanguíneos alrededor de los andamios, observándose un alto grado de vascularización en el implante. Análogamente, el matrigel GFR cargado con 100 mM de Ca^{2+} promovió la formación una amplia red vascular alrededor del gel, encontrándose una alta densidad de vasos sanguíneos en la región del implante.

La cuantificación de vascularización alrededor de los diferentes implantes se realizó mediante la cuantificación de los pixeles correspondientes a los vasos sanguíneos en cada una de las imágenes. De esta forma, se obtuvo el gráfico de barras de la Fig. 65, donde se corroboran que los tratamientos de PLA y Matrigel GFR indujeron una menor densidad de vasos sanguíneos alrededor de los andamios. Asimismo, la cuantificación de la densidad de vasos sanguíneos demostró que el PLA/G5 induce mayor vascularización del andamio al compararlo con el PLA sin vidrio. Sin embargo, la mayor densidad de vasos sanguíneos fue observada alrededor de los implantes de Matrigel GFR + 100 mM de Ca²⁺, siendo incluso mayor a la vascularización inducida por el control positivo (Matrigel GFR + 1 µg/mL VEGF).

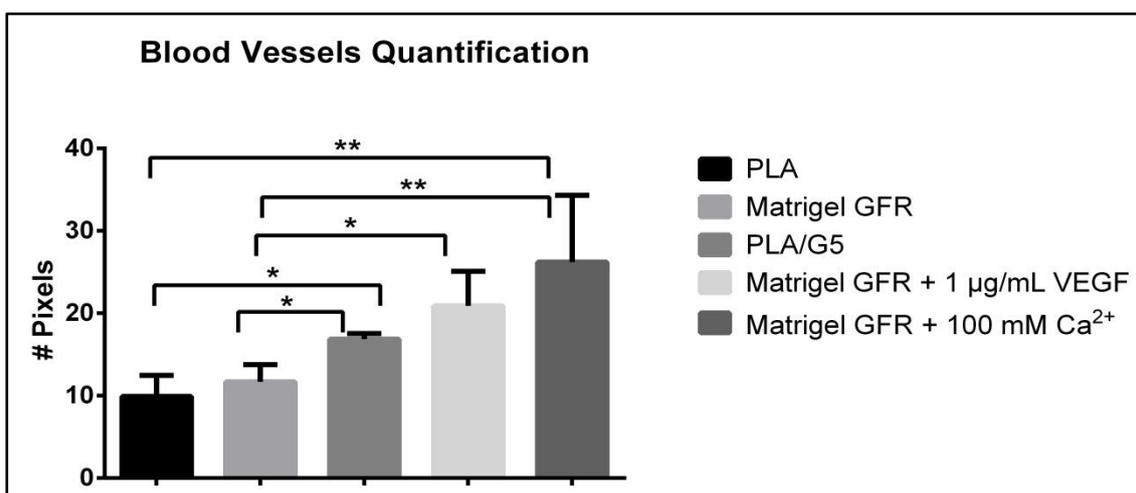


Fig. 65 Cuantificación de la densidad de vasos sanguíneos que rodean los implantes colocados sobre la membrana corioalantoidea (CAM). Diferentes imágenes de cada uno de los tratamientos aplicados fueron analizadas por medio de un software de tratamiento de imágenes (Adobe Photoshop), con la finalidad de cuantificar el número de pixels que ocupan los vasos sanguíneos alrededor de los implantes. El gráfico de barras muestra que el Matrigel GFR suplementado con 100 mM de calcio indujo la mayor densidad de vasos sanguíneos de todos los tratamientos, incluso mayor a la densidad observada en el control positivo (Matrigel GFR + 1 µg/mL de VEGF). Asimismo, el PLA/G5 indujo una mayor densidad de vasos sanguíneos respecto al PLA y el Matrigel GFR. * = p<0,05. ** = p<0,01.

6.3.7. Efecto de la liberación de calcio extracelular sobre la formación de hueso in vivo

Siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo II, los embriones fueron sometidos a 6 tratamientos diferenciales, en donde se colocaron implantes sobre la CAM y se permitió su

degradación e interacción con la CAM durante 5 días. Debido a que todos los implantes colocados son biodegradables, los productos de la degradación de los mismos entraron en contacto con el embrión, ocasionando efectos indirectos sobre el desarrollo. En este sentido, en la Fig. 66 se observa que los huesos de los embriones sin implante (control) presentaron una coloración azul después de ser teñidos con azul de alcian/rojo de alizarina tal y como fue descrito en el Capítulo II. La coloración azul sugiere la presencia mayoritaria de cartílago en el hueso en desarrollo. Semejantes resultados fueron observados al analizar los huesos correspondientes a los embriones donde fueron implantados los geles de matrigel GFR (blanco) y los andamios de PLA. En contraste, los huesos correspondientes a los embriones expuestos a matrigel GFR suplementado con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de VEGF, presentaron zonas marcadas de color rojo correspondiente a la presencia de tejido óseo. Asimismo al analizar las muestras correspondientes a los embriones tratados con PLA/G5 y matrigel GFR suplementado con 100 mM Ca^{2+} , se encontraron extensas zonas marcadas de color rojo. Estos hallazgos revelan el potente efecto que poseen los implantes de PLA/G5 y de 100mM de Ca^{2+} en la formación de tejido óseo y como agentes liberadores de calcio.

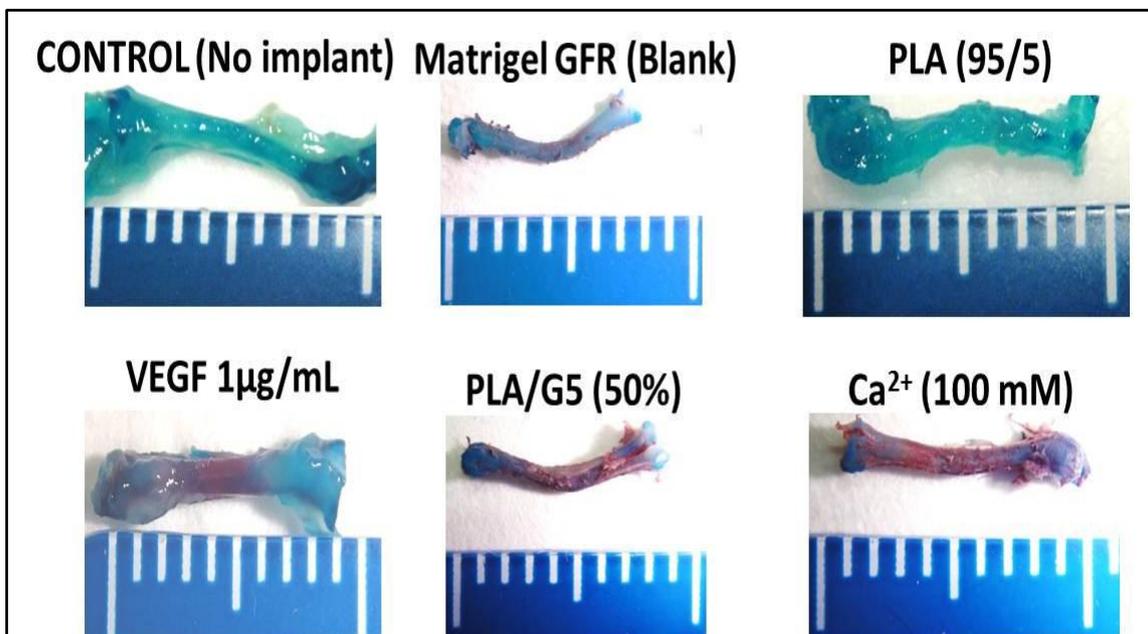


Fig. 66 Ensayo de la formación de hueso. La figura muestra el hueso largo de las extremidades inferiores del embrión de pollo, tras la tinción de azul de alcian/rojo de alizarina. Las imágenes del hueso largo de los embriones sin implante (control), matrigel GFR (blanco) y PLA presentan una coloración azul, demostrando su composición cartilaginosa. En contraste los huesos tratados con VEGF, PLA/G5 y 100 mM de Ca^{2+} mostraron amplias regiones marcadas de color rojo, lo que revela la presencia de tejido óseo. El azul corresponde al cartílago, mientras que el rojo corresponde a tejido óseo.

6.4. *Discusión*

Una de las características esenciales que debe tener cualquier biomaterial que vaya a ser utilizado en la regeneración de tejidos, es la capacidad de atraer células capaces de restituir el tejido deseado. En este sentido, es importante que los andamios sean capaces de liberar señales quimioatrayentes, que permitan la adhesión y la proliferación de las células, y finalmente que induzcan la formación del tejido deseado. Especialmente los andamios utilizados en la regeneración de tejidos *in situ* deben ser capaces de exhibir todas las características. En este sentido, son relevantes los resultados obtenidos en la Fig. 57 donde se cuantificó la cantidad de material genético aislado a partir de los defectos óseos sin implante (empty), así como donde se implantaron los andamios de PLA y los de PLA/G5. En dicha figura se muestra que los defectos óseos donde se implantó el PLA/G5 obtuvieron una mayor concentración de ARN, tanto a los 3 días como a los 15 días, siendo esto un indicativo de la mayor cantidad de células dentro de los defectos óseos tratados con PLA/G5 respecto a los otros dos tratamientos. Tomando en cuenta que la composición de los andamios de PLA y los de PLA/G5 solo se diferencia en la presencia del 50 % de G5, puede ser considerado que la respuesta biológica observada al implantar el PLA/G5 es debida a la presencia del mencionado vidrio bioactivo. Por otra parte, si se toma en cuenta que tanto el G5 como el PLA/G5 son capaces de incrementar la concentración local de calcio extracelular (Navarro *et al.*, 2003; Aguirre *et al.*, 2012), y además se consideran los resultados mostrados en los Capítulos III-IV en los que se demostró que el calcio extracelular por medio de la activación del CaSR ejerce un efecto quimiotáctico sobre las EPCs y las MSCs de médula ósea, se podría entonces explicar el aumento de la población celular observado en los defectos óseos tratados con PLA/G5 como una consecuencia del aumento de la concentración local de calcio en la zona de interés. Dicho efecto del incremento local de calcio como agente movilizador de células provenientes de médula ósea también ha sido reportado durante procesos de daño tisular. Específicamente, ha sido descrito que en los lugares donde se ocasionan daños tisulares ocurre un aumento en la concentración extracelular de calcio. Asimismo se ha descrito

que ese incremento es capaz de regular la respuesta inmune *in vitro* e *in vivo* atrayendo a las células hacia el lugar del daño tisular (Olszak *et al.*, 2000; Adams *et al.*, 2006).

Sin embargo, además de inducir la colonización es necesario que los andamios generen las señales apropiadas para la formación del tejido de interés. Por ello, cobran una mayor relevancia los resultados mostrados en las Fig. 58-60 donde se muestra el perfil de expresión genético de las células que colonizaron los andamios de PLA/G5 respecto al perfil genético de las que colonizaron el PLA, ya que dichos perfiles revelan la expresión de múltiples genes involucrados en la angiogénesis y la osteogénesis.

En el caso particular de la angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos es un proceso multifactorial, que requiere de complejas interacciones espacio temporales de numerosas moléculas, lo cual hace complejo el análisis de los resultados relacionados con la expresión de marcadores angiogénicos. En este sentido, en la **¡Error! No se encuentra el rigen de la referencia.** se muestra que parte del perfil genético observado en las Fig. 58-60 es semejante al perfil observado al cultivar las EPCs de médula ósea de rata en los andamios de PLA/G5 *in vitro* (Aguirre *et al.*, 2012) y al perfil genético expresado en las EPCs estimuladas con calcio extracelular Fig. 37 (Aguirre *et al.*, 2010).

Marcadores angiogénicos sobreexpresados	
PLA/G5 <i>in vivo</i> 3d	Angpt2 , Cdh5, Col 4a3, Epas 1, Eng, F2, F3, Fgf 2, Fgf6, Hgf , Fn1, Ifnb1, IL-6 , Kdr (Vegfr 2) , Mmp2 , Mmp3, Mmp9 , Pecam (CD31) , Serpine 1, Serpinf1, Tgf α y Vegfa
PLA/G5 <i>in vivo</i> 15d	Ang, Angpt1, Angpt2 , Bail, Efna1, Hif 1α , Igf-1 , Mmp9 , Mmp2 , Nos3, Nrp1 , Nrp2, Pdgfa, Tek (Tie-2), Sphk1, Tmp2, Tmp3, Vegfa , y Vegfc .
PLA/G5 <i>in vitro</i> 3d (Aguirre <i>et al.</i> , 2012)	Cxcl 1, Cxcl 2, Mmp 2 , Mmp9 , IL-6 , Hgf , IL-1b , Nrp1 , Hif 1α , Igf-1 , Pecam , Efna1 , Itgb3 , Tgf β 3, Tnf, Fzd5 , Sphk1, Ptgsl, Fgf 1, Ereg, Vegf y Kdr .
10 mM Ca²⁺ <i>in vitro</i> 3d (Aguirre <i>et al.</i> , 2010)	Angpt2 , Anpep, Edg1, Cxcl9, Igf-1 , IL-1b , Itgb3 , Lep, Vegfa , Jag, Fzd5 y Nrp1 .

