

6. Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 23-36.
7. Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002; 297: 2056-60.
8. Matzke MA, Matzke AJM. Planting the seeds of a new paradigm. *PLoS Biol* 2004; 2(5): E133.
9. Bartlett DW, Davis ME. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: 322-33.
10. Li C, Parker A, Menocal E, Xiang S, Borodyansky L, Fruehauf J. Delivery of RNA interference. *Cell Cycle* 2006; 5(18): 2103-9.
11. Takeshita F, Ochiya T. Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci* 2006; 97(8): 689-96.
12. Tong A, Zhang Y, Nemunaitis J. Small interfering RNA for experimental cancer therapy. *Curr Opin Mol Ther* 2005; 7(2): 114-24.
13. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Science* 2002; 296:550-3.
14. Dykxhoorn DM, Lieberman J. Knocking down disease with siRNAs. *Cell* 2006; 126(2): 231-5.
15. Castanotto D, Rossi JJ. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature* 2009; 457(7228): 426-33.
16. Tiemann K, Rossi JJ. RNAi-based therapeutics-current status, challenges and prospects. *EMBO Mol Med* 2009; 1(3): 142-51.

## LABORATORIO DE PATOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA MOLECULAR

Potencial proangiogénico de los productos de disolución de materiales vítreos bioactivos

*Angiogenic potential of bioactive glasses ionic dissolution products*

*Potencial proangiogênico dos produtos de dissolução de materiais vítreos bioativos*

Luis A. Haro Durand<sup>1,2</sup>, Adrián Góngora<sup>1</sup>, Martín Gomez<sup>1</sup>, Alberto Baldi<sup>1</sup>, Alejandro Gorustovich<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biología y Medicina Experimental IByME- CONICET, Buenos Aires, Argentina; <sup>2</sup>Grupo Interdisciplinario en Materiales, IESIING-UCASAL, INTECIN, UBA-CONICET, Salta, Argentina

## Resumen

La angiogénesis es un proceso complejo caracterizado por una cascada de eventos que llevan a la activación, proliferación y migración de células endoteliales y al remodelado y estabilización del tejido vascular. Recientes intentos por estimular angiogénesis se han enfocado en la entrega de factores de crecimientos tales como el factor de crecimiento endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), terapia génica y terapia basada en células, pero estos procedimientos son caros y los mecanismos de entrega óptimos son aún poco comprendidos, por lo tanto, contar con estrategias más sencillas y menos costosas para inducir angiogénesis, representarían una muy buena alternativa al uso de factores de crecimientos costosos para estimular la neovascularización en un tejido en reparación. Los vidrios bioactivos han sido ampliamente investigados para la regeneración de tejido óseo, sin embargo ha habido poca investigación en la aplicación de los vidrios bioactivos para reparar tejidos blandos altamente vascularizados y particularmente, la influencia que tienen sobre la neovascularización. Sin embargo recientes trabajos han mostrado la habilidad de los vidrios bioactivos para promover angiogénesis lo cual es crítico para numerosas aplicaciones en la reparación de herida y en estrategias para la ingeniería de tejidos. Este artículo, en la primera parte; presenta una visión general de los vidrios bioactivos haciendo énfasis en las características que determinan la bioactividad de los vidrios de silicato bioactivos y en la segunda parte, revisa la evidencia existente en la bibliografía sobre estudios que han demostrado el potencial de los vidrios bioactivos, particularmente el 45S5 Bioglass® de estimular la angiogénesis, a través de sus productos de disolución iónica.

