

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA.

Regulación de la adhesividad de células
madre mesenquimales en biomateriales con
distintas composiciones y topografías.

Ramiro Couceiro Otero
Instituto de Cerámica de Galicia

Memoria de trabajo de tesis presentada para la concesión del título de
doctor.



Universidade de Santiago de Compostela

Instituto de Cerámica de Galicia

D. Francisco Guitián Rivera Profesor de la Universidad de Santiago de Compostela y Director del Instituto de Cerámica de Galicia y el Profesor D. José Couceiro Follente, Miembro Numerario de la Real Academia de Medicina de Galicia, Sillón de Cirugía Ortopédica y Traumatología.

CERTIFICAMOS

Que la presente memoria titulada “**Regulación de la adhesividad de células madre mesenquimales en biomateriales con distintas composiciones y topografías**”, que presenta D. Ramiro Couceiro Otero para aspirar al título de doctor por la Universidade de Santiago de Compostela, fue realizada en el Instituto de Cerámica de Galicia bajo nuestra dirección.

Y considerando que representa trabajo de tesis, autorizamos su lectura y defensa pública en la Universidade de Santiago de Compostela.

Para que así conste expedimos este certificado en Santiago de Compostela, a 11 de Abril de 2012.

Francisco Guitián Rivera

José Couceiro Follente

Dedicatorias

Me gustaría dedicar este trabajo experimental en primer lugar a mis directores, el Profesor Dr. Francisco Guitián y al Profesor Dr. José Couceiro. Durante esta época siempre he obtenido de ellos el apoyo necesario para poder terminar esta etapa de investigación. Agradezco mucho su paciencia, inspiración y tutela.

A mi madre en especial le dedico esta tesis, gracias mamá por todo, no puedo enumerar en unas simples líneas todo lo que te debo.

AGRADECIMIENTOS

A mi hermano, José, estoy seguro de que disfrutará de esta tesis.

Al Profesor Álvaro Gil, por su ayuda con los materiales de TiO_2 y la fabricación de las tintas.

A los Doctores Jaime Franco y Víctor Valcárcel. Muchas gracias por toda la ayuda que me habéis brindado durante estos años tan complicados.

No puedo olvidarme de toda la gente del Instituto de Cerámica de Galicia. Deborah, Miguel, Mónica, Alfredo, Rubén, Paula, Carmen, Charo, Esther (ahora en el Imperial College), espero no dejarme a nadie en el tintero, muchas gracias por haberme aguantado tanto tiempo.

A Carla, compañera inseparable tanto fuera como del laboratorio, muchas gracias por toda la ayuda.

ÍNDICE

Tabla de contenido

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	17
1.1.-Ingeniería celular.	19
1.2.-Células Madre mesenquimales y movimientos celulares.....	23
1.3.-Guiado por contacto en células mesenquimales humanas.....	29
1.4.-Tenseguridad y Mecanobiología celular.....	30
1.5.-Efecto de la rugosidad de superficie en la adhesividad celular.....	42
1.6.-Ingeniería de Tejidos Funcional. (FTE).	48
1.7.-Nicho celular de células madre.	50
1.8.-Ruta WNT. Papel en la adhesividad celular y en la clínica humana..	51
1.9.-Materiales empleados en la tesis.	55
• 1.9.1.-Tántalo y Niobio	55
• 1.9.2.-TiO ₂ . Titania.	59
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	61
2.1.-Introducción al cultivo celular.	63
2.2.-Cultivo en cámaras de perfusión.....	69
2.3.-Base teórica de los inmunoensayos.	73
2.4.-Ensayos de Proliferación celular.....	76
2.5.-Microscopía.....	78
• 2.5.1.-Microscopía Confocal	78
• 2.5.2.-Tinción vivo muerto. Ioduro de propidio-Calceína AM.....	80
• 2.5.3.-Ioduro de Propidio.	81
2.6.-Métodos Moleculares	82
• 2.6.1.-Aislamiento de Ácidos nucleicos	82
• 2.6.2.-Reacción en cadena de la polimerasa	84

2.7.- Materiales utilizados.	88
• 2.7.1.- Niobio Metal.	88
• 2.7.2.- Tántalo Metal.	91
• 2.7.3.- Medida del ángulo de contacto de Nb y TA con distintas rugosidades.	95
• 2.7.4.- Óxido de titanio.	98
CAPÍTULO 3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	111
3.1.-Biocompatibilidad de Niobio y Tántalo. Efecto de la rugosidad.	113
• 3.1.1.-Citotoxicidad	113
• 3.1.2.- Ensayo PCR	117
• 3.1.3.-Metilación	120
• 3.1.4.- Microscopía Confocal. Viabilidad Celular	121
3.2.-Resultados de los ensayos sobre cerámicas de TiO₂.	128
• 3.2.1.-Viabilidad Celular.	128
• 3.2.2.-Análisis de Expresión génica.	130
• 3.2.3.-Metilación.	132
CAPÍTULO 4.CONCLUSIONES	141
BIBLIOGRAFÍA	149

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

En el Instituto de Cerámica de Galicia (ICG) se viene trabajando en Materiales Biocerámicos desde su fundación en 1991. Incluso antes, el Grupo de Cerámica que se integró en el Instituto, había comenzado su trabajo en este campo en 1986.

A lo largo de estos años, el ICG ha publicado en este campo más de 60 artículos en revistas SCR, ha registrado 4 Patentes de Procedimiento, y ha creado una empresa “spin-off” que fabrica y vende biocerámicas: KERAMAT S. L.

En los últimos años, el ICG ha colaborado con el Instituto de Materiales de Madrid (ICMM-CSIC) y el Centro de Investigación den Nanomateriales y Nanotecnología (CINN-CSIC), en el desarrollo de BIOCERMETS: materiales metalcerámicos biocompatibles y con actividad biológica.

Estos BIOCERMETS están compuestos siempre de un metal (Tántalo o Niobio) y una cerámica (Alúmina, Circona, Titania, etc) y durante el desarrollo de este tipo de materiales ha surgido el interés por conocer el comportamiento biológico de los metales Nb y Ta puros, y el efecto que determinadas características microestructurales, tales como la rugosidad superficial tienen sobre tal comportamiento.

De igual manera, es de todos sabido que el Titanio es hasta la fecha el metal insustituible en todo tipo de prótesis, implantes dentales, tornillos,

etc. Su utilización clínica está más que extendida desde hace más de 30 años. Sin embargo debe considerarse que el titanio metal nunca está en contacto con los tejidos vivos: siempre está recubierto de una capa fina de ÓXIDO DE TITANIO.

Las interacciones celulares y de los tejidos vivos con el óxido de Titanio como tal no se han investigado a fondo, por lo que un trabajo sobre este tópico presenta para nosotros un gran interés.

La presente tesis doctoral aborda la respuesta las células madre humanas a estos materiales, y es simultánea con el trabajo en marcha en el IC de implantación “in vivo” de Niobio, Tántalo, y óxido de titanio.

OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo es investigar la biocompatibilidad “in vitro”, por cultivos celulares, de los metales Niobio y Tántalo y de las cerámicas de TiO₂. Más detalladamente, se pretende:

- Poner a punto la metodología de extracción y cultivo de Células Madre humanas.
- Poner a punto las técnicas de medida de Citotoxicidad, PCR, Metilación, Adhesividad y Viabilidad celulares.
- Aplicar dichas técnicas a los materiales seleccionados.
- Determinar la influencia del acabado superficial de los metales sobre su actividad biológica.

CAPITULO 1

- Determinar la influencia de la microestructura de las cerámicas de Titania sobre su actividad biológica.
- Estudiar el comportamiento de las cerámicas de Titania cuando se someten a cultivos celulares en medios estáticos y dinámicos.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1.-INTRODUCCIÓN.

1.1.-Ingeniería celular.

El estudio del comportamiento de células madre dentro de microambientes que jueguen un papel en estimulación celular, crecimiento, diferenciación regulando de manera directa la expresión(Merritt 1984, Wood, Bagnaninchi et al. 2008) génica ha sido uno de los principales objetivos de los investigadores en ingeniería de tejidos desde sus comienzos(Golomb, Wagner 1991, Langer, Peppas 1981, Langer, Cima et al. 1990). Con el advenimiento de mejoras en las tecnologías y herramientas de estudio de manipulación de nichos celulares se ha avanzado rápidamente hacia un mejor entendimiento de los conceptos básicos de las interacciones celulares con los biomateriales.

La combinación de dos campos como son la ingeniería celular y los biomateriales ha desarrollado el área de medicina regenerativa que intentará sin duda en los próximos años superar los hitos de la ingeniería de tejidos(Langer, Cima et al. 1990). Por un lado la ingeniería celular va a permitir llevar adelante mejoras en las técnicas in vitro e in vivo para regenerar tejidos a través de ganar un mayor conocimiento de la forma en la que las células se comportan y reaccionan ante diferentes estímulos físicos o ambientales en general. Técnicas como los sistemas microelectromecánicos (MEMS) (Lewis, Ferrari 2003) permiten la manipulación directa de células de una manera muy precisa, definiendo un microambiente local en escalas de 1-100 μm con gran detalle(Sauter-Starace, Pudda et al. 2006). Esta técnica es aplicable a casos en los cuales se buscan substratos que se empleen como plataforma de ingeniería tisular

y sea necesario definir claramente una microtopografía y química de superficie que guíen las células en la dirección que le interese al investigador (Ting, Sniadecki 2011). El conocimiento de cómo interaccionan las células madre mesenquimales humanas con superficies de biomateriales diseñadas de manera funcional y que activen la diferenciación y proliferación celular abrirá las puertas para conocer la forma de modificar esas interacciones de manera efectiva y útil en la clínica humana. Llegados a este punto podemos imaginarnos el ejemplo aplicado a la reparación de hueso humano. Si al cultivar una célula madre mesenquimal en una interfaz que va a servir de interacción entre una superficie de una prótesis articular y el ambiente que lo rodea que es básicamente hueso, la modificación del fenotipo celular para conseguir un osteoblasto es importante y una vez que este cambio fenotípico ha tenido lugar, llevar la técnica más adelante hacia la estimulación de una población de osteoblastos para que colonicen la zona de manera rápida y efectiva, mejorará la integridad mecánica y la fijación del implante en un paciente. Se puede a su vez plantear este caso de manera inversa, en ocasiones interesa modificar la réplica celular a un implante transcutáneo para evitar así una respuesta inflamatoria en esa interfaz (Tripathi, Basu 2012, Subramani, Ahmed 2012, McNamara, McMurray et al. 2011).

Otra área es el estudio de la reparación de heridas y lesiones, al investigador (y al clínico sin duda) le interesa modificar y controlar las variables que se creen en ese microambiente para incrementar el ritmo y la calidad de la reparación y curación de los tejidos dañados. En el campo de la ingeniería de tejidos, es importante entender cómo se producen las

interacciones entre células-biomaterial y matriz extracelular (ECM). Estas interacciones dan lugar a tejidos *de novo* en los microambientes que el investigador modifica. La definición de Ingeniería de tejidos es, como casi todas las definiciones de campos de investigación biomédica, difícil de concretar estrictamente sin levantar ambigüedades sobre la misma. Quizás la definición más interesante que el autor de este trabajo ha encontrado y por la cual se decanta es la establecida mucho antes de que el área de Medicina Regenerativa llegase a los medios de comunicación y se hiciese popular.

El concepto propuesto por la Fundación Nacional de Ciencia en E.E.U.U. (Fung 1982, Chuong, Fung 1984) “*the application of principles and methods of engineering and life sciences toward fundamental understanding of structure-function relationships in normal and pathological mammalian tissues and the development of biological substitutes to restore, maintain, or improve tissue function*” . “*La aplicación de los principios y métodos de ingeniería y ciencias de la vida hacia el conocimiento fundamental de las relaciones estructura-función tanto en tejidos de mamíferos normales como enfermos y el desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función tisular*”.

Un objetivo prioritario para ingeniería de tejidos es la reparación y reemplazar los tejidos u órganos que han sufrido lesiones, degeneración o fallo general. En la actualidad aunque de una manera menos popular que en el pasado y combinada con otras ciencias y disciplinas, sigue buscando

reparar los tejidos conectivos principales de un paciente como son el cartílago, hueso, ligamentos, tendones y piel principalmente. Aunque en algunos casos se llegó muy lejos como con el cartílago donde las técnicas de implantación celular llevaron a la reparación de tejidos y a pesar de que los resultados fueron mecánicamente buenos, quedaron ciertos temas por resolver (Seifu, Isimjan et al. 2011). En primer lugar, el uso de un armazón para llevar las células al área de reparación y que esa misma área pueda ser reparada de manera rápida y efectiva sin acudir a fuentes celulares externas (Dubey, Mequanint 2011, Chiu, Chu et al. 2011, Arafat, Lam et al. 2011).

En los diferentes tejidos conectivos expuestos, la compactación de ECM (Matriz Extracelular) varía de manera significativa dependiendo principalmente de la función. No va a tener los mismos requisitos mecánicos un tejido vascular que el cartílago de las articulaciones. En muchas ocasiones si no hay respuesta mecánica, el tejido presenta una ECM desorganizada de manera aleatoria.

Un ejemplo de disposición ordenada de fibras es el tendón, en respuesta a estímulos mecánicos a los que está sometido el tejido. (Lelièvre 2009) (Liu, Fan et al. 2008) En ocasiones este caso de ordenación-desordenación tisular presenta el primer paso a dar para diseñar un biomaterial ya que incluso en el caso del tendón, cuando existe “reparación natural” la cicatrización del tejido es altamente desordenada en microescala reduciéndose las capacidades mecánicas con una disminución de efectividad en el paciente (Sabatelli, Bonaldo et al. 2001).

Existen por lo tanto unas relaciones obvias entre la estructura y la función de los tejidos y los órganos(Narakathu, Guo et al. 2011, Choi, Lee et al. 2010) . Es importante pues conocer como las células interpretan las señales ambientales tanto físicas como químicas de sus alrededores para desarrollar estructuras ordenadas en forma de tejidos, este conocimiento llevará a mejorar los intentos de cómo fabricar en el laboratorio estructuras válidas para substituir tejidos(Lelièvre 2009).

1.2.-Células Madre mesenquimales y movimientos celulares.

El empleo de células madre en ingeniería de tejidos ha tenido un interés creciente desde hace muchos años debido al potencial que tienen estas células para diferenciarse y sus aplicaciones en reparación tisular(Krawiec, Vorp 2012, Kuraitis, Giordano et al. 2012, Marani, Lakke 2012), se han llegado a plantear usarlas incluso en aplicaciones tales como vectores para terapia génica. Tienen independientemente de sus aplicaciones, un gran interés para conocer facetas más básicas de la biología del desarrollo(Guo, Gonzalez et al. 2011). Brevemente podemos clasificar las células madre disponibles como:

- Células madre embrionarias. Estas células son totipotentes, dan lugar a todos los tejidos que existen en un ser vivo.
- Células madre mesenquimales, MSC (adultas). Son células multipotentes, dan lugar a todos los tejidos salvo al corion.
- Células madre inducidas (iPSc). Son células de tejidos desarrollados que al aislarse y por medio de técnicas de ingeniería genética son diferenciadas hacia mesenquimales.

Las células mesenquimales son las que presentan una gran aplicación en medicina regenerativa, no solo por su multipotencialidad, si no porque hasta cierto punto están libres de restricciones éticas complicadas. Su obtención es relativamente simple así como su procesamiento ya que no es necesario contar con un equipamiento específico para aislarlas. Las MSC están parcialmente diferenciadas y son capaces de dar lugar a varios tejidos conectivos de interés tales como el hueso, cartilago, tendón, músculo y tejido adiposo. Son atractivas para estas aplicaciones ya que están disponibles en grandes cantidades a través de aspirados a través de cánulas realizadas en huesos esponjosos como crestas ilíacas, metafisis tibial, etc.

A diferencia de células obtenidas directamente de explantes, las MSC pueden ser cultivadas a lo largo de varios pases *in vitro* sin que pierdan su capacidad proliferativa ni se diferencien. Existen métodos para dirigir la diferenciación hacia distintos linajes celulares (Hwang, Varghese et al. 2008). Un área de investigación que tiene un peso mayor cada vez es el de emplear armazones de biomateriales capaces de guiar el crecimiento celular, permitir alineamiento de MSC y organización de ECM para conseguir crear tejidos con estructuras específicas y características funcionales.

Aunque existen casos en los cuales se emplean estructuras nanofabricadas, la combinación de células madre mesenquimales con tales complejos es en la actualidad algo raro. Se busca pues controlar el

crecimiento y el comportamiento de las células que se cultiven sobre los armazones. (Liu, Fan et al. 2008) Al conseguir esta organización, se consigue imitar la estructura que se puede encontrar en el organismo vivo. Si se cultivan las células madre directamente en un pocillo de cultivo, se observa como estas células carecen de organización y que están altamente desorganizadas sin seguir ningún patrón de distribución. El hueso es un ejemplo de un tejido ordenado donde se encuentran estructuras organizadas. (Wang, Li et al. 2007, Yu, Chou et al. 2006).

Sin contar con esta estructura inherente, las propiedades mecánicas estarían melladas y no sería un tejido que pudiese cumplir con los requisitos de stress fisiológico. Este ejemplo es extrapolable a todos los casos donde los tejidos tengan que soportar cargas o estar sometidos a esfuerzos mecánicos. Para poder desarrollar nuevas generaciones de biomateriales es necesario conocer de manera precisa cómo el microambiente creado por en el laboratorio va a afectar al comportamiento celular. Entre los componentes de este microambiente o nicho celular se cuentan tanto factores físicos como químicos así como la interacción con otros sistemas dentro del organismo. Los armazones celulares no son independientes una vez implantados, la colonización es importante así como favorecer la integración con otros tejidos o la amilogénesis que mantendrá a la población inicial celular viva. El fenómeno celular más conocido en cuanto a las interacciones célula-biomaterial es el de guiado por contacto. Este comportamiento celular descrito por Weiss {{1081 Weiss, Leonard 1962}} revela como las células se organizan y orientan de manera efectiva y útil a través de factores topográficos. Dentro de todos

estos conceptos de comportamiento celular, se ha considerado como interesante los fenómenos de adhesividad que tienen lugar en la interfaz célula-biomaterial. Además de las técnicas de modificación de superficies de manera química, la creación de micro y nanotopografías parece ser un método viable para dirigir las células hacia patrones de disposición variados.

Existen varios factores que modifican el proceso de guiado por contacto, las dos fuerzas principales que determinan cómo responderá una célula a la superficie de un material, son la química de superficie y la topografía.(GhoshMitra, Diercks et al. 2012, Rajnicek, Foubister et al. 2007).

Estos factores externos influyen de manera directa la movilidad celular guiando tanto movimientos como forma de la célula.

- Haptotaxis
- Guiado por contacto
- Forma celular
- Inhibición por contacto

El primer efecto que el material ha de tener en las células es sobre la motilidad ya que este a su vez se considera un requisito para que el fenómeno de guiado por contacto tenga lugar. (Bettinger, Orrick et al. 2006, Griscom, Degenaar et al. 2002).

Como prerequisite por parte del material por supuesto es que este a su vez tenga unas características de composición que sean biocompatibles La haptotaxis se define como el movimiento de la célula en respuesta a un gradiente de adhesividad y está relacionado directamente con el comportamiento celular en la interfaz que tiene lugar entre la superficie de un implante con el tejido.

Este gradiente puede ser tanto químico (concentración de RGD, fibronectina, etc.) o físico (energía de superficie o tensión superficial)(Holland, Peles et al. 1998, Wilkinson, Shields et al. 1982).

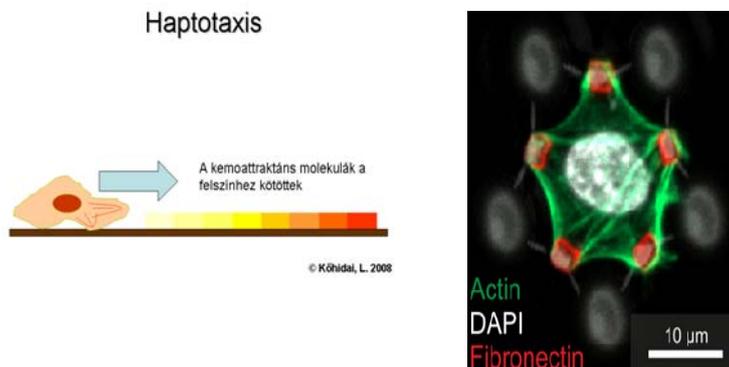


Figura 1.1 a) Haptotaxis b) y c) Estructuras modificadas en laboratorio para favorecer la formación de contactos focales basados en la haptotaxis.{{1208 Nikkhah,Mehdi 2012}}

El guiado por contacto se puede definir como la orientación conformacional de una célula en función de la superficie a la cual se adhiere(Sträuli, Weiss 1977, Weiss 1962).La inhibición por contacto de la motilidad ocurre debido a contactos célula-célula cuando existen

densidades celulares muy elevadas provocando la migración de células hacia zonas más libres donde pueden proliferar con menos problemas. Este proceso se observa de manera sencilla en cualquier pocillo de cultivo celular donde hayamos cultivado las células hasta llegar a una confluencia del 90%. En las placas de cultivo se ha observado como al llegar a alta concentración se producen una alineación celular y algunos autores especulan que este proceso sea el mismo por el cual las células dan lugar a estructuras organizadas en el músculo y en el tendón.

Por último y posiblemente el concepto más importante es la morfología celular. La forma que adquiere una célula en contacto con una superficie o en un tejido, se ha encontrado que define claramente la proliferación expresión de proteínas y deposición de matriz extracelular relacionado estos sucesos directamente con la expresión génica, diferenciación y apoptosis.(Rosslénbroich 2011, Miller, Li et al. 2011) Todo este espectro de factores que modifican el comportamiento celular está relacionado (Ingber) por medio de los cambios conformacionales que son inducidos por la tensión que se produce sobre los componentes del citoesqueleto y el núcleo celular. Todos estos eventos no ocurren de manera independientes si no que están relacionados entre sí y tienen lugar al mismo tiempo. Mientras que muchos de los experimentos que se realizan para estudiar estos procesos celulares tienen lugar *in vitro*, el guiado por contacto tiene lugar en ambientes *in vivo* de tomando un papel crítico en muchos procesos patológicos, de desarrollo y de regeneración tisular(Curtis, Wilkinson et al. 2001).

Clark et al(Clark 1994) describen cómo varios factores de microtopografía influyen el comportamiento celular

- Magnitud de la topografía
- Repetición de patrones
- Tipos celulares empleados y su densidad.

1.3.-Guiado por contacto en células mesenquimales humanas.

Las células mesenquimales son capaces de diferenciarse hacia uno o más linajes terminando este proceso en una célula totalmente definida por un fenotipo estable y único. Las células madre mesenquimales humanas aisladas a partir de médula ósea de pacientes, han alcanzado una gran relevancia en la ingeniería de tejidos. Estas células son obtenidas de manera fácil en el quirófano y libres de problemas éticos.(Connolly, Clark et al. 1990) Las MSCs han sido empleadas en casos clínicos in vivo implantándolas directamente en tejidos que necesitaban ser reparados. Una gran ventaja de este tipo celular es que se pueden emplear célula autólogas evitando así problemas derivados de histocompatibilidad. La implantación directa de MSCs en tejidos dañados se ha experimentado desde hace años, como toda técnica tiene sus detractores y apoyos, lejos de entrar a discutir sobre la validez clínica de este método, el hecho de que se produzca una diferenciación celular in vivo tras un implante, demuestra que el nicho celular está permitiendo ese cambio fenotípico.(Tare, Babister et al. 2008, Laine, Hentunen et al. 2012) Mientras que esto es relativamente sencillo de demostrar in vivo, se complica mucho cuando se intenta recrear in vitro. Hay que reparar aquí sobre el concepto de que aunque se disponga de una

población de células adecuada en tipo y cantidad, estas no se diferencian para dar lugar a tejidos especializados de manera espontánea, es necesario incluir todos los estímulos ambientales que puede presentar un nicho celular concreto en un momento determinado (Curtis, Wilkinson et al. 2001, Dalby, Riehle et al. 2003). La diferenciación de esta manera es complicada de conseguir en un laboratorio.

1.4.-Tenseguridad y Mecanobiología celular.

Después de los últimos experimentos realizados por la comunidad científica, la idea de que el citoesqueleto tiene un papel central en la reacción y acción sobre estímulos mecánicos externos se ha buscado desarrollar modelos en los cuales podamos interpretar las acciones de traducción de señales ambientales por parte de la célula. (Ingber 2008b, Liedl, Ingber et al. 2009, Luo, Xu et al. 2008, Stamenović, Wang et al. 2006) Es posible que el modelo que más ha influenciado este campo sea fruto de la extrapolación de un concepto de ingeniería de estructuras, Tenseguridad, al campo de la biología celular. El modelo de tenseguridad celular propuesto por Ingber destaca por tomar los microfilamentos de actina y los microtúbulos como los componentes de una estructura dinámica en la célula.

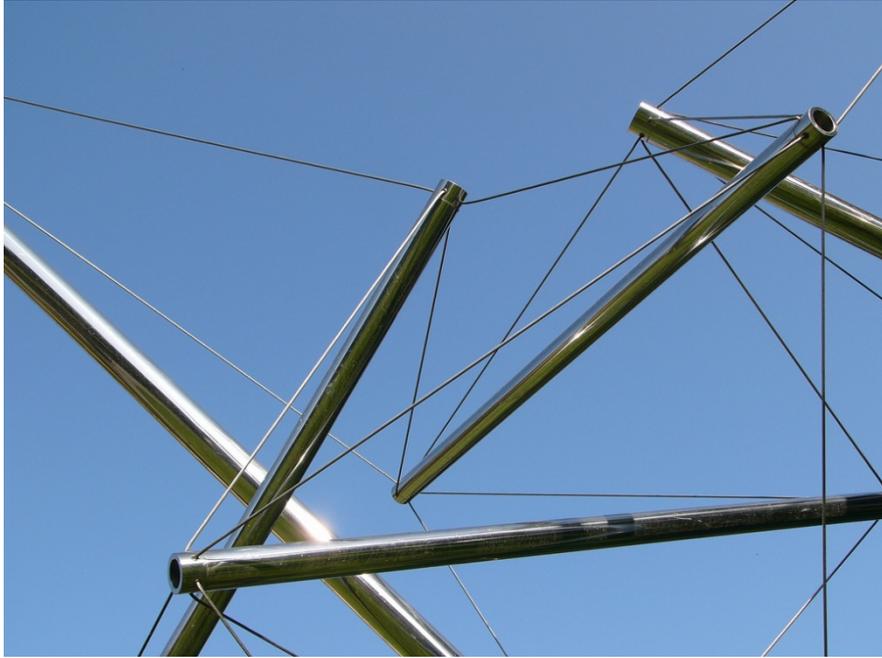


Figura 1.2.-Las estructuras basadas en tensegridad están estabilizadas por tensión en lugar de por compresión.

Algo común entre todos los autores es la unanimidad en considerar los motores de actina /miosina como un elemento de pre-tensión de la estructura de tensegridad mientras que los microtúbulos forman el elemento de compresión. Estudios biofísicos parecen confirmar esta idea ya que los microfilamentos parecen soportar tensión y los microtúbulos soportan mejor la compresión, estas observaciones parecen estar en línea con las consideraciones de ingeniería de que la tensión endereza y la compresión dobla.(Ingber, Prusty et al. 1995)El modelo de Ingber describe el papel general de los filamentos intermedios como proveedores de rigidez en la célula.

Estos se interconectan de manera frecuente con microtúbulos, microfilamentos y la superficie nuclear actuando por lo tanto de elementos de suspensión. De hecho si se produce un choque súbito contra el núcleo estos elementos se sabe que lo han protegido.(Ingber, Dike et al.)

En el concepto general de tensegridad podemos definir dos tipos diferentes(Liedl, Ingber et al. 2009):

- Pre-tensa (relacionada con las interacciones miosina-actina)
- Geodésica

En biología celular la mayoría de los casos de ciernen a la definición de pre-tensa aunque encontramos también casos de geodésica. Las contribuciones a un estado de pre-tensión citoesquelética son interpretadas por las células por medio de la formación de contactos focales que actúen sobre las agregaciones de actina. Además los factores físicos de superficie dados por las fuerzas osmóticas e hidrostáticas que ejercen una presión sobre la membrana citoplasmática.(Ingber 2008a).

El empleo de técnicas de nanoidentación combinadas con microscopía de fuerza atómica han (Charras, Horton 2002, Charras, Williams et al. 2004) (Charras, Lehenkari et al. 2001)demonstrado que mientras que solamente los microtúbulos y filamentos intermedios están relacionados directamente con la respuesta mecánica de una célula con la

superficie dejando fuera a los microfilamentos. Lo microfilamentos establecen cierta tensión intra-citoesquelética mientras que los otros dos componentes cumplen con el concepto de tensegridad. El proceso de adhesividad celular se ha estudiado también de manera teórica por medio de modelos matemáticos. Todas las mediciones que se toman por medio de métodos de microscopía de fuerza o de ensayos bioquímicos son empleados para desarrollar modelos matemáticos. La importancia de un modelo es que permitirá el desarrollo de una interpretación más exacta de la forma en las cuales las células responden a una señal mecánica y cómo esta misma es capaz de eliminar o sobrepasar la respuesta bioquímica llevando a cabo una regulación directa de la actividad celular.(Dalby, Riehle et al. 2003, Dalby, Riehle et al. 2002).

Una pregunta muy común en este campo de la mecanobiología es: *¿A qué responde realmente una célula? ¿Tensión, compresión, señales bioquímicas o una combinación de las tres anteriores?* El problema del desarrollo de estos modelos es que muchas ocasiones se desenvuelven alrededor de conceptos matemáticos en lugar de mediciones continuas.(Dalby, Vilemejeane et al. 2011) Las células responden a estos estímulos continuos aunque es muy complicado medir tales respuestas. Una aproximación válida es cuantificar cantidades más fundamentales como por ejemplo los cambios estructurales de moléculas de adhesividad. En la mayoría de los estudios de mecanotransducción, las células son sometidas a un estímulo puntual alejado de la realidad de un ambiente tisular vivo, lo que se obtiene pues es una visión puntual de lo que está teniendo lugar dentro de la célula al extraer los ácidos nucleicos y realizar

análisis moleculares. Otra premisa a tener en cuenta en el desarrollo matemático es que una célula no constituye un tejido, se pierde pues la heterogeneidad de la respuesta tisular en este tipo de experimentos.(O'Brien 2011, Murphy, Matsiko et al.) Se pueden por supuesto repetir los experimentos de manera seriada “n” veces, pero es claro que los sutiles cambios que puede estar teniendo lugar intracelularmente son muy complicados de detectar con la tecnología actual. La metilación que presentamos en este trabajo experimental puede ser una respuesta a una relación directa en este tipo de modelos. Si es posible juntar las respuestas celulares en un modelo que incluya, respuestas bioquímicas, mecánicas y epigenéticas se obtendría un resultado promotor que pueda armonizar esos tres factores.