Tabla 19 Marcadores angiogénicos sobreexpresados *in vitro* e *in vivo* en respuesta al PLA/G5 y al calcio extracelular. Los marcadores que remarcados en negritas corresponden a los genes que se repiten en al menos dos de las condiciones.

Los genes involucrados en la respuesta biológica al G5 y al calcio extracelular se pueden dividir según su función: 1) factores de crecimiento VEGF, el IGF-1, Efna1 (efrina), y el factor de crecimiento de hepatocitos (Hgf). 2) Moléculas de señalización: Fzd5 (homologo 5 de la proteína “*Frizzled*”, la Nrp 1 (neuropilina), la interleucina 1b (IL-1b) y la interleucina 6 (IL-6). 3) Receptores: el receptor del VEGF (Kdr o Vegfr). 4) Proteasas de la matriz extracelular: las metaloproteinasas 2 y 9 (Mmp-2 y Mmp9). 5) Factores de transcripción: Hif-1 α (factor de transcripción inducible por hipoxia). Y 6) Moléculas de adhesión: Pecam (CD31) y la integrina β 3 (Itgb3).

Los conocimientos actuales acerca de la formación de nuevos vasos sanguíneos por angiogénesis y/o vasculogénesis indican que múltiples moléculas involucradas en la formación y desestabilización de vasos sanguíneos juegan un papel dual en este proceso dependiendo del momento y el lugar donde se activan. Un ejemplo de ello son las metaloproteinasas (Mmps), las cuales son proteasas encargadas de la degradación de la matriz extracelular, por lo que desestabilizan los vasos sanguíneos. Sin embargo, ha sido descrito que una vez las metaloproteinasas actúan sobre la matriz extracelular, también son liberados múltiples factores proangiogénicos, tales como, el VEGF y el FGF, entre otros (Jain, 2003). Otro efecto proangiogénico que ha sido descrito como consecuencia de la activación de las Mmps es el proceso de creación de nuevos vasos sanguíneos por ramificación de los vasos pre-existentes. Esta afirmación se basa en que se ha reportado que durante el proceso de ramificación de los vasos sanguíneos las células endoteliales pierden las uniones célula-célula y se activan las Mmps, lo cual permite a las células endoteliales expresar un comportamiento invasivo y motil que inicia el proceso de ramificación de los vasos sanguíneos (Herbert e Stainier, 2011). Asimismo, la angiopoyetina tipo 2 (Angpt2) puede actuar como promotor de la ramificación de los vasos sanguíneos, ya que al ser un antagonista de Tek (Tie 2) se encarga de interrumpir la ruta de señalización de la angiopoyetina tipo 1 (Angpt1), desestabilizando así los vasos sanguíneos (Augustin *et al.*, 2009). En este punto es importante recordar que los perfiles genéticos asociados a la angiogénesis encontrados a los 3 y 15 días de la implantación del PLA/G5 (Fig.

58-60) revelaron que la Angpt2, la Mmp2 y la Mmp9 estaban sobreexpresadas a los 3 días, mientras que a los 15 días se encontró también la sobreexpresión de la Angpt1, así como del Tek, lo cual, sumado a la reducción de la expresión de las Mmps, sugiere el declive del proceso de la desestabilización y el aumento de las señales de formación de los vasos sanguíneos. Otro aspecto interesante respecto a la cinética de los perfiles genéticos observados es el hecho de que a los 3 días de estimulación de las EPCs *in vivo* e *in vitro* con el PLA/G5 o con el calcio extracelular, se encontró la sobreexpresión de la IL-1b y la IL-6, las cuales son potentes citosinas involucradas en el desarrollo de procesos quimiotácticos e inflamatorios. Mientras que a los 15 días de implantación dicha expresión estaba ligeramente disminuida, sugiriéndose así la inhibición de procesos inflamatorios nocivos, a consecuencia de la implantación del PLA/G5. Similarmente a lo que ocurre con las Mmps y la Angpt2, la sobreexpresión de la IL-1b y la IL-6 es una señal pro-angiogénica en estadios tempranos del proceso. Esta afirmación se basa en el hecho de que la IL-1b además de ser una potente citosina pro-inflamatoria, también posee un potente efecto pro-angiogénico (Voronov, Carmi e Apte, 2007). Otros autores señalan que tanto la inflamación como la angiogénesis comparten múltiples moléculas y rutas de señalización, por lo que comúnmente se desarrollan señales similares durante las primeras etapas de ambos procesos (Ono, 2008).

Por otra parte, la sobreexpresión de los genes de Vegfa, Vegfc, Hif-1 α , Igf-1, Nrp1 y el Hgf, que fue observada en las 4 condiciones mostradas en la **¡Error! No se encuentra el origen de a referencia.**, confirman la activación de las rutas pro-angiogénicas. En particular, el Vegfa es el gen proangiogénico por excelencia, debido a que es el factor clave en el desarrollo de los nuevos vasos sanguíneos. Durante el proceso de ramificación de los vasos, el Vegfa se une al Kdr (VEGFR2) activando así una serie de señales intracelulares que desencadenan la proliferación endotelial, la formación de filopodios en las células endoteliales, la degradación de la matriz extracelular y la quimiotaxis (Herbert e Stainier, 2011). Asociado a esto, ha sido descrito que la hipoxia induce la expresión del Vegfa por medio de la activación del Hif-1 α (Zheng *et al.*, 2003). Otros autores han descrito la relación existente entre la sobreexpresión del

Igf-1, la del Hif-1 α y la del Vegfa en procesos angiogénicos (Fukuda *et al.*, 2002). Tomando en cuenta todos los argumentos anteriores, los resultados del presente capítulo confirman los hallazgos obtenidos con el PLA/G5 *in vitro*, así como aquellos que demostraron el efecto angiogénico del calcio extracelular sobre las EPCs, sugiriendo además que el efecto del PLA/G5 está en gran parte mediado por el incremento del calcio extracelular en la región de interés.

Desde el punto de vista de la formación del nuevo tejido óseo, el PLA/G5 también fue el tratamiento más efectivo durante los períodos de tiempo evaluados. Esta afirmación está basada en el hecho de que tanto a nivel genético, como a nivel tisular fue observada una mayor inducción de la formación de hueso en los defectos óseos tratados con PLA/G5 (Fig. 59, 60C, 61-63). En el caso del análisis genético se pudo observar que el PLA/G5 a los 3 días de implantación indujo la sobreexpresión de la totalidad de los genes evaluados, mientras que a los 15 días de tratamiento se observó que la diferencia en la expresión genética entre el tratamiento con PLA y PLA/G5 fue menos amplia. Sin embargo, en los resultados mostrados en la Fig. 58 muestra que a los 15 días se encuentran sobre expresados genes tales como: el receptor tipo 1 de la morfoproteína ósea (Bmpr1b), la Cadherina tipo 11 (Cdh11), el receptor de la vitamina D (Vdr), el Colágeno tipo 1 (Col 1a1), el Colágeno 2a1 (Col 2a1), el receptor tipo 1 y 2 del factor de crecimiento fibroblástico (Fgfr1 y Fgfr2), la Fibronectina (Fn1), la molécula de adhesión intercelular (Icam1), el factor de transcripción osteogénico (Runx2 ó Cbfa1), Mmp2, el homólogo tipo 2 de la proteína “MAD” (smad2), el homólogo de la proteína “*twist*” de *Drosophila* (Twist1). Asimismo en la Fig. 60 se muestra que el PLA/G5 induce un marcado incremento de la expresión de BMP-2 a los 15 días de tratamiento.

Al igual que en la angiogénesis, durante la formación de huesos existe un gran número de moléculas interactuando al mismo tiempo, siendo el balance de las señales lo que inclina la balanza hacia la formación o no del hueso. En el proceso de formación de hueso las BMPs juegan un papel importante, ya que están íntimamente relacionadas con el Cbfa1, regulándose uno al otro bidireccionalmente. Asimismo, el Cbfa1 trabaja en conjunto con las proteínas “*Smad*” en la activación de la transcripción de genes importantes para la formación de hueso

(Song, Estrada e Lyons, 2009). En este sentido, ha sido descrito que durante el proceso de regeneración del tejido óseo las BMPs junto con el TGF β –ambos sobreexpresados a los 15 días de tratamiento con el PLA/G5- están encargados de la quimiotaxis de células formadoras de tejido óseo, iniciar la condrogénesis, la osteogénesis y la regulación del remodelado del tejido óseo (Song, Estrada e Lyons, 2009). Igualmente, se observó el aumento de la expresión del receptor de la vitamina D y del colágeno tipo 1, los cuáles están íntimamente relacionados con la formación del tejido óseo. Así como la expresión de algunas moléculas de adhesión tales como la Icam y la Itgb1, que están involucradas en la interacción célula-célula y la interacción con la matriz extracelular. Tomando en cuenta la función de los genes sobre-expresados a los 15 días donde fueron implantados los andamios de PLA/G5, era predecible que se encontraría una mayor densidad ósea en dichos defectos óseos. En este sentido, las Fig. 61-63 demostraron que la sobreexpresión de genes relacionados en la formación y regeneración de hueso que fue observada al tratar los defectos óseos con PLA/G5 generó una mayor y más rápida regeneración del tejido perdido en el cóndilo femoral. Debido a que la diferencia entre los andamios de PLA y los de PLA/G5 es la presencia de las micropartículas de G5, se puede inferir que los diferentes efectos entre las respuestas biológicas a dichos andamios es consecuencia del G5. De la misma manera, a partir de estos resultados, asociados a los presentados en el capítulo anterior, se puede concluir que el calcio extracelular liberado por el G5 esté jugando un papel relevante en el desarrollo de estas señales pro-osteogénicas del G5 por medio de la activación del CaSR (Navarro *et al.*, 2003; Aguirre *et al.*, 2012).

Hasta este punto han sido discutidos los resultados correspondientes a la regeneración de hueso observada al implantar PLA/G5 en defectos de cóndilo femoral de rata. Sin embargo, mediante el modelo de embrión de pollo *ex ovo* se logró comparar el efecto de un material liberador de calcio (PLA/G5) y el calcio extracelular propiamente dicho. Antes de iniciar la discusión sobre los hallazgos correspondientes al modelo de embrión de pollo *ex ovo*, es importante resaltar que la cáscara del huevo es la principal fuente de calcio extracelular del embrión durante el desarrollo (Tuan, 1983). Asimismo, el papel de la suplementación de calcio

extracelular sobre el desarrollo del tejido óseo del embrión de pollo es un hecho conocido desde finales de los 80 cuando se publicó un artículo en el que se comparó el grado de mineralización del esqueleto de embriones de pollo cultivados dentro y fuera del huevo. En dicho artículo se demostró que los embriones de 19 días de desarrollo cultivados *ex ovo* presentaron grandes deficiencias de tejido óseo mineralizado, mostrando mineralización únicamente en la región de las extremidades inferiores y el cráneo, mientras que los embriones cultivados dentro del huevo presentaron osificación de todo su esqueleto (Tuan, 1987). En este sentido, el modelo experimental elegido (*ex ovo*), donde el embrión es cultivado fuera del huevo permitió evaluar de una forma clara el efecto que ejerce el calcio extracelular liberado a partir de los tratamientos elegidos sobre la formación del hueso y los vasos sanguíneos.

En el presente capítulo se presentaron resultados que han permitido comparar en un mismo modelo experimental el efecto de la liberación de calcio extracelular a partir de un gel únicamente suplementado con calcio y el liberado a partir de un biomaterial basado en fosfatos de calcio (G5). Los ensayos realizados demostraron que el PLA/G5 y el gel suplementado con calcio ejercen el papel de factores angiogénicos, observándose en este último un mayor grado de vascularización en comparación con el control positivo (Matrigel GFR + VEGF). Este efecto pro-angiogénico del PLA/G5 contrasta con los hallazgos que otros investigadores han encontrado al evaluar el poder angiogénico del Bioglass[®] utilizando el mismo modelo experimental (Vargas *et al.*, 2009). La diferencia entre la capacidad angiogénica del PLA/G5 respecto a la del conocido Bioglass[®] podría ser explicada en base a la liberación de calcio extracelular que poseen dichos materiales. Debido a que el PLA/G5 a partir del segundo día libera al medio extracelular una concentración de 0,6 mM de Calcio, mientras que el Bioglass[®] libera solo 60-90 µg/mL (Jones, 2013).

Por otra parte, el ensayo en el cual se midió la formación de tejido óseo mineralizado (Fig. 66) reveló que los productos iónicos liberados por el PLA/G5 son capaces de incrementar la velocidad de formación del tejido óseo respecto a los embriones control. De la misma manera el calcio liberado por los implantes de matrigel GFR + Ca²⁺ (100 mM) indujeron la mineralización

del tejido óseo en las extremidades inferiores de los embriones. En consecuencia, este ensayo demuestra que el calcio extracelular liberado a partir de la degradación del PLA/G5 es el principal responsable de los resultados indirectos de dichos andamios sobre la formación de tejido óseo mineralizado. De la misma manera que los resultados mostrados en los capítulos anteriores permitieron afirmar que el calcio extracelular per sé es capaz de ejercer efectos pro-angiogénicos y pro-osteogénicos mediante la activación del CaSR *in vitro* y que los andamios de PLA/G5 activan la expresión de un amplio rango de genes involucrados en los procesos de formación hueso y vasos sanguíneos *in vivo*, el presente capítulo provee de indicios claros que permiten afirmar que el calcio extracelular per sé es capaz de ejercer las mismas respuestas biológicas que el PLA/G5 *in vivo*.