**Palabras clave:** angiogénesis \* vidrios bioactivos \* bioglass \* reparación y regeneración de tejidos \* ingeniería de tejidos

## Summary

*Angiogenesis is complex multi-step process that involves endothelial cell activation, dissolution of surrounding basement membrane, increased endothelial cell proliferation and migration, tube formation to form a vascular network. Recent attempts to stimulate angiogenesis have focused on the delivery of growth factors and cytokines, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF), gene therapy and cells-based therapy. However the growth factors are expensive and the optimal delivery strategies are unclear. Therefore use others easier and cheaper strategies to induce angiogenesis could provide and alternative approach to the use of expensive growth factor for stimulating neovascularization of wound repair. While the bioactive glasses have been extensively investigated for bone repair and regeneration, there has been relatively little research on the application of bioactive glass to highly vascularized soft tissues repair and particularly, the effect on the neovascularization. However, there is emerging evidence in the literature that the use of bioactive glasses in biomaterial-based tissue engineering strategies may improve the vascularization, it is the major limitation of tissue engineer-*

*ing approaches for the replacement of diseased or damaged tissue. This article, in the first part, reviews the bioactivity characteristics of silicate bioactive glasses. In the second part, discusses the evidences in the literature showing the angiogenic potential of bioactive glasses ionic dissolution products, focusing on 45S5 bioglass®.*

**Key words:** *angiogenesis \* bioactive glasses \* bioglass \* wound repair and tissue engineering*

### Resumo

*A angiogênese é um processo complexo caracterizado por uma cascata de eventos que levam à ativação, proliferação e migração de células endoteliais e à remodelagem e estabilização do tecido vascular. Recentes tentativas por estimular angiogênese têm se focado na entrega de fatores de crescimentos tais como o fator de crescimento endotelial (VEGF) e o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), terapia gênica e terapia baseada em células, mas estes procedimentos são caros e os mecanismos de entrega ótimos são ainda pouco compreendidos, portanto, poder contar com estratégias mais simples e menos custosas para induzir angiogênese, representariam uma muito boa alternativa ao uso de fatores de crescimentos custosos para estimular a neovascularização num tecido em reparação. Os vidros bioativos têm sido amplamente pesquisados para a regeneração de tecido ósseo, entretanto tem havido pouca pesquisa na aplicação dos vidros bioativos para reparar tecidos moles altamente vascularizados e particularmente, a influência que têm sobre a neovascularização. Entretanto recentes trabalhos têm mostrado a habilidade dos vidros bioativos para promover angiogênese o qual é crítico para numerosas aplicações na reparação de ferida e em estratégias para a engenharia de tecidos. Este artigo, na primeira parte; apresenta uma visão geral dos vidros bioativos fazendo ênfase nas características que determinam a bioatividade dos vidros de silicato bioativos e, na segunda parte, revisa a evidência existente na bibliografia sobre estudos que têm demonstrado o potencial dos vidros bioativos, particularmente o 45S5 Bioglass® de estimular a angiogênese, através de seus produtos de dissolução iônica.*

**Palavras chave:** *angiogênese \* vidros bioativos \* bioglass \* reparação e regeneração de tecidos \* engenharia de tecidos*

### Biomateriales

Los biomateriales son materiales sintéticos o naturales modificados que tienen la habilidad de coexistir en contacto con tejidos del cuerpo humano sin causar ningún grado de daño al cuerpo (1). Los biomateriales han sido categorizados, según el comportamiento biológico desencadenado por los mismos, en: biomateriales de primera, segunda y tercera generación. Los materiales de primera generación han demostrado un comportamiento bioinerte (no-bioactivo), mientras que los de segunda y tercera generación poseen propiedades bioactivas (2). La nueva generación de materiales bioactivos,

denominada tercera generación, comprende a todos aquellos materiales biorreabsorbibles y/o biodegradables que tienen la capacidad de estimular respuestas celulares específicas a nivel molecular como resultado de la liberación de iones a partir de los mismos (3).

