



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Estudio in vitro de la formulación de la matriz
ósea desmineralizada sobre la diferenciación
osteogénica de las células musculares C2C12.**

Margalida Maria Cladera Amer

Grado de Bioquímica

Año académico 2015-16

DNI del alumno: 41574155E

Trabajo tutelado por Marta Monjo Cabrer
Departamento de Biología Fundamental i Ciencias de la Salud

| | | | | |
|---|-------|----|-------|----|
| Se autoriza la Universidad en incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta y acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación. | Autor | | Tutor | |
| | Sí | No | Sí | No |
| | | X | | X |

Palabras clave del trabajo:

Matriz ósea desmineralizada, inducción osteogénica, metacrilato de gelatina, ácido hialurónico, glicerol, fosfatasa alcalina, células musculares C2C12, BMP2.

Índice

| | |
|--|----|
| 1. Abreviaturas | 3 |
| 2. Resumen | 4 |
| 3. Abstract..... | 5 |
| 4. Introducción..... | 6 |
| 5. Objetivos y planteamiento experimental..... | 11 |
| 6. Materiales y métodos..... | 12 |
| 6.1. Preparación de la DBM..... | 12 |
| 6.2. Preparación de los excipientes y formulación de la DBM..... | 12 |
| 6.3. Cultivo celular..... | 13 |
| 6.4. Cuantificación de la BMP-2..... | 13 |
| 6.5. Viabilidad celular..... | 14 |
| 6.6. Actividad fosfatasa alcalina..... | 14 |
| 6.7. Análisis estadístico..... | 15 |
| 7. Resultados y discusión..... | 16 |
| 8. Conclusiones..... | 24 |
| 9. Bibliografía..... | 25 |

1. Abreviaturas

DBM: matriz ósea desmineralizada.

BMP: proteína morfogenética ósea.

ALP: fosfatasa alcalina.

LDH: lactato deshidrogenasa.

PBS: tampón fosfato salino.

GelMA: metacrililo de gelatina.

Gly: glicerol

A.H.: ácido hialurónico.

2. Resumen

La matriz ósea desmineralizada (DBM) es un aloinjerto óseo con propiedades osteoinductoras muy utilizado para promover la formación de nuevo hueso. Este potencial osteoinductivo es debido a las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) que contiene, y a otras moléculas como miembros de la familia TGF- β o la metaloproteasa de la matriz MMP2. La DBM se obtiene a partir del hueso cortical del fémur de donantes, tras la molienda, lavado y desmineralización. Para su aplicación, es necesario formular la DBM con un excipiente que, además de facilitar su manipulación e implementación, potencie su actividad osteoinductora. En este estudio, se han evaluado tres excipientes (glicerol, ácido hialurónico y metacrilato de gelatina (GelMA)) para formular la DBM y se ha investigado su efecto sobre la diferenciación osteogénica de la línea de células musculares C2C12. Todas las muestras de DBM de los donantes analizados indujeron la actividad ALP en células musculares, indicativo de la diferenciación osteogénica. Además, los extractos proteicos de las DBM analizados mostraron niveles cuantificables de BMP2. De los excipientes investigados, ninguno resultó tóxico para las células C2C12 y el GelMA fue el excipiente que mostró una mayor inducción de la actividad ALP en estas células, cuando se formularon a una concentración de DBM al 30%. Esta concentración es la que mostró una mejor consistencia y maleabilidad. En conclusión, el GelMA es un excipiente que podría ser usado para la formulación de la DBM y su aplicación clínica en humanos.

3. Abstract

The demineralized bone matrix (DBM) is a bone allograft with osteoinductive properties widely used to promote the formation of new bone. This osteoinductive potential is due to the presence of bone morphogenetic proteins (BMP) and other proteins like members of the TGF- β family or the matrix metalloproteinase MMP2. DBM is obtained from human femoral cortical bone, after grinding, washing and demineralization. For its application, it is necessary to formulate the DBM with an excipient that, in addition to facilitating handling and implementation, it also enhances its osteoinductive activity. In this study, we evaluated three excipients (glycerol, hyaluronic acid and gelatin methacryloyl (GelMA)) to formulate the DBM and we have investigated its effect on osteogenic differentiation of the C2C12 muscle cell line. All of the DBM donor samples that were analyzed induced the ALP activity in muscle cells, indicative of osteogenic differentiation. In addition, the protein extracts of DBM showed measurable levels of BMP2. Of the excipients tested, none were toxic to C2C12 cells and the GelMA was the excipient that showed a greater induction of ALP activity in these cells when formulated at a concentration of 30% DBM. This concentration was the one that showed better consistency and malleability. In conclusion, the GelMA is an excipient that could be used to formulate the DBM for its clinical application in humans.