6.5. Conclusiones

En líneas generales los resultados mostrados en el presente capítulo demostraron que la implantación de los andamios de PLA/G5 con un 50 % de G5 promueve la expresión de múltiples genes involucrados en rutas de señalización angiogénicas y osteogénicas (ver Fig. 58-60). Asimismo, se mostró que la densidad ósea de los defectos tratados con PLA/G5 fue mayor a la densidad ósea observada en los controles y el PLA (ver Fig. 61-63). En consecuencia, en este capítulo se demuestra el potencial del PLA/G5 como sustituto óseo capaz de inducir la formación de un nuevo tejido óseo vascularizado. Por otra parte, la hipótesis sobre la gran relevancia del calcio extracelular liberado por el PLA/G5 como principal agente promotor de los efectos pro-angiogénicos y pro-osteogénicos observados en el modelo de defectos de cóndilo femoral y en previas publicaciones de nuestro grupo de investigación quedó demostrado en el modelo de embrión de pollo *ex ovo*. En este sentido, los resultados relacionados con el efecto de la liberación del calcio extracelular a partir de los diferentes implantes reafirma el potencial que posee el control de la liberación de este ión como mecanismo para aumentar la eficiencia de los materiales utilizados en la ingeniería de tejidos ósea.

Capítulo VIII: Conclusiones generales

7. General Conclusions

7.1. General Conclusions

Current project was focused in showing the mechanism behind the angiogenic and osteoinductive effects, previously reported in the literature, as consequence of the interaction with CaP glasses *in vivo* or *in vitro*. Throughout this thesis, we reached several important conclusions related with the specific aims; however current section summarizes the findings as a whole.

Nowadays, several strategies are being tested in bone tissue engineering in order to achieve the final clinical application and restore the bone tissue in patients. Most of them, involve the use of scaffolds containing CaP. In particular, the bioactive and biodegradable glasses such as the G5 are being successfully used to promote angiogenesis and bone formation. However, there are several aspects to be enhanced and developed to reach the clinical application. A relevant aspect that could enhance the efficacy of these biomaterials is to increase the signals that induce the bone regeneration and promote a faster recovery. Considering these arguments, the findings revealed in the present project could bring light over a new way to control or enhance the efficacy of CaP glasses in bone tissue engineering.

Taking all together our results show the role of extracellular calcium as a differentiation factor on EPCs and MSCs that promote, respectively, angiogenesis and osteogenesis through the activation of CaSR. Furthermore, using our findings in addition to the results previously published by other researchers we build a model that explain the role of Ca^{2+} /CaSR in the modulation of osteoinduction and the relation in bone tissue engineering. Regarding the G5 action the last two chapters demonstrated the similar cellular and tissue responses caused by the CaP glass and the extracellular calcium. Therefore, based on the results presented above we propose that CaP glasses, such as G5 can be systems to release in a controlled manner calcium ions to activate CaSR and thus promote bone regeneration.

Anexos

8. Anexos

8.1. Publicaciones asociadas a este proyecto

- González-Vázquez A, Planell J, Engel E. **Extracellular calcium and CaSR drive the osteoinduction on Mesenchymal Stromal Cells**. PLoS ONE. Accepted.
- A Aguirre, A González, M Navarro, Ó Castaño, JA Planell, E Engel. **Control of microenvironmental cues with a smart biomaterial composite promotes endothelial progenitor cell angiogenesis**. European Cells & Materials. 24:90-106. 2012.
- Aguirre, A; González, A; Planell, J; Engel, E. **Extracellular calcium modulates in vitro bone marrow-derived Flk-1⁺ CD34⁺ progenitor cell chemotaxis and differentiation through a calcium-sensing receptor**. Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC). 393:156-161. 2010.

8.2. Participaciones en Congresos Internacionales

- Autores: Arlyng González Vázquez, Sylvain Catros, Chantal Bourget, Melba Navarro, Joëlle Amedeé, Josep Planell and Elisabeth Engel. Participación: Poster. Congreso: 25th European Conference on Biomaterials (ESB 2013). Madrid-Spain.
- Autores: Arlyng González Vázquez, Melba Navarro, Joëlle Amedeé, Josep Planell and Elisabeth Engel. Participación: Poster. Congreso: 3rd TERMIS World Congress. 2012. Vienna-Austria.
- Autores: Arlyng González Vázquez, Josep Planell and Elisabeth Engel. Participación: Poster. Congreso: 14th JFBTM. 2012. Bordeaux-France.
- Autores: Arlyng González Vázquez, Melba Navarro, Oscar Castaño, Josep Planell and Elisabeth Engel. Participation: Oral. Congreso: 9th World Biomaterials Congress (WBC 2012). Chengdu-China.
- Autores: González, A, Schlaubitz, S, Catros, S, Fricain, JC, M, Navarro, Amedee, J, Planell, J, Engel, E. Participación: Oral. Congreso: 24th European Conference on Biomaterials (ESB 2011). Dublin-Ireland.
- Autores: González, A, Planell, J, Engel, E. Participación: Poster. Congreso: 1st Advanced Summer School Interrogations at the Biointerface. 2011. Porto-Portugal.
- Autores: González, A, Schlaubitz, S, Catros, S, Fricain, JC, M, Navarro, Amedee, J, Planell, J, Engel, E. Participación: Oral. Congreso: TERMIS-EU 2011. Granada-Spain.

-Autores: A. Aguirre, A. González, L. Márquez, M. Navarro, O. Castaño, JA. Planell, E. Engel. Participación: Oral. Congreso: 23rd European Conference on Biomaterials (ESB 2010). Tampere-Finland.

-Autores: A. González, A. Aguirre, J. Planell, E. Engel. Participación: Oral. Congreso: TOPEA 2010. Barcelona-Spain.

-Autores: A. González, A. Aguirre, J. Planell, E. Engel. Participación: Poster. Congreso: TERMIS-EU 2010. Galway - Irland.

-Autores: A. González; A. Aguirre; J. Planell; E. Engel. Participación: Poster. Congreso: 22nd European Conference on Biomaterials (ESB 2009). Lausanne-Switzerland.

8.3. Estancias en el Exterior

- **INSERM U1026 BioTIS:** Bordeaux-France. Período: 19 de Marzo 2012 - 3 de Agosto de 2012. Bajo la dirección de la Dr. Joëlle Amédée-Vilamitjana.

8.4. Financiación

- European project NMP3-LA-2008-214402, ANGIOSCAFF.
- European ERANET project PI11/03030, NANGIOFRAC.
- AGAUR: Aire-CTP2011.
- Ministerio de Ciencia e Innovación: Proyecto MAT2011-29778-C02-01.
- Ministerio de Ciencia e Innovación: Proyecto MAT2008-06887-C03-01.

8.5. Índice de Figuras y Leyendas

Capítulo I: Introducción

Fig. 1: Diagrama 3D de la estructura de un hueso compacto (Ross, Kaye e Pawlina, 2005).....	4
Fig. 2: Vascularización de un hueso largo (Ross, Kaye e Pawlina, 2005).....	5
Fig. 3: Ciclo de Remodelación Ósea. Imagen modificada a partir de la siguiente página web http://www.ns.umich.edu/Releases/2005/Feb05/bone.html	6
Fig. 67: Factores involucrados en el proceso de remodelación ósea (Fauci <i>et al.</i> , 2008)	8
Fig. 5 Proceso de restauración del hueso fracturado (Marieb e Bostwick-Taylor, 2009).....	10
Fig. 6 Diferentes tipos de células madre. Tomada de (Lutolf, Gilbert e Blau, 2009).....	14
Fig. 7 Diferentes propiedades a considerar en un andamio. Tomado de (Sundelacruz e Kaplan, 2009).....	16
Fig. 8 Técnicas de vascularización en Andamios pre-celularizados. Tomada de (Santos e Reis, 2010).....	20
Fig. 9 Respuestas celulares a la liberación de iones de los vidrios bioactivos. Tomado de (Hoppe, Gueldal e Boccaccini, 2011).....	23
Fig. 10 Vías de señalización intracelulares donde está involucrado el calcio. Tomado de (Www.Sabiosciences.Com).....	25
Fig. 11 Modelo de la estructura del CaSR (Breitwieser, 2008).....	26
Fig. 12 Resumen de las vías de señalización en las que está involucrado el CaSR (Smajilovic e Tfelt-Hansen, 2007).....	26

Capítulo II: Metodología

Fig. 13 Diagrama del protocolo de obtención de MSCs y EPCs.....	31
Fig. 14 Diagrama del procedimiento que se utilizó en los ensayos de migración.....	38
Fig. 15 Listado de genes evaluados en el ensayo de Angiogénesis PCR Array.....	43

Fig. 16 Cirugía e implantación de andamios de PLA, PLA/G5 en cóndilos femorales de rata...	50
Fig. 17 Períodos de implantación y ensayos aplicados a las muestras <i>in vivo</i>	50
Fig. 18 Listado de genes evaluados en el Osteogénesis PCR Array <i>in vivo</i>	53
Fig. 19 Listado de genes evaluados en el Angiogenesis PCR array <i>in vivo</i>	54
Fig. 20 Procedimiento de selección de la región de interés en la muestra, el volumen total y el volumen óseo.....	56
Fig. 21 Sistema de cultivo de embriones <i>Ex ovo</i>	58

Capítulo III: Aislamiento y caracterización de células progenitoras

Fig. 21 Sistema de cultivo de embriones Ex ovo	65
Fig. 22 Esquema que describe la alta potencialidad de las Células Madre Mesenquimales. Imagen extraída de (Caplan, 2010).....	70
Fig. 24 Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD11b (marcador de leucocitos) y CD45 (marcador hematopoyético) en EPCs de pasajes 2-4. Como se puede observar el bajo porcentaje de células contaminantes, permite afirmar que la población celular obtenida no está contaminada con células hematopoyéticas ni leucocitos.....	71
Fig. 25 Ensayo de formación de túbulos en Matrigel. A la izquierda se pueden observar células progenitoras endoteliales cultivadas sobre matrigel durante 6 horas en medio mínimo de células endoteliales (A). A la derecha se muestran EPCs cultivadas sobre matrigel durante 6 horas en medio mínimo suplementado con 40 ng/mL de VEGF (B). Las cabezas de flecha señalizan algunos de los túbulos formados por las células endoteliales. Objetivo 4X.....	72
Fig. 26 Imágenes de contraste de fases de células madre mesenquimales (MSCs). En las imágenes superiores (A-B) se muestran MSC de pasaje 2 donde se puede apreciar la presencia de células fusiformes (cabezas de flecha rojas) y otra población minoritaria de células redondeadas (cabezas de flecha blanca) posiblemente correspondientes a células contaminantes del tipo hematopoyético (cabeza de flechas blancas). Las MSCs de P4 (C-D) están compuestas casi exclusivamente por células fusiformes. En la imagen C se muestran MSCs P4 tras 24 horas de cultivo en condiciones control, mientras que en D se puede observar que al cabo de 3 días en cultivo las células han alcanzado la confluencia, por lo que se muestra su alta tasa de proliferación en condiciones control. Las barras de escala corresponden a 100 μ m.....	73
Fig. 27 Perfil de expresión de las MSCs. Las imágenes muestran que las MSCs de P2-P4 son Stro 1+, CD105 ⁺ , CD44 ⁺ , CD34 ⁻ y CD45 ⁻ , siendo este es un perfil de expresión característico de MSCs. También se puede observar que las células en condiciones control mantienen dicho perfil de expresión en el tiempo (24h-15d). Las barras de escala corresponden a 50 μ m.....	74
Fig. 28 Tinción del Rojo de Alizarina para evaluar la diferenciación de MSCs. En la imagen superior izquierda (A) se pueden observar MSCs cultivadas durante 3 días con medio osteogénico. Se muestran algunos nódulos ligeramente mineralizados (círculo rojo). La imagen superior derecha (B) muestra MSCs cultivadas en medio osteogénico durante 7 días. En	

particular se observa una mayor cantidad de nódulos ligeramente mineralizados (círculos rojos). (C) corresponde a MSCs cultivadas durante 10 días con medio osteogénico en el cuál se observan regiones altamente mineralizadas marcadas de color rojo intenso. Al cabo de 15 días en cultivo en condiciones osteogénicas (D) se observan amplias regiones mineralizadas marcadas de color rojo intenso. Las barras de escala representan 100 μm75

Capítulo IV: Papel del Calcio extracelular y el CaSR en la diferenciación de las EPCs

Fig. 29 Ventajas y desventajas de cada una de las estrategias utilizadas en ingeniería tisular (Rouwkema, Rivron e Van Blitterswijk, 2008).....81