El empleo de varios “arrays o matrices” de expresión génica a distintos tiempos nos puede favorecer el conocimiento de ese patrón de expresión génica diferencial, aunque sin duda, el problema será determinar qué periodos de tiempo son los más adecuados a seguir ya que dependerán enormemente del tipo celular y las condiciones de entorno simuladas en el laboratorio. Se han realizado pruebas con modelos de hibridación con fluorescencia para conocer las pautas de expresión génica o de activación de un promotor, pero estos modelos aunque válidos para dar una idea temporal de los acontecimientos nucleares, no puede darnos la cuantificación directa que es necesaria para parametrizar estos fenómenos celulares aunque si para conocer qué genes y bajo qué condiciones se expresan(Plunkett, Jaasma et al. 2008, Jaasma, Plunkett et al. 2008, Lyons, Al-Munajjed et al. 2010). Se han tenido en cuenta el tiempo de

estimulación, la ordenación del citoesqueleto en respuesta al mismo, pero ya que las células se cultivan sobre un substrato el modelo desarrollado por Kaunas parece ser a día de hoy el más completo.(Kaunas, Huang et al. 2010, Kaunas, Hsu 2009) La modificación del mismo por Butler al incluir la energía total transmitida por las células tras la deformación elástica del substrato es (teniendo en cuenta la expresión proteica y génica como un valor escalar)(Butler, Bhatnager et al. 2006, Turner, Armitage et al. 2004):

$$U = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \vec{T}_i(x, y) \cdot \vec{u}_i(x, y)$$

Ecuación 1.1

Donde

- U es la energía de estiramiento.
- $\vec{T}_i(x, y)$ es la fuerza tractora aplicada en la posición (x,y)
- $\vec{u}_i(x, y)$ es el desplazamiento del citoplasma en el punto (x,y)
-

Cuando los estímulos son muy continuos y de gran magnitud, la expresión génica y aumenta, pero como todas las señales celulares se llega a un punto en el cual se satura la expresión. Incluir este concepto de saturación da lugar a una aproximación más cercana de lo que se espera que ocurra en situaciones in vivo.

La expresión de esta respuesta de saturación puede ser enunciada como la función sigmoidea de U :

$$r\delta(U) = \frac{r \text{ máxima}}{1+e^{-Ar(U-U_{0.5})}}$$

Ecuación 1.2

Donde:

- $r\delta(U)$ es la magnitud de la expresión génica que a su vez llega a un valor máximo de saturación $r \text{ máxima}$.
- Ar es la sensibilidad de la respuesta celular a la tracción mecánica que experimenta el citoesqueleto.
- U es la magnitud máxima de la activación de señalización celular.
-

U puede ser cambiada en ambas ecuaciones en caso de que se opte por otro valor escalar que represente de manera más exacta la correspondencia entre señales celulares (bioquímicas o génicas). Todo este modelo busca poner de manifiesto como la mecanotransducción a través del citoesqueleto y las interacciones con los substratos de cultivo establecen las propiedades estructurales de la célula. Los resultados teóricos parecen confirmar que el citoplasma con las estructuras de microtúbulos y microfilamentos de actina un conjunto que responde a la topografía y estímulos del nicho celular casando pues con lo propuesto en el modelo de Tensegridad de Donald Ingber{{1111 Ingber,Donald E. 2008}}.

En el trabajo experimental desarrollado sea intentado poder unir todas las observaciones anteriores sobre las interacciones entre núcleo, citoesqueleto, adhesiones focales e interacciones topográficas por medio de la hipótesis de que existe una mecanotransducción autoinducida por parte de la célula, en este caso la topografía de superficie modifica la morfología del núcleo celular así como la posición de los cromosomas originando una expresión diferencial de genes al cambiar su probabilidad de transcripción. Aunque parece algo novedoso, nos decantamos a pensar que es una extensión o un caso particular de la teoría de Heslop-Harrison(Heslop-Harrison 2012, Heslop-Harrison). Para poder comprobar esta aserción varios autores han llevado a cabo estudios comprobando cambios en la posición del cromosoma 3 y su posición durante la interfase cuando se cultivan células sobre nanocolumnas. Los primeros resultados sobre este tema han sido ya publicados con resultados interesantes(Dalby, Riehle et al. 2004, Biggs, Richards et al. 2010).

Cómo relacionar una cascada de señales bioquímicas con un stress físico causado tanto por condiciones mecánicas dinámicas como por la acción de la topografía de superficie sobre los contactos focales e integrinas de membrana es pues uno de los objetivos de este trabajo y de la mecanobiología celular.(Wood, Bagnaninchi et al. 2008, Turner, Armitage et al. 2004, Prowse, Chong et al. 2011, Chen, Ingber 2008).

Se conoce por experimentos de citogenética que la disposición de los cromosomas y la forma nuclear cambia cuando son se cultiva las células sobre superficies con nanocolumnas de PDMS.(Lee, Yang 2012,

Shao, Wu et al. 2012) Al realizar hibridación con fluorescencia sobre los centrómeros en G2 (ciclo celular) se observa que las dos copias de material genético están muy cerca en comparación con un control en el cual las células fueron cultivadas sobre una superficie plana. Esto estará indicando que la tensión creada por el material sobre el citoesqueleto ha desplazado las dos copias aproximándolas y provocando una expresión génica que es diferente al grupo control. Por lo general la forma “relajada” de una célula se supone redonda o esférica, pero cuando la célula entra en contacto con una superficie toma formas aplanadas y radiales, aunque en el caso de las nanocolumnas se observa una conformación fusiforme(Kim, Seo et al. 2011).

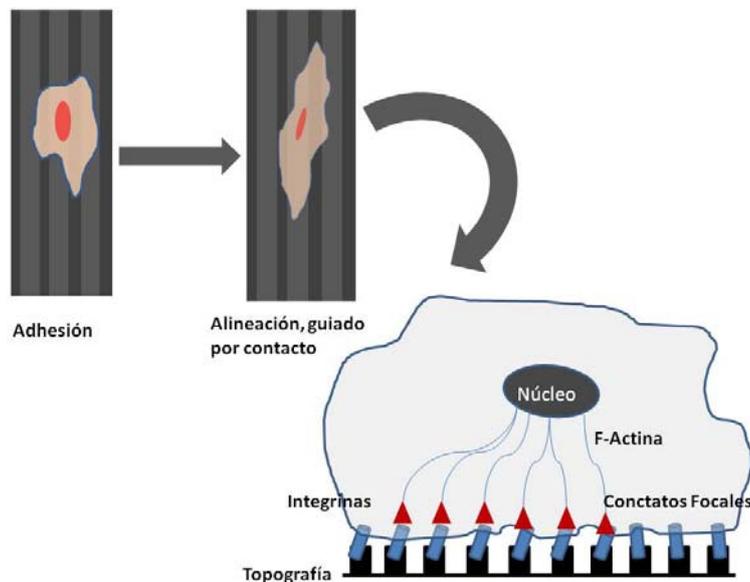


Figura 1.3.- Modificación morfológica del núcleo por parte de la topografía y el citoesqueleto

El empleo de topografías para conocer las funciones celulares es todavía una disciplina relativamente nueva, aunque ya fueron puestas sus bases en los 60 por Weiss y Curtis cuando se describieron lo que parecían las primeras respuestas a superficies. La ampliación de estos conceptos primigenios hasta llegar a los postulados de mecanotransducción directa sobre elementos genéticos es aún un camino que se está recorriendo. Considerando lo expuesto con anterioridad se observa la respuesta de la célula sobre la topografía es el “esparcimiento o "spreading” modulado por las nanocolumnas. (Ellinas, Smyrnakis et al. 2011, Stranz, Sökmen et al. 2011)

Si realmente existen cambios en la posición del centrómero es muy probable que exista una peculiaridad en la transcripción génica. Este punto fue demostrado por Curtis con estudios en los cuales al aplicar una tensión los centrómeros modificaban su posición por medio de la interacción del citoesqueleto (Figura 1.3). Observar los cambios que tienen lugar durante la interfase es de gran importancia ya que es durante esta etapa cuando el DNA es transcrito y traducido a proteínas con función celular. La idea clásica de que los cromosomas no tienen una posición geográfica exacta dentro de la célula parece estar siendo desbancada con los estudios de Heslop-Harrison demostrando que ocupan una posición poco variable. Es incluso posible que cambios infinitesimales en la cromatina tenga un valor regulador. Si esto está ocurriendo, una herramienta a emplear es el estudio de la metilación del DNA o Epigenética.

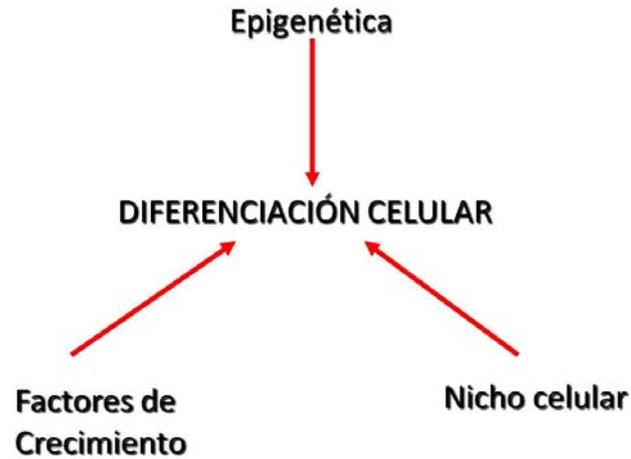


Figura 1.4.-Factores que influyen en la diferenciación celular

La epigenética es un término complicado de definir, la idea principal es que el material génico sufre alteraciones y modificaciones post-transcripcionales por medio de factores externos o ambientales (Delgado-Calle, Sañudo et al. 2011, Brooks, Le Dantec et al. 2010). En este caso, los impulsos mecánicos representan esos factores epigenéticos regulando la transcripción. La metilación de DNA ocupa es uno de los mecanismos clave durante los procesos epigenéticos. El mecanismo de metilación de citosina es la modificación más común de una base dentro del genoma de eucariotas. Se define como la adición de un grupo metil al carbon situado en el 5' de un anillo pirimidínico generando un compuesto 5-metilcitosina (Roloff, Nuber 2005).

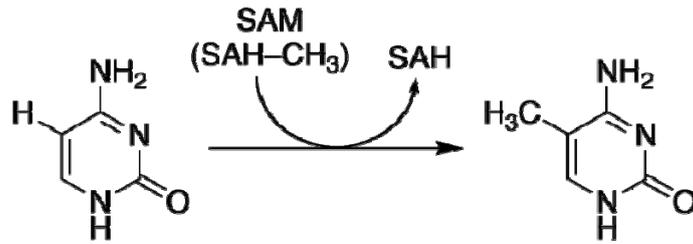


Figura 1.5.-Mecanismo de Metilación

Este compuesto, 5 metilcitosina se encuentra sobre todo en las islas CpG, regiones ricas en citosinas y guaninas. La reacción está catalizada por una DNA metiltransferasa que emplea una coenzima S-Adenosil metionina (SAM). Entre las funciones de la metilación de DNA, se incluye la silenciamiento de transposones, inactivación de secuencias virales o mantenimiento de una integridad cromosomal. Para poder detectar cambios a nivel epigenético, se emplea una técnica de monitorización de las islas CpG, la 5 metilcitosina de manera espontánea por lo que existe una pobre presencia de islas CpG aunque estas a su vez están metiladas en proporciones mayores al 60% y con una distribución no aleatoria en el epigenoma. Esta metilación coincide con fragmentos altamente repetidos que en principio se consideraba que carecían de interés, las últimas investigaciones apuntan en la dirección de su papel regulador de la disposición de la cromatina. (Sidoli, Cheng et al. , Nakao 2001)

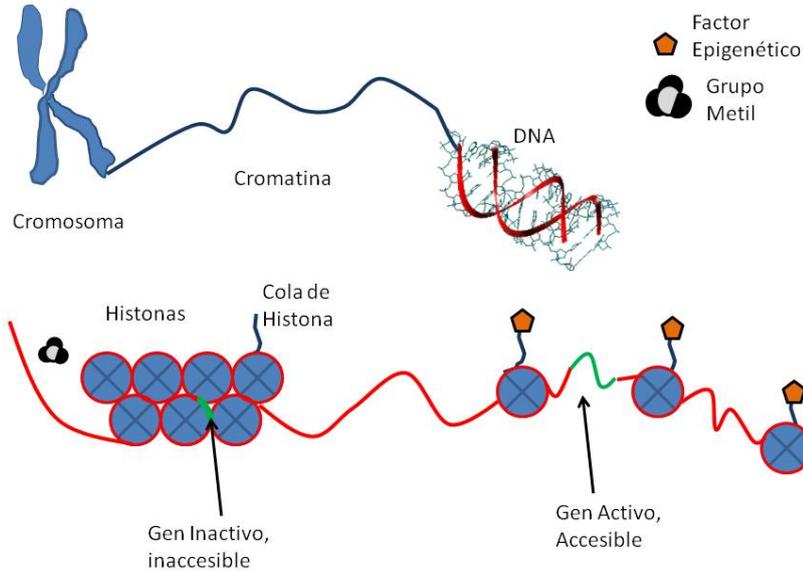


Figura 1.6.-Esquema de un proceso de metilación.

1.5.-Efecto de la rugosidad de superficie en la adhesividad celular.

Cuando los biomateriales se introducen en los tejidos humanos, sus superficies entran en contacto directo con tejidos vivos, la reacción inicial no depende solamente de la química de superficie ni de sus propiedades físicas sino también de la reacción inicial que tiene lugar entre células y material. Uno de los campos donde se ha estudiado más el efecto de rugosidad de superficie en la integración de biomateriales dentro de un tejido es la osteointegración de implantes metálicos, especialmente de Ti6Al4V y Ti30Ta (Ranella, Barberoglou et al. 2010, Zan, Wang et al. 2008).

CAPITULO 1

Los estudios llevados a cabo con fibroblastos sobre esas superficies, así como de Ti puro, dieron lugar a resultados diferentes en cuanto al tipo de rugosidad y su correlación con la alineación celular. Experimentos reproducidos con células madre mesenquimales produjeron resultados muy diferentes a los obtenidos con fibroblastos, en este caso, las células preferían superficies con poca rugosidad. Los osteoblastos por otro lado mostraban una mayor proliferación en Ti con una gran rugosidad. Se ha encontrado también que las células mesenquimales responden de manera positiva a la existencia de una rugosidad de superficial de Ti, a la hora de diseñar un material que sea capaz de movilizar unas respuestas óptimas. La comparación de materiales que han sido tratados por chorro de arena para promover una topografía de superficie, demuestran cómo tras 60 minutos de incubación de cultivo celular, las células muestran ya características de membrana y de citoesqueleto superiores a lo que se observa en un metal liso. En el caso particular del Ti6Al4V la adhesividad celular de osteoblastos es mucho mejor sobre una superficie más lisa (Ra: 0,30 micrómetros) que las superficies más rugosas (Ra: 0,42microm y 0,61 micrómetros). Se ha observado este mismo en variaciones de 0,05 micras en Ti con células MC3T3(Huang, Ho et al. 2004).

El titanio puro por otro lado presenta cambios en otros patrones de adhesividad siendo los valores situados entre 0,05 y 0,07micras los más acertados. Estas investigaciones relacionadas con la adhesividad y proliferación celular sobre superficies rugosas intentan simular el comportamiento del material en contacto con las células de un tejido. Es necesario mencionar que en el cuerpo humano las citoquinas presentes así

que la señalización celular es más compleja que la recreada en un pocillo de cultivo celular.(Brettle 1970a, Brettle 1970b, Lüthen, Lange et al. 2005)

En la clínica se han obtenido resultados que varían mucho en función de los rangos de rugosidad de superficie, por ejemplo, una rugosidad entre 0,08 y 1,3 micras es relativamente difícil de encontrar en la literatura. Existen datos contradictorios en la bibliografía sobre los rangos mejores para favorecer la adhesividad e incluso hasta hace muy poco no se consideraba el efecto de las nanotopografías ni de la ordenación de patrones topográficos sobre las mismas. Estas rugosidades superficiales favorecen los fenómenos mecanosensitivos de las células cultivadas sobre ellos, por lo general una célula una vez que se ha adherido va a buscar explorar la superficie que la rodea por medio de filopodios para continuar con la extensión de lamelipodios para mover y extenderse sobre la superficie.(Sjöström, Dalby et al. 2009)Es importante diferenciar aquí estos dos conceptos:

- Adhesividad celular: Es el proceso por el cual una célula se une a una superficie, matriz extracelular o a otra célula por medio de proteínas de adhesividad como las selectinas o las integrinas.
- Extensión o esparcimiento celular: Llamado “*cell spreading*” en la literatura, tiene la característica de ser un fenómeno influenciado claramente por el tipo de sustrato empleado. Existe una clara deformación celular a varios niveles, citoplasmático y nuclear.

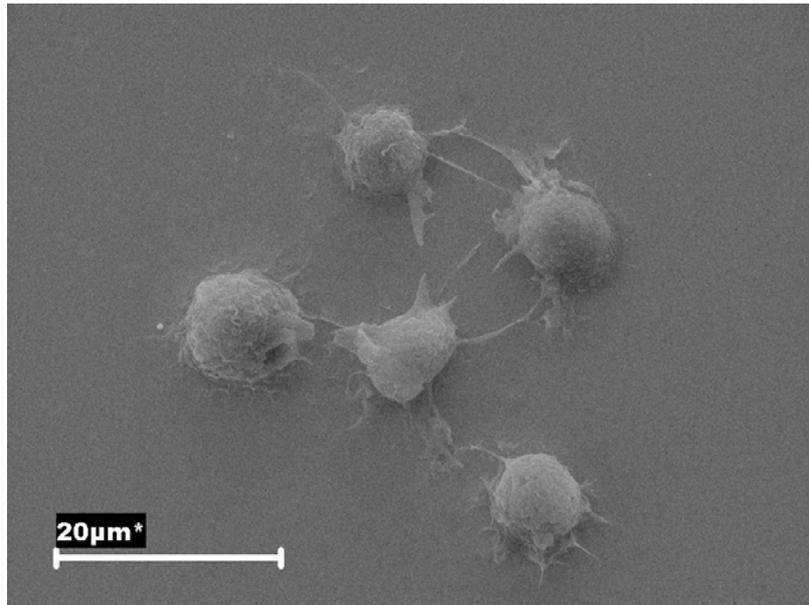


Figura 1.7.-Adhesividad de osteoblastos sobre Titanio. Tomada tras 4 minutos de cultivo

El hecho de que exista una mecanosensitividad tiene una gran relevancia en procesos in vivo. Tomando el ejemplo fisiológico de la remodelación ósea podemos demostrar que los tejidos, son mecanosensitivos(Gupta, New et al. 2006, Frost 1989, Kular, Tickner et al.). En los casos de pacientes con largos periodos de reposo en cama sin rehabilitación ni ejercicio físico o la exposición a condiciones de microgravedad conllevan una disminución de la masa ósea los procesos de carga propiciados por una ganancia de peso o el ejercicio continuo llevan ejercen un efecto de ganancia en la masa ósea. Este tejido fue uno de los primeros sobre los cuales se realizaron las primeras hipótesis de cómo las fuerzas mecánicas actúan sobre la estructura tisular y por extensión celular.

Las fuerzas de compresión que inciden sobre un hueso durante el ejercicio provocan no solamente una presión sobre las células individualmente sino también sobre la presión hidrostática y potenciales eléctricos.

Como se ha expuesto con anterioridad, los cambios ambientales afectan directamente al comportamiento celular y en este caso los osteocitos perciben tales impulsos en su microambiente o nicho celular. Hasta el momento se creen que este proceso ocurre lugar por medio de varios mecanismos activados por los cambios ambientales:

- Activación de canales iónicos
- Integrinas
- Deformación del citoesqueleto
- Activación de conexinas

Los canales iónicos son activados por medio de fuerzas de tracción sobre el citoesqueleto debido a fenómenos que tienen lugar en el nicho celular como por ejemplo la acción de una fuerza hidrodinámica que favorezca la apertura de canales de Ca^{+2} .

Este fenómeno desencadena una cascada de eventos de movilización de enzimas intracelulares como la proteinquinasa C paralelamente a una despolarización de membrana que conduzca a la apertura de los canales dependientes de voltaje para aumentar la entrada de iones. El papel del Ca^{+2} dentro de los procesos celulares y bioquímicos es conocido desde hace muchos años, durante la mecanosensitividad el ión Ca^{+2} previene

cambios en la expresión de genes importantes como el COX2(Wadhwa, Choudhary et al. 2002, Joldersma, Burger et al. 2000).

Las integrinas por su parte son mecano receptores de superficie celular que al ser activados por el proceso de tensegridad al ser activados por deformación del núcleo los genes que expresan componentes estructurales importantes como el colágeno o la fibronectina. La mecanoregulación de la integrinas involucra también la liberación de Ca^{+2} al ser afectadas por estimulaciones pequeñas tanto cíclicas como continuas o al responder a fuerzas mecánicas débiles medidas por microscopía de fuerza atómica (AFM).(Prowse, Chong et al. 2011, Chen, Ingber 2008).

Las células madre derivadas de médula ósea responden de manera diferente en cuanto a los patrones de liberación de Ca^{+2} . En este caso, las células mesenquimales tienen una respuesta menos acusada a la liberación de estos iones, siendo quizás una indicación de su no especialización celular, mientras que las señales mecánicas y bioquímicas del nicho celular las conducen hacia las diferentes estirpes de células óseas (osteoblastos, osteocitos etc...). Las integrinas actúan como puntos de anclaje, dónde las fuerzas de deformación son transmitidas al citoesqueleto llevando a la formación de nuevos contactos focales que son estimulados a través de la ECM por medio de las quinasas de adhesividad focal (QAF) directamente relacionadas con la proliferación y la migración celular. Son estas estructuras de membrana las que sirven para anclar a las células en el primer paso de adhesividad previo a la expansión sobre el substrato. Los filamentos de actina van a servir de transmisores de fuerza que pueden ser

modificados por la propia célula para ajustar tanto la organización interna celular como la orientación y polaridad que expresan en cultivo. El paso de esparcimiento celular conlleva la colonización del área de cultivo y por lo tanto es clave su estimulación a la hora de considerar el diseño de un biomaterial, es en este paso dónde las conexinas juegan su papel por medio de favorecer la interacción célula-célula por medio de hemicanales por los cuales se transfieren proteínas y se transmiten información sobre el nicho celular entre una población.(Cantley 2008, Waggett, Benjamin et al. 2006) Este punto ha sido comprobado al observar que durante periodos de estimulación mecánica, las poblaciones celulares registran un aumento en el número de conexinas. Este proceso presenta un especial interés ya que responde casi a un mecanismo de cinética enzimática dónde el aumento de la concentración de conexinas permite una mejor conexión entre células en respuesta a los estímulos ambientales(Coletti, Jaroszeski et al. 2012, Djikanović, Kalauzi et al. 2012). Son estos componentes de mecanotransducción los que permiten que exista un fenómeno de remodelación celular al permitir la comunicación e intercambio de información entre distintos tipos celulares.

1.6.-Ingeniería de Tejidos Funcional. (FTE).

El objetivo principal de la ingeniería de tejidos es la creación de una tejido in vitro por medio de procesos que incluyan el empleo de células, un armazón sobre el cual cultivar las células y que favorezca la integración en el tejido llegando a ser deseable la característica de biodegradabilidad en algunos casos.(Chiu, Chu et al. 2011) Los otros

factores que conforman el epítipo de la definición son el empleo de fármacos y señales de nicho celular.

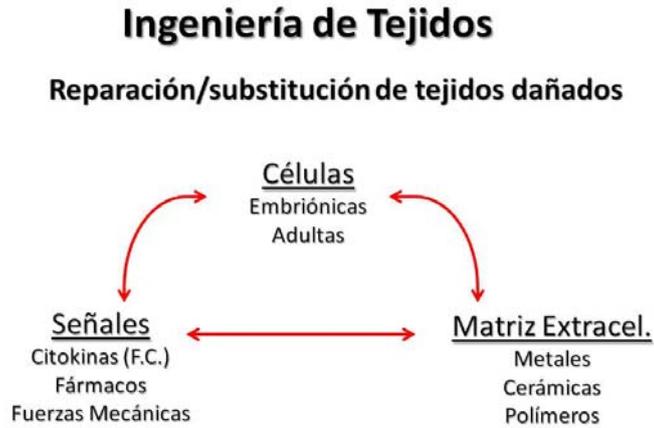


Figura 1.8.-Componentes de la Ingeniería de Tejidos.

Las células son el componente principal de la FTE, en ella se busca la interacción de las mismas con un armazón que sirve tanto como de relleno de espacio como de vector de transporte de células hasta la zona deseada pudiendo estar funcionalizado con características de superficie o con fármacos.(Freed, Guilak 2007, Yang, Yamato et al. 2007) La protección de las células en la zona de reparación favorece la diferenciación desde célula mesenquimal hasta un tipo celular deseado creando así un ambiente o nicho celular específico en el que las tres partes interaccionan entre sí. Los fármacos pueden ser de varios tipos, desde antibióticos hasta factores de crecimiento y antitumorales.(Horan, Collette et al. 2006) El armazón favorece también que las células se organicen y conformen unos patrones básicos dependientes de la adhesividad

favoreciendo el guiado por contacto y la comunicación célula-célula. Debido a restricciones existentes sobre el empleo de factores de diferenciación en la clínica parece lógico diseñar materiales inteligentes que permitan la diferenciación, integración y angiogénesis en función de la morfología del material así como su porosidad con el fin de permitir la formación rápida de un tejido funcional. La estimulación propiciada por fuerzas mecánicas favorece el desarrollo tisular al provocar una deposición de ECM y reorganice la disposición celular. En el desarrollo de este trabajo experimental, se estudian los efectos que tales fuerzas ejercen sobre una población de células mesenquimales en un armazón poroso bajo condiciones de flujo en bioreactor a fin de simular un nicho celular.

1.7.-Nicho celular de células madre.

Al producirse daño tisular, se pierden estructuras llamadas “nichos celulares”, el empleo de biomateriales en FTE puede permitir la recuperación y rehabilitación de esos nichos volviéndolos funcionales de nuevo.

El desarrollo de nichos artificiales ha de incluir señales de anclaje capaces de atraer y de localizar células madre endógenas a través de los mecanismos descritos con anterioridad de comunicación célula-célula y célula-ECM. Por lo tanto la ingeniería de nicho requiere que se consideren parámetros de control dinámico de citoquinas, formación de ECM, comunicación celular y factores físico-químicos.

A pesar de que existe una enorme variedad de materiales disponibles en la industria actual de biomateriales, solamente se han empezado a emplear de manera reciente para controlar la diferenciación celular.(Tare, Babister et al. 2008, Laine, Hentunen et al. 2012) Al emplear armazones con estructuras 3D se favorece el comportamiento celular de una manera más cercana al encontrado in vivo al permitir una reorganización espacial que se asemeje al tejido en comparación con lo obtenido en un armazón en 2D. Un experimento realizado con un armazón 3D de cristales coloidales invertidos para simular la topografía de un nicho de médula ósea. Estas superficies fueron capaces de ayudar al crecimiento de células y favorecer la diferenciación de linfocitos. Así mismo parámetros como la elasticidad del sustrato pueden regular la diferenciación celular de células mesenquimales en cultivo. Cuando se cultivaron células mesenquimales sobre materiales con elasticidad similar a la que presenta un ambiente muscular, se propiciaba una diferenciación hacia células musculares(Kuraitis, Giordano et al. 2012, Guo, Gonzalez et al. 2011).

1.8.-Ruta WNT. Papel en la adhesividad celular y en la clínica humana.

La observación de la existencia de ciertas mutaciones en la formación de hueso dio lugar al estudio de la señalización de WNT en formación de hueso. Al presentarse mutaciones donde no se expresaban de manera normal las señales (Schambony, Kunz et al. 2004, Jin, Park et al. 2006)WNT los pacientes incrementaban sensiblemente la cantidad de hueso formado.

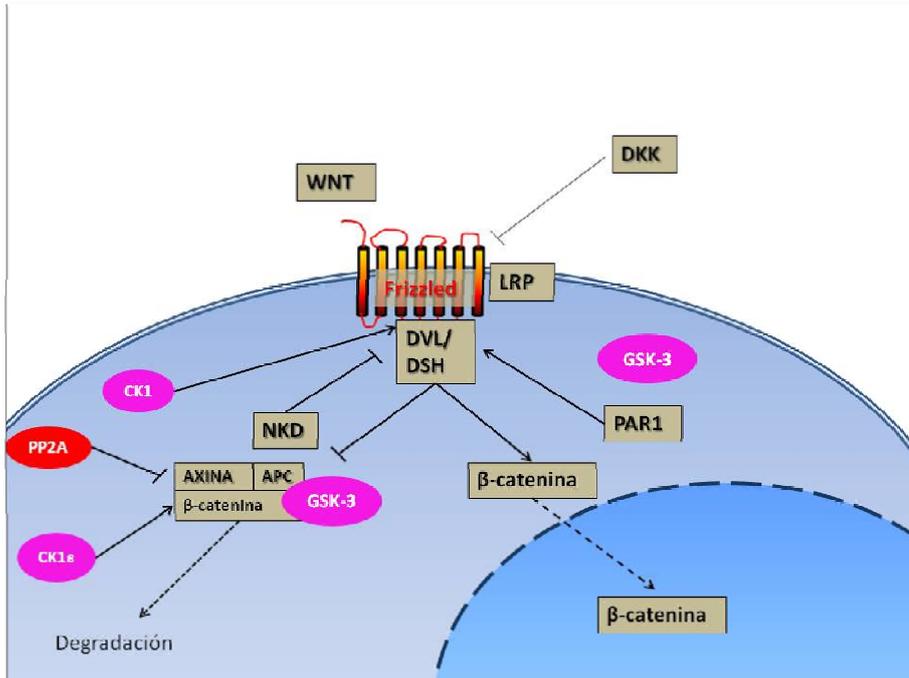


Figura 1.9.- Activación/Degradación Beta Catenina

Al realizar con posterioridad más estudios se descubrió el potencial que tenía esta ruta para el control de la actividad ósea. Las proteínas WNT se conocían ya por su papel en procesos embrionicos, tumorgénicos y de diferenciación de células madre en humanos.(Vlad-Fiegen, Langerak et al. 2012a)

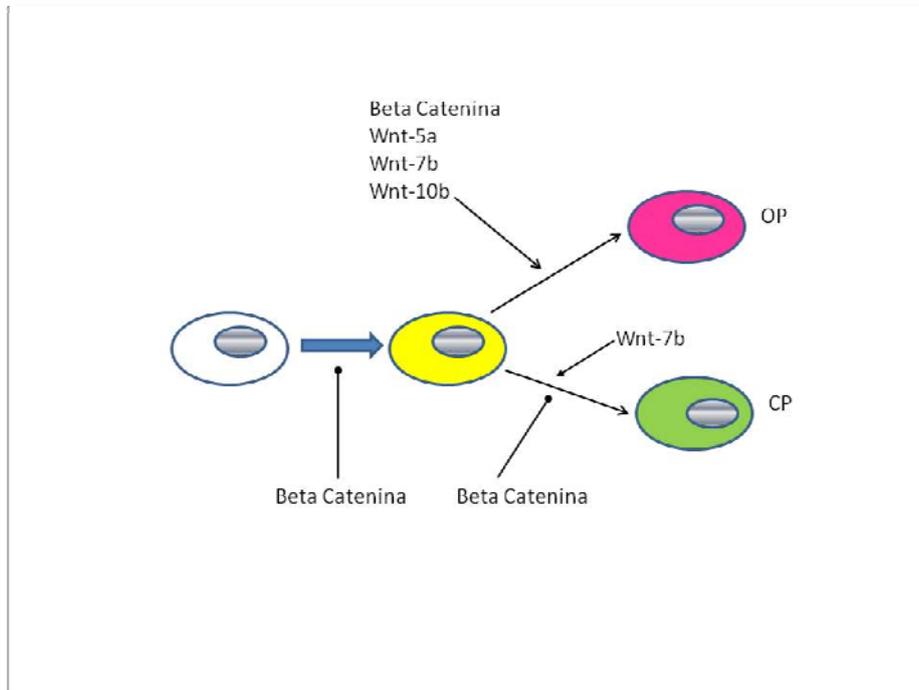


Figura 1.9.1.-Papel de WNT y Beta Catenina en diferenciación celular.