### Vidrios Bioactivos

Un material bioactivo ha sido definido como un material que ha sido diseñado para inducir un respuesta biológica específica (4). La característica común que comparten todos los materiales bioactivos es una modificación cinética, dependiente del tiempo que ocurre bajo implantación (5). La superficie forma una capa de hidroxycarbonatoapatita (HCA) biológicamente activa que provee la interfase de unión con los tejidos. La HCA que se forma sobre el implante bioactivo es estructural y químicamente equivalente a la fase mineral del hueso (5). La habilidad de un material de precipitar sobre su superficie una capa de HCA cuando es sumergido en un fluido fisiológico simulado *in vitro*, es a menudo tomado como un indicador de bioactividad (6), pero este concepto esta siendo cuestionado debido a la creciente evidencia de que no siempre la bioactividad observada *in vitro*, implique estrictamente una bioactividad *in vivo* (4). La unión al tejido óseo fue primero demostrado para ciertos rangos de composición de vidrios bioactivos que contenían SiO<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>O, CaO y P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en proporciones específicas, estos presentaban tres características composicionales claves que los distinguían de los vidrios tradicionales: [1] menos del 60% de SiO<sub>2</sub>, [2] alto contenido de Na<sub>2</sub>O y CaO y (3) alta relación CaO/P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Estas características composicionales hacen a la superficie del material altamente reactiva cuando es expuesta a medios acuosos (5).

### Vidrios de Silicato Bioactivos

Desde su descubrimiento hace aproximadamente 40 años, el vidrio de silicato bioactivo 45S5 Bioglass (composición en %; 45% SiO<sub>2</sub>, 24,5% Na<sub>2</sub>O, 24,5% CaO, y 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) ha sido el más ampliamente investigado para aplicaciones biomédicas (4). Este material inorgánico provee un medioambiente ideal para la colonización, proliferación y diferenciación de osteoblastos para formar hueso nuevo exhibiendo, una unión mecánicamente fuerte a la superficie del implante. Por otro lado, las reacciones sobre la superficie del vidrio bioactivo induce la liberación de concentraciones críticas de iones solubles, por ejemplo, Si, Ca y P, los cuales han mostrado favorecer respuestas intacelulares y extracelulares que promueven una respuesta rápida de formación de hueso (7), genéticamente controlada, por la sobrerregulación de genes que participan en la

proliferación de osteoblastos (8-10). Si bien los vidrios bioactivos, particularmente el 45S5, han sido ampliamente investigados para la regeneración y reparación de hueso, hay relativamente pocos estudios respecto a la aplicación de los vidrios bioactivos para reparar o regenerar tejidos blandos. Sin embargo, recientes trabajos han mostrado la habilidad de los vidrios bioactivos de promover angiogénesis *in vitro* (11-13), lo cual es un obstáculo cuando se precisa establecer un sistema vascular maduro en un tejido en regeneración. Recientes intentos por estimular angiogénesis se han enfocado en la entrega de factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), terapia génica y terapia basada en células (13), pero estos procedimientos son caros y los mecanismos de entrega óptimos son aun poco comprendidos. Por lo tanto la habilidad de un vidrio bioactivo para inducir angiogénesis podría proveer una buena alternativa al uso de factores de crecimiento caros, para estimular la neovascularización de un tejido en reparación (4).

### Vidrios de boro-silicatos bioactivos

Nuevos vidrios bioactivos basados en el 45S5 Bioglass®, han sido desarrollados, reemplazando completamente el SiO<sub>2</sub> en el 45S5 por B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (generando un vidrio de boro bioactivo), reemplazando parcialmente el SiO<sub>2</sub> por B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> en el vidrio 45S5 o simplemente agregando a la fórmula 45S5 ciertas concentraciones de B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (produciendo vidrios de borosilicato bioactivos) (14) (15). Estos vidrios bioactivos debido a su baja durabilidad química se degradan más rápido y se convierten más completamente en un material similar a la HCA en un medio fisiológico cuando son comparados con el 45S5. Por lo tanto, la fácil fabricación, la posibilidad de controlar la tasa de degradación de estos vidrios variando la concertación de B y por otro lado, ya que ha sido bien establecido que el boro desempeñaría funciones en la angiogénesis y la reparación tisular (16-18), estas características lo hacen especialmente útil para aplicaciones en ingeniería de tejidos (4). Si bien se puede establecer que la bioactividad de los vidrios 45S5 Bioglass® dopados con Boro ha sido bien documentada, los datos existentes con respecto a los efectos biológicos son escasos y controversiales por lo que son necesarios más estudios tanto, *in vitro* como *in vivo* para poder clarificar esta cuestión.