Fig. 30 Mecanismo de acción a través del cual el incremento en la concentración extracelular de Ca^{2+} activa el CaSR, controlándose así la contracción vascular y disminuyendo la presión sanguínea (Smajilovic e Tfelt-Hansen, 2008).....84

Fig. 31 El vidrio bioactivo S53P4 (Vivoxid Ltd) promueve la movilización y colonización de células. Andamio sin vidrio bioactivo (A) y recubierto con vidrio bioactivo (B) luego de 7 días de implantación en el espacio subepidérmico de ratones. (Tommila *et al.*, 2009).....85

Fig. 32. En la imagen se observan Células progenitoras endoteliales (EPCs) marcadas con un anticuerpo monoclonal contra CaSR (verde), los núcleos fueron marcados con DAPI (azul). Las fotografías muestran la intensa expresión del CaSR en la membrana celular. En el control negativo (sin anticuerpo primario) demuestra la alta especificidad de la señal.....87

Fig. 33 Expresión genética de CaSR en EPCs. La expresión genética fue calculada utilizando el método del $\Delta\Delta\text{CT}$, utilizando como referencia la expresión del CaSR en el tratamiento **Ctrl** a los 30 min. ***= $p < 0,001$. Las barras de error pese a estar graficadas, no es posible observarlas debido a que los valores son pequeños para la escala del gráfico.....88

Fig. 34 Efecto del tratamiento con altas concentraciones de calcio extracelular sobre la viabilidad y proliferación de las EPCs. La viabilidad fue medida usando el reactivo WST-1. Las EPCs fueron cultivadas con medio control (Ctrl = contiene 1,5 mM Ca^{2+}), EGTA = 0 mM Ca^{2+} , o medios suplementados con la cantidad de Ca^{2+} para alcanzar concentraciones de 3mM, 10 mM y 20 mM. No se observaron efectos en la proliferación y/o viabilidad de las EPCs. $p < 0,01 = **$89

Fig. 35 El gráfico muestra el efecto quimiotáctico que ejerce el calcio extracelular sobre las EPCs. En particular se observa una quimiotaxis dependiente de la concentración de calcio. Observándose un pico a los 10 mM. El VEGF fue utilizado como control positivo, mientras que el medio suplementado con 10 mM de Mg^{2+} (agonista del calcio) aunado a la inhibición de la quimiotaxis al bloquear el CaSR (AntiCaSR + 10 mM Ca^{2+}) demuestran el relevante papel del CaSR en la modulación de dicha respuesta biológica. *** = $p < 0,001$. **** = $p < 0,0001$90

Fig. 36 Expresión genética de vWF (A), CD31 (B), VEGF-A (C) e IGF-2 (D) en EPCs. Los gráficos indican claramente que el calcio extracelular induce la sobre-expresión de los diferentes genes evaluados. * = $p < 0,05$. ** = $p < 0,01$. *** = $p < 0,001$91

Fig. 37 *Angiogenesis PCR Array*. La imagen representa la expresión genética de 96 genes involucrados en rutas angiogénicas. Particularmente, se muestra la expresión de las EPCs estimuladas con 10 mM Ca^{2+} durante 3 días en comparación con la expresión de EPCs

cultivadas en condición control durante el mismo período de tiempo. Los cuadros en rojo representan genes sobre expresados, mientras que los cuadros marcados en verde representan genes reprimidos en comparación con el control.....92

Fig. 38 Formación de microcapilares en matrigel. En la figura se muestran capturas representativas de cada uno de los tratamientos aplicados. Tanto en las fotos como en el gráfico de barras se puede apreciar claramente el aumento de la cantidad de ramificaciones y microcapilares en los tratamientos que contienen VEGF y Ca²⁺, observándose el máximo índice de ramificación en el tratamiento de VEGF + 10 mM Ca²⁺. Mientras que el bloqueo del CaSR (AntiCaSR + Ca²⁺) inhibió completamente dicha respuesta celular.....95

Capítulo V: Papel del Calcio Extracelular y el CaSR en la diferenciación de las MSCs

Fig. 39 Expresión del CaSR en células madre mesenquimales cultivadas en condiciones control. (A) Fibras de actina en las MSCs reveladas con faloidina (rojo), el DAPI (azul) revela la presencia de los núcleos. (B) El marcaje con AntiCaSR (verde) revela la presencia del CaSR en la membrana plasmática (asteriscos), siendo particularmente fuerte la expresión del CaSR en las regiones de unión intercelular (flechas blancas). (C) En esta imagen se muestra la co-localización del CaSR y las fibras de actina (cabezas de flecha). (D) Control negativo, MSCs teñidas en ausencia del AntiCaSR. La barra de escala corresponde a 50 µm.....108

Fig. 40 Expresión genética del CaSR en MSCs cultivadas con medio de cultivo Control y medio con 10 mM Ca²⁺. El $\Delta\Delta Ct$ fue calculado normalizando la expresión del CaSR en las células tratadas con Ca²⁺ con la expresión en las muestras Control de cada período de tiempo. * = p<0,05. *** = p<0,001.....109

Fig. 41 Efecto del calcio extracelular sobre la proliferación y viabilidad de las MSCs. ** = p<0,01.....110

Fig. 42 Efecto del calcio extracelular y del CaSR en la quimiotaxis de MSCs. El gráfico muestra que el índice de migración en las células estimuladas con VEGF (control positivo) es estadísticamente igual al efecto observado con el tratamiento de 10 mM Ca²⁺. Mientras que los tratamientos de EGTA (0 mM Ca²⁺) y Ctrl (1,8 mM Ca²⁺) fueron estadísticamente iguales. La estimulación con 10 mM Mg²⁺ (agonista del calcio) y AntiCaSR + Ca²⁺ (bloqueo del CaSR + 10 mM Ca²⁺) demuestran que el CaSR está íntimamente involucrado en la respuesta quimiotáctica observada en las concentraciones de 3 mM y 10 mM Ca²⁺. * = p<0,05. ** = p<0,01.....111

Fig. 43 Papel del calcio extracelular en la expresión de los siguientes marcadores osteogénicos: (A) Fosfatasa alcalina (ALP), (B) Sialoproteína ósea (BSP), (C) Osteocalcina (OC), (D) Colágeno I (Col Ia1). * = p<0,05. ** = p<0,01. *** = 0,001.....112

Fig. 44 Papel del CaSR en la expresión genética del ALP y el Col Ia1 inducida por el tratamiento con 10 mM Ca²⁺. ** = p<0,01.....114

Fig. 45 Expresión a nivel proteico de la Fosfatasa Alcalina (ALP), Osteocalcina (OC), Osteopontina (OPN) en células madre mesenquimales cultivadas con medio control, 10 mM Ca²⁺ o medio osteogénico durante 7 días (A) o 15 días (B). Todas las imágenes fueron capturadas bajo las mismas condiciones de aumento e intensidad de los láseres. Las barras de escala representan 50 µm.....115

Fig. 46 Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en MSCs cultivadas en medio Control, 10 mM Ca²⁺, Medio osteogénico y 10 mM Ca²⁺ + Medio Osteogénico. * = p<0,05. ** = p<0,01. *** = p<0,001.....116

Fig. 47 Ensayo de mineralización. La tinción con rojo de alizarina reacciona con el calcio en forma de hidroxapatita o con los fosfatos de calcio, dando origen a un color rojo intenso. (A) se muestran imágenes de MSC cultivadas durante 7 días con medio control, 10 mM Ca²⁺, medio osteogénico (ost) y medio osteogénico + 10 mM Ca²⁺ (Ost + 10 mM Ca²⁺). Las imágenes fueron capturadas usando el Objetivo de 10X. (B) se muestran fotos macroscópicas correspondientes a la tinción con rojo de alizarina en cada uno de los tratamientos aplicados durante 10, 15 y 21 días. (C) Gráfico de barras que representa la concentración de Ca²⁺ en forma de fosfatos de calcio en la matriz extracelular en cada uno de los tratamientos. ** =p<0,01. *** =p<0,001.....118

Fig. 48 El CaSR es el principal modulador del efecto del calcio extracelular en la mineralización. (A) Imágenes que muestran los resultados de la tinción con rojo de alizarina en MSCs cultivadas durante 10 y 15 días con medio control, 10 mM Ca²⁺, medio osteogénico (Ost medium) y bloqueo del CaSR + 10 mM Ca²⁺. Se observa una marcada reducción de la mineralización de la matriz extracelular en las muestras AntiCaSR + 10 mM Ca²⁺. (B) gráfico de barras que representa la cantidad de calcio en la matriz extracelular de cada una de las muestras. Es de destacar que como consecuencia del bloqueo del CaSR la cantidad de calcio fue estadísticamente igual al control a los 10 días. Mientras que a los 15 días la cantidad de calcio fue la mitad de lo obtenido a partir de las MSCs cultivadas solo con 10 mM Ca²⁺. * = p<0,05. ** = p<0,01. *** =p<0,001.....119

Fig. 49 Diagrama resumen de las implicaciones de los efectos del calcio extracelular en la ingeniería de tejidos, basado en los resultados mostrados en el presente trabajo de investigación, aunados a conocimientos previos reportados en la literatura.....124

Capítulo VI: Papel del PLA/G5 y el calcio extracelular en la regeneración y formación de

hueso *in vivo*

Fig. 50 Respuesta tisular a la implantación de hidroxapatita (izquierda) y el *Bioglass*[®] (derecha) con el mismo tamaño de partículas (100-300 µm). Figura modificada a partir de (Oonishi *et al.*, 1999).....129

Fig. 51 Imágenes representativas de fotografías electrónicas del maxilar de pacientes tratados con partículas de S53P4 (A), y un paciente tratado con hueso autólogo (B), ambas fotografías fueron tomadas tras 62 semanas de la implantación. Imagen extraída de (Turunen *et al.*, 2004) . B: hueso. BG: vidrio bioactivo. LW: pared lateral del maxilar.....130

Fig. 52 Efectos proangiogénicos directos e indirectos del PLA/G5 sobre EPCs. Figura extraída de (Aguirre *et al.*, 2012).....131

Fig. 53 Diagrama ilustrativo del procedimiento desarrollado por (Ribatti *et al.*, 2006) para la evaluación de factores angiogénicos. Las imágenes muestran una escala representativa para realizar la medición semicuantitativa de la formación de vasos sanguíneos alrededor del implante. Figura extraída de (Ribatti *et al.*, 2006).....133

Fig. 54 Diagrama representativo del desarrollo de un embrión de pollo en el huevo, donde se muestra la posición del embrión, así como la de las diferentes membranas en las que se encuentra envuelto el embrión.....**134**

Fig. 55 Embrión de pollo de 3 días de desarrollo. Se observa el desarrollo de los vasos sanguíneos extraembrionarios, el órgano pulsátil (corazón primitivo), y el embrión en el estadio 17 (52-64 horas) según el manual de (Hamburger e Hamilton, 1992).....**135**

¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**Fig. 57** Integridad del ARN. En la parte superior se encuentra la imagen correspondiente a la electroforesis del ARN, donde se puede observar que la mayor proporción del ARN, correspondiente a las 6 condiciones, se encuentra en buen estado (A). El cuadro mostrado en la esquina inferior izquierda se encuentra la tabla correspondiente a la concentración de ARN de cada una de las 6 condiciones experimentales (B). Por último en la esquina inferior derecha se observa el resultado de una PCR clásica donde se midió la expresión de un gen constitutivo (P0) que se realizó para verificar la funcionalidad del ARN (C),.....**140**

Fig. 58 Análisis genético de múltiples marcadores relacionados con la formación de hueso “*Osteogenesis PCR Array*”. En la imagen se puede observar el nivel de expresión de los diferentes marcadores óseos en las muestras donde fueron implantados los andamios de PLA/G5 en comparación con las muestras donde fueron implantados los andamios de PLA. Los períodos de tiempo evaluados, fueron 3 y 15 días. Los cuadros en rojo representan genes sobre expresados, mientras que los cuadros marcados en verde representan genes reprimidos en comparación con el control.....**142**

Fig. 59 Análisis genético múltiple de marcadores relacionados con la formación de vasos sanguíneos “*Angiogenesis PCR Array*”. En la imagen se puede observar el nivel de expresión de los diferentes marcadores relacionados con la formación de vasos sanguíneos en las muestras donde fueron implantados los andamios de PLA/G5 en comparación con las muestras donde fueron implantados los andamios de PLA. Los períodos de tiempo evaluados, fueron 3 y 15 días. Los cuadros en rojo representan genes sobre expresados, mientras que los cuadros marcados en verde representan genes reprimidos en comparación con el control.....**144**

Fig. 60 PCR en tiempo real para medir la expresión de VEGF-A (A), metaloproteína 2 (MMP2) (B), morfoproteína ósea tipo 2 (BMP2) (C), y la metaloproteína 9 (MMP9) (D). La expresión genética fue evaluada en las muestras donde no se colocó implante (Empty), muestras donde se implantó PLA y PLA/G5. La expresión genética fue determinada por medio del método del $\Delta\Delta CT$ usando la expresión de las muestras sin implante (Empty) como referencia.....**146**