El proceso es bastante extenso y complejo, sobre un esquema general se van añadiendo cada vez más componentes e interacciones. Estas interacciones activan diferentes tipos de modelos de señalización intracelular dividiéndose en:

- Señalización canónica. Dependiente de \square -Catenina.
- Señalización no canónica. Independiente de \square -Catenina.

La ruta canónica es hasta el momento la más estudiada en el campo músculo esquelético al dirigir los procesos de formación ósea. Una pieza

por la cual se regula toda la ruta es la β -Catenina, esta al ser estabilizada en el citoplasma tras pasa la membrana nuclear y produce una regulación directa de la expresión génica.(Jamieson, Sharma et al. 2012) En la membrana celular existe un marcador Frizzled (Fz) que permite el anclaje de la WNT a la superficie celular, siendo trasladada al citoplasma por receptores de lipoproteína (LRP 6), al realizarse este paso, se evita la degradación de la β -catenina por la formación de un complejo de Axina-, GSK3 β , y APC. Al no existir degradación, se acumula en el citoplasma antes de ser trasladada en el núcleo donde comienza a regular las interacciones de proteínas de unión a DNA y de varios factores de transcripción(Vlad-Fiegen, Langerak et al. 2012a, Vlad-Fiegen, Langerak et al. 2012b). Esta regulación modela la correcta formación del sistema nervioso, hepático, cerebral y cardíaco.

El interés para la bioingeniería es derivado de lo observado en procesos de cáncer donde las células proliferan a gran ritmo y porque esta ruta tiene una relación directa con otra ruta de diferenciación celular que ha sido estudiada con gran entusiasmo durante los últimos años, la de las proteínas morfogénicas de hueso (BMPs), parte de la TGF- β . A la hora de activar esa ruta in vitro se puede realizar por medio del empleo de carga mecánica(Jamieson, Sharma et al. 2012).

En la ruta, un componente, DKK-1, en su ausencia, se incrementa la masa ósea obteniéndose un tejido óseo más sólido y fuerte. Esto mismo se observa al fosforilar a la β -Catenina en modelos murinos. Los polimorfismos del gen del receptor de Wnt LRP6 están asociadas a las

fracturas osteoporóticas asociándose con una baja densidad ósea. Al conocer desde un punto de vista más básico las interacciones intra-ruta se puede intentar modularlas por medio de ingeniería de tejidos al considerarla parte del nicho celular (Monroe, McGee-Lawrence et al. 2012).

1.9.-Materiales empleados en la tesis.

1.9.1.-Tántalo y Niobio

La historia del tántalo y del niobio es tan antigua como los dioses griegos y quizás sea este el *μῦθος* (relato, en lengua *ἀγρία*) en la cual se describe la mitología de los implantes en tiempo helénico. Tántalo, *Τάνταλος*, hijo de Zeus era un rey que nadaba en la abundancia, favorecido por los dioses en todos los aspectos este era a su vez padre de Pélope, *Πέλοψ* y de Niobio, *Νιόβη*. Tántalo era constantemente invitado a compartir los banquetes de los dioses, pero creció el rey en confianza y compartió con los hombres los secretos revelados por los dioses. Al conocer estas noticias Zeus se encolerizó, algo bastante común en él, y castigó a Tántalo a permanecer en los dominios de Hades (*Ἄφιδης*) donde los árboles con frutas apartaban sus ramas para que no pudiese comer y las aguas del lago se retiraban cuando intentaba beber. Tras esta afrenta el rey se sintió su orgullo dañado y se dirigió de nuevo a su palacio, donde organizó una comida para los Dioses.

Las mesas se llenaron de invitados que desconocían que Tántalo había servido como comida a su propio hijo Pélope con el fin de poner a

prueba la omnisciencia inherente de las deidades. Los dioses no tardaron en descubrir el engaño, salvo *Δημήτηρ* que dio buena cuenta de un hombro entero. Enojados los dioses por este agravio llevaron los restos del pobre infante a una olla donde *Μοῖραι* (*Μοῖραι*) y Hephaesto (*Ἥφαιστος*) consiguieron volverlo a recomponer y llenar de vida, salvo claro, por el hombro que había sido degustado por la diosa de la fertilidad. Buscó Hephaesto una pieza de marfil que empleó como implante de hombro para que Pélope pudiese volver a ser rey del Pisa en el Peloponeso. La parte de biocompatibilidad nunca fue explicada en la historia que ha llegado hasta nuestros tiempos quizás borrada por *Αἴολος*, pero... ¿Desde cuándo los misterios de la ciencia de los Dioses es menester de los *θνητούς*?



Figura1.9.2.- Hephaesto, el mítico “científico de materiales”.

Los procesos de manufactura son muy similares para ambos metales desde el punto de vista metalúrgico ambos sufren una separación por medio de extracciones líquido-líquido pudiendo ser también destilados y precipitados en forma de hidróxidos y óxidos deshidratados. La forma de óxido se reduce por la acción de sodio siendo también empleado el aluminio y el carbón.

Los puntos de fusión de ambos metales son bastante elevados (2468°C para Ta y 2996°C para Nb) por lo que el proceso de formación de aleaciones para mejorar sus propiedades mecánicas con Mo o V puede llegar a ser un factor económico a tener en cuenta al tener estos su vez puntos de fusión también altos. La industria manufactura el Ta y el Nb en formas suficientemente dúctiles para que se puedan tratar en un molino de bolas en atmósfera inerte admitiendo el uso de técnicas mecánicas de aleación. El polvo ya en forma de aleación se procesa a 1200°C seguidos de una compresión y sinterización en condiciones de vacío o por compresión isostática a temperatura elevada (HIPping).

	Nb	Ta	Mo	W	V
Atomic radii (nm)	0.143	0.143	0.136	0.137	0.132
Ionic radii ^a (nm)	0.069	0.068	0.062	0.062	0.059
ρ (kg.m ⁻³)	8,580	16,680	10,280	19,260	6,110
Melting point (°C)	2,468	2,996	2,610	3,410	2,178
α (10 ⁻⁶ K ⁻¹)	7.3	6.5	4.9	4.5	8.3
E^b (GPa)	110	185	329	405	134
Shear modulus ^b (GPa)	37.5	69			
YS ^b (0.2%)(MPa)	228	207			
E_0 (V)	-0.96	-1.12	-0.2		-1.18

Tabla 1.1 Comparación de valores para diferentes materiales empleados en bioingeniería.(Helsen 2010)

Ambos metales son electronegativos y las cualidades de resistencia a la corrosión son mayores en el Ta comparado con Nb y Ti. Son también biocompatibles sin que se haya encontrado en la literatura ejemplos que los descarten para el empleo en la clínica humana. De hecho ambos materiales llevan más de 60 años siendo empleados en medicina en aplicaciones tales como suturas, reparación de huesos, electrodos para reparación nerviosa o como material radiopaco. Debido a sus características físicas el material parece tener una mayor aplicación cuando se produce en forma porosa.(Balla, Bodhak et al. 2010) Empresas como Zimmer comercializan Ta en forma porosa para varias aplicaciones en traumatología y ortopedia. Desde el punto de vista mecánico su rendimiento es bueno como sustituto óseo o en prótesis articulares. Los resultados obtenidos en cuanto a osteointegración muestran la necesidad de adecuar el tamaño de poro para favorecer procesos angiogénicos habiéndose observado remodelación cerca de los canales de Haverst. (Miyazaki, Kim et al. 2002)El material es en ocasiones como implante en zonas de osteonecrosis. El sistema de reparación ósea requiere la presencia de diferentes porosidades y tamaños para poder crear sistemas vasculares, colonización celular y dar lugar a una estructura estable. El Niobio ha sido empleado incluso para stents y en aleación con Ti para mejorar las propiedades de los implantes en traumatología y ortopedia.(Boby, Toh et al. 1999, Dittrick, Balla et al. 2011)

Tipo de Prueba	UTS MPa	YS MPa	E Gpa	Elongación %
Ta Poroso				
Compresión	55	37	2-4	317
Hueso Trabecular				
Compresión	10	5	7	

Tabla 1.2 Comparación valores para Ta poroso con hueso humano trabecular. UTS(Fuerza de Tensión Final),YS(Límite Elástico), E (Módulo Young). (Helsen 2010)

1.9.2.-TiO₂. Titania.

La implantación de un material metálico implica la formación de un óxido en forma de capa superficial sobre el biomaterial. La velocidad de oxidación y la calidad de la capa de óxido formada en cuanto a la capacidad de difusión de iones determina también el comportamiento del implante en condiciones *in vivo*. Los peores resultados son obtenidos por el acero inoxidable siguiendo este orden Al₂O₃, Cr₂O₃, TiO₂, ZrO₂ y Ta₂O₅ vemos que el TiO₂ parece tener un comportamiento válido para ser considerado como plataforma de ingeniería de tejidos(Sjöström, Dalby et al. 2009, Vasilev, Poh et al. 2010). Otra razón para considerar a la Titania es que la mayoría de los implantes que se emplean en Traumatología y Ortopedia son de Titanio y si la experiencia clínica demuestra que el rendimiento es bueno en estas prótesis podemos considerar que estudiar un armazón de Titania es interesante para conocer el comportamiento de células madre mesenquimales sobre el mismo. La formación de una capa de TiO₂ preserva al resto del implante de la corrosión. Tiene capacidad de

atraer células madre mesenquimales y de osteoconducción sobre implantes de NiTi si se emplea como cerámica con nanoporosidad recubriendo la superficie de Ti se obtienen interacciones íntimas entre el implante y el tejido, la Titania además ha demostrado ser una superficie válida para estudios de mecanotransducción (Haddow, Kothari et al. 1996).(McNamara, Sjöström et al. 2011)

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.-Introducción al cultivo celular.

El cultivo celular representa el método más claro de estudio de biocompatibilidad de un material a nivel in vitro. Con los protocolos actuales de cultivo celular las primeras reacciones entre célula y biomaterial son posibles de realizar de manera más barata que en las pruebas in vivo.

Para la realización de un cultivo celular es necesario contar con los siguientes materiales mínimos en un laboratorio con ambiente estéril:

- Cabina de flujo laminar.

Estas cabinas con flujo laminar que puede ser vertical o horizontal son la piedra angular de estas técnicas. Permiten mantener un ambiente estéril en el cual las células pueden entrar en contacto con los materiales sin ninguna interacción no deseada como pueden ser hongos o bacterias. Las cabinas horizontales son clasificadas como de seguridad biológica y en ellas se realizan todos los pasos cuando se emplean tejidos humanos ya que permiten una manipulación segura hacia el investigador. Durante la tesis se empleó una cabina de cultivo de seguridad biológica clase y flujo vertical.

- Incubador. Las células eucariotas han de ser mantenidas en un ambiente de CO₂ al 5% y 37C, para ello se contó un un incubador Nuair

- Plástico de cultivo, tratado para favorecer la adhesividad celular y la rápida proliferación de las células en monocapa.

Obviamente uno de los puntos más importantes a la hora de diseñar experimentos es escoger adecuadamente el tipo celular que se empleará. Cada tipo de célula cumple una función diferente en el organismo, su fenotipo es diferente así como su comportamiento ante los posibles microambientes en biomateriales donde podemos realizar el cultivo. Por lo general existe una gran tendencia a emplear líneas celulares en los experimentos. Estas líneas son células “inmortalizadas” o bien por métodos de ingeniería genética (virus Epstein-Barr) o procedentes de explantes tumorales. Algunas de las líneas tumorales se han venido cultivando desde hace decenas de años y son mundialmente conocidas como las HeLa, extraídas a Henrietta Lacks. En el campo de la biocompatibilidad se emplean células de varios orígenes, pre-osteoblásticas (MG-63, Saos-2), Musculares (NIH 3t3) etc.

Durante el diseño de estos experimentos no hemos decidido decantarnos por ninguna de estas líneas, al estar su mecanismo de adhesividad y proliferación alterado se optó por el empleo de células madre adultas ya que facilitarían una simulación más cercana a lo que se puede esperar de la reacción de un tejido a un implante en condiciones *in vivo*. En el campo de la biocompatibilidad, algunos científicos cuestionan la utilidad de las pruebas *in vitro* y animales a la luz de la aparente falta de correlación con el uso pruebas y la historia clínica de los materiales. Sin embargo, la falta de correlación no es sorprendente a la luz de las

CAPITULO 2

diferencias entre estas pruebas. En pruebas *in vitro* y animales menudo medir aspectos de la respuesta biológica que son más sutil o menos importante que los observados durante el uso clínico de un material. Además, las barreras entre el material y los tejidos pueden existir en el uso de las pruebas o el uso clínico, pero no pueden existir en el *in vitro* o las pruebas con animales. Por lo tanto, es importante recordar que cada tipo de ensayo ha sido diseñado para medir diferentes aspectos de la respuesta biológica a un material, y la correlación no es siempre de esperar.

Las células madre mesenquimales son células primarias multipotentes que fueron aisladas de médula ósea humana donada por el Departamento de Cirugía Ortopédica y Traumatología bajo acuerdos de donación y consentimiento por parte de pacientes que iban a ser intervenidos quirúrgicamente en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela. Las muestras obtenidas en quirófano eran recibidas en el laboratorio de cultivo celular en tubos con EDTA (referencia). Inmediatamente tras su recepción se procedía a aislar las células madre presentes en la muestra por medio del protocolo gradiente en Ficol-Histopak (Sigma). Brevemente en estéril se procede a pipetear un volumen de 5 ml de Ficol previamente atemperado a 37°C en un tubo falcon de 15 ml.

Sobre este volumen se pipetea con cuidado un volumen igual de médula ósea formándose dos capas claramente diferenciadas (Figuras 2.1 y 2.2.). Este procedimiento se repite para todo el volumen disponible.

AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE Y CULTIVO CELULAR

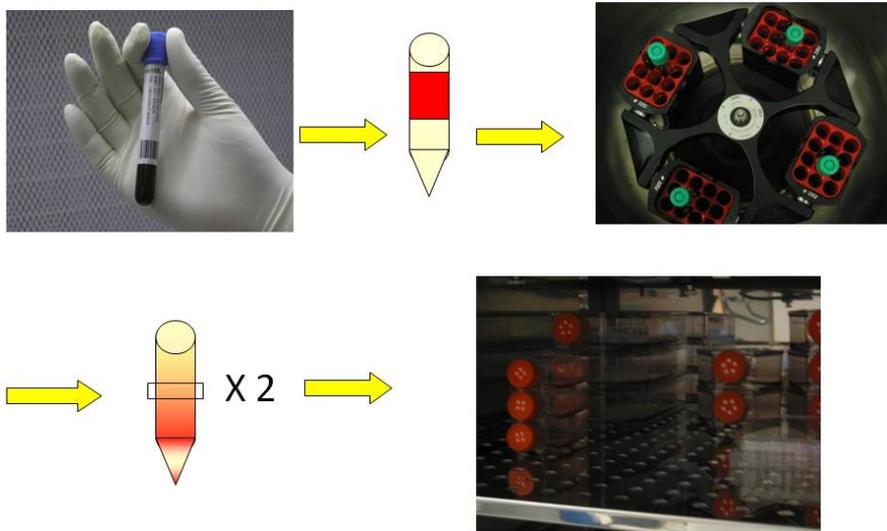


Figura 2.1.- Esquema de aislamiento de células madre mesenquimales a partir de médula ósea humana. El proceso incluye una centrifugación a 2000 rpm y dos lavados posteriores.

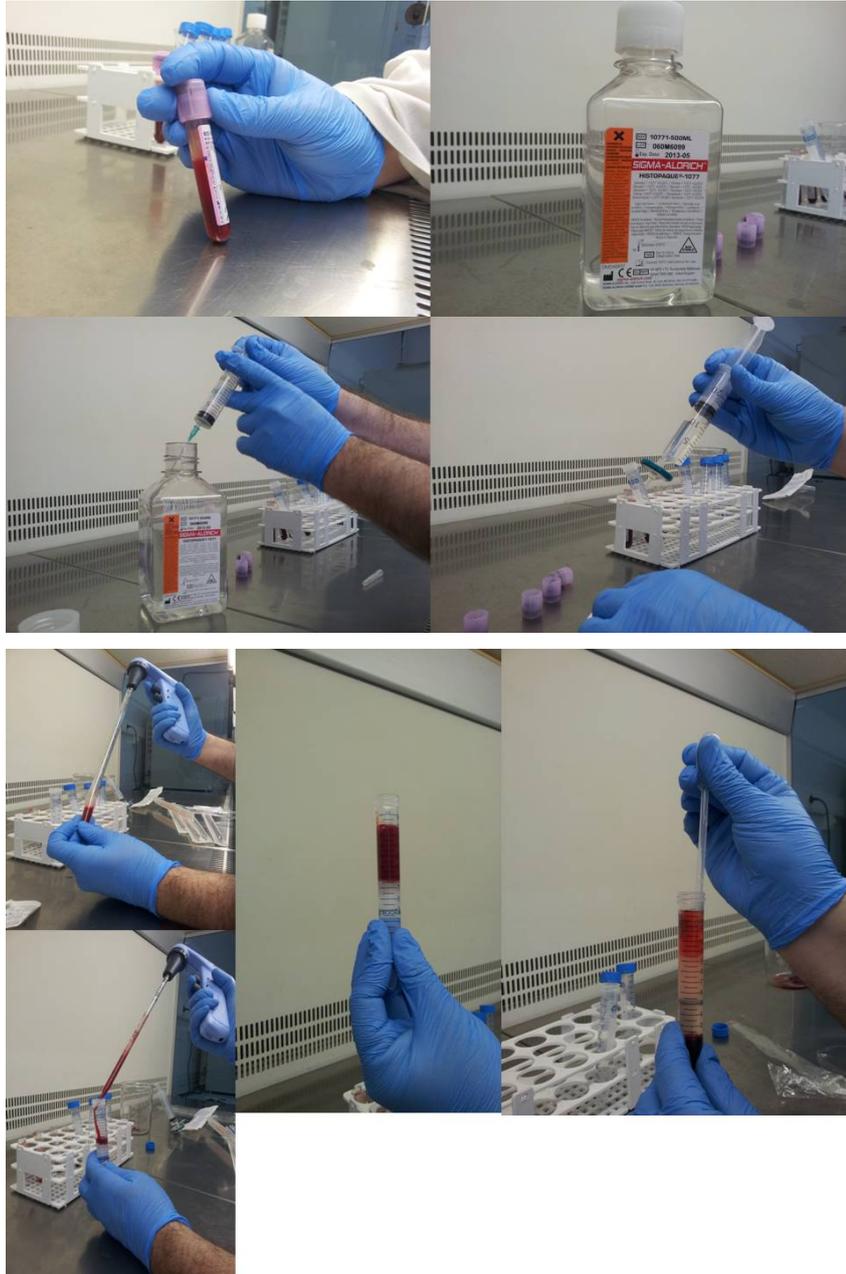


Figura 2.2.- Aislamiento de células mesenquimales. Preparación de un gradiente de Ficoll

Una vez que se tiene una batería de tubos preparados, se procede a realizar una centrifugación a 37C en una centrífuga durante 30 minutos a 2000rpm. Este paso favorece la formación de diferentes capas de gradiente donde podemos localizar varios tipos celulares. La fracción de glóbulos rojos se precipita en el fondo del tubo , la grasa en la capa más superficial y una interfase rica en células madre ocupa una zona intermedia del tubo. Por medio de una pipeta estéril tipo Pasteur se aspira esa interfase (Fig. 2.2) para su posterior lavado en D-MEM. El aspirado es pipeteado en un tubo nuevo donde es lavado con D-MEM y centrifugado a 1500 rpm durante 3 minutos formándose un pellet rico en células madre. Este pellet es resuspendido en D-MEM y subcultivado en frascos de cultivo de 25cm². En estos frascos se alcanzará la confluencia celular aproximadamente tras dos semanas de cultivo en un incubador a 37C y 5% de CO₂.

Al alcanzarse la confluencia las células son tripsinizadas para poder ser subcultivadas sobre los materiales de nuestra investigación mientras que una alícuota es cultivada de nuevo en un frasco de cultivo permitiendo así tener más células para los experimentos. El número celular es medido por medio de un hemocitómetro (cámara de Neubauer). Para el cultivo de células madre el D-MEM está suplementado con gentamicina (280ul/250ml) y Suero Fetal Bovino (Hyclone) 20%. Esta misma fórmula de D-MEM es empleada en el cultivo de la línea celular MG-63 a excepción de la concentración de SFB que es de un 10%. Los medios son cambiados cada tres días y los cultivos tripsinizados cuando se alcanza una confluencia del 90%. Una vez que se alcanza la confluencia en los frascos

CAPITULO 2

de 25cm² se pasa a frascos de 125cm² para obtener un mayor número de células.

Los materiales empleados son siempre tratados en un baño de ultrasonidos para limpiarlos efectivamente y posteriormente autoclavados (Selecta Autotester) a 121 °C durante 30 minutos.

2.2.-Cultivo en cámaras de perfusión.

Parte de los experimentos presentados en esta tesis han buscado recrear un ambiente dinámico en el cual se pudiesen investigar el comportamiento de células madre sobre materiales simulando un nicho celular similar al que se puede dar en condiciones in vivo.

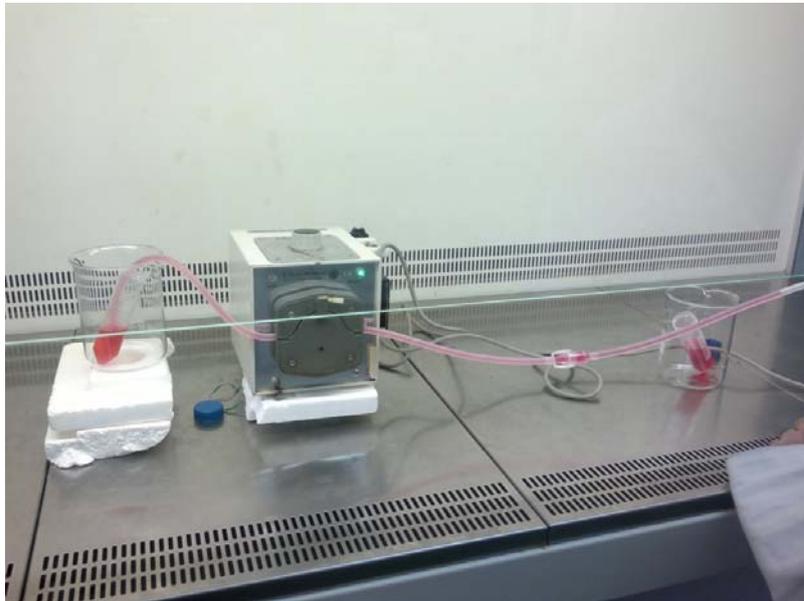


Figura 2.3.-Montaje de cultivo en bioreactor. La bomba peristáltica crea un flujo continuo hacia el bioreactor, localizado a la derecha de la foto.

El cultivo celular en estático es el más extendido hasta el momento a la hora de realizar pruebas in vitro, aún así, es importante tener en cuenta que la ingeniería de tejidos juega con señales bioquímicas como físicas.

En el caso de las señales físicas, una de las técnicas más interesantes en la actualidad es emplear bioreactores de flujo. Estos bioreactores como el de la figura 2.4 fueron empleados a lo largo del estudio de interacciones célula-TiO₂ en malla. A cada extremo del bioreactor se conectan unos tubos autoclavados que son conectados a su vez uno a una bomba peristáltica que bombea un flujo pequeño durante un largo periodo de tiempo y otro extremo a un vaso colector.

El flujo es creado con medio de cultivo completo D-MEM tal y como se emplea para cultivo estático ya que favorece la supervivencia celular en el armazón. Tanto el armazón como los bioreactores son estériles a la hora de realizar el cultivo. En primer lugar se deja crecer las células madre durante 24 horas a una densidad de 60×10^3 células/cm². Esto favorece el asentamiento de las mismas sobre las estructuras. Los experimentos constan de un grupo control “estático” donde no se procede a bombear flujo de medio a través del armazón.

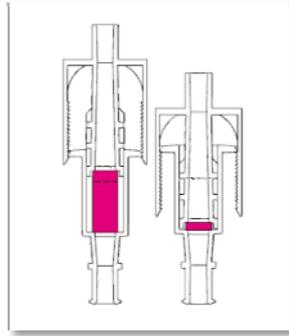


Figura 2.4.-Bioreactor de Flujo EBERS.

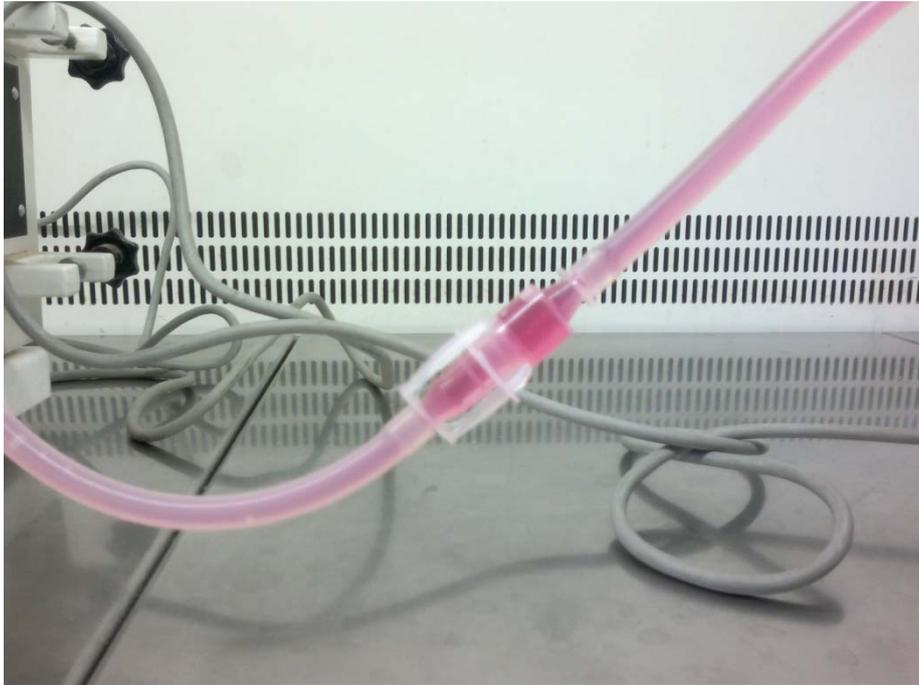


Figura 2.4.-Bioreactor de flujo EBERS durante el proceso experimental.

La idea detrás de esta parte experimental es conocer la capacidad de regulación de la ruta WNT canónica (Beta-Catenina) a través de diferentes impulsos cíclicos. Los ciclos constaron de impulso de 1ml/ minuto durante 30s durante 5 minutos, seguidos de un reposo de 10 minutos. Estos tiempos fueron escogidos en función de la bibliografía existente ((O'Brien 2011, Plunkett, Jaasma et al. 2008)) en los cuales se describió cómo ciclos de flujo pueden influenciar el potencial osteogénico de las células cultivadas en armazones poliméricos.

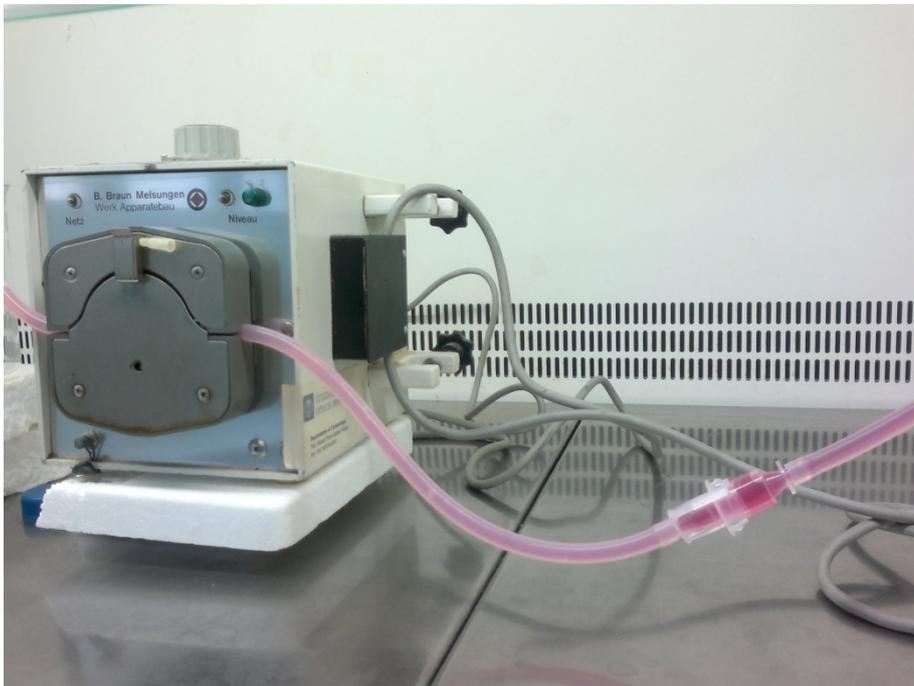


Figura 2.5.-Detalle del montaje del bioreactor

2.3.-Base teórica de los inmunoensayos.

Los inmunoensayos (ELISA, enzyme ligand inmuno assay) son una herramienta rápida para estudiar la presencia de posibles citokinas expresadas por células en contacto con la superficie de un biomaterial. La citoquina ELISA (Enzyme-Linked Inmuno Ensayo sorbente) es un método específico y altamente sensible para mediciones cuantitativas de citocinas o analitos en otras soluciones.

Un anticuerpo monoclonal específico (MAB) capaz de capturar la citoquina de interés está recubierta por una placa de microvaloración. Un segundo mAb, utilizado para la detección, se une un epítipo diferente sobre la citoquina. El mAb detección está marcado con biotina, que permite la unión posterior de una enzima de estreptavidina conjugada. Todos los reactivos no son lavados. Cuando se añade el sustrato, una reacción de color se desarrollará que es proporcional a la cantidad de citoquina atado. La concentración de citoquinas se determina por comparación con una curva estándar con concentraciones conocidas de citoquinas. La sensibilidad de un ELISA depende principalmente de la afinidad de los anticuerpos y en el sistema de amplificación utilizado. Los límites de detección para la prueba ELISA de citoquinas se encuentran comúnmente en la parte inferior picogramos / ml. El tipo de ensayo ELISA elegido fue el denominado “sándwich”, ideal para detectar antígenos en muestras.