### Productos de Disolución Iónica IDPs

Por mucho tiempo se asumió que la formación de una capa de HCA superficial era el requerimiento crítico para la bioactividad de un material. Sin embargo,

hoy se sabe que la formación de HCA es útil, pero no es un fenómeno crítico para determinar la bioactividad (19). Nueva evidencia científica indica que los productos de disolución de los vidrios bioactivos son la clave para comprender el comportamiento bioactivo de un vidrio tanto *in vitro* como *in vivo* (20). La liberación de iones a partir de un vidrio bioactivo, se da como resultado de una secuencia de reacciones químicas que se llevan a cabo en la superficie del material bioactivo, que en última instancia llevan a la precipitación de una capa de HCA policristalina (5). Resumidamente, cuando el vidrio bioactivo toma contacto con un fluido fisiológico del cuerpo o simulado se produce una rápida reacción de intercambio iónico de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> desde el material con H<sup>+</sup> (o H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>) desde la solución llevando a la formación de grupos silanoles (Si-OH) sobre la superficie del vidrio. Esta etapa eleva el pH de la solución lo que genera el ataque de SiO<sub>2</sub> liberándose el Si en forma de ácido silícico Si(OH)<sub>4</sub>. La continua liberación Si(OH)<sub>4</sub> y formación de Si-OH, lleva a la condensación y polimerización de una capa rica en SiO<sub>2</sub> en el material carente de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>. La disolución del material continúa, y ahora acoplado al intercambio iónico de Ca<sup>2+</sup> y (PO<sub>4</sub>)<sup>3-</sup> entre el vidrio y la solución se forma una capa de fosfato de calcio amorfa (ACP) sobre la capa rica en SiO<sub>2</sub>. Esta capa altamente reactiva, una vez formada, incorpora (OH)<sup>-</sup> y (CO<sub>3</sub>)<sup>-</sup> desde la solución cristalizando como una capa de HCA policristalina. Como implante y en contacto con fluidos fisiológicos del cuerpo y luego de formada la capa de HCA, sobre el vidrio se genera una superficie de reacción que incrementa la adsorción y desorción de factores de crecimiento y el periodo de tiempo de permanencia de macrófagos en la zona tratada que son requeridos para preparar el sitio de implante para la reparación tisular, el proceso de unión del vidrio con el tejido y la posterior diferenciación y proliferación de las células involucradas en la regeneración del tejido. La mineralización de la matriz que le sigue a la maduración de osteocitos luego que se encapsulan en una matriz de HCA-colágeno es el producto final observado *in vivo* cuando el tejido en cuestión es el tejido óseo (4) (19).

### Mecanismos de acción de los productos de disolución iónica

Como se expuso anteriormente, el fenómeno clave de bioactividad de los vidrios bioactivos y en particular el Bioglass®, era la tasa controlada de liberación de iones, especialmente concentraciones críticas de Si, Ca, P y Na (19). La subsecuente liberación de estos iones luego de la exposición de los vidrios bioactivos a un ambiente fisiológico incrementaría la bioactividad de estos materiales y serían los responsables de la respuesta bio-

lógica observada hasta ahora. Con respecto a la osteogénesis ya ha sido bien establecido, con estudios *in vitro* e *in vivo*, el potencial osteogénico del Bioglass® (5) (19). Si bien aún no está muy claro el mecanismo de acción a nivel molecular de los IDPs se cree que estos actuarían regulando la expresión génica de ciertas moléculas relevantes, que intervienen en los procesos de control del ciclo celular de osteoblastos y en la proliferación y diferenciación, promoviendo además, la producción de componentes de la matriz ósea (8) (9) posiblemente a través de señales celulares que involucrarían las vías de señalización de las MAP Kinasas (10). La bibliografía actual sobre el efecto de los vidrios sobre el proceso angiogénico es escasa y la mayoría de los estudios fueron realizados en modelos *in vitro* de cultivo de células relevantes en contacto directo con el material. Hoppe (20) postula, basado en la bibliografía, que los IDPs actuarían estimulando la secreción de factores de crecimiento angiogénicos desde los fibroblastos como el VEGF y bFGF lo que llevaría a un incremento en la proliferación, diferenciación y migración de células endoteliales generando una red de túbulos de células endoteliales conectadas. Hasta ahora se ha postulado, basado en la bibliografía existente, que los vidrios bioactivos estimularían la proliferación de células endoteliales, pero estos trabajos son escasos y fueron basados en la respuesta observada de células endoteliales humanas en contacto directo con el material (7). Por lo tanto, son necesarios más trabajos futuros que analicen la respuesta angiogénica, tanto *in vitro* como *in vivo*, a los productos de disolución iónica de los vidrios bioactivos.