Fig. 61 Radiografías de rayos X realizadas mediante la técnica del μCT ex vivo. Los círculos rojos señalan la región donde fue realizado el defecto femoral. Fémures sin implante (Empty), fémures donde se implantaron andamios de ácido poliláctico (PLA), fémures donde se implantaron andamios de PLA/G5 (PLA/G5).....**147**

Fig. 62 Radiografías de rayos X realizadas mediante la técnica del μCT ex vivo. Los círculos rojos señalan la región donde fue realizado el defecto femoral. Fémures sin implante (Empty), fémures donde se implantaron andamios de ácido poliláctico (PLA), fémures donde se implantaron andamios de PLA/G5 (PLA/G5).....**148**

Fig. 63 Fracción ósea del volumen. La fracción ósea del volumen es la proporción de tejido óseo que se encuentra en el volumen correspondiente al defecto femoral. Volumen óseo (BV). Volumen Total (TV). Fémures sin implante (Empty), fémures donde se implantaron andamios

de ácido poliláctico (PLA), fémures donde se implantaron andamios de PLA/G5 (PLA/G5). * = p<0,05. ** = p<0,01.....149

Fig. 64 Ensayo de angiogénesis sobre la CAM. En la figura se observa la apariencia normal de un embrión de pollo de 13 días de desarrollo (control) en el cual no se colocó implante. El matrigel GFR (matrigel con una reducida cantidad de factores de crecimiento) no generó ningún tipo de respuesta angiogénica. Asimismo, los andamios de PLA no indujeron efectos pro-angiogénicos. En contraste la liberación de VEGF por parte de Matrigel GFR cargado con 1 µg/mL de VEGF (control positivo) indujo la formación y ramificación de vasos sanguíneos alrededor del implante. Similarmente, los implantes de PLA/G5 indujeron la formación de vasos sanguíneos alrededor de los andamios, observándose un alto grado de vascularización en el implante. Análogamente, el matrigel GFR cargado con 100 mM de Ca²⁺ promovió la formación una amplia red vascular alrededor del gel, encontrándose una alta densidad de vasos sanguíneos en la región del implante.....150

Fig. 65 Cuantificación de la densidad de vasos sanguíneos que rodean los implantes colocados sobre la membrana corioalantoidea (CAM). Diferentes imágenes de cada uno de los tratamientos aplicados fueron analizadas por medio de un software de tratamiento de imágenes (Adobe Photoshop), con la finalidad de cuantificar el número de pixels que ocupan los vasos sanguíneos alrededor de los implantes. El gráfico de barras muestra que el Matrigel GFR suplementado con 100 mM de calcio indujo la mayor densidad de vasos sanguíneos de todos los tratamientos, incluso mayor a la densidad observada en el control positivo (Matrigel GFR + 1 µg/mL de VEGF). Asimismo, el PLA/G5 indujo una mayor densidad de vasos sanguíneos respecto al PLA y el Matrigel GFR. * = p<0,05. ** = p<0,01.....151

8.6. Índice de Tablas

Capítulo I: Introducción

Tabla 1 Principales Materiales utilizados en Ingeniería de Tejidos Óseos y sus características. Extraída de (Szpalski, Wetterau, *et al.*, 2012).....18

Capítulo II: Metodología

Tabla 2 Anticuerpos primarios utilizados en la caracterización de las MSCs. Las diluciones fueron preparadas usando PBS-Gli-BSA como solvente.....32

Tabla 3 Anticuerpos secundarios. Las diluciones fueron preparadas usando PBS-Gli-BSA como solvente.....32

Tabla 4 Anticuerpos utilizados en la Citometría de flujo.....34

Tabla 5 Composición de los medios usados para el cultivo de MSCs.....35

Tabla 6 Composición de los medios usados para el cultivo de EPCs.....36

Tabla 7 Tratamientos evaluados en los ensayos de viabilidad y proliferación.....37

Tabla 8 Detalle de los tratamientos evaluados en los ensayos de Migración con MSCs.....39

Tabla 9 Detalle de los tratamientos evaluados en los ensayos de Migración con EPCs.....	39
Tabla 10 Detalle de los tratamientos evaluados en los ensayos de expresión genética.....	40
Tabla 11 Detalle de los cebadores específicos utilizados para revelar la expresión genética de marcadores osteoblásticos.....	41
Tabla 12 Detalle de los cebadores específicos utilizados para revelar la expresión genética de marcadores angiogénicos.....	41
Tabla 13 Anticuerpos usados para revelar la expresión a nivel proteico de marcadores osteoblasticos.....	44
Tabla 14 Ensayos en los que se evaluó el papel del CaSR.....	47
Tabla 15 Composición de los andamios utilizados en los ensayos <i>in vivo</i>	48
Tabla 16 Listado de cebadores utilizados en la PCR tiempo real de muestras <i>in vivo</i>	55
Tabla 17 Condiciones experimentales evaluadas en el sistema <i>Ex ovo</i>	58

Capítulo IV: Papel del Calcio extracelular y el CaSR en la diferenciación de las EPCs

Tabla 18 Resumen de la regulación de genes ocasionada por el tratamiento de EPCs con calcio extracelular durante 3 días.....	93
---	-----------

Capítulo VI: Papel del PLA/G5 y el calcio extracelular en la regeneración y formación de hueso *in vivo*

Tabla 20 Marcadores angiogénicos sobreexpresados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> en respuesta al PLA/G5 y al calcio extracelular. Los marcadores que remarcados en negritas corresponden a los genes que se repiten en al menos dos de las condiciones.....	154
---	------------

8.7. Abreviaciones

[Ca²⁺]₀: calcio extracelular.

AA: Ácido Ascórbico.

Actb: beta actina.

ADMEM: medio Eagle Modificado por Dulbecco avanzado.

ADN: ácido desoxiribonucleíco.

ADNc: ADN copia, proveniente de la retrotranscripción del ARN mensajero.

Agpt-2: Angiopoyetina tipo 2.

Ahsg: glicoproteína HS alfa 2.

Akt: Homólogo tipo 1 del oncogen de timoma viral V-akt murino.

ALP: fosfatasa alcalina.

Alpl: fosfatasa alcalina de hígado, hueso y riñón.

Ambn: ameloblastina.

Ang: angiogenina.

Angpt1: angiopoyetina tipo 1.

Anpep: alanil amilopeptidasa.

AntiCaSR + Ca²⁺: medio de cultivo control suplementado con 10 mM de Ca²⁺ y 20 ng/mL de AntiCaSR.

Anxa5: Anexina A5.

AR: rojo de alizarina.

ARN: ácido ribonucleico.

Bail: inhibidor de la angiogénesis específico cerebral tipo 1.

Bgn: también conocida como OC, osteocalcina.

Bmpr: receptor de la morproteína ósea.

BMPs: morfoproteínas óseas.

BSA: albúmina sérica bovina.

BSP: sialoproteína ósea.

Ca²⁺: ión calcio.

CAM: membrana corioalantoidea.

CaSR: receptor sensor de calcio.

CaP: fosfatos de calcio.

Ccl2: ligando tipo 2 de la quimioquina de motivos C-C.

CD105: Endoglina, glicoproteína de membrana extracelular.

CD11b: también conocida como integrina alfa M. Molécula de adhesión característica de macrófagos.

CD133: glicoproteína de superficie celular. Marcador de células hematopoyéticas y células endoteliales progenitoras.

CD166: molécula de adhesión celular también conocida como ALCAM.

CD19: antígeno característico de linfocitos.

CD29: Integrina $\beta 1$. Molécula de adhesión.

CD31: también conocido como PECAM. Proteína transmembrana característica de células endoteliales.

CD34: receptor de membrana extracelular característico de EPCs y células hematopoyéticas.

CD36: receptor de la trombospodina.

CD44: glicoproteína de membrana extracelular involucrada en la interacción célula-célula.

CD45: antígeno característico de linfocitos.

CD73: ectonucleotidasa número 5.

CD90: también conocido como Thy. Glicoproteína de membrana con posibles funciones en la interacción célula-célula y célula-ligando.

Cdh11: cadherina tipo 11.

Cdh5: cadherina tipo 5.

Cfs3: factor de estimulación de colonias de granulocitos.

Col Ia1: procolágeno tipo I.

Col: colágeno.

Col18a1: cadena alfa 1 del colágeno 18.

Col4a3: cadena alfa 3 del colágeno 4.

Comp: proteína oligomérica de matriz de cartílago.

Csf: factor estimulante de colonias.

Ctgf: factor de crecimiento de tejido conectivo.

Ctrl: control.

Ctsk: catepsina K.

Cxcl 1: ligando tipo 1 de la quimioquinas de motivos C-X-C.

Cxcl2: ligando tipo 2 de la quimioquinas de motivos C-X-C.

Cxcl9: ligando tipo 9 de la quimioquinas de motivos C-X-C.

DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol, dihidrocloruro. Marcador fluorescente del núcleo.

Dmp1: fosfoproteína ácida de matriz de dentina.

DMSO: dimetilsulfoxido.

Ecgf1: factor de crecimiento plaquetario derivado de células endoteliales.

Edg1: también conocido como S1P1, gen tipo 1 de diferenciación endotelial.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético. Quelante de calcio.

Efna 2: efrina tipo 2.

Efna 5: efrina tipo 5.

Efna1: efrina tipo 1.

EGF: factor de crecimiento epidérmico.

EGTA: ácido tetracético de etilenglicol, agente quelante de calcio.

ELPs: polímeros similares a la elastina.

Enam: Enamelina.

Eng: endoglina.

Epas1: también conocido como HIF 2A, factor de transcripción inducible por hypoxia tipo 2.

EPCs: células progenitoras endoteliales.

Ereg: erregulina.

ERK ½: quinasa regulada por señales extracelulares.

ESC: células madre embrionarias.

F2: trombina.

FGF-2: factor de crecimiento fibroblástico tipo 2.

Fgfr: receptor del factor de crecimiento fibroblástico.

Flt1: también conocido como VEGFR1, receptor tipo 1 del VEGF.

FN: fibronectina.

Fzd5: homólogo 5 de la proteína *Frizzled*. Receptor de las proteínas Wnt.

G5: vidrio bioactivo de fosfato de calcio del sistema P₂O₅-CaO-Na₂O-TiO₂.

GAPDH: gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa. Proteína constitutiva involucrada en la respiración celular.

Gdf10: factor de diferenciación tipo 10. También conocida como BMP3b.

GFR Matrigel: matrigel con reducidos factores de crecimiento.

GPRC: receptores acoplados a proteínas G.

HA: hidroxapatita.

Hgf: factor de crecimiento de hepatocitos.

Hif1a: factor de transcripción inducible por hipoxia tipo 1.

HUVEC: células endoteliales de cordón umbilical humano.

Icam: molécula de adhesión intercelular.

Id1: inhibidor de la unión del ADN tipo 1.

Id3: inhibidor de la unión del ADN tipo 3.

Ifna1: interferón alfa 1.

Ifnb1: interferón beta 1.

Ifng: interferón gamma.

IGF I: factor de crecimiento insulínico tipo I.

IGF II: factor de crecimiento insulínico tipo II.

IGFBP-3: proteína de anclaje del factor de crecimiento similar a la insulina.

IL-1b: Interleucina tipo 1.

IL-6: Interleucina tipo 6.

iPS: células madre inducidas.

Itga5: integrina alfa 5.

Itgav: integrina alfa V.

Itgb3: integrina beta 3.

Jag 1: gen Jagged.

Lama 5: laminina.

Lect1: proteína quimiotáctica derivada de leucocitos.

Lep: Leptina.

L-Glu: L-Glutamina.

MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos.

Mdk: factor promotor de crecimiento de neuritas tipo 2.

Mmp: metaloproteinasas.

MSCs: células madre mesenquimales.

NF- κ B: Factor de transcripción conocido como factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

Nrp: neuropilina.

OC: Osteocalcina.

OPG: Osteoprotegerina.

OPN: Osteopontina.

Ost: medio osteogénico.

P/E: penicilina estreptomina.

PBS: solución tampón de fosfato.

PBS-Gli: PBS suplementado con 0,15 g/L de Glicina.

PBS-Gli-BSA: PBS-Gli suplementado con 3 % p/v de BSA.

Pdgf: polipéptido alfa del factor de crecimiento plaquetario.

PFA: paraformaldehído.

Pgf: factor de crecimiento placentario.

Phex: Fosfato regulador de la endopeptidasa. Involucrada en la mineralización ósea y de la dentina.

PI4K: fosfatidil inositol 4 quinasa.

PKA: proteína quinasa A.

PKC: proteína quinasa C.

PLA/G5: andamios compuestos de ácido poliláctico y 50 % de G5.

PLA: ácido poliláctico.

Plau: uroquinasa, activador del plasminogeno.

PLC: fosfolipasa C.

Plg: plasminogeno.

PO₄⁻: ión fosfato.

Ptgs1: prostaglandina peroxidasa sintetasa tipo 1.

PTH: hormona paratiroidea.

RANK: receptor del RANKL.

RANKL: ligando activador del receptor NF- κ B

RGDs: polipéptidos de adhesión conformados por Arginina, Glicina y Ácido Aspártico.

Runx2: también conocido como Cbfa1. Factor de transcripción específico de osteoblastos.