El protocolo utilizado es el siguiente:

1. Sobre una superficie se ha capturado una capa de anticuerpos conocidos.
2. La superficie es tratada para evitar uniones secundarias no deseadas.
3. Se aplica el antígeno presente en los sobrenadantes de cultivo.
4. Se realice un primer lavado para liberar el antígeno no unido..
5. Se añade un anticuerpo, que se une al antígeno fijado (por eso se denomina “sándwich”).
6. Se usan ahora unos anticuerpos secundarios marcados de manera enzimática que se unen al anticuerpo anterior.
7. Un Segundo lavado es hecho para eliminar material que no se haya unido.
8. En este paso se emplea un producto químico que reacciona con la enzima anterior dando lugar a una señal de fluorescencia que es detectada por medio de un lector específico de microplacas. (Biorad Microplate Reader).

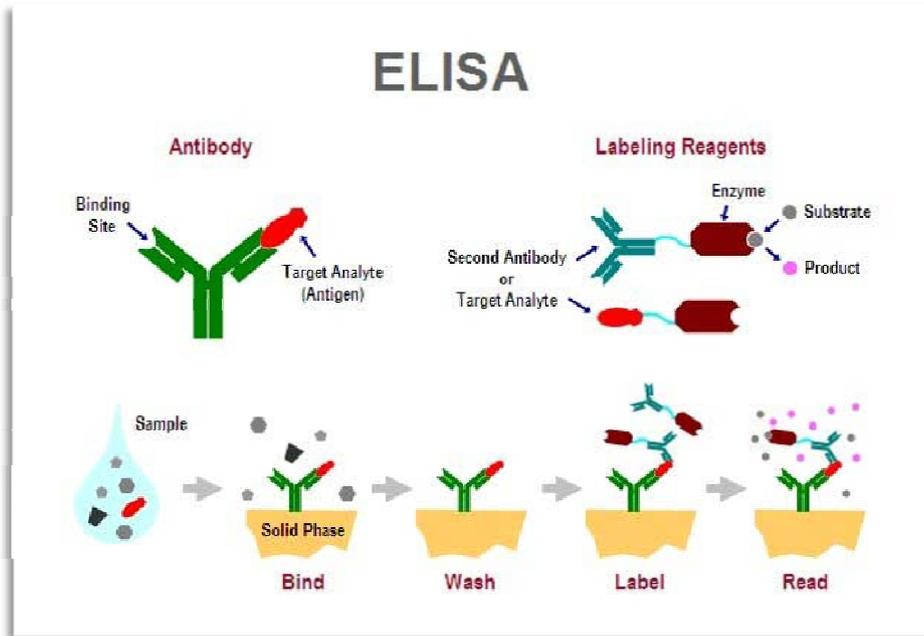


Figura 2.6.-Esquema de un Elisa Sanwich. Bendermedsystems.

Para poder identificar en qué material se está produciendo un mayor índice de apoptosis se realizó un ELISA de Caspasa-3. La caspasa 3 es una enzima que está activada en los procesos apoptóticos celulares tanto en la vía intrínseca como extrínseca. (Kihara, Nakamura et al. 2009) La caspasa 3 tiene una característica de zimógeno que es esencial ya que controla la actividad de la misma evitando una muerte celular indiscriminada mediante la caspasa-3.

El zimógeno no tiene actividad hasta que es activado por un iniciador, este proceso solamente se da una vez que se han desencadenado los procesos apoptóticos de señalización celular. Estas señales celulares producen el ataque por células T-Killer. La caspasa 3 juega un papel central

pues en los procesos de muerte celular interaccionando de manera muy cercana con la Caspasa-9 en la vía intrínseca. In vitro la activación es mucho más sencilla que in vivo, siendo un marcador ideal a la hora de realizar ensayos de biocompatibilidad celular de biomateriales.(Anderson, Rodriguez et al. 2008) En el ensayo un anticuerpo monoclonal anti-Caspasa-3 es adsorbido sobre la superficie de placas de 96 pocillos estériles. La caspasa 3 presente en los sobrenadantes recogidos se une directamente sobre esta superficie al ser capturada por el anticuerpo primario. Estos experimentos se realizaron a 2,5 y 7 días. Los sobrenadantes son recogidos directamente de los pocillos de cultivo y congelados a -20C , de esta manera se puede realizar todo el ensayo en una sola sesión. Para permitir la detección por medio del lector de microplacas, un anticuerpo marcado con peroxidasa de rábano se une al anticuerpo secundario (anti-Caspasa-3). Siguiendo el protocolo, se procede a hacer un lavado para eliminar todos los componentes no unidos y a añadir un componente que haga reacción con la peroxidasa para poder ser observada. La reacción se deja incubar durante 45 minutos y es terminada con la adición de un compuesto ácido que bloquea la reacción. Inmediatamente se procede a la lectura de la placa(Biorad USA) a una longitud de onda de 450nm.

2.4.-Ensayos de Proliferación celular.

Para realizar estos ensayos se utiliza el método denominado MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-dipheniltetrazolium bromuro,).

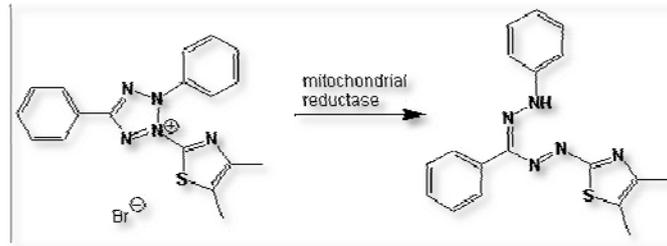


Figura 2.7 Esquema del proceso de reducción del marcador MTT en la mitocondria.(Sigma-Aldrich).

Para determinar en qué material o ambiente las células proliferan de una manera más patente existen varios métodos en el mercado, uno de ellos es posiblemente el más empleado en la actualidad, desarrollado por Mossman (ref) a principios de la década de los 80 del siglo pasado. El método MTT es un método colorimétrico que emplea indicadores cromógenos fluorescentes. La base del ensayo es la conversión del compuesto soluble en agua MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromuro a otro insoluble, 2-4 Formazan.

Este proceso ocurre tras la captación del MTT por parte de las células a través de las mitocondrias. Este tipo de ensayo es por lo tanto dependiente de la capacidad metabólica de cada tipo celular. El Formazán resultante es tratado con un solubilizante específico que produce una coloración en el medio de cultivo proporcional al número de células siendo determinado a una longitud de onda de 570nm. Para los ensayos de proliferación celular de los experimentos desarrollados en la tesis, se cultivaron 50 células por cm² de material a 3 tiempos diferentes, 3,7, y 10 días, tras lo cual se procedió siguiendo el protocolo descrito.

2.5.-Microscopía

Con el fin de obtener una imagen que nos permite conocer cómo se distribuyen las células sobre las diferentes superficies, la existencia de comunicación celular, la formación de matriz extracelular o aún más importante, la presencia de células vivas y muertas que nos conceda una perspectiva de la viabilidad celular se ha recurrido al empleo de métodos de microscopía electrónica de barrido (SEM) y Microscopía láser confocal (LCM) Leica confocal SP2.

2.5.1.-Microscopía Confocal

La microscopía confocal es una técnica que ofrece varias ventajas sobre otras técnicas de microscopía de fluorescencia convencionales. Entre las ventajas cabe destacar la capacidad del usuario de controlar la profundidad de campo o la mejora de la imagen por medio de la reducción de la información de fondo focal. En este campo de biomateriales es especialmente interesante el poder además seleccionar el grosor de las secciones que el láser va a ir leyendo o la eliminación del resplandor de especímenes con un espesor superior al plano inmediato de foco.

En la figura 2.8 podemos ver cómo es el principio de confocalidad. La luz es emitida por un láser que funciona como fuente de excitación, está a su vez pasa a través de una apertura “pinhole” estenopéica situada bajo un plano conjugado (confocal). Hay dos aperturas importantes en el sistema, a) una situada para realizar la exploración sobre la muestra b) otra apertura estenopéica posicionada delante de un tubo fotomultiplicador que

funciona como detector. La luz láser es reflejada por un espejo dicromático que se mueve para explorar la muestras en un plano focal y la fluorescencia emitida de manera secundaria en diferentes puntos de la muestras pasa de nuevo a través del espejo dicromático concentrándose con un solo punto en el detector confocal de la apertura estenopénica. El punto láser se mantiene siempre fijo mientras que el usuario puede operar el sistema en X, Y, Z.

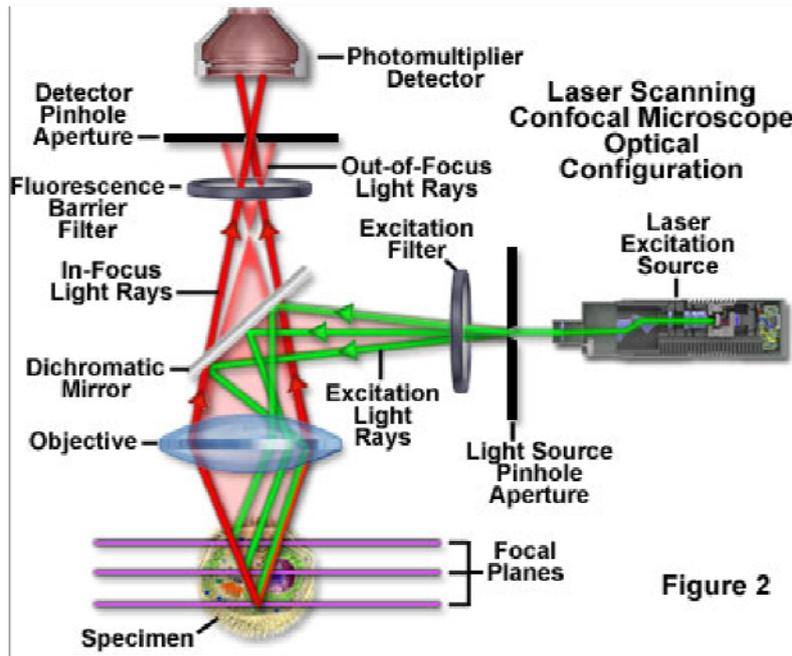


Figura 2.8.-Esquema de un microscopio láser confocal. (Leica)

2.5.2.-Tinción vivo muerto. Ioduro de propidio-Calceína AM.

El microscopio confocal ha sido empleado en esta tesis para conocer la presencia de células vivas y muertas sobre la superficie de las muestras estudiadas. La técnica empleada de Calceína-Ioduro de propidio es un método rápido y efectivo que se usa con asiduidad para este tipo de pruebas.

Calceína AM (calceína acetoximetil éster), una organización no-fluorescente, compuesta de células permeables, se convierte en el calceína fluorescente de color verde fuerte cuando se hidroliza por las esterasas intracelulares en células vivas (Figura 2.9) Es ampliamente utilizado para la determinación de la viabilidad celular ya que la intensidad de fluorescencia de calceína es proporcional a la cantidad de células vivas. Calceína es un reactivo fotoestable y está bien retenido en el citoplasma de las células vivas. Calceína no se ve influenciada por el pH intracelular. Su fluorescencia verde brillante puede ser controlada en $Ex / Em = 494nm / 520 nm$.

Entre otros reactivos, incluyendo BCECF, AM y diacetato de carboxi-fluoresceína, calceína AM es el indicador más adecuado para la tinción de células viables, debido a su propiedad de baja citotoxicidad. Calceína AM no afecta a la proliferación celular o viabilidad. Calceína AM se utiliza en la invasión celular, adhesión, migración y otros ensayos basados en proliferación celular.

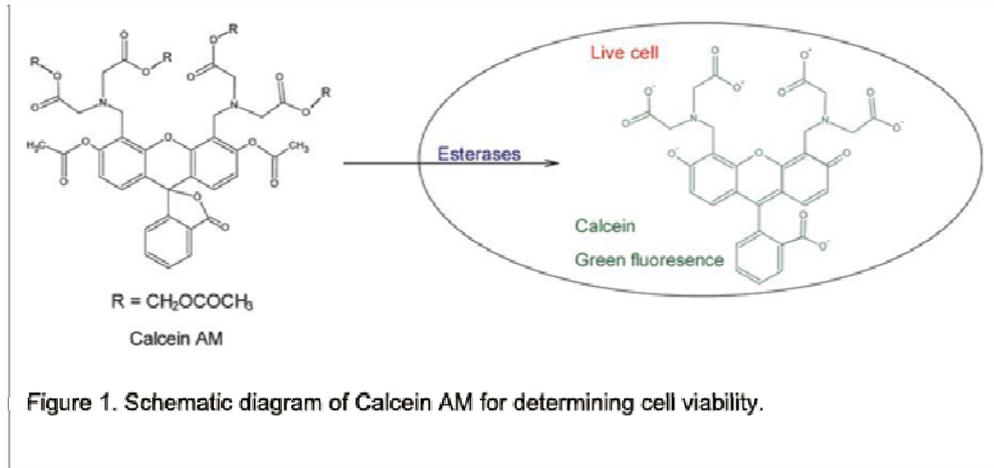


Figura 2.9.-Mecanismo de acción de la Calceína AM en células vivas Sigma-Aldrich.

2.5.3.-Ioduro de Propidio.

El ioduro de propidio (IP) es un compuesto que se une a las secuencias de ácidos nucleicos al intercalarse entre las bases nucleicas sin preferencia por secuencia. Una vez que el colorante se une al núcleo, este produce una fluorescencia con una excitación aumentada entre 20 y 30 nm hacia el rojo y 30nm hacia el azul. El ioduro de propidio marcará pues las células que están muertas o en proceso apoptótico que facilita la incorporación del mismo al permeabilizarse la membrana celular. Esta tinción es altamente tóxica por lo que además de tener las precauciones necesarias para su empleo, ha de ser empleada en cortos periodos de tiempo para no favorecer un aumento en la apoptosis del cultivo celular. Durante los experimentos los cultivos son retirados previamente del incubador de CO₂, y marcados con calceína (10microL/ml) Sigma

Aldrich). Y IP (2 microL/ml) (Sigma Aldrich). Se realiza este marcaje durante 10 minutos y después se cambia el medio para evitar la aparición de tinciones no deseadas que pueden ser interpretadas como “ruido” por el microscopio confocal. Esta técnica no permite la fijación celular. Las placas son observadas rápidamente en confocal tomándose fotografías aleatorias de diferentes zonas para observar la disposición y estado de las células.

2.6.-Métodos Moleculares

2.6.1.-Aislamiento de Ácidos nucleicos

Las células interactúan con los materiales por medio de contactos focales e integrinas. Estos contactos transmiten una fuerza física a lo largo del citoesqueleto para traducirse en una señal molecular en forma de la expresión de una proteína.

Para conocer el estado en el cual se encuentran las células, es necesario proceder a la extracción de ácidos nucleicos para poder realizar la reacción en cadena de la polimerasa y obtener un cDNA a partir de un RNA. Este RNA es obtenido por medio de un proceso de extracción con mini columnas (ThermoSci). Las columnas presentan una ventaja frente a métodos tradicionales como el Trizol ya que es factible extraer ácidos nucleicos de un menor número de células y aunque la cantidad final conseguida puede ser menor, la pureza de la muestra es mayor al estar concentrada.

CAPITULO 2

El proceso se basa en el denominado dogma central de la biología molecular.(Keyes 1999, Werner 2005).

Durante todo el proceso es necesario usar guantes y trabajar en un ambiente libre de RNAsas que sin duda estropearían las muestras. El proceso de extracción de RNA está sintetizado en la figura 2.9.2

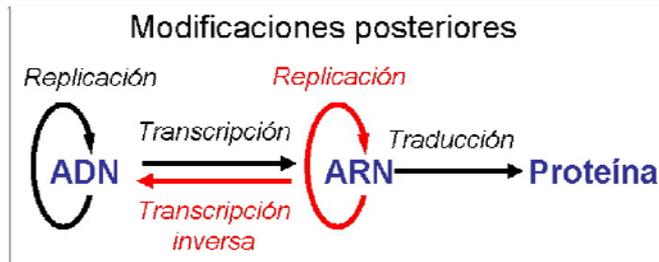
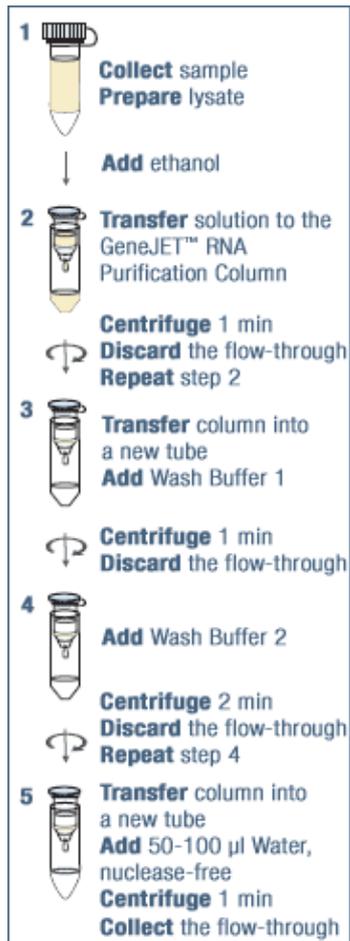


Figura 2.9.1.-Dogma central de la biología molecular.



El proceso de extracción de RNA comienza con la tripsinización de las células cultivadas sobre los soportes, estas son centrifugas hasta formar un pellet que será lisado.

Al lisado se le añade un volumen frío de etanol al 100% para preservar y estabilizar la muestra. Un volumen de 100microL son depositados en la columna y centrifugados a 10000 rpm.

El volumen eluido es descartado y la columna pasada a un nuevo tubo de recolección para proceder a 2 lavados con tampones de lavado específicos del Kit suplementados con etanol al 100%.

Tras haber realizado dos lavados, la columna es colocada de nuevo en un tubo limpio. Se procederá ahora a añadir 100microlitros de agua libre de RNAasa(DEPC) y tras volver a centrifugar a 10000rpm durante 1 minuto el eluido es recogido y cuantificado en un espectrofotómetro.

Figura 2.9.2.-Extracción de RNA. ThermoSci.

2.6.2.-Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa representa posiblemente la técnica molecular más potente existente a nivel usuario en casi cualquier

laboratorio del mundo. Esta técnica permite la amplificación de secuencias por medio de enzimas polimerasas derivadas de *T.aquaticus*.

Brevemente podemos definir los pasos principales de la PCR;(Erlich, H.A. 1989. PCR technology: principles and applications for DNA amplifications. Stockton Press, NY.):

- *Desnaturalización:* los fragmentos de ADN se calientan a altas temperaturas, que producen una reestructuración de la doble hélice de DNA en hebras individuales. Estos filamentos se hacen accesibles a cebadores (primers) específicos de cada secuencia que nos interese estudiar.
- *Anillamiento:* La mezcla de resultante de la acción anterior se enfría, permitiendo la hibridación de los cebadores con las regiones complementarias correspondientes a las secuencias en las hebras de DNA (plantillas, templates). Se produce una unión de hebras de nuevo tras este paso.
- *Extensión:* La DNA polimerasa sintetiza una hebra complementaria, esta enzima reconoce la posición de polimerasa procede a añadir nucleótidos.

Estos tres pasos se repiten continuamente hasta según el programa de amplificación que haya preparado el usuario, por lo general en la tesis se han empleado siempre 23 ciclos.

Diseño de cebadores:

Las secuencias que fueron objeto de estudio durante esta parte de la tesis fueron las siguientes:

A la hora de diseñar las secuencias se procedió a escoger los cebadores con temperaturas de fusión más similares entre sí para evitar problemas en el procesamiento. Los cebadores fueron diseñados con ayuda del programa Primer Design del NCBI:

Wnt3a: Sentido 5'-TCACGCTCTCGGGGCGGACT-3',
Antisentido 5'-AGGCTGTCGTGGACGGTGGT-3'

Beta Catenina: Sentido 5'-CGAAGGGGGTAGGGCTGCCA-3'
Antisentido 5'-GGCGGTCGACTCCACCTCAA-3'

Rho: Sentido 5'-GGGTGGGAAGTGGGAGGGCA-3'
Antisentido 5'-GGTTGGGGGTATGGGGGCCA-3'

GAPDH: Sentido-5'-CACCCATGGCAAATTCATGGCA-3'
Antisentido-5'TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC 3'

2.6.2.1.-PCR Específica de Metilación (MSP). Ensayos de metilación.

Tal y como se mencionó en la introducción de la tesis, la metilación es una herramienta útil para conocer los cambios producidos a nivel micro RNA durante procesos adaptativos por parte de sistemas vivos. En la actualidad existen varias maneras de observar los fenómenos de metilación, o epigenéticos (Delgado-Calle, Sañudo et al. 2011, Roloff, Nuber 2005). Secuenciación directa y PCR de bisulfito. En el caso de esta tesis se ha optado por emplear la PCR de bisulfito al ser un modelo probado con anterioridad, siendo capaces pues de comparar resultados con

CAPITULO 2

otros trabajos publicados. En primer lugar se procede a separar el DNA metilado del no metilado por medio de un Kit “Methylcollector”(ActiveMotif). Se siguió el protocolo del proveedor para aislar el DNA genómico. Los pasos seguidos se explican a continuación:

- 1.-Se procede a la rotura de las células por medio de una sonicación.
- 2.-A continuación tiene lugar una incubación del sonicado con proteínas de fusión HIS MDB2b/MDB3L1.
- 3.-Para separar los fragmentos de DNA metilado se emplean unas nanopartículas magnéticas recubiertas de níquel.
- 4.-En este punto un lavado es realizado para eliminar el DNA no unido.
- 5.-Se degrada el complejo proteico y se separan las nanopartículas por medio de un imán.
- 6.-El DNA obtenido es empleado en aplicaciones posteriores.

2.7.- Materiales utilizados.

2.7.1.- Niobio Metal.

Se utiliza niobio metal de alta pureza, suministrado por Goodfellow en dos formas: a) cilindros de 2mm de diámetro; y b) placas de 1mm de espesor. Las características fisicoquímicas, determinadas en el laboratorio se presentan a continuación.

Elemento	Contenido	Elemento	Contenido
Al	<10	Ca	2
Co	<10	Cr	<5
Cu	<5	Fe	8
Mg	<2	Mn	6
Mo	<10	Ni	<10
Si	0.0	Sn	<10
Ta	211	Ti	4
W	87	Zr	<10

Tabla 2.1.- Análisis químico de Niobio (ppm).

La única fase detectada en Difracción de Rayos X es el NIOBIO METAL, tal como se presenta en la figura (2.9.3). Se trata por lo tanto de niobio de alta pureza, sin elementos extraños en cantidad apreciable que puedan modificar sus propiedades biológicas. Se han utilizado piezas de niobio con dos rugosidades distintas obtenidas por pulido con abrasivos de 0,5 y 120 micras, para evaluar el efecto del acabado superficial sobre los

cultivos celulares. En la figura adjunta se presentan ambos tipos de superficie tal como se observan en Microscopía Electrónica de barrido (SEM).

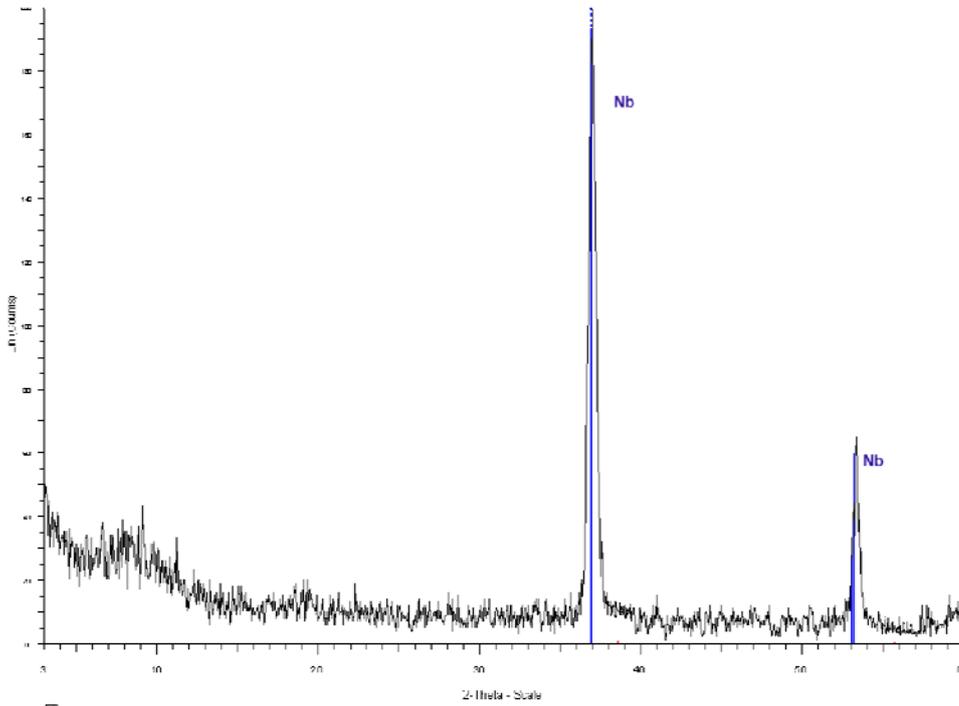


Figura 2.9.3.- Espectro de Difracción de RX del niobio metal.

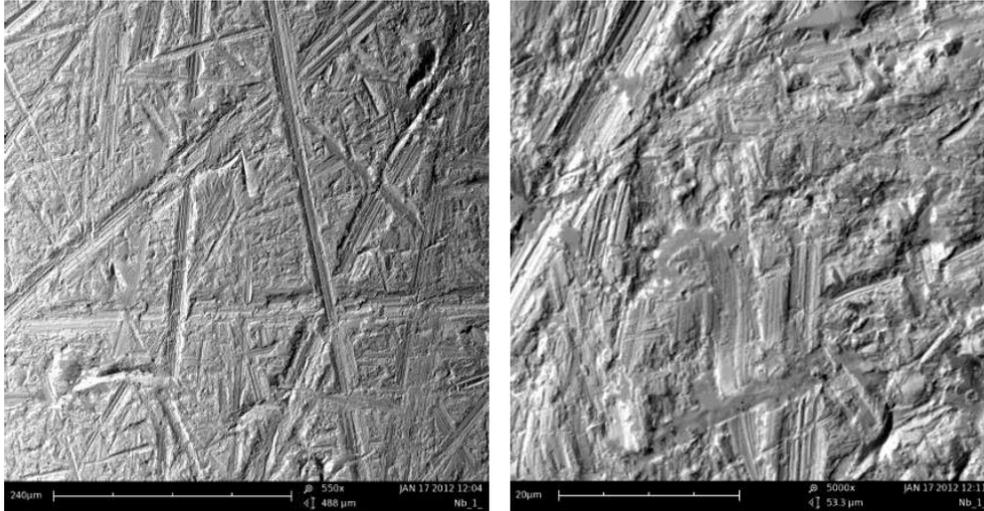


Figura 2.9.4.- Imagen SEM de la superficie de Niobio con dos rugosidades distintas.

Esta rugosidad se ha determinado cuantitativamente utilizando un Microscopio de Fuerza Atómica (AFM), obteniendo valores de rugosidad de 0.04 y de 0.7 micras respectivamente.

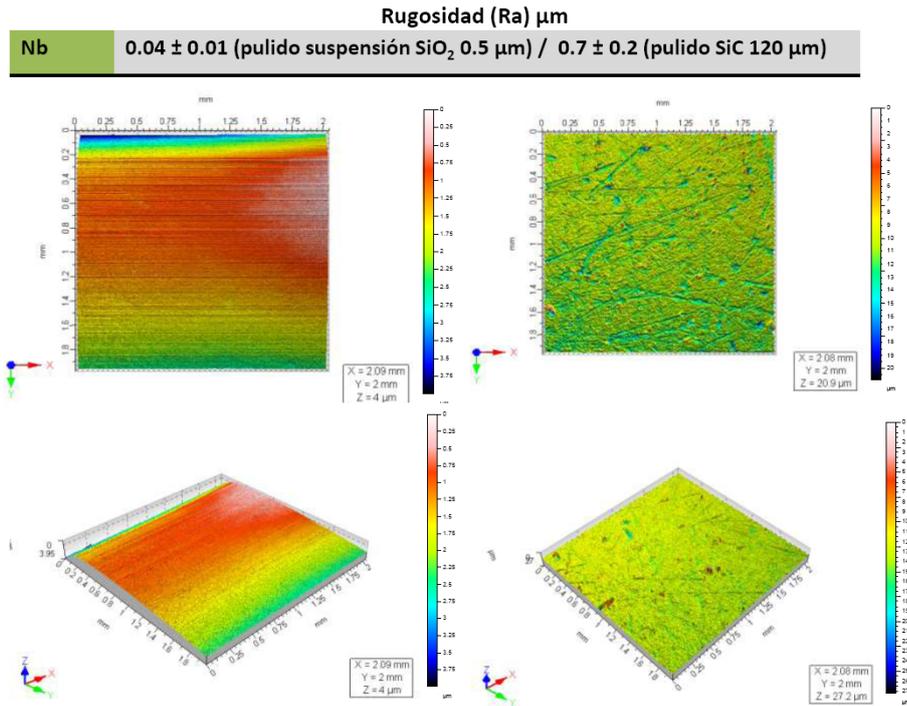


Figura 2.9.5.- Resultados de la medida de rugosidad por AFM en probetas de Niobio.

2.7.2.- Tántalo Metal.

Al igual que en el caso del niobio, se utiliza tántalo metal de alta pureza, suministrado por Goodfellow en dos formas: a) cilindros de 2mm de diámetro; y b) placas de 1mm de espesor. Las características fisicoquímicas, determinadas en el laboratorio se presentan a continuación.

Elemento	Contenido	Elemento	Contenido
Al	5	Ca	2
Co	1	Cr	<5
Cu	2	Fe	25
Mg	2	Mn	2
Mo	96	Ni	3
Si	12	Sn	3
Nb	450	Ti	22
W	90	Zr	11

Tabla 2: Análisis químico del Tántalo (ppm).

Análisis de fases

La única fase detectada en Difracción de Rayos X es Tántalo metal, tal como se presenta en la figura (2.9.7), por lo que las muestras son de Tántalo de alta pureza, sin elementos extraños en cantidad apreciable que puedan modificar sus propiedades biológicas. Al igual que con el niobio, se han utilizado piezas de tántalo con dos rugosidades distintas obtenidas por pulido con abrasivos de 0,5 y 120 micras, para evaluar el efecto del acabado superficial sobre los cultivos celulares. En la figura adjunta se presentan ambos tipos de superficie tal como se observan en Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

La rugosidad de las piezas de Tántalo también se ha determinado cuantitativamente mediante un Microscopio de Fuerza Atómica (AFM), obteniendo valores de rugosidad de 0.05 y de 0.5 micras respectivamente.