#### Referencias bibliográficas

- Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008; 29:2941-53.
- Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science* 2002; 295(5557): 1014-7.
- Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006; 27(18): 3413-31.
- Rahaman MN, Day DE, Sonny Bal B, Fu Q, Jung SB, Bonewald LF, *et al.* Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomater* 2011; 6: 2355-73.
- Hench LL. Bioceramics: From concept to clinic. *J Am Ceram Soc* 1991; 74(7): 1487-510.
- Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce *in vivo* surface-structure changes in bioactive glass-ceramic. *J Biomed Mater Res* 1990; 24: 721-34.
- Gorustovich AA, Roether JA, Boccaccini AR. Effect of bioactive glasses on angiogenesis: A review of *in vitro* and *in vivo* evidence. *Tissue Eng* 2010; 16(2): 199-207.
- Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LDK, Hench LL, Polak JM. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblast and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276(2): 461-5.
- Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LDK, Hench LL, Polak JM. Gene expression profiling of human osteoblast following treatment with the ionic products of Bioglass® 45S5 dissolution. *J Biomed Mater Res* 2001; 55(2): 151-7.
- Au AY, Au RY, Demko JL, McLaughlin RM, Eves BE, Frondoza CG. Consil® bioactive glass particles enhance osteoblast proliferation and selectively modulate cell signaling pathways *in vitro*. *J Biomed Mater Res* 2010; 86(3): 678-84.
- Day RM. Bioactive glass stimulates the secretion of angiogenic growth factors and angiogenesis *in vitro*. *Tissue Eng* 2005; 11(5/6):768-77.
- Leach JK, Kaigler D, Wang Z, Krebsbach PH, Mooney DJ. Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration. *Biomaterials* 2006; 27(17): 3249-55.
- Leu A, Leach JK. Proangiogenic potential of collagen bioactive glass substrate. *Pharm Res* 2008; 25(5): 1222-9.
- Yao A, Wang DP, Huang W, Rahaman MN, Day DE. *In vitro* bioactive characteristics of borate-based glasses with controllable degradation behavior. *J Am Ceram Soc* 2007; 90: 303-6.
- Huang W, Day DE, Kittiratanapiboon K, Rahaman MN. Kinetics and mechanisms of conversion of silicate (45S5), borate, and borosilicate glass to hydroxyapatite in dilute phosphate solution. *J Mater Sci Med* 2006; 17: 583-96.
- Benderdour M, Bui-Van T, Dicko A, Belleville F. *In vivo* and *in vitro* effects of boron and boranated compounds. *J Trace Elem Med Biol* 1998; 12(1): 2-7.
- Mayap Nzietchueng R, Dousset B, Franck P, Benderdour M, Nabet P, Hess K. Mechanisms implicated in the effects of boron on wound healing. *Trace Elem Med Biol* 2002; 16: 239-44.
- Gorustovich AA, Steimetz T, Nielsen FH, Guglielmotti MB. Histomorphometric study of alveolar bone healing in rats fed a boron-deficient diet. *Anat Rec* 2008; 291(4): 441-7.
- Hench LL. The story of Bioglass®. *J Mater Sci: Mater Med* 2006; 17: 967-78.
- Hoppe A, Guldal NS, Boccaccini AR. A review of biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* 2011; 32: 2757-74.