Scarb1: análogo de CD36. Miembro tipo 1 del receptor de macrófagos.

Serpin: inhibidor serpin peptidasa.

SFB: suero fetal bovino.

Smad: factor de transcripción activado por BMP.

Sost: esclerosteosis. Regulador negativo del crecimiento óseo.

Sox9: factor de transcripción importante en el desarrollo normal del hueso.

Sphk1: esfingosina quinasa tipo 1.

Stro 1: marcador de superficie celular característico de células de médula ósea.

Tbx4: factor de transcripción de la caja T.

Tek: también conocido como Tie-2, receptor de la angiopoyetina 1.

Tfip11: proteína involucrada en la diferenciación de odontoblastos y la formación de la matriz extracelular del esmalte.

TGF β : factor de crecimiento transformante beta.

Tgfr: receptor del factor de crecimiento transformante β .

Thbs4: trombospondina.

Timp: inhibidor de metaloproteinasas.

TNF α : Factor de Necrosis tumoral alfa.

Tuft1: tuftelina. Involucrada en la mineralización del esmalte.

Twist: factor de transcripción homólogo de Twist. Involucrado en la represión de los efectos pro-inflamatorios de las citocinas como el TNF α , y el IL-1b.

Vcam: molécula de adhesión vascular.

Vdr: vitamina D.

VEGF: factor de crecimiento epidérmico vascular.

VEGFR 2: receptor del VEGF tipo 2 también conocido como Kdr y Flk-1.

VSMCs: células de músculo liso vasculares.

vWF: Factor de vonWillebrand.

β -TCP: fosfato tricálcico beta.

9. Referencias

1. ADAMS, G. B. et al. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. **Nature**, v. 439, n. 7076, p. 599-603, Feb 2006. ISSN 1476-4687. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16382241> >.
2. AGUIRRE, A. et al. Control of microenvironmental cues with a smart biomaterial composite promotes endothelial progenitor cell angiogenesis. **European cells & materials**, v. 24, p. 90-106, 2012 2012.
3. _____. Extracellular calcium modulates in vitro bone marrow-derived Flk-1(+) CD34(+) progenitor cell chemotaxis and differentiation through a calcium-sensing receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 1, p. 156-161, FEB 26 2010 2010.
4. AHLSTROM, M. et al. Extracellular calcium regulates parathyroid hormone-related peptide expression in osteoblasts and osteoblast progenitor cells. **Bone**, v. 42, p. 483-490, 2008.
5. AHMED, I. et al. Phosphate glasses for tissue engineering: Part 1. Processing and characterisation of a ternary-based P2O5-CaO-Na2O glass system. **Biomaterials**, v. 25, n. 3, p. 491-9, Feb 2004a. ISSN 0142-9612. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14585698> >.
6. _____. Phosphate glasses for tissue engineering: Part 2. Processing and characterisation of a ternary-based P2O5-CaO-Na2O glass fibre system. **Biomaterials**, v. 25, n. 3, p. 501-7, Feb 2004b. ISSN 0142-9612. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14585699> >.
7. ALBERTS, B. et al. **Biología Molecular de la Célula**. 5ta Edición. Barcelona, España: 2010.
8. ARTHUR, A.; ZANNETTINO, A.; GRONTHOS, S. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. **J Cell Physiol**, v. 218, n. 2, p. 237-45, Feb 2009. ISSN 1097-4652. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18792913> >.
9. ASAHARA, T.; KAWAMOTO, A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 287, n. 3, p. C572-9, Sep 2004. ISSN 0363-6143. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15308462> >.
10. ASAHARA, T.; KAWAMOTO, A.; MASUDA, H. Concise review: Circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. **Stem Cells**, v. 29, n. 11, p. 1650-5, Nov 2011. ISSN 1549-4918. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21948649> >.
11. ASAHARA, T. et al. Isolation of Putative Progenitor Endothelial cells for Angiogenesis. **Science**, v. 275, p. 964-967, 1997.
12. ASAI, J. et al. Topical application of ex vivo expanded endothelial progenitor cells promotes vascularisation and wound healing in diabetic mice. **Int Wound J**, Jun 2012. ISSN 1742-481X. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22738265> >.
13. AUERBACH, R.; AUERBACH, W.; POLAKOWSKI, I. Assays for angiogenesis: a review. **Pharmacol Ther**, v. 51, n. 1, p. 1-11, 1991. ISSN 0163-7258. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1722898> >.
14. AUERBACH, R. et al. A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos. **Dev Biol**, v. 41, n. 2, p. 391-4, Dec 1974. ISSN 0012-1606. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4452416> >.
15. AUGUSTIN, H. G. et al. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 3, p. 165-77, Mar 2009. ISSN 1471-0080. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19234476> >.

16. BADYLAK, S. F.; NEREM, R. M. Progress in tissue engineering and regenerative medicine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 8, p. 3285-6, Feb 2010. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20181571> >.
17. BARRADAS, A. M. C. et al. A calcium-induced signaling cascade leading to osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Biomaterials**, v. 33, n. 11, p. 3205-3215, Apr 2012. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000301561300013 >.
18. BARTHOLOMEW, A. et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. **Exp Hematol**, v. 30, n. 1, p. 42-8, Jan 2002. ISSN 0301-472X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11823036> >.
19. BHATTACHARYA, V. et al. Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34(+) bone marrow cells. **Blood**, v. 95, n. 2, p. 581-5, Jan 2000. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10627466> >.
20. BOYER, M. et al. Isolation of endothelial cells and their progenitor cells from human peripheral blood. **J Vasc Surg**, v. 31, n. 1 Pt 1, p. 181-9, Jan 2000. ISSN 0741-5214. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10642721> >.
21. BREITWIESER, G. E. Extracellular calcium as an integrator of tissue function. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, n. 8, p. 1467-1480, 2008.
22. BROWN, E. M. Biology of the Extracellular Ca²⁺-Sensing Receptor. In: (Ed.). **Principles of Bone Biology**. 3rd Edition: Academic Press Inc., 2008. cap. 26, p.533-553.
23. _____. Role of the calcium-sensing receptor in extracellular calcium homeostasis. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, n. 0, 2013. ISSN 1521-690X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521690X13000249> >.
24. BROWN, E. M.; MACLEOD, R. J. Extracellular Calcium Sensing and Extracellular Calcium Signaling. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 1, p. 239-297, 2001.
25. BU, L. et al. Improved model building and assessment of the Calcium-sensing receptor transmembrane domain. **Proteins**, v. 71, p. 215-226, 2008.
26. BUKOSKI, R. D. et al. Perivascular sensory nerve Ca²⁺ receptor and Ca²⁺-induced relaxation of isolated arteries. **Hypertension**, v. 30, n. 6, p. 1431-9, Dec 1997. ISSN 0194-911X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9403564> >.
27. BURGE, R. et al. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. **J Bone Miner Res**, v. 22, n. 3, p. 465-75, Mar 2007. ISSN 0884-0431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17144789> >.
28. CAPLAN, A. I. Mesenchymal Stem Cells: The Past, the Present, the Future. **Cartilage**, v. 1, n. 1, p. 6-9, January 1, 2010. Disponível em: < <http://car.sagepub.com/content/1/1/6.short> >.
29. CASE, J. et al. Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. **Exp Hematol**, v. 35, n. 7, p. 1109-18, Jul 2007. ISSN 0301-472X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17588480> >.
30. CHANG, W. et al. Expression and signal transduction of calcium-sensing receptors in cartilage and bone. **Endocrinology**, v. 140, n. 12, Dec. 1999. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <Go to ISI>://BIOSIS:PREV200000066212 >.
31. CHAPEL, A. et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. **J Gene Med**, v. 5,

- n. 12, p. 1028-38, Dec 2003. ISSN 1099-498X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14661178> >.
32. CHATTOPADHYAY, N. et al. Mitogenic Action of Calcium-Sensing Receptor on Rat Calvarial Osteoblasts. **Endocrinology**, v. 145, n. 7, p. 3451-3462, 2004.
 33. CHEN, Q. Z.; THOMPSON, I. D.; BOCCACCINI, A. R. 45S5 Bioglass-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 11, p. 2414-25, Apr 2006. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16336997> >.
 34. CIMPEAN, A. M.; RIBATTI, D.; RAICA, M. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to study tumor metastasis. **Angiogenesis**, v. 11, n. 4, p. 311-9, 2008. ISSN 1573-7209. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18780151> >.
 35. CORELI, M. et al. Perivascular Ancestors of Adult Multipotent Stem Cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, p. 1103-1109, 2010.
 36. DA SILVA M, L. et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine & Growth factor Reviews**, v. 20, p. 419-427, 2009.
 37. DERYUGINA, E. I.; QUIGLEY, J. P. Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. **Histochem Cell Biol**, v. 130, n. 6, p. 1119-30, Dec 2008. ISSN 0948-6143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19005674> >.
 38. DEVINE, S. M. et al. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. **Blood**, v. 101, n. 8, p. 2999-3001, Apr 2003. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12480709> >.
 39. DIMITRIOU, R.; TSIRIDIS, E.; GIANNOUDIS, P. V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. **Injury**, v. 36, n. 12, p. 1392-404, Dec 2005. ISSN 0020-1383. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102764> >.
 40. DVORAK, M. M.; RICCARDI, D. Ca²⁺ as an extracellular signal in bone. **Cell Calcium**, v. 35, n. 3, p. 249-55, Mar 2004. ISSN 0143-4160. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15200148> >.
 41. DVORAK, M. M. et al. Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calcitropic hormones. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 14, p. 5140-5, Apr 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15051872> >.
 42. DVORAK-EWELL, M. M. et al. Osteoblast extracellular Ca²⁺ -sensing receptor regulates bone development, mineralization, and turnover. **J Bone Miner Res**, v. 26, n. 12, p. 2935-47, Dec 2011. ISSN 1523-4681 (Electronic)
 43. 0884-0431 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21956637 >.
 44. EDWARDS, G.; WESTON, A. H. Potassium and potassium clouds in endothelium-dependent hyperpolarizations. **Pharmacol Res**, v. 49, n. 6, p. 535-41, Jun 2004. ISSN 1043-6618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15026031> >.
 45. FAUCI, A. et al. **Harrison's Principles of Internal Medicine**. 17th Edition. McGraw-Hill 2008. 2958.
 46. FIEDLER, U.; AUGUSTIN, H. G. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. **Trends Immunol**, v. 27, n. 12, p. 552-8, Dec 2006. ISSN 1471-4906. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17045842> >.

47. FREEMONT, A. J. Basic bone cell biology. **Int J Exp Pathol**, v. 74, n. 4, p. 411-6, Aug 1993. ISSN 0959-9673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8398815> >.
48. FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. THE DEVELOPMENT OF FIBROBLAST COLONIES IN MONOLAYER CULTURES OF GUINEA-PIG BONE MARROW AND SPLEEN CELLS. **Cell Proliferation**, v. 3, n. 4, p. 393-403, 1970.
49. FUKUDA, R. et al. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. **J Biol Chem**, v. 277, n. 41, p. 38205-11, Oct 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12149254> >.
50. GALLAGHER, J. C.; SAI, A. J. Molecular biology of bone remodeling: implications for new therapeutic targets for osteoporosis. **Maturitas**, v. 65, n. 4, p. 301-7, Apr 2010. ISSN 1873-4111. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20116187> >.
51. HABIBOVIC, P.; DE GROOT, K. Osteoinductive biomaterials--properties and relevance in bone repair. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 1, n. 1, p. 25-32, 2007 Jan-Feb 2007. ISSN 1932-6254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18038389> >.
52. HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. **Dev Dyn**, v. 195, n. 4, p. 231-72, Dec 1992. ISSN 1058-8388. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1304821> >.
53. HARTING, M. et al. Immunophenotype characterization of rat mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**, v. 10, n. 3, p. 243-53, 2008. ISSN 1477-2566. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18418770> >.
54. HENCH, L. L. Biomaterials. **Science**, v. 208, n. 4446, p. 826-31, May 1980. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6246576> >.
55. HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third generation biomedical materials. **Science**, v. 295, n. 5557, p. 1014-1017, 2002.
56. HENCH, L. L.; XYNOS, I. D.; POLAK, J. M. Bioactive glasses for in situ tissue regeneration. **J Biomater Sci Polym Ed**, v. 15, n. 4, p. 543-62, 2004. ISSN 0920-5063. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15212333> >.
57. HERBERT, S. P.; STAINIER, D. Y. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12, n. 9, p. 551-64, Sep 2011. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21860391> >.
58. HOFER, A. M.; BROWN, E. M. Extracellular calcium sensing and signalling. **Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 7, p. 530-538, 2003.
59. HOLLOWAY, E. T.; BOHR, D. F. Reactivity of vascular smooth muscle in hypertensive rats. **Circ Res**, v. 33, n. 6, p. 678-85, Dec 1973. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4357568> >.
60. HOPPE, A.; GUELDAL, N. S.; BOCCACCINI, A. R. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, Apr 2011. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000288465800008 >.
61. HORWITZ, E. M. et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. **Nat Med**, v. 5, n. 3, p. 309-13, Mar 1999. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10086387> >.