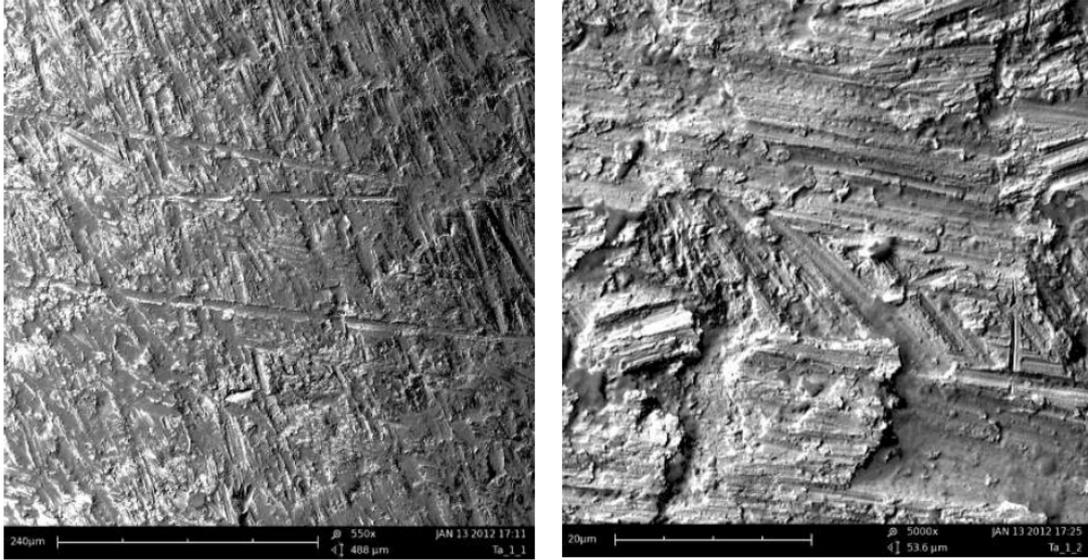


Figura 2.9.6.- Imagen SEM de la superficie de Tántalo con dos rugosidades distintas.

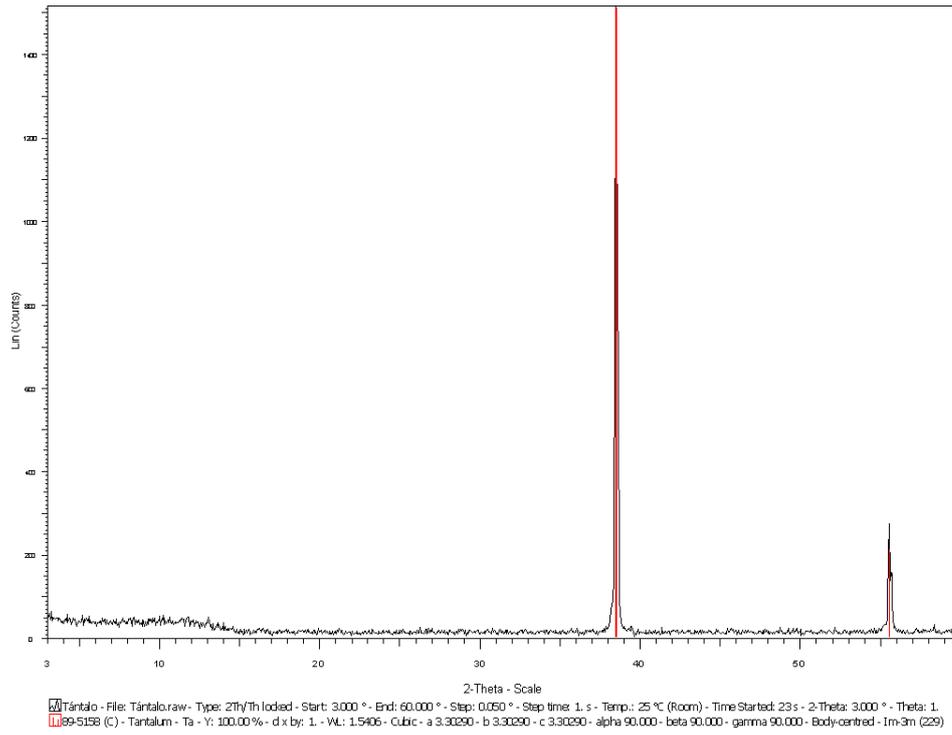


Figura 2.9.7.- Espectro de Difracción de RX del Tántalo metal.

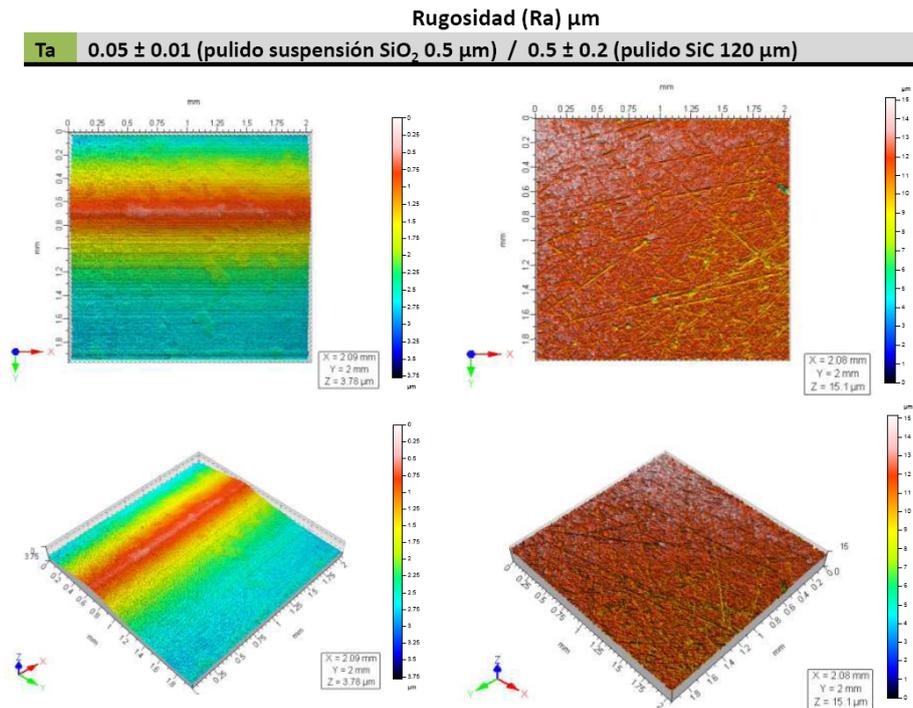


Figura 2.9.8.- Resultados de la medida de rugosidad por AFM en probetas de Tántalo.

2.7.3.- Medida del ángulo de contacto de Nb y TA con distintas rugosidades.

Para poner en su contexto la adhesión celular y demás propiedades biológicas sobre Niobio y Tántalo con distintas rugosidades, es interesante determinar el comportamiento de dichas superficies frente a los líquidos acuosos: es decir su ángulo de contacto. A continuación se presentan una serie de resultados obtenidos en dichas medidas.

Ángulo de contacto para Nb, rugosidad 1.

Ta R1	M1	M2	M3	M4	Media	Dev Std
Energía de Superficie	mN/m	30	37,99168	31,654932	33	4,1827342
Ángulo de Contacto	grados	66	59	65,542	63	4,05297845
Volumen de Gota	ul	9	8	8	8	0,7367747

Ángulo de contacto para el Tántalo. Rugosidad 1.

Nb R1	M1	M2	M3	M4	Media	Dev Std
Energía de Superficie	mN/m	26	33,648369	32,758931	31	4,29342527
Ángulo de Contacto	grados	69	62	67,562	66	3,52419535
Volumen de Gota	ul	9	8	8	8	0,77104765

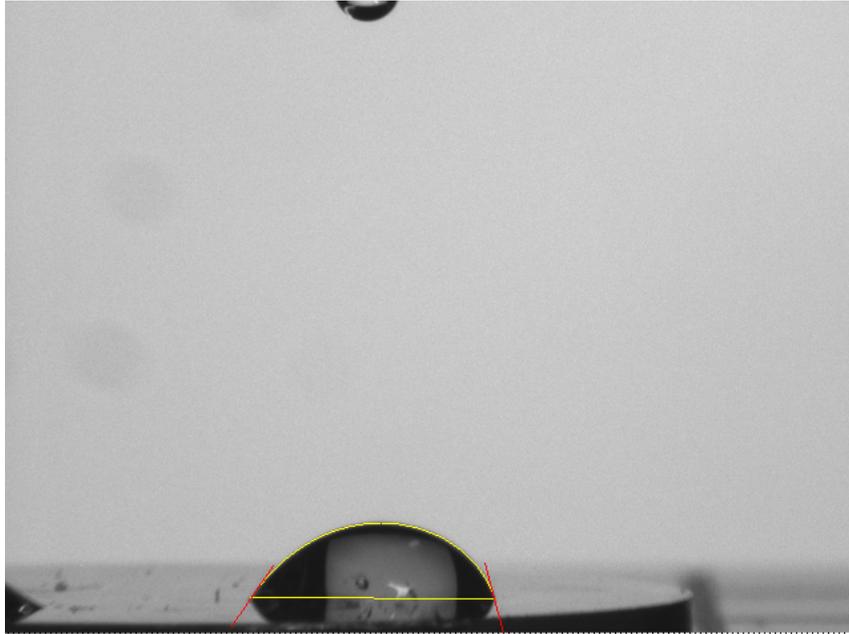


Figura 2.9.9. —Ejemplo de gota para Ángulo de Contacto Nb R1

Ángulo de contacto para el Niobio. Rugosidad 2.

Nb R2	M1	M2	M3	M4	Media	Dev Std
Energía de Superficie	nN/m	38	35,9235	33,5897	36	2,21934626
Ángulo de Contacto	grados	70	66	66,332	68	2,44556054
Volumen de Gota	ul	8	7	7,706	8	0,54065269

Ángulo de contacto para el Tántalo. Rugosidad 2

Ta R2	M1	M2	M3	M4	Media	Dev Std
Energía de Superficie	mN/m	38	35,923	33,589	36	2,2193462
Ángulo de Contacto	grados	59	67	66,21	64	4,3870149
Volumen de Gota	ul	6	7	7,9449	7	0,7705793

2.7.4.- Óxido de titanio.

Materia Prima: Para la fabricación de las distintas piezas de óxido de titanio se ha utilizado como materia prima un TiO₂ en nanopartículas (D₅₀= 100nm), que se caracteriza a continuación.

Tabla 3.- Análisis Químico del TiO₂ (Materia Prima)

TiO ₂	99,5%
As	0.0001%
Fe	0.02%
Sb	0.0002%
Material soluble en agua	0,25%
Material soluble en HCl	<0,50%
Metales pesados (como Pb)	0.002%
Pérdida por calcinación	0.5%

Análisis de fases.

La Difracción de Rayos X demuestra que el material está formado por ANATASA (polimorfo de TiO₂ de baja temperatura). (figura 2.9.9).

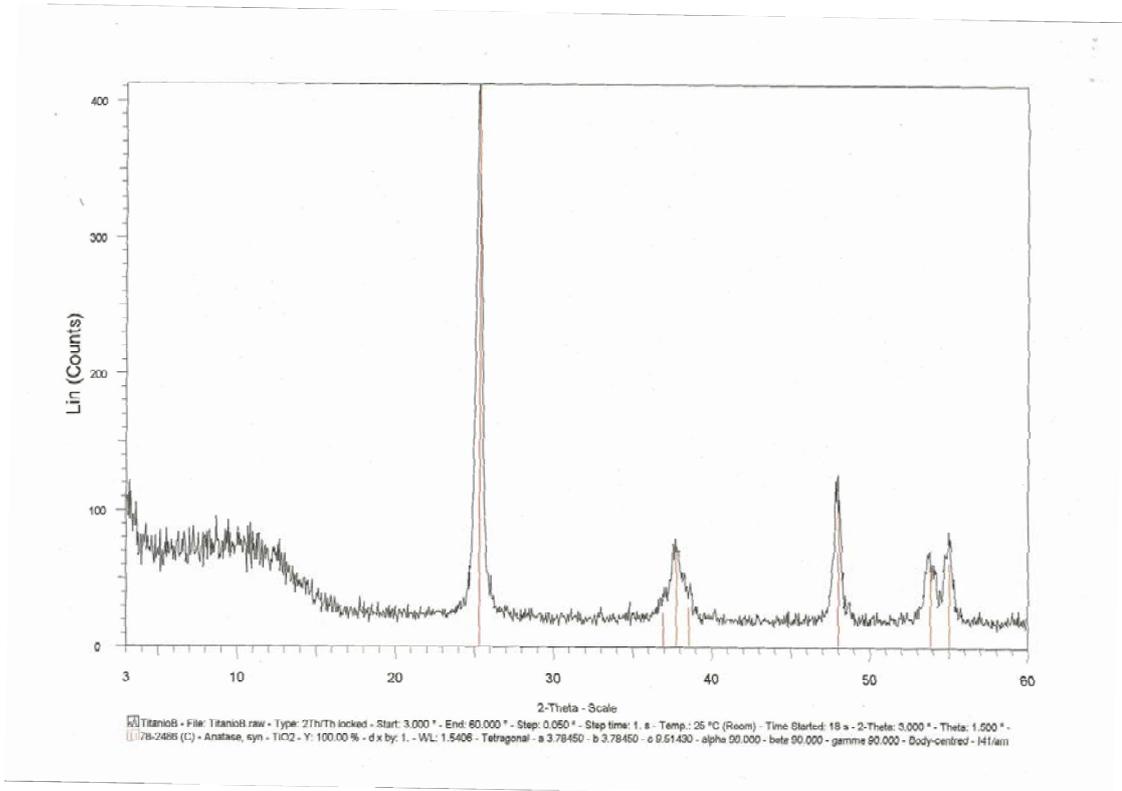


Figura 2.9.10.- Espectro DRX de la materia prima en donde se observan claramente los picos de ANATASA.

Fabricación de piezas de ensayo de TiO₂: Con la materia prima descrita se han fabricado dos tipos de piezas: a) pastillas prensadas y procesadas a 1100°C; y b) dispositivos tipo “pila de leña”, obtenidos por ROBOCASTING y procesados a 900°C.

Pastillas.- Se obtienen por prensado uniaxial del polvo de titania en una matriz de acero, a 10Ton/cm². Una vez procesadas térmicamente se comprueba que se ha producido la transformación polimórfica de anatasa RUTILO. La microestructura de las muestras se presenta en las figuras 2.3.1 y 2.3.2..

Dispositivos en “pila de leña”.

Elaboración de la tinta de TiO₂

Para formar con el TiO₂ una pasta que presente las propiedades reológicas adecuadas para ser extruido, se empleó Poly(vinyl butyral) (PVB) (Aldrich) y poly (ethylene glycol) (PEG) (Mm = 600, Sigma). Para ello se realizó una mezcla de 75 % de PVB y 25 % PEG disueltos en propanol (Sigma-Aldrich). Separadamente, se dispersó en propanol TiO₂ en polvo con un tamaño medio de partícula de 9,83 μm de diámetro utilizando ultrasonidos (IKA U200S, IKA Labortechnik Staufen, Alemania) durante 15 minutos. A continuación se mezclaron los polímeros con la dispersión de TiO₂ en una proporción del 60 % en volumen de TiO₂ (residuo seco) y se agitaron en un mezclador orbital (Thinky ARE-250, Japón) a 2000 r.p.m. en cinco series de 2 minutos cada una. Una vez bien agitada y dispersada la mezcla, se evaporó parte del propanol hasta el nivel adecuado para la extrusión de la tinta. El contenido final de propanol fue aproximadamente del 15 %.

Fabricación de la estructura porosa de TiO₂

Para elaborar las estructuras porosas de TiO₂ se utilizó un dispositivo de deposición robótico (Robocad 3.4, USA). Las estructuras se

imprimieron sobre portaobjetos de vidrio, con los que se consiguió una adecuada adhesión durante la escritura. La adhesión fue adecuada como para que el portaobjetos no ofreciera una gran resistencia en el momento de retirar la estructura sin deformarla. La tinta se estruyó a través de agujas de 410 μm de diámetro. La estructura realizada consta 20 capas formadas cada una de ellas por cilindros entrecruzados de la tinta extruida, con una disposición tipo *woodpile* alternada de 8,33 mm de diámetro. La estructura se mantuvo aislada e inmovilizada durante 48 horas hasta que se evaporase la totalidad del disolvente. Una vez seca, se procedió a su calcinado para eliminar los polímeros y a la vez sinterizar la estructura de TiO_2 , incrementándose así la resistencia mecánica de la estructura. Para ello se calentó en un horno a 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 400 $^{\circ}\text{C}$, permaneciendo a esta temperatura durante 1 hora y continuando después con un aumento de 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 1500 $^{\circ}\text{C}$, manteniéndose a esta temperatura durante una hora. Posteriormente se dejó enfriar a 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta temperatura ambiente. Una vez calcinado también está compuesto por RUTILO. Tiene una estructura característica, tal como se presenta en la figura 2.3.4 y siguientes.

Puede observarse que el espacio entre las barras de TiO_2 , (MACROPOROSIDAD), es del orden de 200 micras y el porcentaje de macroporos es del 50% aproximadamente.

Tal como se puede observar en las microfotografías de las 2.3.7 y 2.3.8, la microporosidad del material es del orden del 30%, y el tamaño de micro poro está comprendido entre 0.5 y 1.5 micras.

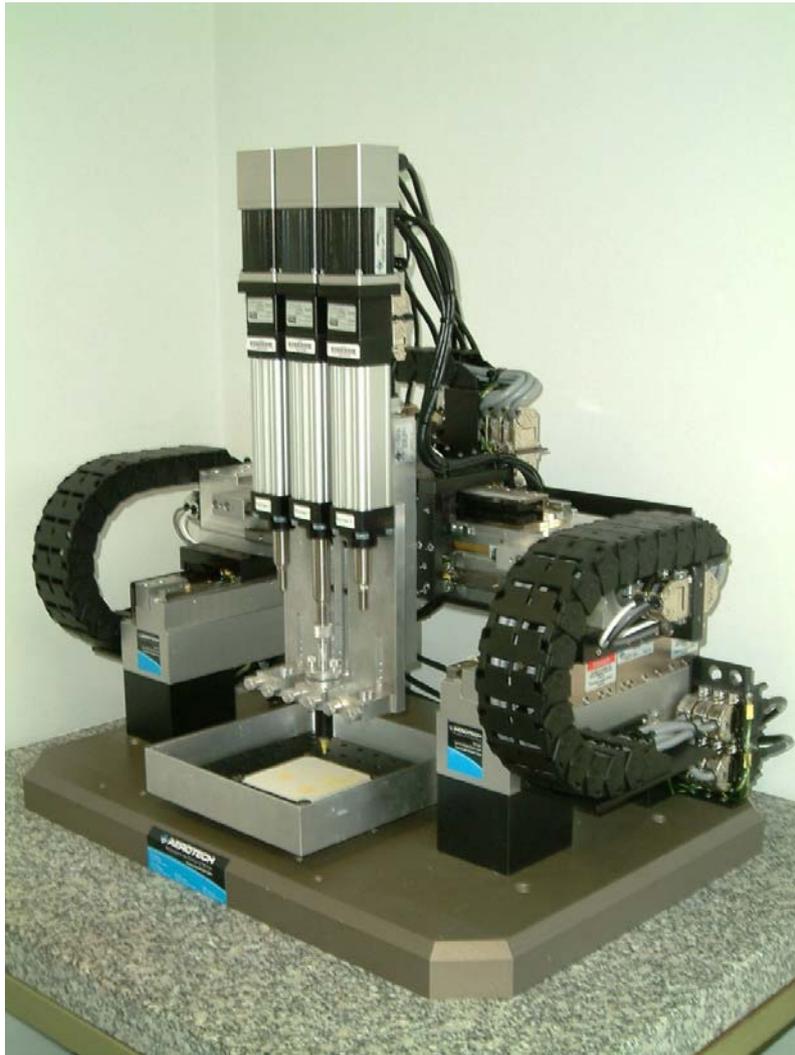


Figura 2.9.11.-Aparato de Robocasting. Instituto de Cerámica de Galicia.

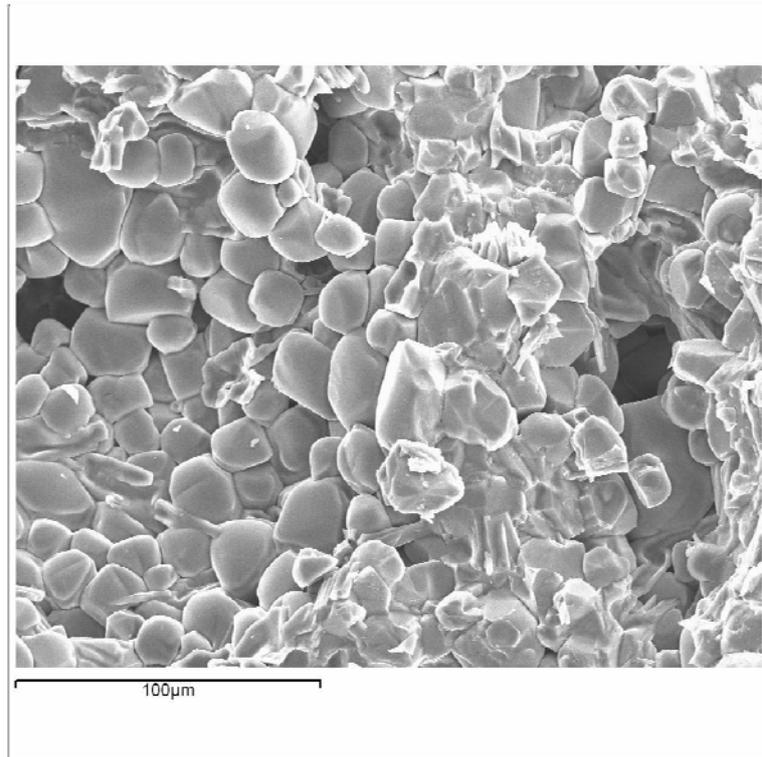
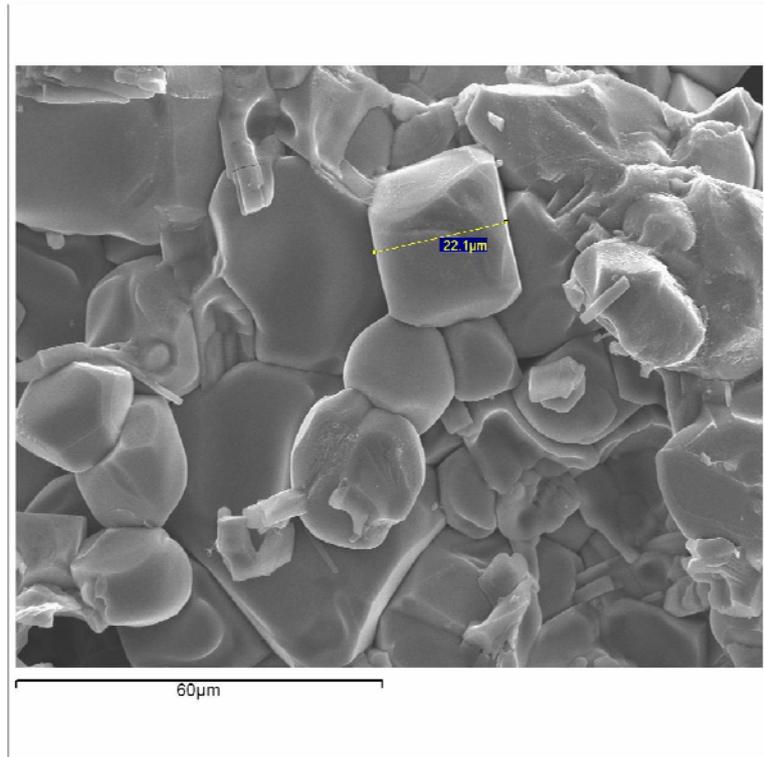


Figura 2.9.12.- Microestructura de una fractura de una pastilla densa de RUTILO en Microscopía SEM.



**Figura 2.9.13.- Otra zona de la fractura. De una pastilla densa.
Microscopía SEM.**

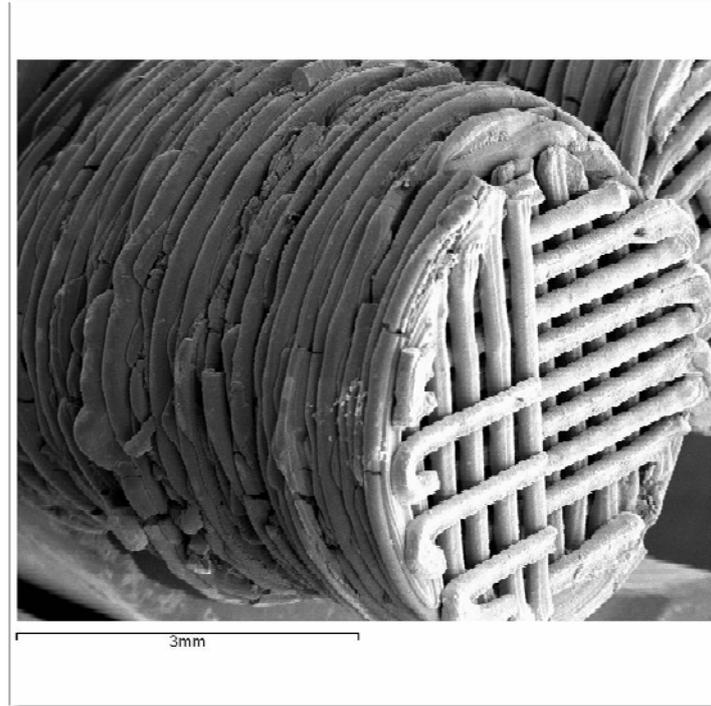


Figura 2.9.14.- Estructura general de la pieza de ROBOCASTING. (SEM).

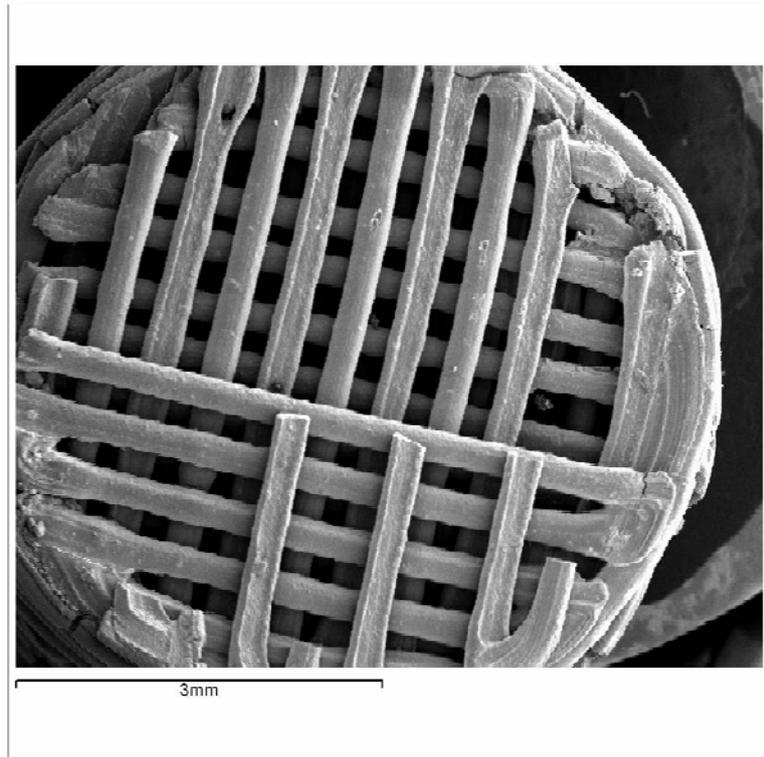


Figura 2.9.15.- Vista SEM del plano superior de la pieza.

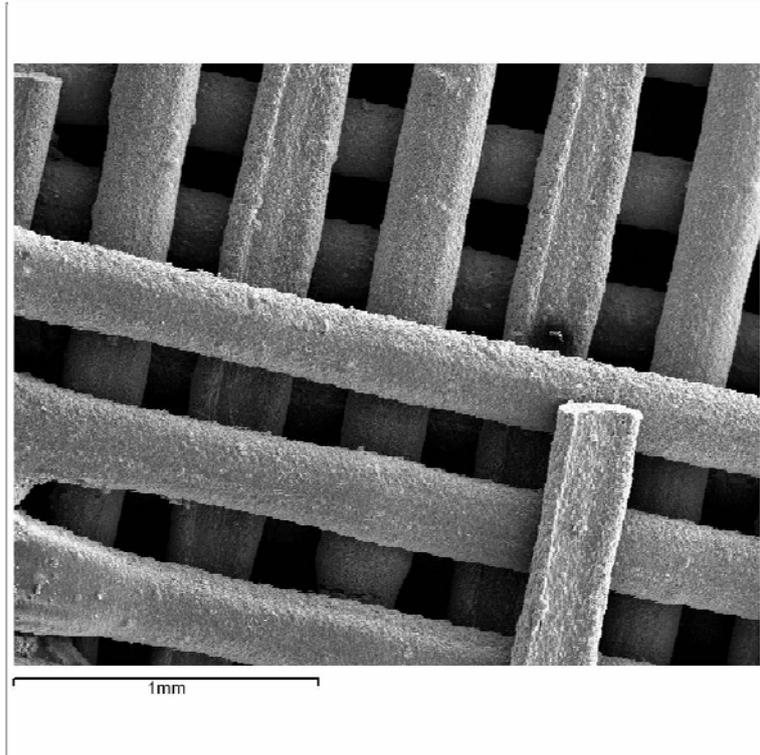


Figura 2.9.16.- Detalle de la pieza de ROBOCASTING. Microscopía SEM.

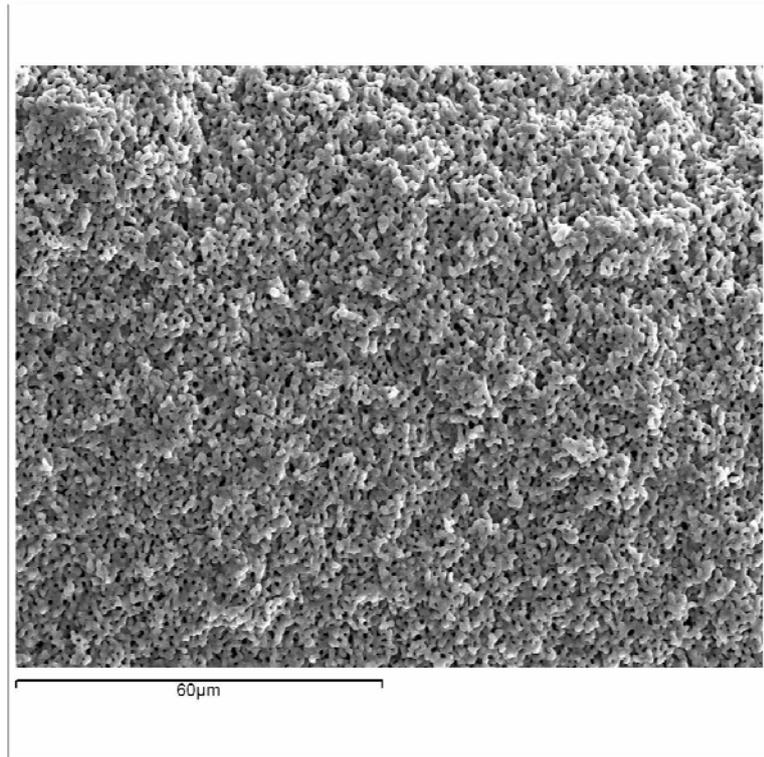


Figura 2.9.17.- Microestructura de la pieza de robocasting: microporosidad. Imagen SEM.