62. HOUSE, M. G. et al. Expression of an extracellular calcium-sensing receptor in human and mouse bone marrow cells. **J Bone Miner Res**, v. 12, n. 12, p. 1959-70, Dec 1997. ISSN 0884-0431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9421228> >.
63. HRISTOV, M.; ERL, W.; WEBER, P. C. Endothelial progenitor cells: isolation and characterization. **Trends Cardiovasc Med**, v. 13, n. 5, p. 201-6, Jul 2003. ISSN 1050-1738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12837583> >.
64. IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 3, p. 589-601, 2006.
65. INGRAM, D. A.; CAPLICE, N. M.; YODER, M. C. Unresolved question, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. **Blood**, v. 106, n. 5, p. 1525-1531, 2005.
66. ISHIKAWA, T. et al. Mouse Wnt receptor gene Fzd5 is essential for yolk sac and placental angiogenesis. **Development**, v. 128, n. 1, p. 25-33, Jan 2001. ISSN 0950-1991. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11092808> >.
67. JAIN, R. K. Molecular regulation of vessel maturation. **Nat Med**, v. 9, n. 6, p. 685-93, Jun 2003. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778167> >.
68. JANSSEN, F. W. et al. A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone: in vivo bone formation showing proof of concept. **Biomaterials**, v. 27, n. 3, p. 315-23, Jan 2006. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16125223> >.
69. JOGGERST, S. J.; HATZOPOULOS, A. K. Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers. **Experts Reviews in molecular medicine**, v. 11, n. 20, p. 1-20, 2009.
70. JOHNSON, K. E. **Histology and Cell Biology**. Williams & Wilkins, 1991. ISBN 9780683062106. Disponível em: < <http://books.google.es/books?id=KHttQgAACAAJ> >.
71. JONES, J. R. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. **Acta Biomater**, v. 9, n. 1, p. 4457-86, Jan 2013. ISSN 1878-7568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22922331> >.
72. KALKA, C. et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 7, p. 3422-7, Mar 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10725398> >.
73. KARAOZ, E. et al. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 132, n. 5, p. 533-546, Nov 2009. ISSN 0948-6143. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000271026000006 >.
74. KAULLY, T. et al. Vascularization—The Conduit to Viable Engineered Tissues. **TISSUE ENGINEERING: Part B**, p. 1-11, 2009.
75. KAWAMOTO, A. et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. **Circulation**, v. 103, n. 5, p. 634-7, Feb 2001. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11156872> >.
76. KIFOR, O. et al. Regulation of MAP kinase by calcium-sensing receptor in bovine parathyroid and CaR-transfected HEK293 cells. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 280, n. 2, p. F291-302, Feb 2001. ISSN 1931-857X (Print)
77. 1522-1466 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11208605 >.

78. KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, n. 15, p. 2907-15, May 2006. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16448693> >.
79. KOVACIC, J. C. et al. Endothelial progenitor cells, angioblasts, and angiogenesis--old terms reconsidered from a current perspective. **Trends Cardiovasc Med**, v. 18, n. 2, p. 45-51, Feb 2008. ISSN 1050-1738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18308194> >.
80. KULTERER, B. et al. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. **BMC Genomics**, v. 8, p. 70, 2007. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17352823> >.
81. LIECHTY, K. W. et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. **Nat Med**, v. 6, n. 11, p. 1282-6, Nov 2000. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11062543> >.
82. LOKMAN, N. A. et al. Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay as an In Vivo Model to Study the Effect of Newly Identified Molecules on Ovarian Cancer Invasion and Metastasis. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 8, p. 9959-70, 2012. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22949841> >.
83. LORGET, F. et al. High extracellular calcium concentrations directly stimulate osteoclast apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 268, n. 3, p. 899-903, Feb 2000. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10679302> >.
84. LOVETT, M. et al. Vascularization strategies for tissue engineering. **Tissue Eng Part B Rev**, v. 15, n. 3, p. 353-70, Sep 2009. ISSN 1937-3376. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19496677> >.
85. LUTOLF, M. P.; GILBERT, P. M.; BLAU, H. M. Designing materials to direct stem-cell fate. **Nature**, v. 462, n. 7272, p. 433-41, Nov 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19940913> >.
86. MAENG, Y.-S. et al. Endothelial progenitor cell homing: prominent role of the IGF2-IGF2R-PLC β 2 axis. **Blood**, v. 113, p. 233-243, 2009.
87. MAENO, S. et al. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. **Biomaterials**, v. 26, n. 23, p. 4847-4855, Aug 2005. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000228315900016 >.
88. MARIE, P. J. The calcium-sensing receptor in bone cells: a potential therapeutic target in osteoporosis. **Bone**, v. 46, n. 3, p. 571-6, Mar 2010. ISSN 1873-2763. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19660583> >.
89. MARIEB, E.; BOSTWICK-TAYLOR, P. Essentials of Human Anatomy & Physiology. Florence-Darlington Technical College, 2009. Disponível em: < <http://s8rsience.com/Anatomy/wp-content/uploads/2012/10/fractures.pdf> >.
90. MASCKAUCHÁN, T. N.; KITAJEWSKI, J. Wnt/Frizzled signaling in the vasculature: new angiogenic factors in sight. **Physiology (Bethesda)**, v. 21, p. 181-8, Jun 2006. ISSN 1548-9213. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16714476> >.
91. MCCAULEY, L. K.; NOHUTCU, R. M. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. **J Periodontol**, v. 73, n. 11, p. 1377-91, Nov 2002. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12479643> >.
92. MEIJER, G. J. et al. Cell-based bone tissue engineering. **PLoS Med**, v. 4, n. 2, p. e9, Feb 2007. ISSN 1549-1676. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17311467> >.

93. MELERO-MARTIN, J. M. et al. In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. **Blood** v. 109, n. 11, p. 4761-4768, 2007.
94. MURASAWA, S.; ASAHARA, T. Endothelial Progenitor Cells for Vasculogenesis. **Physiology**, v. 20, p. 36-42, 2004.
95. MURPHY, S. V.; ATALA, A. Organ engineering - combining stem cells, biomaterials, and bioreactors to produce bioengineered organs for transplantation. **Bioessays**, v. 35, n. 3, p. 163-72, Mar 2013. ISSN 1521-1878. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22996568> >.
96. NAVARRO, M. et al. Surface characterization and cell response of a PLA/CaP glass biodegradable composite material. **J Biomed Mater Res A**, v. 85, n. 2, p. 477-86, May 2008. ISSN 1552-4965. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17729262> >.
97. NAVARRO, M.; GINEBRA, M. P.; PLANELL, J. A. Cellular response to calcium phosphate glasses with controlled solubility. **J Biomed Mater Res A**, v. 67, n. 3, p. 1009-15, Dec 2003. ISSN 1549-3296. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14613251> >.
98. NAVARRO, M. et al. In vitro degradation behavior of a novel bioresorbable composite material based on PLA and a soluble CaP glass. **Acta Biomaterialia**, v. 1, n. 4, p. 411-419, Jul 2005. ISSN 1742-7061. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000235057200006 >.
99. _____. Development and cell response of a new biodegradable composite scaffold for guided bone regeneration. **J Mater Sci Mater Med**, v. 15, n. 4, p. 419-22, Apr 2004. ISSN 0957-4530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15332610> >.
100. _____. Physicochemical Degradation of Titania-Stabilized Soluble Phosphate Glasses for Medical Applications. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 86, n. 8, p. 1345--1352, 2003. ISSN 1551-2916. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1151-2916.2003.tb03474.x> >.
101. NOVOSEL, E. C.; KLEINHANS, C.; KLUGER, P. J. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 63, n. 4-5, p. 300-11, Apr 2011. ISSN 1872-8294. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21396416> >.
102. OHANIAN, J. et al. Evidence for a functional calcium-sensing receptor that modulates myogenic tone in rat subcutaneous small arteries. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 288, n. 4, p. H1756-62, Apr 2005. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15576443> >.
103. OLSZAK, I. T. et al. Extracellular calcium elicits a chemokinetic response from monocytes in vitro and in vivo. **J Clin Invest**, v. 105, n. 9, p. 1299-305, May 2000. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10792005> >.
104. ONO, M. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. **Cancer Sci**, v. 99, n. 8, p. 1501-6, Aug 2008. ISSN 1349-7006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18754859> >.
105. OONISHI, H. et al. Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes. **J Biomed Mater Res**, v. 44, n. 1, p. 31-43, Jan 1999. ISSN 0021-9304. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10397902> >.
106. _____. Quantitative comparison of bone growth behavior in granules of Bioglass, A-W glass-ceramic, and hydroxyapatite. **J Biomed Mater Res**, v. 51, n. 1, p. 37-46, Jul 2000. ISSN 0021-9304. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10813743> >.

- 107.PAN, H. B. et al. Strontium borate glass: potential biomaterial for bone regeneration. **J R Soc Interface**, v. 7, n. 48, p. 1025-31, Jul 2010. ISSN 1742-5662. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20031984>>.
- 108.PAREKKADAN, B.; MILWID, J. M. Mesenchymal stem cells as therapeutics. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 12, p. 87-117, Aug 2010. ISSN 1545-4274. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20415588>>.
- 109.PARFITT, A. M. Plasma calcium control at quiescent bone surfaces: a new approach to the homeostatic function of bone lining cells. **Bone**, v. 10, n. 2, p. 87-8, 1989. ISSN 8756-3282. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2765314>>.
- 110.PECHAK, D. G.; KUJAWA, M. J.; CAPLAN, A. I. Morphological and histochemical events during first bone formation in embryonic chick limbs. **Bone**, v. 7, n. 6, p. 441-58, 1986a. ISSN 8756-3282. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3541986>>.
- 111._____. Morphology of bone development and bone remodeling in embryonic chick limbs. **Bone**, v. 7, n. 6, p. 459-72, 1986b. ISSN 8756-3282. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3801237>>.
- 112.PI, M. et al. Identification of a Novel Extracellular Cation-sensing G-protein-coupled Receptor. **J Biol Chem**, v. 280, n. 48, p. 40201–40209, 2005.
- 113.PI, M.; HINSON, T. K.; QUARLES, L. D. Failure to detect the extracellular calcium-sensing receptor (CasR) in human osteoblast cell lines. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 8, Aug 1999. ISSN 0884-0431. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000081682000007 >.
- 114.PI, M. et al. Impaired Osteoblast Function in GPRC6A Null Mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 5, p. 1092-1102, May 2010. ISSN 0884-0431. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000278292100020 >.
- 115.PLACE, E. S.; EVANS, N. D.; STEVENS, M. M. Complexity in biomaterials for tissue engineering. **Nat Mater**, v. 8, n. 6, p. 457-70, Jun 2009. ISSN 1476-1122. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19458646>>.
- 116.PYNE, S.; PYNE, N. J. Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. **Biochem J**, v. 349, n. Pt 2, p. 385-402, Jul 2000. ISSN 0264-6021. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10880336>>.
- 117.QIN, L.; ZHANG, M. Maspin regulates endothelial cell adhesion and migration through an integrin signaling pathway. **J Biol Chem**, v. 285, n. 42, p. 32360-9, Oct 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20713357>>.
- 118.QUARLES, L. D. et al. A distinct cation-sensing mechanism in MC3T3-E1 osteoblasts functionally related to the calcium receptor. **J Bone Miner Res**, v. 12, n. 3, p. 393-402, Mar 1997. ISSN 0884-0431. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9076582>>.
- 119.QUARTO, R. et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. **N Engl J Med**, v. 344, n. 5, p. 385-6, Feb 2001. ISSN 0028-4793. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11195802>>.
- 120.RAHAMAN, M. N. et al. Bioactive glass in tissue engineering. **Acta Biomater**, v. 7, n. 6, p. 2355-73, Jun 2011. ISSN 1878-7568. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21421084>>.
- 121.RAUH, J. et al. Bioreactor systems for bone tissue engineering. **Tissue Eng Part B Rev**, v. 17, n. 4, p. 263-80, Aug 2011. ISSN 1937-3376. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21495897>>.

122. REZWAN, K. et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 18, p. 3413-31, Jun 2006. ISSN 0142-9612. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16504284> >.
123. RIBATTI, D. et al. The gelatin sponge-chorioallantoic membrane assay. **Nat Protoc**, v. 1, n. 1, p. 85-91, 2006. ISSN 1750-2799. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406216> >.
124. _____. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. **Int J Dev Biol**, v. 40, n. 6, p. 1189-97, Dec 1996. ISSN 0214-6282. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9032025> >.
125. RINGE, J. et al. Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. **Naturwissenschaften**, v. 89, n. 8, p. 338-351, Aug 2002. ISSN 0028-1042. Disponible em: < <Go to ISI>://WOS:000177897500002 >.
126. RIVRON, N. C. et al. Engineering Vascularised Tissues in vitro. **European Cells and Materials**, v. 15, p. 27-40, 2008.
127. ROJEWSKI, M. T.; WEBER, B. M.; SCHREZENMEIER, H. Phenotypic Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Various Tissues. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 35, p. 168-184, 2008.
128. ROSS, M.; KAYE, G.; PAWLINA, W. **Histología. Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular**. 4a Edición. Buenos Aires-Argentina: 2005. 182-203.
129. ROUWKEMA, J.; RIVRON, N. C.; VAN BLITTERSWIJK, C. A. Vascularization in tissue engineering. **Cell Press**, v. 26, n. 8, 2008.
130. ROZMAN, C. **Compendio de Medicina Interna**. 4ta Edición. 2009.
131. SAKURAI, T.; KUDO, M. Signaling pathways governing tumor angiogenesis. **Oncology**, v. 81 Suppl 1, p. 24-9, 2011. ISSN 1423-0232. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22212932> >.
132. SALGADO, A. J.; COUTINHO, O. P.; REIS, R. L. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. **Macromol Biosci**, v. 4, n. 8, p. 743-65, Aug 2004. ISSN 1616-5187. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15468269> >.
133. SANTOS, M. I.; REIS, R. L. Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. **Macromol Biosci**, v. 10, n. 1, p. 12-27, Jan 2010. ISSN 1616-5195. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19688722> >.
134. SANZANA, E. S. et al. Of the in vivo behavior of calcium phosphate cements and glasses as bone substitutes. **Acta Biomater**, v. 4, n. 6, p. 1924-33, Nov 2008. ISSN 1878-7568. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18539102> >.
135. SCHEPERS, E. J.; DUCHEYNE, P. Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: a 1-24 month experiment with several materials and particle sizes and size ranges. **J Oral Rehabil**, v. 24, n. 3, p. 171-81, Mar 1997. ISSN 0305-182X. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9131472> >.
136. SCHROEDER, J. E.; MOSHEIFF, R. Tissue engineering approaches for bone repair: concepts and evidence. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 609-13, Jun 2011. ISSN 1879-0267. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21489529> >.
137. SEEBACH, C. et al. Endothelial progenitor cells improve directly and indirectly early vascularization of mesenchymal stem cell-driven bone regeneration in a critical bone defect in rats. **Cell Transplant**, v. 21, n. 8, p. 1667-77, 2012. ISSN 1555-3892. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22507568> >.

138. SHALHOUB, V. et al. In vitro studies with the calcimimetic, cinacalcet HCl, on normal human adult osteoblastic and osteoclastic cells. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, v. 13, n. 2-4, p. 89-106, 2003. ISSN 1045-4403. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14696958> >.
139. SHARAN, K. et al. Role of calcium-sensing receptor in bone biology. **Indian J Med Res**, v. 127, n. 3, p. 274-86, Mar 2008. ISSN 0971-5916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18497443> >.
140. SIKDER, H. A. et al. Id proteins in cell growth and tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 3, n. 6, p. 525-30, Jun 2003. ISSN 1535-6108. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12842081> >.
141. SILVER, I. A.; MURRILLS, R. J.; ETHERINGTON, D. J. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 2, p. 266-276, Apr 1988. ISSN 0014-4827.
142. SIMMONS, P. J.; TOROK-STORB, B. Identification of Stromal Cell Precursors in Human Bone Marrow by a Novel Monoclonal Antibody, STRO-1. **Blood**, v. 78, n. 1, p. 55-62, 1991.
143. SINGH, S.; WU, B. M.; DUNN, J. C. Delivery of VEGF using collagen-coated polycaprolactone scaffolds stimulates angiogenesis. **J Biomed Mater Res A**, v. 100, n. 3, p. 720-7, Mar 2012. ISSN 1552-4965. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22213643> >.
144. SMAJLOVIC, S.; Tfelt-Hansen, J. Calcium acts as a first messenger through the calcium-sensing receptor in the cardiovascular system. **Cardiovascular Research**, v. 75, p. 457-467, 2007.
145. _____. Novel role of the calcium-sensing receptor in blood pressure modulation. **Hypertension**, v. 52, n. 6, p. 994-1000, Dec 2008. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18955662> >.
146. SONG, B.; ESTRADA, K. D.; LYONS, K. M. Smad signaling in skeletal development and regeneration. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 20, n. 5-6, p. 379-88, 2009 Oct-Dec 2009. ISSN 1879-0305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19926329> >.
147. STEPHAN, S. J. et al. Injectable Tissue-Engineered Bone Repair of a Rat Calvarial Defect. **Laryngoscope**, v. 120, p. 895-901, 2010.
148. STOCUM, D. L.; ZUPANC, G. K. Stretching the limits: stem cells in regeneration science. **Dev Dyn**, v. 237, n. 12, p. 3648-71, Dec 2008. ISSN 1058-8388. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18985720> >.
149. SUNDELACRUZ, S.; KAPLAN, D. L. Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine. **Semin Cell Dev Biol**, v. 20, n. 6, p. 646-55, Aug 2009. ISSN 1096-3634. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19508851> >.
150. SZPALSKI, C. et al. Bone tissue engineering: current strategies and techniques--part II: Cell types. **Tissue Eng Part B Rev**, v. 18, n. 4, p. 258-69, Aug 2012. ISSN 1937-3376. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22224439> >.
151. _____. Bone tissue engineering: current strategies and techniques--part I: Scaffolds. **Tissue Eng Part B Rev**, v. 18, n. 4, p. 246-57, Aug 2012. ISSN 1937-3376. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22029448> >.
152. TAE, S.-K. et al. Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering and regenerative medicine. **Biomedical Materials**, v. 1, p. 63-71, 2006.

153. TFELT-HANSEN, J.; BROWN, E. M. The calcium-sensing receptor in normal physiology and pathophysiology: A review. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 42, n. 1, p. 35-70, 2005. ISSN 1040-8363. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000226138700002 >.
154. TFELT-HANSEN, J. et al. Calcium-Sensing Receptor Induces Messenger Ribonucleic Acid of Human Securin, Pituitary Tumor Transforming Gene, in Rat Testicular Cancer. **Endocrinology**, v. 144, n. 12, p. 5188-5193, 2003.
155. THARMALINGAM, S. et al. Calcium-sensing receptor modulates cell adhesion and migration via integrins. **J Biol Chem**, v. 286, n. 47, p. 40922-33, Nov 25 2011. ISSN 1083-351X (Electronic)
156. 0021-9258 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21969374 >.
157. THOMPSON, T. J.; OWENS, P. D.; WILSON, D. J. Intramembranous osteogenesis and angiogenesis in the chick embryo. **J Anat**, v. 166, p. 55-65, Oct 1989. ISSN 0021-8782. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2482839> >.
158. TOMMILA, M. et al. Hydroxyapatite coating of cellulose sponges attracts bone-marrow-derived stem cells in rat subcutaneous tissue. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 6, p. S269-S277, 2009.
159. TUAN, R. S. Supplemented eggshell restores calcium transport in chorioallantoic membrane of cultured shell-less chick embryos. **J Embryol Exp Morphol**, v. 74, p. 119-31, Apr 1983. ISSN 0022-0752. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6604121> >.
160. _____. Mechanism and regulation of calcium transport by the chick embryonic chorioallantoic membrane. **J Exp Zool Suppl**, v. 1, p. 1-13, 1987. ISSN 1059-8324. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2955074> >.
161. TURUNEN, T. et al. Bioactive glass granules as a bone adjunctive material in maxillary sinus floor augmentation. **Clin Oral Implants Res**, v. 15, n. 2, p. 135-41, Apr 2004. ISSN 0905-7161. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15008925> >.
162. VARGAS, A. et al. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 59, n. 11, p. 1162-76, Sep 2007. ISSN 0169-409X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17870202> >.
163. VARGAS, G. E. et al. Biocompatibility and bone mineralization potential of 45S5 Bioglass-derived glass-ceramic scaffolds in chick embryos. **Acta Biomater**, v. 5, n. 1, p. 374-80, Jan 2009. ISSN 1878-7568. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18706880> >.
164. VORONOV, E.; CARMI, Y.; APTE, R. N. Role of IL-1-mediated inflammation in tumor angiogenesis. **Adv Exp Med Biol**, v. 601, p. 265-70, 2007. ISSN 0065-2598. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17713014> >.
165. VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; FRESHNEY, R. I. **Culture of Cells for Tissue Engineering (Culture of Specialized Cells)**. New Jersey-United States of America: John Wiley & Sons, Inc., 2006. 518.
166. WALENTA, K. et al. In vitro differentiation characteristics of cultured human mononuclear cells-implications for endothelial progenitor cell biology. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 333, n. 2, p. 476-82, Jul 2005. ISSN 0006-291X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15961064> >.
167. WARD, D. T. Calcium receptor-mediated intracellular signalling. **Cell Calcium**, v. 35, n. 3, p. 217-28, Mar 2004. ISSN 0143-4160 (Print)

- 168.0143-4160 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15200145 >.
- 169.WENHAN, C. et al. The Extracellular Calcium-Sensing Receptor (CaSR) Is a Critical Modulator of Skeletal Development. **Science Signaling**, v. 1, n. 35, p. 1-13, 2008.
- 170.WESTON, A. H. et al. Evidence in favor of a calcium-sensing receptor in arterial endothelial cells: studies with calindol and Calhex 231. **Circ Res**, v. 97, n. 4, p. 391-8, Aug 2005. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16037572> >.
- 171._____. The vascular extracellular calcium-sensing receptor: an update. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 203, n. 1, p. 127-37, Sep 2011. ISSN 1748-1716. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21199402> >.
- 172.WILSON, J. et al. Toxicology and biocompatibility of bioglasses. **J Biomed Mater Res**, v. 15, n. 6, p. 805-17, Nov 1981. ISSN 0021-9304. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7309763> >.
- 173.WU, X. et al. Tissue-engineered microvessels on three-dimensional biodegradable scaffolds using human endothelial progenitor cells. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 287, p. H480-H487, 2004.
- 174.[WWW.SABIOSCIENCES.COM](http://www.sabiosciences.com). Calcium Intracellular Signalling Pathways. Disponível em: < [http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=Intracellular Calcium Signaling](http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=Intracellular_Calcium_Signaling) >.
- 175.XIAO, G. et al. Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells. **J Bone Miner Res**, v. 17, n. 1, p. 101-10, Jan 2002. ISSN 0884-0431 (Print)
- 176.0884-0431 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11771655 >.
- 177.XU, Z. et al. Effect of the calcium sensing receptor on rat bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation through the ERK1/2 pathway. **Mol Biol Rep**, v. 39, p. 7271-7279, Feb 8 2012. ISSN 1573-4978 (Electronic)
- 178.0301-4851 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22314915 >.
- 179.XYNOS, I. D. et al. Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation In vitro: implications and applications for bone tissue engineering. **Calcif Tissue Int**, v. 67, n. 4, p. 321-9, Oct 2000. ISSN 0171-967X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11000347> >.
- 180.YAMAGUCHI, T. et al. Mouse osteoblastic cell line (MC3T3-E1) expresses extracellular calcium (Ca²⁺)-sensing receptor and its agonists stimulate chemotaxis and proliferation of MC3T3-E1 cells. **J Bone Miner Res**, v. 13, n. 10, p. 1530-8, Oct 1998. ISSN 0884-0431 (Print)
- 181.0884-0431 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9783541 >.
- 182._____. Expression of extracellular calcium-sensing receptor in human osteoblastic MG-63 cell line. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 280, n. 2, p. C382-93, Feb 2001. ISSN 0363-6143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11208534> >.
- 183.YAMAUCHI, M. et al. Involvement of calcium-sensing receptor in osteoblastic differentiation of mouse MC3T3-E1 cells. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 288, n. 3, p. E608-16, Mar 2005. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15547142> >.

184. YE, C. P. et al. Extracellular calcium-sensing-receptor (CaR)-mediated opening of an outward K(+) channel in murine MC3T3-E1 osteoblastic cells: evidence for expression of a functional CaR. **Bone**, v. 27, n. 1, p. 21-7, Jul 2000. ISSN 8756-3282. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10865205> >.
185. ZAMPETAKI, A.; KIRTON, J. P.; XU, Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells. **Cardiovasc Res**, v. 78, n. 3, p. 413-21, Jun 2008. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18349136> >.
186. ZERLIN, M.; JULIUS, M. A.; KITAJEWSKI, J. Wnt/Frizzled signaling in angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 11, n. 1, p. 63-9, 2008. ISSN 0969-6970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18253847> >.
187. ZHAO, D. et al. Mechanism for converting Al₂O₃-containing borate glass to hydroxyapatite in aqueous phosphate solution. **Acta Biomater**, v. 5, n. 4, p. 1265-73, May 2009. ISSN 1878-7568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19119086> >.
188. ZHENG, H. et al. The transcription factor Net regulates the angiogenic switch. **Genes Dev**, v. 17, n. 18, p. 2283-97, Sep 2003. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12975317> >.
189. ZHOU, H. et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 5, p. 381-4, May 2009. ISSN 1875-9777. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19398399> >.
190. ZIEGELSTEIN, R. C. et al. Expression of a functional extracellular calcium-sensing receptor in human aortic endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, p. 153-163, 2006.
191. ZWADLO-KLARWASSER, G. et al. The chorioallantoic membrane of the chick embryo as a simple model for the study of the angiogenic and inflammatory response to biomaterials. **J Mater Sci Mater Med**, v. 12, n. 3, p. 195-9, Mar 2001. ISSN 0957-4530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15348302> >.