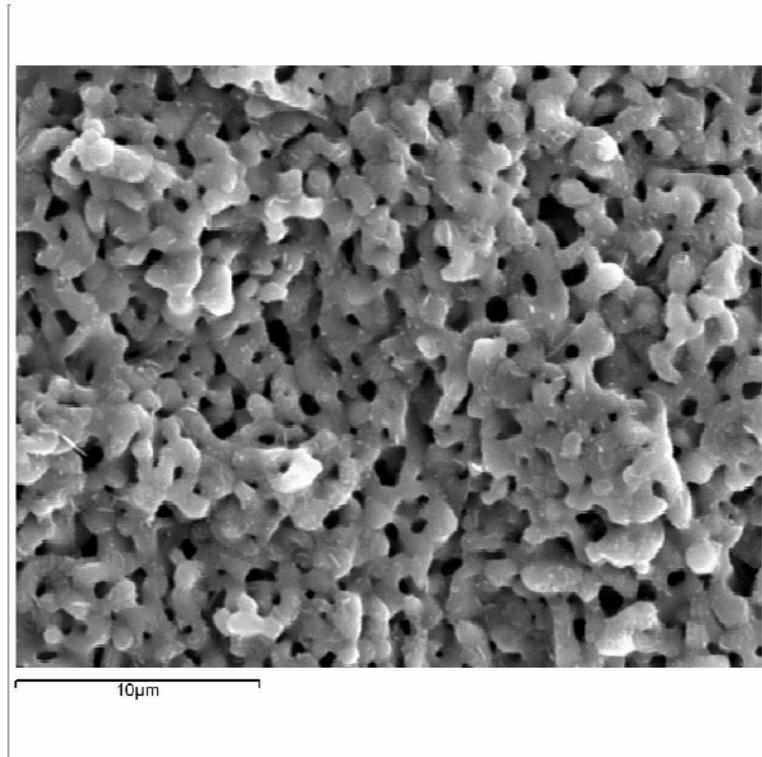


Figura 2.9.18.- Detalle de la microestructura a más aumentos. Imagen SEM.

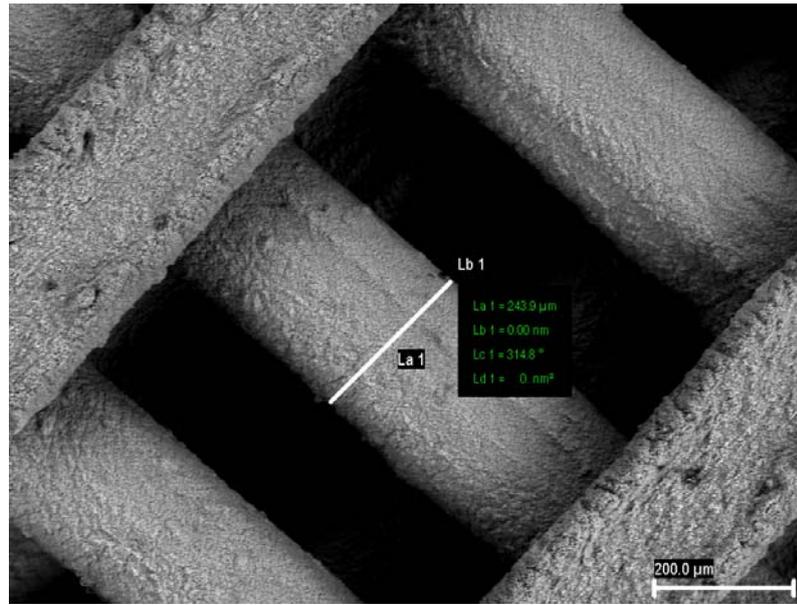


Figura 2.9.19.- Dimensiones de las “mallas” de la estructura.

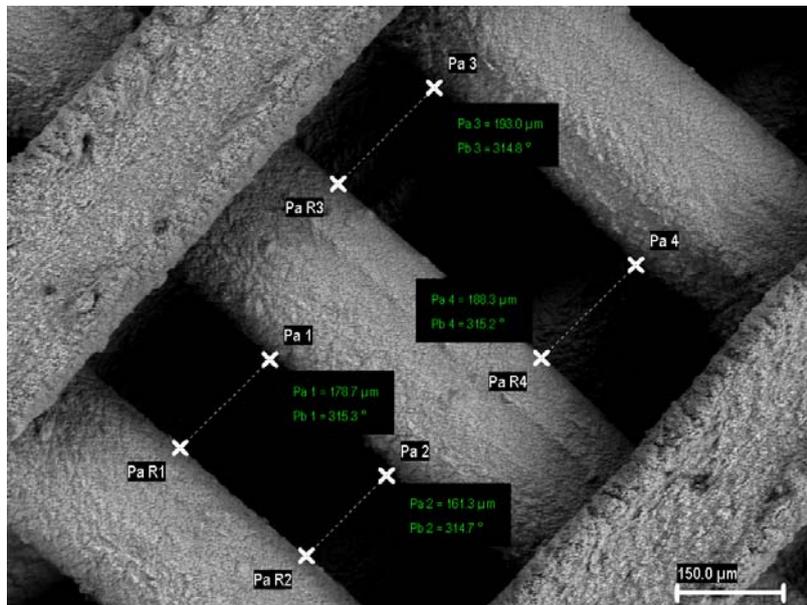


Figura 2.9.20.- Dimensiones de las mallas de la estructura

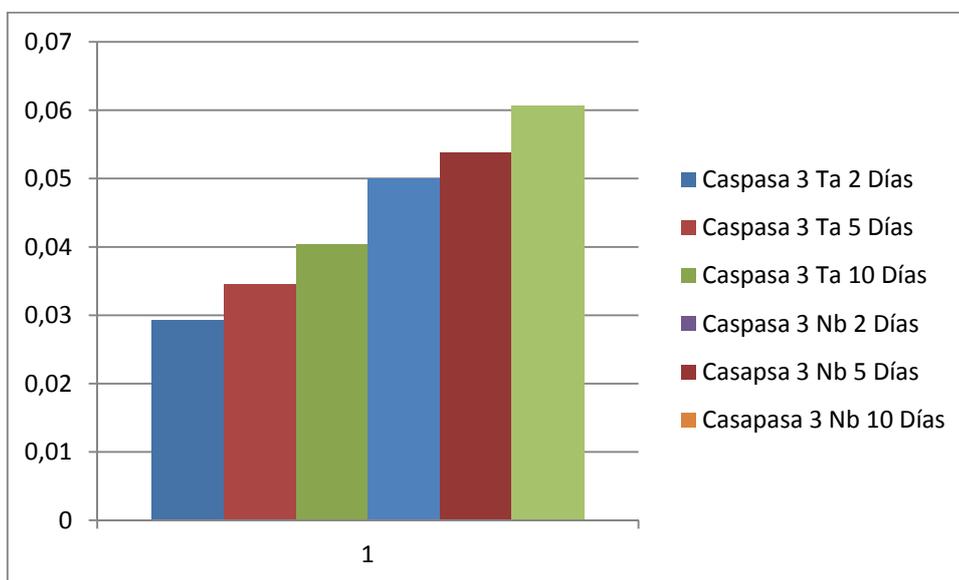
CAPÍTULO 3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3.-Resultados y Discusión

3.1.-Biocompatibilidad de Niobio y Tántalo. Efecto de la rugosidad.

3.1.1-Citotoxicidad

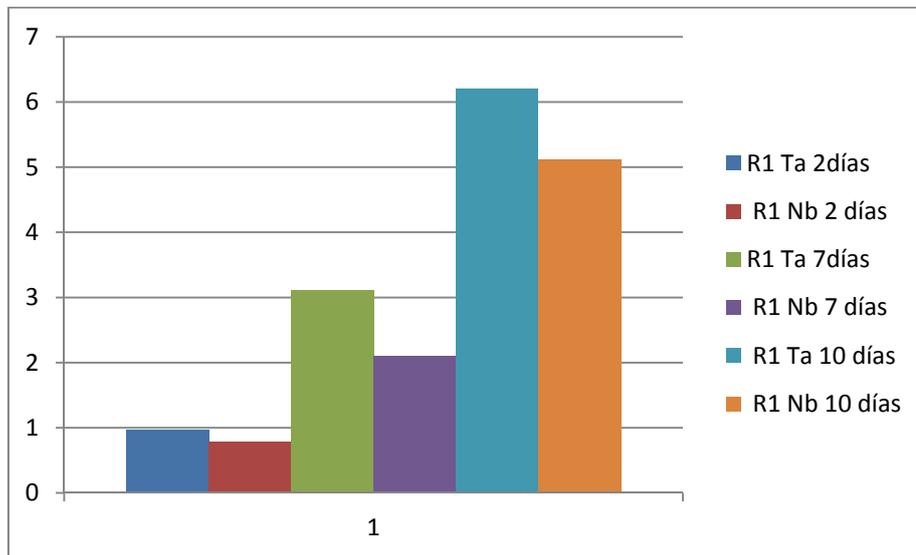
Para determinar el índice de mortalidad celular en las muestras de Ta y Nb, se procedió a realizar un cultivo de células madre mesenquimales a 3 tiempos diferentes (2,5 y 7 días) para poder observar las diferencias en la expresión de Caspasa-3 por parte de las células sobre las diferentes rugosidades empleadas. Un total de 30×10^3 células por cm^2 fueron cultivadas sobre los discos a diferentes tiempos. Los sobrenadantes fueron guardados a -20°C hasta poder proceder a realizar el ensayo de citotoxicidad ELISA (Promega)



Gráfica 3.1.- Expresión de Caspasa 3 en las diferentes muestras ensayadas a 2,5 y 10 días. El eje X representa la muestra y el Y la absorbancia a 405nm.

3.2.- Ensayo MTT

Desde hace tiempo es conocido el efecto de la rugosidad en la proliferación celular. Para comprobar este efecto en nuestras muestras, se procedió a realizar un estudio de proliferación sobre ambos tipos de rugosidades. La segunda rugosidad (R2) es mucho más marcada que R1 para poder observar así los posibles cambios. Un tema importante a la hora de estudiar la proliferación es la expresión génica de ciertos genes directamente relacionados con la adhesividad celular. Si tenemos en cuenta la hipótesis de Ingber sobre la tensegridad podemos teorizar sobre la manera en la que se producen patrones diferenciales de expresión génica debido a las características físicas de la superficie del biomaterial sobre el cual estamos haciendo los estudios.



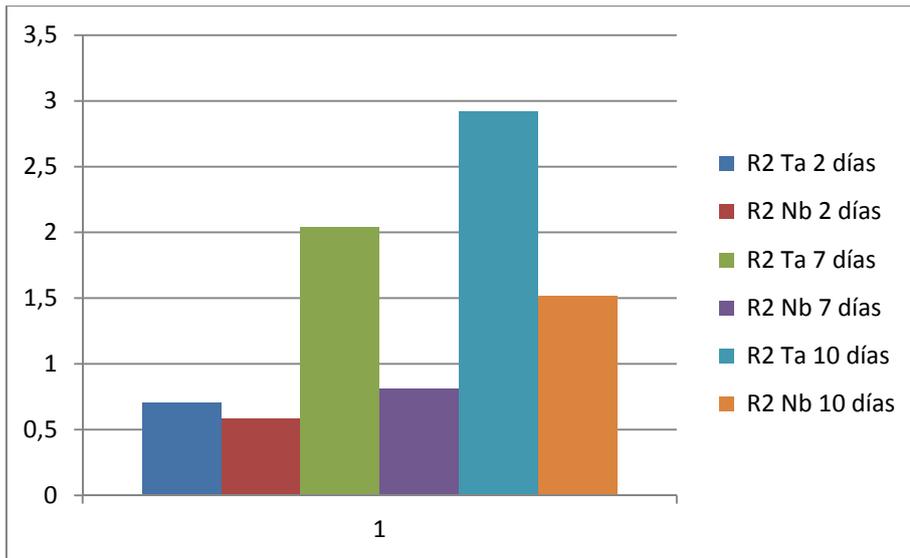
Gráfica 3.2.- Comparación Proliferación Celular en R1 El eje X representa la muestra y el Y la absorbancia a 570nm.

CAPÍTULO 3

Existe un gran debate sobre qué rugosidad es mejor para la proliferación celular, desde escala nano hasta escalas mayores y la posibilidad de que la conformación de diferentes topografías se muestren más óptimas para la colonización del implante o la osteogenicidad. Aunque hay que tener cuidado una vez más a la hora de interpretar los resultados obtenidos en esta sección ya que un implante in vivo va a tener un comportamiento muy diferente al que puede ser recreado en una placa de cultivo donde la extrapolación de resultados se ve comprometida ante la comparación con un ambiente fisiológico real.

R1 Ta 2 días	R1 Ta 7 días	R1 Ta 10 días	R1 Nb 2 días	R1 Nb 7 días	R1 Nb 10 días
1	3,2	6,2	0,8	2	5
1	2,9	6,25	0,78	2,1	5,1
1,1	3,4	6,22	0,77	2	5,2
0,8	3	6,3	0,78	2,3	5,12
0,98	3,2	6,15	0,81	2,1	5,16
0,99	3	6,1	0,81	2,1	5,15
R2 Ta 2 días	R2 Ta 7 días	R2 Ta 10 días	R2 Nb 2 días	R2 Nb 7 días	R2 Nb 10 días
0,7	2	2,8	0,61	0,84	1,5
0,71	2,1	2,91	0,58	0,81	1,48
0,712	2,2	3	0,56	0,82	1,52
0,689	2,1	3,1	0,66	0,81	1,6
0,714	2,12	2,78	0,54	0,75	1,45
0,711	1,71	2,95	0,55	0,81	1,55

Tabla 3.4.-. Proliferación R1 vs R2 . Valores de absorbancia a 570nm.



Gráfica 3.5.- Comparación Proliferación Celular en R2 El eje X representa la muestra y el Y la absorbancia a 570nm.

Para comprobar la existencia de diferencias significativas entre los grupos estudiados se procedió a realizar una T de student para dos muestras sobre los datos obtenidos. Estos datos son comparados tanto intra como intergrupo. Se empleó el paquete estadístico Minitab 13.

Según vemos en las pruebas estadísticas existe una diferencia significativa entre la proliferación de Ta comparada con Nb. También vemos como existe una mayor proliferación ($\alpha=0,05$) en cuanto a la proliferación celular de R1 frente a R2, siendo en todos los casos la hipótesis nula de igualdad rechazada y aceptada la alternativa de mayor proliferación en R1 frente a R2. Existe por lo tanto un efecto producido por el material sobre la colonización del material por células mesenquimales.

Una rugosidad menor ha mejorado la comunicación celular y la formación de matriz extracelular, favoreciendo pues unos contactos entre las células y el material que se han traducido en un aumento de las señales de adhesividad por medio del citoesqueleto.

3.1.2.- Ensayo PCR

En primer lugar se ha de aislar el RNA por medio de mini columnas tal y como se explica en la sección de material y métodos. Todo el proceso es delicado ya que el peligro de que las RNAsas degraden la muestra es muy factible. El RNA es sumamente complicado de aislar de manera efectiva ya que puede fragmentarse y no ser útil haciendo que se tenga que repetir todo el experimento volviendo al primer paso del cultivo celular.

Una vez extraído el RNA es cuantificado en un espectrofotómetro en un ratio A260/280nm. (Invitrogen, Qbit) Todas las muestras obtenidas tenían una concentración mayor o igual de 6 microgramos/ml. Este método de cuantificación es útil cuando se realiza PCR cuantitativa (qPCR) ya que con una concentración de aproximadamente 2 microgramos/ml es posible realizar amplificaciones satisfactorias. Se procede después a realizar una PCR reverso transcriptasa para obtener cDNA (Fermentas cDNA, first strand Kit) que por último será empleado en la amplificación por qPCR. El paso de qPCR se realizó con un iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) en un Bio-Rad iCycler usando GADPH como control, los datos fueron analizando siguiendo el método δC_t {{1201 Fairfax, Marilyn R. 2010; 691 Brenan, Colin 2005}}.

3.3.- Expresión de marcadores de adhesividad celular.

A la hora de que el proceso de adhesividad tenga lugar, la expresión de ciertos marcadores como las integrinas juegan un papel clave en los primeros minutos del proceso, tras un pequeño periodo de tiempo, estas proteínas de membrana empiezan a realizar una tracción mecánica que se traduce en una cascada de señales bioquímicas intracelulares. Las proteínas Rho/Roc pertenecientes a una familia de GTPasas están íntimamente relacionadas con estos procesos.

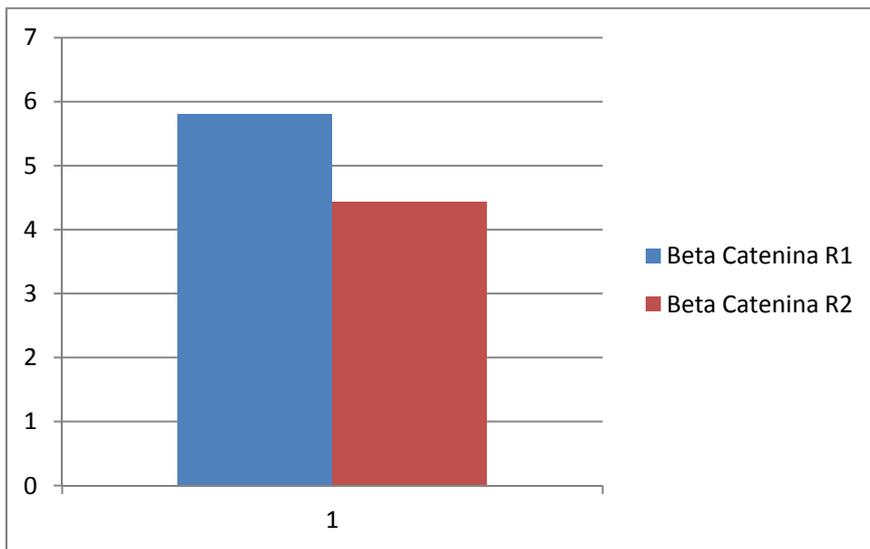


Figura 3.7. Expresión de genes de adhesividad celular en R1 y R2. La expresión de Beta Catenina es mayor en las muestras con menor rugosidad. El eje X representa la muestra y el Y el número de copias transcrito.

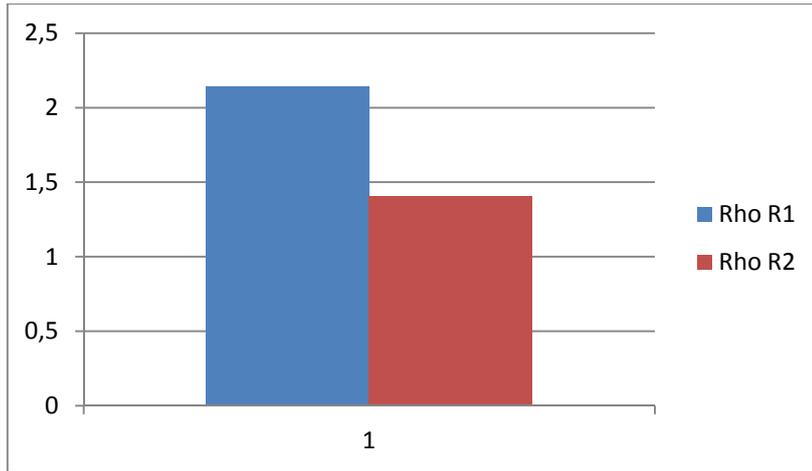


Figura 3.8. Expresión de Rho en las diferentes rugosidades. R1 vuelve a presentar un mayor número de copias amplificadas que en R2. . El eje X representa la muestra y el Y el número de copias transcrito...

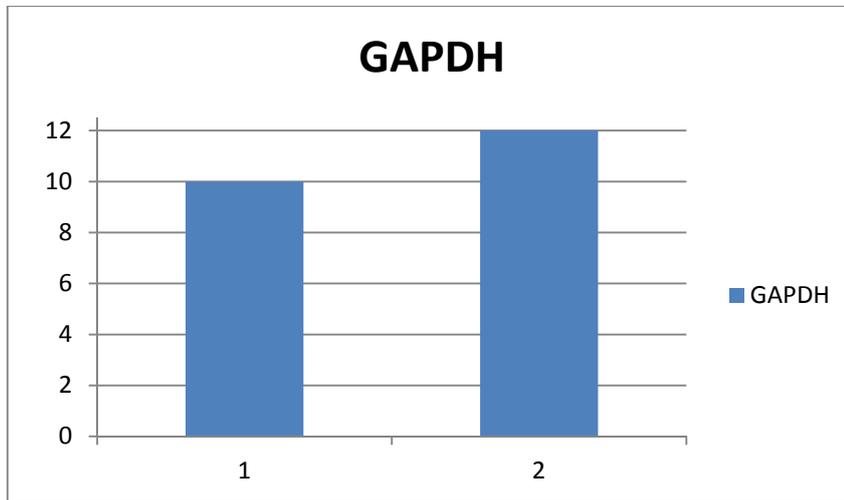
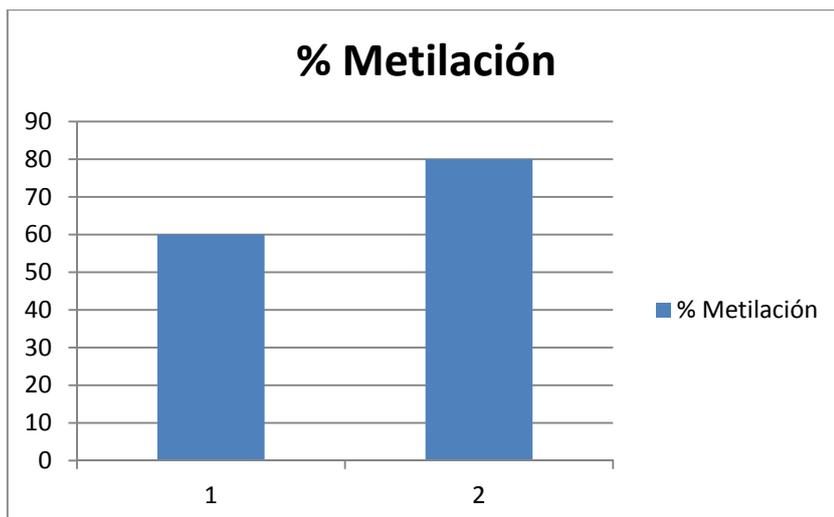


Figura 3.9.- Controles de Expresión de GAPDH. Muy similar entre ambas muestras. . El eje X representa la muestra y el Y el número de copias transcrito.

La expresión génica de los marcadores de adhesividad celular es mayor en las superficies que poseen una rugosidad menor. Tanto la proteína Rho como la Beta Catenina son codificadas a niveles de transcripción mayores que en el caso de una rugosidad mayor. Estos datos indican cómo es factible que las señales físicas que jugaron un papel claro en la proliferación estén ejecutando un efecto sobre los niveles de transcripción. Este tipo de modificación génica explicada en el modelo de Ingber explicaría cómo la tensión generada por los contactos físicos de la célula con la superficie genera tensión sobre el citoesqueleto y finalmente sobre el núcleo codificando de manera diferencial la expresión de proteínas de conocido papel en modelos de movimiento y adhesividad celular como la familia de las Rho GTPasas.

3.1.3.-Metilación

Si existe una respuesta diferencial a la hora de expresarse Rho y Roc, estos cambios pueden estar determinados a nivel de transcripción génica. Para conocer estos cambios se recurrió a realizar una PCR específica de metilación.



Gráfica 4.0.- Los diferentes niveles de metilación fueron medidos a 2 días. . El eje X representa la muestra y el Y el porcentaje de metilación de islas CpG.

El porcentaje de metilación observado, Gráfica 4.0, puede ser relacionado con el control mecanobiológico que el material realiza sobre las células mesenquimales cultivadas. En el caso de la primera rugosidad esta metilación es ligeramente más débil, lo que se correlacionaría con una mayor expresión de Rho y de Beta Catenina.Confocal.

3.1.4.- Microscopía Confocal. Viabilidad Celular

Para comprobar la viabilidad celular y la disposición de las células mesenquimales sobre las dos rugosidades estudiadas, se procedió a hacer una tinción Calceína Am- I.P. siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 2 de la tesis. Las muestras fueron observadas en el microscopio confocal SP-2 Leica del Servicio de Microscopía Electrónica de la USC.

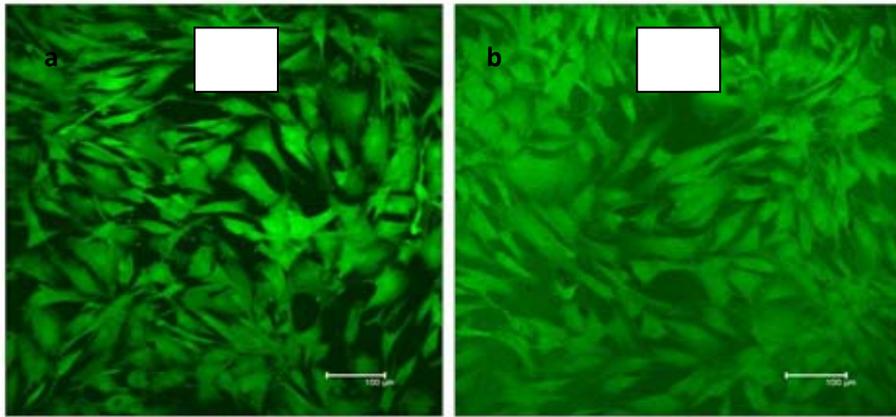


Figura 4.1.- Imagen de células teñidas co calceina sobre Ta (izquierda), Nb (derecha) con dos rugosidades distintas.

A dos días de cultivo en R1, Fig 4.1 las células parecen distribuirse de manera óptima en ambos materiales, no existe a penas presencia de células muertas y se observan cantidades importantes de filopodios, lamelipodios dando lugar a una comunicación celular muy rica en las muestras. Se cultivaron 40×10^3 células /cm².

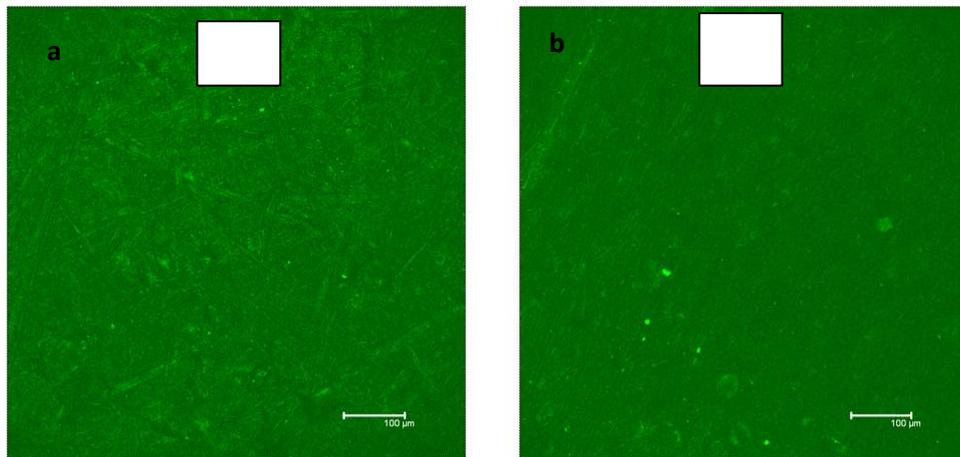


Figura 4.2. Viabilidad Celular a 2 días sobre R2. A)Ta, B) Nb

En contraposición a lo observado en R1, la rugosidad elevada presenta unos resultados sumamente opuestos al anterior, a pesar de haber realizados el cultivo con las mismas condiciones que en las muestras de menor rugosidad, no se observa la presencia de filopodios, lamelipodios e incluso la presencia de células es bastante escasa, lo único que se observa es una tímida adhesividad en el Nb dónde las células aún están en las primeras fases de la interacción con una superficie sin existir la formación de una red de comunicación celular. Estos experimentos fueron repetidos por triplicado y en todos los casos los resultados fueron similares a los presentados en la Figura.4.2.

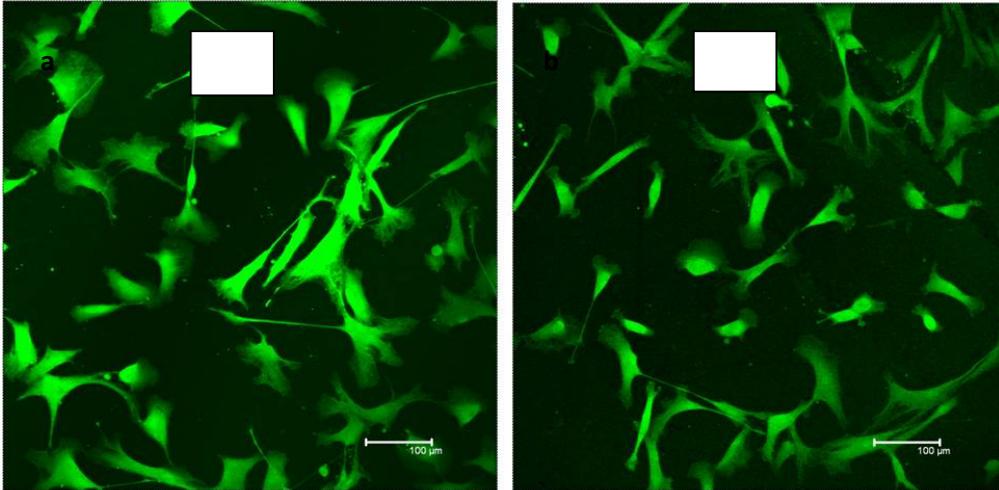


Figura 4.3. Tinción Calceína-I.P. de células crecidas a 5 días sobre R1

Cuando se procedió a realizar la observación de las muestras a 5 días los resultados de R1 seguían mostrando una gran comunicación celular en las muestras. Figura 4.3. La matriz extracelular es abundante y la señal de vitalidad de las células era óptima. Al comparar este resultado con la Figura 4.2 dónde se ven a las células creciendo sobre R2 podemos destacar los siguientes puntos. Mientras que en R1 (cualquier material) las células presentan una matriz extracelular clara, en R2 no es este el caso, las células han reconocido las características topográficas de la superficie y las están siguiendo en lo que Curtis bautizó como guiado por contacto. Este guiado por contacto favorece la organización celular y no es algo negativo aunque que se observe a estas alturas del experimento puede señalar el hecho de

que el material no está ejerciendo el efecto deseado que promueva la colonización de la superficie por parte de las células de una manera rápida. Llegados a este punto vale la pena cuestionarse un hecho observable que será desarrollado en la discusión con mayor detalle. Una vez que el material está altamente colonizado por la células, ¿a qué responden las células?, es posible que los efectos realizados por las superficies se hayan atenuado y sean efectivamente las mismas células las que hayan “enmascarado” esos señales físicas para sustituirlas por otras bioquímicas

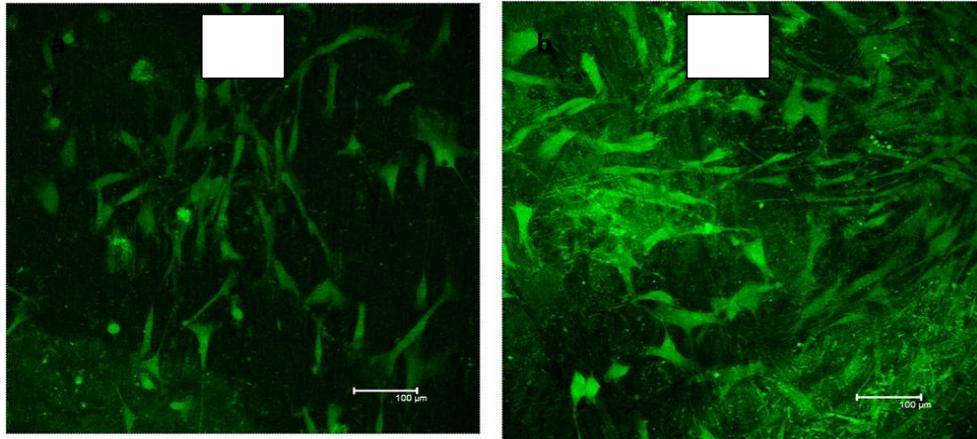


Figura 4.4.- Tinción Calceína-I.P. de células crecidas a 5 días sobre R2 a)Ta, b)Nb

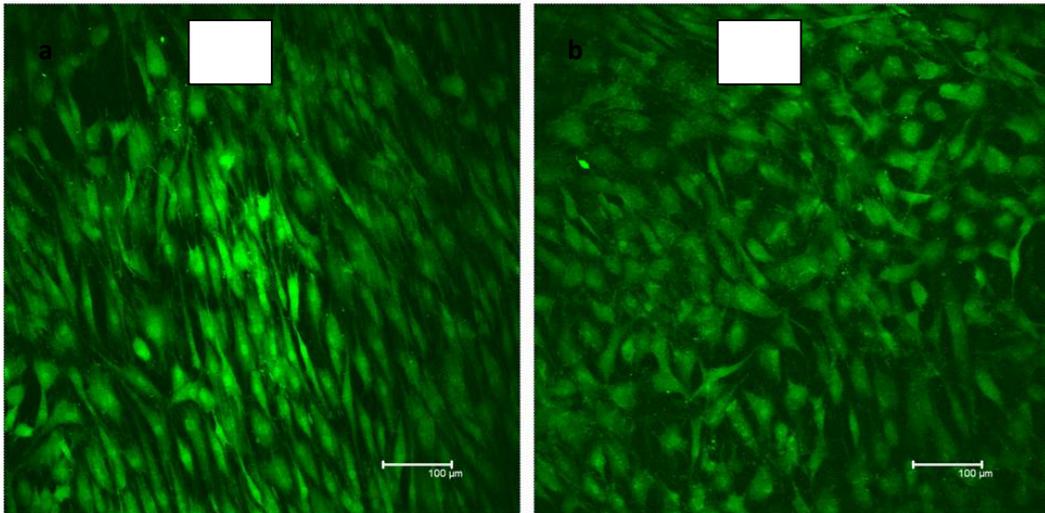


Figura 4.5. Proliferación celular sobre R2 a 10 días a)Ta b)Nb El fenómeno de guiado por contacto es claro en ambas aunque en Ta es ciertamente patente.

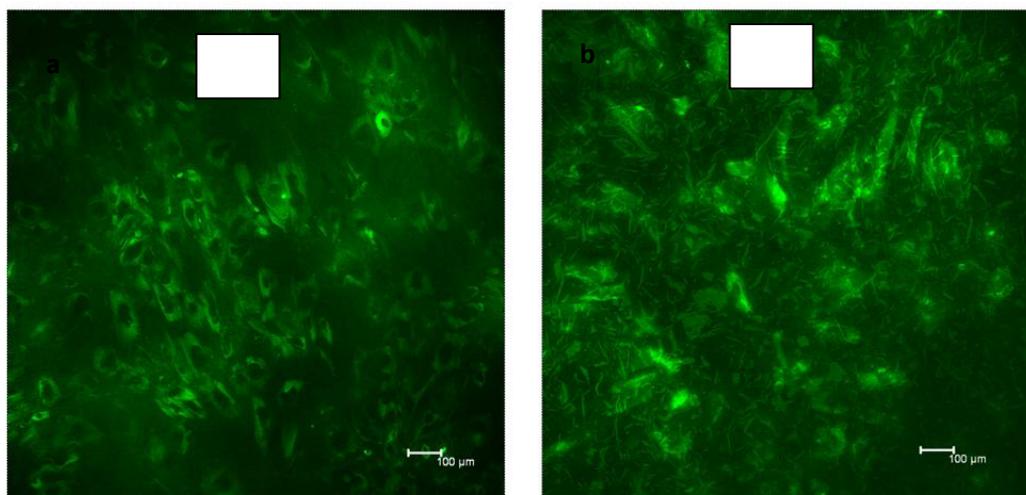


Figura 4.6. Células mesenquimales sobre R1 tras 10 días de cultivo. A)Ta, b)Nb.

Las fotos que se obtuvieron tras 10 días de cultivo presentan características sumamente interesantes. Las células en R2 Ta siguen aún un modelo de orientación de guiado por contacto, parece que las células han creado su microambiente en los valles de las rugosidades, están generando ECM suficiente para colonizar toda la superficie aunque lo más destacable es que han conseguido orientarse. Esta orientación tiene aplicaciones en el campo de la ingeniería de tejidos a la hora de simular las estructuras que se encuentran en el organismo de manera natural. En cuanto a la disposición de las células en R1, en el caso del Ta se observa cómo han tapizado la superficie y la morfología que presentan es diametralmente opuesta a la observada en R2.

La menor rugosidad ha favorecido el “esparcimiento” celular, esto tiene gran importancia a la hora de entender la adhesividad celular y los fenómenos de colonización de superficies. Las células no presentan una morfología fusiforme y basándonos de nuevo en el modelo de Ingber la fuerza física que el citoesqueleto realiza sobre el núcleo es diferente que en R2 dando lugar a un fenotipo diferente. Es quizás por este detalle por lo cual se observan variaciones en los patrones de metilación de DNA en las muestras. La célula ha llegado a extenderse por la superficie por medio de lamelipodios, ya no está explorándola por medio de filopodios, si no que está buscando la comunicación célula-célula y generando una interacción más estable que la que se podría esperar en otras fotos.

3.2.-Resultados de los ensayos sobre cerámicas de TiO₂.

3.2.1.-Viabilidad Celular.

Los ensayos se han realizado sobre los tres tipos de muestras disponibles:

- Pastillas densas de Titania.
- Armazones o “pilas de leña”, en cultivo estático.
- Armazones o pilas de leña en cultivo dinámico (bajo flujo).
- A la hora de realizar el cultivo sobre armazones de TiO₂, se procedió a cultivar primero las células sobre el mismo durante 2 días para asegurar la colonización del material por parte de las mismas. En esta parte de los experimentos no interesaba tanto el conocer la proliferación sino el

mantener las células sometidas a un stress mecánico una vez que estuviesen cultivadas en el mismo.

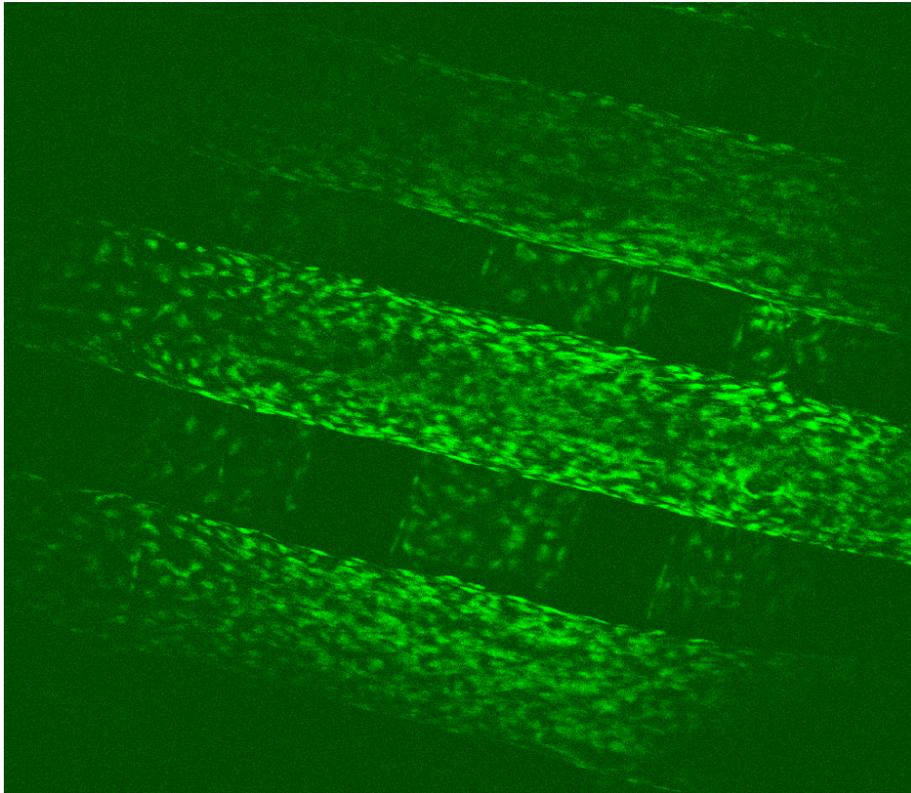


Foto 3.4.- Fotografía de microscopía confocal donde se observa el crecimiento celular sobre el armazón de TiO₂ fabricado por robocasting. La tinción demuestra la total colonización del material por parte de las células.

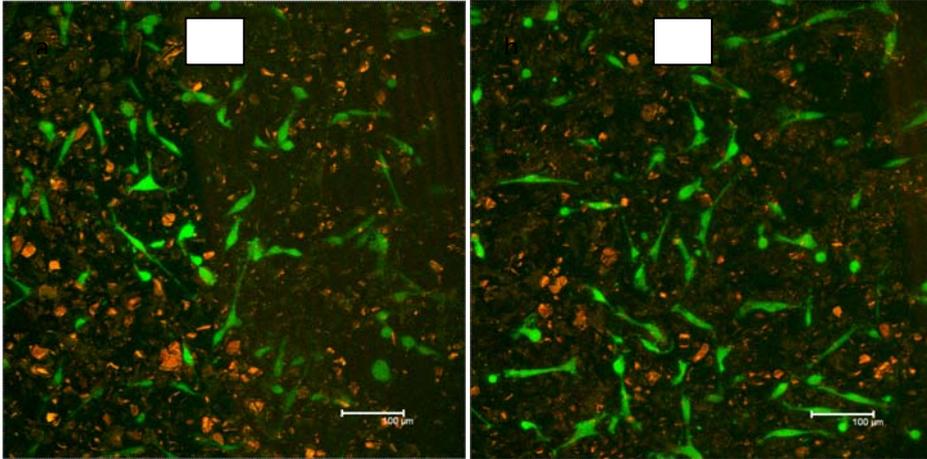


Foto3.5. Ensayo realizado sobre pastillas densas de TiO₂. Las células en verde muestran tinción por calceína AM mientras que existe poca presencia de células muertas. El material parece absorber un poco de IP creando una imagen de fondo roja que no se corresponde con células muertas.

3.2.2.-Análisis de Expresión génica.

Para conocer los efectos que está produciendo la variación de flujo sobre las células en el armazón de TiO₂ se realizó un análisis de expresión génica similar al realizado en las muestras de Ta y Nb. En este caso la regulación de la ruta WNT por medio de los estímulos mecánicos es una parte central de la teoría de esta tesis. La mecanoregulación de las células sobre los materiales por medio de las fuerzas mecánicas como del substrato. Para realizar este estudio se procede a llevar a cabo una qPCR en las mismas condiciones que en el apartado de materiales y métodos..

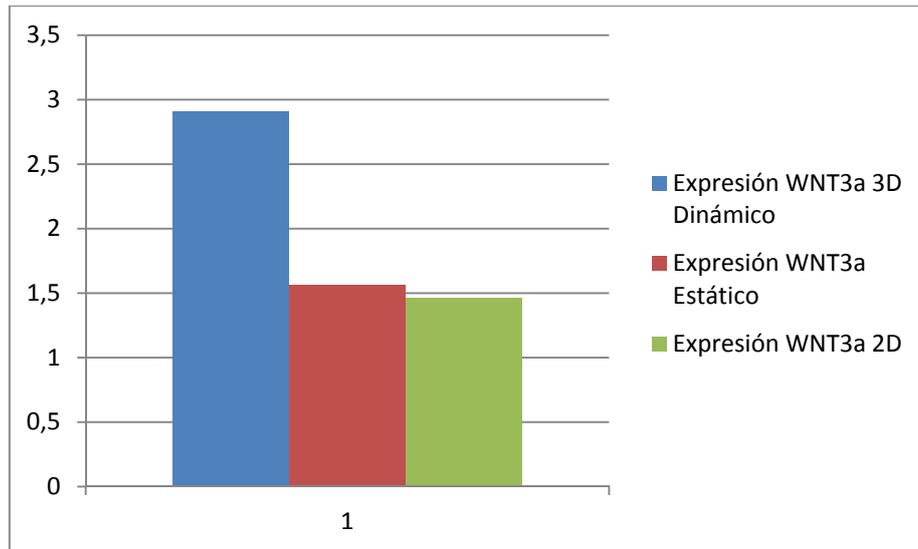


Figura 3.2.2.-Expresión de WNT3a en dinámico, estático (3D) y pastilla de control.

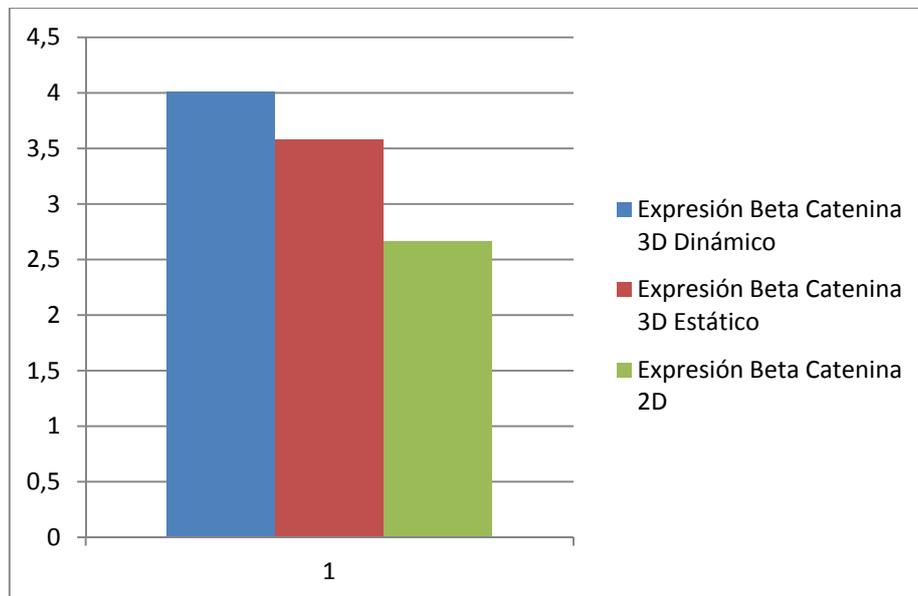


Figura 3.2.3.-Expresión de Beta-Cateninina en dinámico, estático (3D) y pastilla de control.

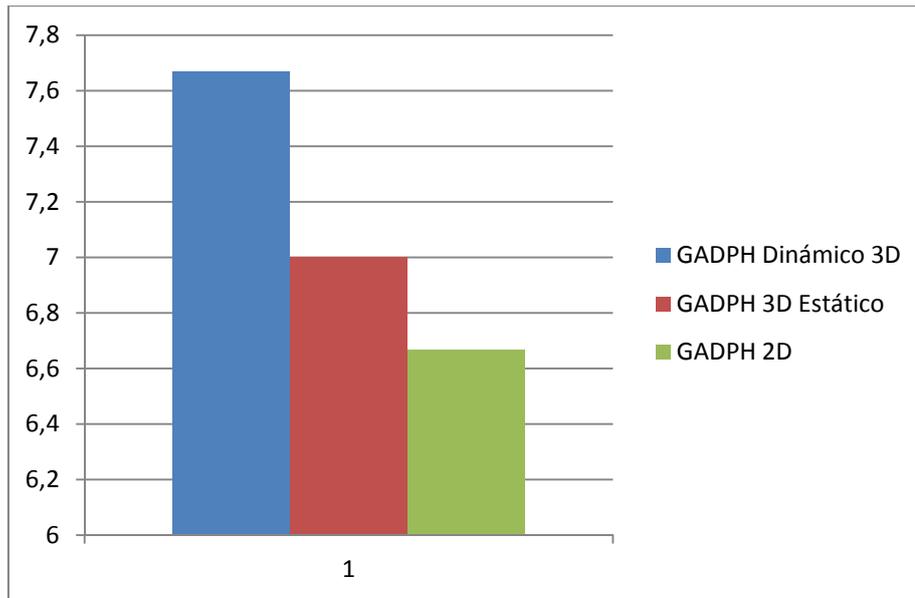


Figura 3.2.3.-Expresión de gen “housekeeping” en dinámico, estático (3D) y pastilla de control.

3.2.3.-Metilación.

Esta parte del experimento constituye una de las secciones más importantes en el diseño experimental. La manera en la cual las células están sometidas a un control mecanobiológico por parte del material y del medio representa una manera de entender el nicho celular como el conjunto de señales químicas y físicas que influyen el fenotipo celular. Esta regulación fenotípica puede venir dada por la metilación de DNA en las muestras, respondiendo a modificaciones epigénicas. En la figura 3.2.2 vemos cómo la activación de la WNT3a es mucho mayor en dinámico que en cultivo estático. Tanto en 3D como en control, la expresión génica para este factor es muy similar lo cual apunta a la mecanoregulación del mismo. La ruta WNT está regulada en su inicio por la presencia de Beta catenina (canónica). Al aumentar la expresión de Beta Catenina, lo hace también la

WNT3a en dinámico, no así en estático. Se observa cómo a pesar de tener bajas concentraciones de WNT3a, la expresión de Beta Catenina es alta y no parece ser un factor de regulación en este caso. Si nos fijamos con detenimiento en los porcentajes de metilación de DNA, son muy similares para los 3 grupos, estando metilado el material genético en mayor medida bajo condiciones de impulso mecánico cíclico. El estímulo mecánico ejercido por el flujo de medio produce una metilación de DNA y se puede ligar esto a una expresión diferencial de Beta Catenina. Es aún así, complicado de explicar por qué razón la WNT3a no parece tener relación con el fenómeno epigenético explicado. Como hemos mencionado existe una ruta WNT canónica y otra no canónica, esta parte no canónica puede estar regulando la expresión de WNT3a, siendo directamente modulada por la fuerza mecánica independientemente de un control inicial vinculado a la Beta Catenina.

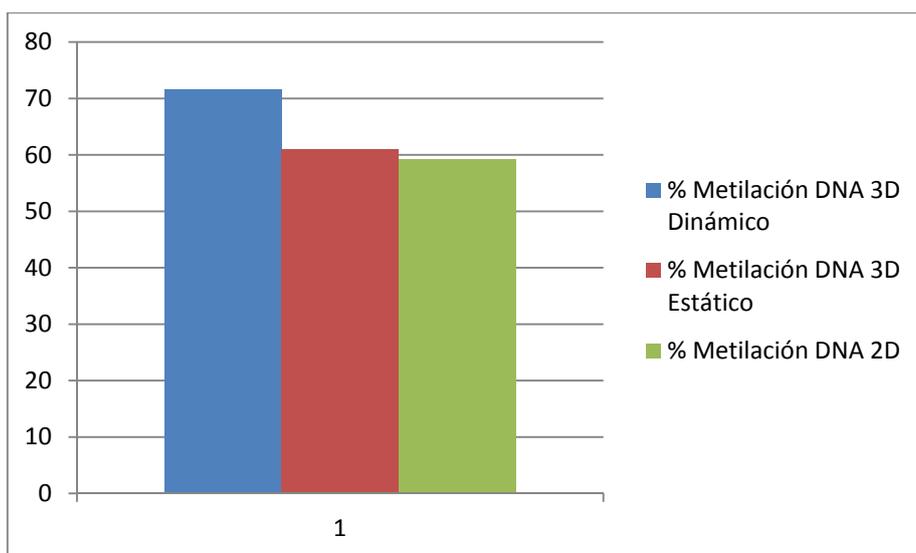


Figura 3.2.4.-Porcentajes de metilación en dinámico, estático (3D) y pastilla de titania.

3.3.- Resumen de la interpretación de resultados.

Si nos fijamos en un libro de biología celular básico como el que podemos encontrar en cualquier bibliografía recomendada a estudiantes de biología celular (Alberts) es sencillo observar cómo las células poseen orgánulos que están en la escala nano. Las mismas células poseen características citoesqueléticas como los filopodios que sobresalen ligeramente de la escala nanométrica. Estas formas citoesqueléticas juegan un papel clave en los primeros momentos de exploración de una superficie, del mismo guiado que se produce entre ellas o con el material.

Nos encontramos ante dos disposiciones de material. Por un lado la rugosidad o conformaciones exteriores que presenta una superficie de un biomaterial y por otro lado la misma organización de citoesquelética de la célula que reorganiza las organelas y su núcleo en función del micro o nano ambiente en el cual se encuentre. No se pueden pues separar ni entender de otra manera las interacciones si no es en una simbiosis creada entre los dos componentes. Tenemos pues, dos interfaces de interacción que producen un efecto dramático sobre la mecánica nuclear de la célula. Si el material es débil, desde un primer momento la adhesividad celular fallará y esto implica claramente que no habrá más eventos a nivel celular. En un material muy débil, fragmentado que libere partículas la respuesta más probable que puede ocurrir es la de fagocitosis por parte de la célula. Esta consideración puede ser tomada en principio como una mera conjetura desde el punto de vista de la biología celular sin mayor implicación en la Ingeniería de tejidos.

Realmente, es una cualidad muy importante a tener en cuenta ya que uno de los problemas de aflojamientos de prótesis “aflojamiento aséptico” se produce cuando nanopartículas liberadas por desgaste de HMWP en una prótesis son reconocidas por los macrófagos desencadenándose una cadena de acontecimientos aún no muy clara, por la cual los osteoclastos comienzan a proliferar sobre los osteoblastos, llevando a un fracaso quirúrgico del implante. Durante esta tesis una pregunta que me he realizado de manera constante fue fruto de la observación de que siempre existe una respuesta por parte de la célula cuando interacciona con un material. Esta respuesta puede ser dependiente del tiempo y por lo general en el caso de los biomateriales, así es. Pero cabe también preguntarse a un nivel más básico de investigación ¿Cómo de corta ha de ser una interacción del material con la célula para que no ejerza ningún efecto?.

En todos los materiales que se han empleado en esta tesis existía una topografía ante la cual las células reaccionaban, desde las pequeñas plaquetas hasta las células madre mesenquimales. En el campo industrial el hecho de que la topografía es importante se conoce desde hace muchos años debido a la observación de la integración de implantes en tejidos como el óseo. Es además indudablemente altamente complicado obtener una superficie lisa perfecta sobre la cual las células tengan poca interacción. Es así una de las cuestiones principales planteadas en esta tesis el papel que juega esa topografía de superficie y la estructura del material (malla, disco) sobre la proliferación celular y su mecánica molecular. Si tal

y como se apunta en la bibliografía estas modificaciones están modificando los patrones de expresión génicos es posible emplearlos para mejorar los tratamientos de enfermedades o lesiones mejorando así el campo de la medicina regenerativa al conjugar y entender que son señales las bioquímicas y físicas de manera combinada las que modifican el nicho celular en un biomaterial.

Es lógico pues asumir que existen interacciones a nivel nano y micrométrico dentro de un ser vivo (a nivel tisular, celular, molecular etc...). Esta reflexión quizás nos dirija hacia una pregunta mucho más interesante. ¿Qué tipo de topografías o rugosidades de superficie rigen cada proceso? Pues no son los mismos requerimientos los que buscan una empresa que manufactura piezas en contacto con la sangre que una empresa de ortopedia que desarrolle un cemento óseo. El profesor Adam Curtis de la Universidad de Glasgow sugirió que los fenómenos de adhesividad celular puede ser controlado por medio de la manera en la cual las topografías nanoestructuradas se distribuyan y si lo hacen de manera repetitiva(Curtis, Casey et al. 2001, Curtis, Wilkinson 1997, de Curtis 1991). Pero el papel que juega la química de superficie parece ser obviado en ciertas ocasiones, como hemos visto, las diferencias en la humectabilidad y energía de superficie entre muestras no es excesivamente dispar, pero da lugar a respuestas muy diferentes al cultivar células sobre esos mismos materiales. Weiss y Garber en 1962(Weiss 1962, Weiss) acuñaron por primera vez el término “guiado por contacto” mostrando cómo las células pueden seguir estructuras físicas dando lugar a una polarización de la célula. Esta conformación de microtúbulos y filamentos

CAPÍTULO 3

celulares ejerce un efecto directo sobre el núcleo celular dando lugar a una tensión física sobre el núcleo y por lo tanto modificando la expresión génica.

En el desarrollo de este trabajo experimental, se ha hecho insistencia en los siguientes fenómenos:

- Adhesividad.
- Proliferación
- Regulación de todos estos procesos por medio de metilaciones.
- Debido a las diferencias y los gradientes de energía superficial de adsorción.
- Uno de los marcadores escogidos para la realización de los estudios fue la proteína Rho.

Cuando Rho ha presentado un mayor grado de activación, ha incrementado la contractilidad celular dando lugar a la formación de contactos focales maduros. Esta diferencia entre R1 y R2 ha sido clara, las células en la rugosidad menos acentuada se han visto beneficiadas en los procesos de adhesividad celular a corto plazo, favoreciendo la colonización rápida de la superficie. Dalby et al describen precisamente este mismo efecto, lo relacionan con la activación rápida y abundante de integrinas debidas a la fuerza generada por el citoesqueleto en puntos de adhesión permitiendo que la consolidación de esos contactos focales sobre el material puedan favorecer la transmisión de la tensión necesaria para la estabilización de la célula. Estos contactos focales están regulados por medio de Quinasas de adhesión focal (FAK) que están a su vez relacionadas con la regulación de la actividad de las gtpasas Rho

En las muestras usadas, la proteína Rho tenía una mayor expresión en las muestras con rugosidad R1 y en Ta. La manera que se ha buscado para explicar esto es por medio de metilación de DNA. Los cambios epigenéticos que se llevan a cabo durante los procesos de adhesividad celular parecen ser la explicación por la cual se está realizando un control de la expresión génica por parte del ambiente en las células.

Cuando se emplean armazones de TiO₂ en condiciones estáticas, la metilación no está es mucho menor que en dinámico. La respuesta celular a la acción mecánica del flujo es la metilación del DNA de nuevo. La regulación de la ruta de WNT por medio de Beta Catenina es uno de los campos más explorados en la actualidad debido a que esta misma ruta es la que puede diferenciar una célula madre a osteoblasto o a condrocito. Se sabe que las células madre sometidas a ambientes osteogénicos (O'Brien) se han diferenciado en función del flujo empleado para estimular a las células mesenquimales en sus nichos celulares. El paso siguiente en la Ingeniería de tejidos es conocido como Ingeniería de tejidos funcional (FTE). Este modelo busca recrear de la manera más precisa posible las interacciones que las células tienen en el organismo. Por lo tanto en el modelo de TiO₂ estamos recreando por un lado las señales bioquímicas y celulares y por otro las físicas al aplicar un flujo de medio que de manera cíclica va a estimular la mecanoregulación de Beta Catenina y de WNT3a por medio de mecanismos de metilación. No son solamente las señales bioquímicas las que están favoreciendo las regulaciones intracelulares, sino que estas mismas señales están inducidas por estímulos mecánicos exteriores.

CAPÍTULO 3

Los experimentos de expresión génica realizados sobre todos los materiales tienen una cosa en común, se han realizado a corto plazo. En la literatura es fácil encontrar mediciones de hasta 30 días (Harle, Kim et al. 2006, Park, Kim et al. 2010, Huang 2004) en los cuales se ha hecho un estudio de la expresión de algún marcador como la osteocalcina. Un punto importante a cubrir en esta discusión es que todos estos experimentos están realizados *in vitro*. Aunque puede parecer una obviedad que se repita tanto esta idea durante la tesis, el hecho de que no seamos capaces de recrear de manera exacta o por lo menos aproximada el ambiente en el cual las células reparan tejidos, interaccionan con implantes etc...

Tanto las propiedades físicas de la ECM como las fuerzas mecánicas externas que juegan un papel regulador sobre las células forman parte de procesos morfogénicos en el desarrollo embrionario {{1218 Baker,Erin L. 2009; 1219 Petreaca,M. 2011}}. En condiciones *in vivo*, este ambiente dirige la arquitectura y diferenciación celular {{1217 Breuls,Roel G.M. 2009; 1221 Davidson,Lance 2009}}. En los experimentos se ha visto cómo la mecanotransducción permite a las células una adaptación a estímulos externos, tanto generados por flujos, como por la rugosidad de superficie. Estos cambios en la mecanorecepción conllevan una redistribución del citoesqueleto y al mismo tiempo activar programas génicos específicos. Tales cambios no son desconocidos ni limitados al ámbito de la medicina regenerativa teniendo importancia en áreas de prioridad sanitaria como cáncer {{1229 Ananthanarayanan,Badriprasad 2011; 1228 Samuel,Michael S. 2011}}.

Deja abierta la pregunta sobre cuándo dejan de ejercer efecto los materiales sobre las células y son directamente las células las que se regulan entre ellas por medio de comunicación celular o señales contenidas en la ECM. A la hora de realizar un implante in vivo, la cantidad de factores de crecimiento, citokinas y fuerzas físicas que existen en el tejido son tan grandes y variadas que se convierte en una tarea complicada el reproducir un nicho celular dentro de una simple placa de cultivo o en un bioreactor.

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

- Las muestras de Niobio presentan unas buenas características de biocompatibilidad. A una rugosidad pequeña, las células proliferan con mayor facilidad. De hecho se observó cómo a tiempos cortos su comportamiento es muy similar al Ta aunque varía de manera sensible a periodos de 10 días de cultivo. La citotoxicidad es progresiva en función del tiempo de cultivo, algo lógico ya que siempre va a existir un índice de apoptosis en cualquier cultivo.
- El Tántalo presenta una biocompatibilidad mayor en comparación con el niobio. Los resultados de Caspasa 3 son más bajos para este metal frente al Niobio. Estos efectos también son patentes en la proliferación celular. Durante los ensayos de microscopía confocal la formación de ECM y comunicación celular es mucho mejor en Tántalo que en Niobio.
- La rugosidad afecta directamente a la mecanotransducción de la célula, modifica el comportamiento de la proteína Rho GTPasa vinculada con la adhesividad celular inicial y los procesos de colonización de una superficie por parte de una población inicial de células. La rugosidad elevada (R2) pone más complicado el que las células proliferen con mayor ritmo sobre los materiales. R1 por su parte muestra diferencias significativas de crecimiento celular incluso a momentos iniciales de cultivo.

- La biocompatibilidad del TiO₂ en pastillas densas y de los armazones fabricados por robocasting pone de manifiesto la existencia de cambios celulares en función de la conformación tridimensional del material. La proliferación es mejor en la estructura creada por escritura directa ya que permite la formación de nichos o microambientes reconocidos por las células. Las imágenes de viabilidad celular tomadas por confocal corroboran una mayor viabilidad también en estructuras tridimensionales.
- Un ambiente de cultivo dinámico estimula la regulación génica de la célula en provocando metilaciones a nivel celular.
- Las fuerzas mecánicas a las que se someten las células tienen una respuesta genética por medio de un modelo de tensigridad. Estas fuerzas regulan la ruta de las WNT de manera canónica por medio de B-Catenina, influenciando de manera directa componentes de la misma, WNT3a.
- La rugosidad de superficie modifica la proliferación celular. La Rho GTPasa está regulada por medio de estas rugosidades de superficie. No existe una rugosidad ideal para todas las aplicaciones, si no que cada aplicación tiene posee unos requisitos propios que se han de tener en cuenta a la hora de diseñar un material. La rugosidad afecta a factores como la coagulación y hemólisis así como a la activación de plaquetas.

- La proliferación en armazones 3D está favorecida debido a la creación de nichos celulares dónde se juntan señales bioquímicas y físicas. Las condiciones de reposo son muy diferentes de las dinámicas por lo que diseñar modelos de estudio dinámicos para aproximarnos a la realidad parece una buena alternativa para sobreponerse a las limitaciones de los ensayos in vitro.
- La epigenética es útil para conocer más a fondo los cambios que se producen a nivel molecular en cuanto a la adhesividad. Permite explicar con mayor detalle, por qué unas condiciones químicas o físicas de superficie obtienen mejores resultados de actividad celular.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

ANDERSON, J.M., RODRIGUEZ, A. and CHANG, D.T., 2008. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in immunology*, 20(2), pp. 86-100.

ARAFAT, M.T., LAM, C.X.F., EKAPUTRA, A.K., WONG, S.Y., LI, X. and GIBSON, I., 2011. Biomimetic composite coating on rapid prototyped scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 7(2), pp. 809-820.

BALLA, V.K., BODHAK, S., BOSE, S. and BANDYOPADHYAY, A., 2010. Porous tantalum structures for bone implants: Fabrication, mechanical and in vitro biological properties. *Acta Biomaterialia*, 6(8), pp. 3349-3359.

BETTINGER, C.J., ORRICK, B., MISRA, A., LANGER, R. and BORENSTEIN, J.T., 2006. Microfabrication of poly (glycerol–sebacate) for contact guidance applications. *Biomaterials*, 27(12), pp. 2558-2565.

BIGGS, M.J.P., RICHARDS, R.G. and DALBY, M.J., 2010. Nanotopographical modification: a regulator of cellular function through focal adhesions. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(5), pp. 619-633.

BOBYN, J.D., TOH, K., HACKING, S.A., TANZER, M. and KRYGIER, J.J., 1999. Tissue response to porous tantalum acetabular cups: A canine model. *The Journal of arthroplasty*, 14(3), pp. 347-354.

BRETTLE, J., 1970a. A survey of the literature on metallic surgical implants. *Injury*, 2(1), pp. 26-39.

BRETTLE, J., 1970b. A survey of the literature on metallic surgical implants. *Injury*, 2(1), pp. 26-39.

BIBLIOGRAFIA

BROOKS, W.H., LE DANTEC, C., PERS, J., YOUINOU, P. and RENAUDINEAU, Y., 2010. Epigenetics and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 34(3), pp. J207-J219.

BUTLER, P.J., BHATNAGER, A. and FERKO, M.C., 2006. Multiscale analysis of shear-induced stresses at endothelial cell focal adhesions. *Journal of Biomechanics*, 39, Supplement 1(0), pp. S311.

CANTLEY, L., 2008. Chapter 11 - Principles of Cell Signaling. *Seldin and Giebisch's The Kidney (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press, pp. 297-IV.

CHARRAS, G.T., LEHENKARI, P.P. and HORTON, M.A., 2001. Atomic force microscopy can be used to mechanically stimulate osteoblasts and evaluate cellular strain distributions. *Ultramicroscopy*, 86(1-2), pp. 85-95.

CHARRAS, G.T. and HORTON, M.A., 2002. Determination of Cellular Strains by Combined Atomic Force Microscopy and Finite Element Modeling. *Biophysical journal*, 83(2), pp. 858-879.

CHARRAS, G.T., WILLIAMS, B.A., SIMS, S.M. and HORTON, M.A., 2004. Estimating the Sensitivity of Mechanosensitive Ion Channels to Membrane Strain and Tension. *Biophysical journal*, 87(4), pp. 2870-2884.

CHEN, C.S. and INGBER, D.E., 2008. Tensegrity und Mechanoregulation: Vom Skelett zum Zytoskelett. *Osteopathische Medizin, Zeitschrift für ganzheitliche Heilverfahren*, 9(4), pp. 4-17.

CHIU, L.L.Y., CHU, Z. and RADISIC, M., 2011. 2.07 - Tissue Engineering. In: EDITORS-IN-CHIEF: DAVID L. ANDREWS A2GREGORY D. SCHOLEES and GARY P. WIEDERRECHT, eds, *Comprehensive Nanoscience and Technology*. Amsterdam: Academic Press, pp. 175-211.

- CHOI, E., LEE, S.Q., KIM, T.Y., CHANG, H., LEE, K.J. and PARK, J., 2010. MEMS-based power generation system using contractile force generated by self-organized cardiomyocytes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 151(1), pp. 291-296.
- CHUONG, C.J. and FUNG, Y.C., 1984. Compressibility and constitutive equation of arterial wall in radial compression experiments. *Journal of Biomechanics*, 17(1), pp. 35-40.
- CLARK, P., 1994. Cell behaviour on micropatterned surfaces. *Biosensors and Bioelectronics*, 9(9-10), pp. 657-661.
- COLETTI, C., JAROSZESKI, M.J., HOFF, A.M. and SADDOW, S.E., 2012. Chapter 4 - SiC In Vitro Biocompatibility: Epidermal and Connective Tissue Cells. *Silicon Carbide Biotechnology*. Oxford: Elsevier, pp. 119-152.
- CONNOLLY, P., CLARK, P., CURTIS, A.S.G., DOW, J.A.T. and WILKINSON, C.D.W., 1990. An Extracellular microelectrode Array for monitoring electrogenic cells in culture. *Biosensors and Bioelectronics*, 5(3), pp. 223-234.
- CURTIS, A.S.G., CASEY, B., GALLAGHER, J.O., PASQUI, D., WOOD, M.A. and WILKINSON, C.D.W., 2001. Substratum nanotopography and the adhesion of biological cells. Are symmetry or regularity of nanotopography important? *Biophysical chemistry*, 94(3), pp. 275-283.
- CURTIS, A. and WILKINSON, C., 1997. Topographical control of cells. *Biomaterials*, 18(24), pp. 1573-1583.
- CURTIS, A., WILKINSON, C., CURTIS, A. and WILKINSON, C., 2001. Nanotechniques and approaches in biotechnology. *Materials Today*, 4(3), pp. 22-28.

DALBY, M.J., RIEHLE, M.O., JOHNSTONE, H., AFFROSSMAN, S. and CURTIS, A.S.G., 2004. Investigating the limits of filopodial sensing: a brief report using SEM to image the interaction between 10 nm high nanotopography and fibroblast filopodia. *Cell biology international*, 28(3), pp. 229-236.

DALBY, M.J., RIEHLE, M.O., JOHNSTONE, H., AFFROSSMAN, S. and CURTIS, A.S.G., 2002. In vitro reaction of endothelial cells to polymer demixed nanotopography. *Biomaterials*, 23(14), pp. 2945-2954.

DALBY, M.J., RIEHLE, M.O., YARWOOD, S.J., WILKINSON, C.D.W. and CURTIS, A.S.G., 2003. Nucleus alignment and cell signaling in fibroblasts: response to a micro-grooved topography. *Experimental cell research*, 284(2), pp. 272-280.

DALMAY, C., VILLEMEJANE, J., JOUBERT, V., FRANÇAIS, O., MIR, L.M. and LE PIOUFLE, B., 2011. Design and realization of a microfluidic device devoted to the application of ultra-short pulses of electrical field to living cells. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 160(1), pp. 1573-1580.

DE CURTIS, I., 1991. Neuronal interactions with the extracellular matrix. *Current opinion in cell biology*, 3(5), pp. 824-831.

DELGADO-CALLE, J., SAÑUDO, C., SÁNCHEZ-VERDE, L., GARCÍA-RENEDO, R.J., AROZAMENA, J. and RIANCHO, J.A., 2011. Epigenetic regulation of alkaline phosphatase in human cells of the osteoblastic lineage. *Bone*, 49(4), pp. 830-838.

DITTRICK, S., BALLA, V.K., BOSE, S. and BANDYOPADHYAY, A., 2011. Wear performance of laser processed tantalum coatings. *Materials Science and Engineering: C*, 31(8), pp. 1832-1835.

DJIKANOVIĆ, D., KALAUZI, A., JEREMIĆ, M., XU, J., MIĆIĆ, M., WHYTE, J.D., LEBLANC, R.M. and RADOTIĆ, K., 2012. Interaction of the CdSe quantum dots with plant cell walls. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 91(0), pp. 41-47.

DUBEY, G. and MEQUANINT, K., 2011. Conjugation of fibronectin onto three-dimensional porous scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*, 7(3), pp. 1114-1125.

ELLINAS, K., SMYRNAKIS, A., MALAINOU, A., TSEREPI, A. and GOGOLIDES, E., 2011. "Mesh-assisted" colloidal lithography and plasma etching: A route to large-area, uniform, ordered nano-pillar and nanopost fabrication on versatile substrates. *Microelectronic Engineering*, 88(8), pp. 2547-2551.

FREED, L.E. and GUILAK, F., 2007. Chapter Eleven - Engineering functional tissues. In: ROBERT LANZA A2ROBERT LANGER AND JOSEPH VACANTIA2 ROBERT LANZA,ROBERT LANGER and JOSEPH VACANTI, eds, *Principles of Tissue Engineering (Third Edition)*. Burlington: Academic Press, pp. 137-153.

FROST, H.M., 1989. Some effects of basic multicellular unit-based remodelling on photon absorptiometry of trabecular bone. *Bone and mineral*, 7(1), pp. 47-65.

FUNG, Y.C., 1982. Perspectives in soft tissue mechanics. *Journal of Biomechanics*, 15(10), pp. 795.

GHOSHMITRA, S., DIERCKS, D.R., MILLS, N.C., HYND, D.L. and GHOSH, S., 2012. Role of engineered nanocarriers for axon regeneration and guidance: Current status and future trends. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(1), pp. 110-125.

BIBLIOGRAFIA

- GOLOMB, G. and WAGNER, D., 1991. Development of a new in vitro model for studying implantable polyurethane calcification. *Biomaterials*, 12(4), pp. 397-405.
- GRISCOM, L., DEGENAAR, P., LEPIOUFLE, B., TAMIYA, E. and FUJITA, H., 2002. Techniques for patterning and guidance of primary culture neurons on micro-electrode arrays. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 83(1-3), pp. 15-21.
- GUO, X., GONZALEZ, M., STANCESCU, M., VANDENBURGH, H.H. and HICKMAN, J.J., 2011. Neuromuscular junction formation between human stem cell-derived motoneurons and human skeletal muscle in a defined system. *Biomaterials*, 32(36), pp. 9602-9611.
- GUPTA, S., NEW, A.M.R. and TAYLOR, M., 2006. Bone remodelling inside a cemented resurfaced femoral head. *Clinical Biomechanics*, 21(6), pp. 594-602.
- HADDOW, D.B., KOTHARI, S., JAMES, P.F., SHORT, R.D., HATTON, P.V. and VAN NOORT, R., 1996. Synthetic implant surfaces: 1. The formation and characterization of sol-gel titania films. *Biomaterials*, 17(5), pp. 501-507.
- HARLE, J., KIM, H., MORDAN, N., KNOWLES, J.C. and SALIH, V., 2006. Initial responses of human osteoblasts to sol-gel modified titanium with hydroxyapatite and titania composition. *Acta Biomaterialia*, 2(5), pp. 547-556.
- HESLOP-HARRISON, J., Forty Years of Genecology. *Advances in Ecological Research*. Academic Press, pp. 159-247.

BIBLIOGRAFIA

- HESLOP-HARRISON, J.(., 2012. Genome evolution: extinction, continuation or explosion? *Current opinion in plant biology*, 15(2), pp. 115-121.
- HOLLAND, S.J., PELES, E., PAWSON, T. and SCHLESSINGER, J., 1998. Cell-contact-dependent signalling in axon growth and guidance: Eph receptor tyrosine kinases and receptor protein tyrosine phosphatase β . *Current opinion in neurobiology*, 8(1), pp. 117-127.
- HORAN, R.L., COLLETTE, A.L., LEE, C., ANTLE, K., CHEN, J. and ALTMAN, G.H., 2006. Yarn design for functional tissue engineering. *Journal of Biomechanics*, 39(12), pp. 2232-2240.
- HUANG, H., 2004. In situ surface electrochemical characterizations of Ti and Ti-6Al-4V alloy cultured with osteoblast-like cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 314(3), pp. 787-792.
- HUANG, H., HO, C., LEE, T., LEE, T., LIAO, K. and CHEN, F., 2004. Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion. *Biomolecular engineering*, 21(3-5), pp. 93-97.
- HWANG, N.S., VARGHESE, S. and ELISSEEFF, J., 2008. Controlled differentiation of stem cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(2), pp. 199-214.
- INGBER, D.E., 2008a. Tensegrity and mechanotransduction. *Journal of Bodywork and Movement Therapies*, 12(3), pp. 198-200.
- INGBER, D.E., 2008b. Tensegrity-based mechanosensing from macro to micro. *Progress in biophysics and molecular biology*, 97(2-3), pp. 163-179.
- INGBER, D.E., DIKE, L., HANSEN, L., KARP, S., LILEY, H., MANIOTIS, A., MCNAMEE, H., MOONEY, D., PLOPPER, G., SIMS, J.

and WANG, N., Cellular Tensegrity: Exploring How Mechanical Changes in the Cytoskeleton Regulate Cell Growth, Migration, and Tissue Pattern during Morphogenesis. *International Review of Cytology*. Academic Press, pp. 173-224.

INGBER, D.E., PRUSTY, D., SUN, Z., BETENSKY, H. and WANG, N., 1995. Cell shape, cytoskeletal mechanics, and cell cycle control in angiogenesis. *Journal of Biomechanics*, 28(12), pp. 1471-1484.

JAASMA, M.J., PLUNKETT, N.A. and O'BRIEN, F.J., 2008. Design and validation of a dynamic flow perfusion bioreactor for use with compliant tissue engineering scaffolds. *Journal of Biotechnology*, 133(4), pp. 490-496.

JAMIESON, C., SHARMA, M. and HENDERSON, B.R., 2012. Wnt signaling from membrane to nucleus: β -catenin caught in a loop. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(6), pp. 847-850.

JIN, E., PARK, J., LEE, S., CHUN, J., BANG, O. and KANG, S., 2006. Wnt-5a is involved in TGF- β 3-stimulated chondrogenic differentiation of chick wing bud mesenchymal cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(2), pp. 183-195.

JOLDERSMA, M., BURGER, E.H., SEMEINS, C.M. and KLEIN-NULEND, J., 2000. Mechanical stress induces COX-2 mRNA expression in bone cells from elderly women. *Journal of Biomechanics*, 33(1), pp. 53-61.

KAUNAS, R. and HSU, H., 2009. A kinematic model of stretch-induced stress fiber turnover and reorientation. *Journal of theoretical biology*, 257(2), pp. 320-330.

BIBLIOGRAFIA

- KAUNAS, R., HUANG, Z. and HAHN, J., 2010. A kinematic model coupling stress fiber dynamics with JNK activation in response to matrix stretching. *Journal of theoretical biology*, 264(2), pp. 593-603.
- KEYES, M.E., 1999. The Prion Challenge to the 'Central Dogma' of Molecular Biology, 1965–1991: Part I: Prelude to Prions. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 30(1), pp. 1-19.
- KIHARA, T., NAKAMURA, C., SUZUKI, M., HAN, S., FUKAZAWA, K., ISHIHARA, K. and MIYAKE, J., 2009. Development of a method to evaluate caspase-3 activity in a single cell using a nanoneedle and a fluorescent probe. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(1), pp. 22-27.
- KIM, J., SEO, S. and MIN, J., 2011. Epithelial cell patterns on a PDMS polymer surface using a micro plasma structure. *Journal of Biotechnology*, 155(3), pp. 308-311.
- KRAWIEC, J.T. and VORP, D.A., 2012. Adult stem cell-based tissue engineered blood vessels: A review. *Biomaterials*, 33(12), pp. 3388-3400.
- KULAR, J., TICKNER, J., CHIM, S.M. and XU, J., An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clinical biochemistry*, (0),.
- KURAITIS, D., GIORDANO, C., RUEL, M., MUSARÒ, A. and SUURONEN, E.J., 2012. Exploiting extracellular matrix-stem cell interactions: A review of natural materials for therapeutic muscle regeneration. *Biomaterials*, 33(2), pp. 428-443.
- LAINÉ, S.K., HENTUNEN, T. and LAITALA-LEINONEN, T., 2012. Do microRNAs regulate bone marrow stem cell niche physiology? *Gene*, 497(1), pp. 1-9.

LANGER, R.S. and PEPPAS, N.A., 1981. Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. *Biomaterials*, 2(4), pp. 201-214.

LANGER, R., CIMA, L.G., TAMADA, J.A. and WINTERMANTEL, E., 1990. Future directions in biomaterials. *Biomaterials*, 11(9), pp. 738-745.

LEE, D. and YANG, S., 2012. Surface modification of PDMS by atmospheric-pressure plasma-enhanced chemical vapor deposition and analysis of long-lasting surface hydrophilicity. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 162(1), pp. 425-434.

LELIÈVRE, S.A., 2009. Contributions of extracellular matrix signaling and tissue architecture to nuclear mechanisms and spatial organization of gene expression control. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1790(9), pp. 925-935.

LEWIS, J.R. and FERRARI, M., 2003. - BioMEMS for drug delivery applications. In: R. EDWIN OOSTERBROEK and ALBERT VAN DEN BERG, eds, *Lab-on-a-Chip*. Amsterdam: Elsevier, pp. 373-389.

LIEDL, T., INGBER, D.E. and SHIH, W.M., 2009. Pre-stressed Tensegrity Structures built from DNA. *Biophysical journal*, 96(3, Supplement 1), pp. 20a.

LIU, H., FAN, H., WANG, Y., TOH, S.L. and GOH, J.C.H., 2008. The interaction between a combined knitted silk scaffold and microporous silk sponge with human mesenchymal stem cells for ligament tissue engineering. *Biomaterials*, 29(6), pp. 662-674.

LUO, Y., XU, X., LELE, T., KUMAR, S. and INGBER, D.E., 2008. A multi-modular tensegrity model of an actin stress fiber. *Journal of Biomechanics*, 41(11), pp. 2379-2387.

LÜTHEN, F., LANGE, R., BECKER, P., RYCHLY, J., BECK, U. and NEBE, J.G.B., 2005. The influence of surface roughness of titanium on β 1- and β 3-integrin adhesion and the organization of fibronectin in human osteoblastic cells. *Biomaterials*, 26(15), pp. 2423-2440.

LYONS, F.G., AL-MUNAJJED, A.A., KIERAN, S.M., TONER, M.E., MURPHY, C.M., DUFFY, G.P. and O'BRIEN, F.J., 2010. The healing of bony defects by cell-free collagen-based scaffolds compared to stem cell-seeded tissue engineered constructs. *Biomaterials*, 31(35), pp. 9232-9243.

MARANI, E.E. and LAKKE, E.A.J.F., 2012. Chapter 4 - Peripheral Nervous System Topics. In: JUERGEN K. MAI and GEORGE PAXINOS, eds, *The Human Nervous System (Third Edition)*. San Diego: Academic Press, pp. 82-140.

MCNAMARA, L.E., MCMURRAY, R.J., DALBY, M.J. and TSIMBOURI, P.M., 2011. 4.409 - Surfaces and Cell Behavior. In: EDITOR-IN-CHIEF: PAUL DUCHEYNE, ed, *Comprehensive Biomaterials*. Oxford: Elsevier, pp. 115-126.

MCNAMARA, L.E., SJÖSTRÖM, T., BURGESS, K.E.V., KIM, J.J.W., LIU, E., GORDONOV, S., MOGHE, P.V., MEEK, R.M.D., OREFFO, R.O.C., SU, B. and DALBY, M.J., 2011. Skeletal stem cell physiology on functionally distinct titania nanotopographies. *Biomaterials*, 32(30), pp. 7403-7410.

MERRITT, K., 1984. Role of medical materials, both in implant and surface applications, in immune response and in resistance to infection. *Biomaterials*, 5(1), pp. 47-53.

MILLER, E.D., LI, K., KANADE, T., WEISS, L.E., WALKER, L.M. and CAMPBELL, P.G., 2011. Spatially directed guidance of stem cell

population migration by immobilized patterns of growth factors. *Biomaterials*, 32(11), pp. 2775-2785.

MIYAZAKI, T., KIM, H., KOKUBO, T., OHTSUKI, C., KATO, H. and NAKAMURA, T., 2002. Mechanism of bonelike apatite formation on bioactive tantalum metal in a simulated body fluid. *Biomaterials*, 23(3), pp. 827-832.

MONROE, D.G., MCGEE-LAWRENCE, M.E., OURSLER, M.J. and WESTENDORF, J.J., 2012. Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. *Gene*, 492(1), pp. 1-18.

MURPHY, C.M., MATSIKO, A., HAUGH, M.G., GLEESON, J.P. and O'BRIEN, F.J., Mesenchymal stem cell fate is regulated by the composition and mechanical properties of collagen–glycosaminoglycan scaffolds. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, (0),.

NAKAO, M., 2001. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene*, 278(1–2), pp. 25-31.

NARAKATHU, B.B., GUO, W., OBARE, S.O. and ATASHBAR, M.Z., 2011. Novel approach for detection of toxic organophosphorus compounds. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 158(1), pp. 69-74.

O'BRIEN, F.J., 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), pp. 88-95.

PARK, J., KIM, H., KIM, Y., JANG, J., SONG, H. and HANAWA, T., 2010. Osteoblast response and osseointegration of a Ti–6Al–4V alloy implant incorporating strontium. *Acta Biomaterialia*, 6(7), pp. 2843-2851.

PLUNKETT, N.A., JAASMA, M.J. and O'BRIEN, F.J., 2008. EFFECT OF REST-INSERTED FLUID FLOW ON CELLULAR ACTIVITY

BIBLIOGRAFIA

DURING BIOREACTOR CULTURE. *Journal of Biomechanics*, 41, Supplement 1(0), pp. S80.

PROWSE, A.B.J., CHONG, F., GRAY, P.P. and MUNRO, T.P., 2011. Stem cell integrins: Implications for ex-vivo culture and cellular therapies. *Stem Cell Research*, 6(1), pp. 1-12.

RAJNICEK, A.M., FOUBISTER, L.E. and MCCAIG, C.D., 2007. Prioritising guidance cues: Directional migration induced by substratum contours and electrical gradients is controlled by a rho/cdc42 switch. *Developmental biology*, 312(1), pp. 448-460.

RANELLA, A., BARBEROGLU, M., BAKOGIANNI, S., FOTAKIS, C. and STRATAKIS, E., 2010. Tuning cell adhesion by controlling the roughness and wettability of 3D micro/nano silicon structures. *Acta Biomaterialia*, 6(7), pp. 2711-2720.

ROLOFF, T.C. and NUBER, U.A., 2005. Chromatin, epigenetics and stem cells. *European journal of cell biology*, 84(2-3), pp. 123-135.

ROSSLENBROICH, B., 2011. Outline of a concept for organismic systems biology. *Seminars in cancer biology*, 21(3), pp. 156-164.

SABATELLI, P., BONALDO, P., LATTANZI, G., BRAGHETTA, P., BERGAMIN, N., CAPANNI, C., MATTIOLI, E., COLUMBARO, M., OGNIBENE, A., PEPE, G., BERTINI, E., MERLINI, L., MARALDI, N.M. and SQUARZONI, S., 2001. Collagen VI deficiency affects the organization of fibronectin in the extracellular matrix of cultured fibroblasts. *Matrix Biology*, 20(7), pp. 475-486.

SAUTER-STARACE, F., PUDDA, C., DELATTRE, C., JEANSON, H., GILLOT, C., SARRUT, N., CONSTANTIN, O. and BLANC, R., 2006. - Lab on a Chip: Advances in packaging for MEMS and Lab on a Chip. In:

WOLFGANG MENZ, STEFAN DIMOV AND BERTRAND FILLON² WOLFGANG MENZ, STEFAN DIMOV and BERTRAND FILLON, eds, *4M 2006 - Second International Conference on Multi-Material Micro Manufacture*. Oxford: Elsevier, pp. 3-7.

SCHAMBONY, A., KUNZ, M. and GRADL, D., 2004. Cross-regulation of Wnt signaling and cell adhesion. *Differentiation*, 72(7), pp. 307-318.

SEIFU, D.G., ISIMJAN, T.T. and MEQUANINT, K., 2011. Tissue engineering scaffolds containing embedded fluorinated-zeolite oxygen vectors. *Acta Biomaterialia*, 7(10), pp. 3670-3678.

SHAO, G., WU, J., CAI, Z. and WANG, W., 2012. Fabrication of elastomeric high-aspect-ratio microstructures using polydimethylsiloxane (PDMS) double casting technique. *Sensors and Actuators A: Physical*, 178(0), pp. 230-236.

SIDOLI, S., CHENG, L. and JENSEN, O.N., Proteomics in chromatin biology and epigenetics: Elucidation of post-translational modifications of histone proteins by mass spectrometry. *Journal of Proteomics*, (0),.

SJÖSTRÖM, T., DALBY, M.J., HART, A., TARE, R., OREFFO, R.O.C. and SU, B., 2009. Fabrication of pillar-like titania nanostructures on titanium and their interactions with human skeletal stem cells. *Acta Biomaterialia*, 5(5), pp. 1433-1441.

STAMENOVIĆ, D., WANG, N. and INGBER, D.E., 2006. 4 - Cellular tensegrity models and cell-substrate interactions. In: MICHAEL R. KING, ed, *Principles of Cellular Engineering*. Burlington: Academic Press, pp. 81-III.

STRANZ, A., SÖKMEN, Ü., KÄHLER, J., WAAG, A. and PEINER, E., 2011. Measurements of thermoelectric properties of silicon pillars. *Sensors and Actuators A: Physical*, 171(1), pp. 48-53.

STRÄULI, P. and WEISS, L., 1977. Cell locomotion and tumor penetration: Report on a workshop of the EORTC cell surface project group (Zürich, 8–10 April 1976). *European Journal of Cancer (1965)*, 13(1), pp. 1-12.

SUBRAMANI, K. and AHMED, W., 2012. Chapter 11 - Fabrication of PEG Hydrogel Micropatterns by Soft-Photolithography and PEG Hydrogel as Guided Bone Regeneration Membrane in Dental Implantology. *Emerging Nanotechnologies in Dentistry*. Boston: William Andrew Publishing, pp. 171-187.

TARE, R.S., BABISTER, J.C., KANCZLER, J. and OREFFO, R.O.C., 2008. Skeletal stem cells: Phenotype, biology and environmental niches informing tissue regeneration. *Molecular and cellular endocrinology*, 288(1–2), pp. 11-21.

TING, L.H. and SNIADOCKI, N.J., 2011. 3.315 - Biological Microelectromechanical Systems (BioMEMS) Devices. In: EDITOR-IN-CHIEF: PAUL DUCHEYNE, ed, *Comprehensive Biomaterials*. Oxford: Elsevier, pp. 257-276.

TRIPATHI, G. and BASU, B., 2012. A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations. *Ceramics International*, 38(1), pp. 341-349.

TURNER, N., ARMITAGE, M., BUTLER, R. and IRELAND, G., 2004. An in vitro model to evaluate cell adhesion to metals used in implantation

shows significant differences between palladium and gold or platinum. *Cell biology international*, 28(7), pp. 541-547.

VASILEV, K., POH, Z., KANT, K., CHAN, J., MICHELMORE, A. and LOSIC, D., 2010. Tailoring the surface functionalities of titania nanotube arrays. *Biomaterials*, 31(3), pp. 532-540.

VLAD-FIEGEN, A., LANGERAK, A., EBERTH, S. and MÜLLER, O., 2012a. The Wnt pathway destabilizes adherens junctions and promotes cell migration via β -catenin and its target gene cyclin D1. *FEBS Open Bio*, 2(0), pp. 26-31.

VLAD-FIEGEN, A., LANGERAK, A., EBERTH, S. and MÜLLER, O., 2012b. The Wnt pathway destabilizes adherens junctions and promotes cell migration via β -catenin and its target gene cyclin D1. *FEBS Open Bio*, 2(0), pp. 26-31.

WADHWA, S., CHOUDHARY, S., VOZNESENSKY, M., EPSTEIN, M., RAISZ, L. and PILBEAM, C., 2002. Fluid flow induces COX-2 expression in MC3T3-E1 osteoblasts via a PKA signaling pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 297(1), pp. 46-51.

WAGGETT, A.D., BENJAMIN, M. and RALPHS, J.R., 2006. Connexin 32 and 43 gap junctions differentially modulate tenocyte response to cyclic mechanical load. *European journal of cell biology*, 85(11), pp. 1145-1154.

WANG, H., LI, Y., ZUO, Y., LI, J., MA, S. and CHENG, L., 2007. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 28(22), pp. 3338-3348.

WEISS, L., 1962. Cell movement and cell surfaces: A working hypothesis. *Journal of theoretical biology*, 2(3), pp. 236-250.

BIBLIOGRAFIA

WEISS, P., Cell Contact. *International Review of Cytology*. Academic Press, pp. 391-423.

WERNER, E., 2005. Genome semantics, in silico multicellular systems and the Central Dogma. *FEBS letters*, 579(8), pp. 1779-1782.

WILKINSON, P.C., SHIELDS, J.M. and HASTON, W.S., 1982. Contact guidance of human neutrophil leukocytes. *Experimental cell research*, 140(1), pp. 55-62.

WOOD, M.A., BAGNANINCHI, P. and DALBY, M.J., 2008. The β integrins and cytoskeletal nanoimprinting. *Experimental cell research*, 314(4), pp. 927-935.

YANG, J., YAMATO, M., SHIMIZU, T., SEKINE, H., OHASHI, K., KANZAKI, M., OHKI, T., NISHIDA, K. and OKANO, T., 2007. Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering. *Biomaterials*, 28(34), pp. 5033-5043.

YU, B., CHOU, P., SUN, Y., LEE, Y. and YOUNG, T., 2006. Topological micropatterned membranes and its effect on the morphology and growth of human mesenchymal stem cells (hMSCs). *Journal of Membrane Science*, 273(1-2), pp. 31-37.

ZAN, Q., WANG, C., DONG, L., CHENG, P. and TIAN, J., 2008. Effect of surface roughness of chitosan-based microspheres on cell adhesion. *Applied Surface Science*, 255(2), pp. 401-403.