4. Introducción

El hueso está formado por una matriz extracelular, células y agua, como cualquier otro tejido conectivo. La matriz extracelular ósea está compuesta por materia orgánica (~35%) e inorgánica (~65%). La parte orgánica se compone principalmente de colágeno (90%), que aporta flexibilidad y resistencia a la tracción al hueso, y proteínas no colagenosas (10%), entre las que predominan la sialoproteína del hueso, la osteocalcina y la osteonectina. Las proteínas no colagenosas tienen funciones importantes como la modulación de la calcificación y la reparación del tejido óseo, la adhesión celular y el enlace de factores de crecimiento. La parte mineral está formada principalmente por cristales de hidroxapatita carbonatada, un fosfato cálcico cristalino de fórmula molecular $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$. Los cristales de hidroxapatita se encuentran localizados entre las fibras de colágeno.

El hueso es un tejido dinámico que sufre un proceso continuo de formación y resorción, conocido como remodelación ósea. La remodelación ósea tiene lugar en distintos sitios del cuerpo donde el hueso se encuentra en crecimiento, sufre tensiones mecánicas, o donde se han producido micro-fracturas o pequeñas roturas. Sin embargo, cuando existen fracturas traumáticas, o defectos patológicos (diabetes, osteoporosis...) el tejido óseo no se regenera correctamente por lo que es necesario el uso de estrategias que ayuden a recuperar la arquitectura y las funciones del tejido dañado¹.

De entre estas estrategias, actualmente se acepta que el mejor material para sustituir al tejido óseo es el propio hueso, al ser un material biocompatible. Aunque el hueso autólogo está considerado como el estándar "oro", fundamentalmente debido a sus propiedades osteoconductoras y osteoinductivas, no siempre es posible obtener hueso del mismo paciente, siendo además una técnica no exenta de morbilidad que muchas veces incomoda más al paciente que la patología original. Es por ello que la utilización en múltiples aplicaciones de cirugía traumatológica y ortopédica, cirugía máxilo-facial y neurocirugía, de aloinjertos óseos suministrados por los Bancos de

Tejidos a partir de donaciones altruistas ha experimentado un gran aumento en los últimos años.

Todas las presentaciones de aloinjerto óseo mantienen la capacidad osteoconductora pero únicamente los aloinjertos desmineralizados, y en menor medida los congelados, conservan además propiedades osteoinductoras^{2,3}. El aloinjerto óseo desmineralizado más ampliamente utilizado es la matriz ósea desmineralizada (DBM). Cabe destacar que los aloinjertos son injertos óseos o de parte del hueso extraídos de individuos de la misma especie que pueden ofrecer distintas capacidades biológicas como son la osteogénesis, osteoconducción y la osteoinducción. La osteogénesis es la capacidad que tiene el injerto de producir hueso nuevo a partir de células vivas que contiene el mismo. La osteoconducción es la capacidad del injerto de servir como molde para que el hueso pueda regenerarse. Finalmente, la osteoinducción es la habilidad del injerto de producir hueso nuevo a partir de células madre mesenquimales⁴.

La DBM se prepara a partir de hueso cortical eliminando los minerales y manteniendo activos los factores de crecimiento osteoinductivos del hueso, el colágeno y otros componentes orgánicos. Así, contiene los complejos de proteínas necesarias para la inducción ósea utilizada sola o en combinación con otros biomateriales para la reconstrucción de defectos óseos.

Para elaborar la DBM, en primer lugar se tiene que separar el hueso del donante de los tejidos blandos que lo rodean y eliminar la sangre y los lípidos. A continuación se sumerge en una solución con antibiótico para, posteriormente someter al hueso ya limpiado a un proceso de desmineralización con ácido clorhídrico 0.5-0.6 M seguido de una fase de liofilización. Tras esta fase, el polvo obtenido se puede formular en pastas o masillas para su uso⁵.

Un punto conflictivo en la preparación de la DBM es el tamaño de partícula óptimo. Se sugiere que partículas de menos de 250 micras no son tan osteoinductivas como partículas de mayor tamaño. Hay estudios que avalan que partículas de DBM de

entre 550 y 710 micras de tamaño son las que presentan un mayor potencial osteoinductivo, que disminuye a medida que el tamaño de partícula se reduce⁶.

La DBM es ampliamente investigada como material para promover la formación de hueso nuevo. Muchos estudios demuestran que contiene proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) que son importantes reguladores para la formación de hueso. Se postula que el potencial osteoinductivo de la DBM es atribuible a la disponibilidad de BMPs presentes. El papel osteoinductivo de las BMPs es multifacético. Pueden funcionar como factores quimiotácticos, que inician el reclutamiento de células progenitoras, como el crecimiento de factores estimulantes de la proliferación de células madre mesenquimales y como factores de diferenciación para promover la maduración de estas células en condrocitos, osteoblastos y osteocitos⁷. Entre la amplia familia de BMPs, la BMP4 es una de las más osteoinductivas que han sido investigadas para su uso en aplicaciones clínicas pero otras como la BMP2 y la BMP7 también están presentes en extractos de DBM y juegan un papel importante en la osteoinducción^{8,9}. Por ejemplo, la BMP7 es capaz de restaurar defectos óseos⁷. Por otra parte, la BMP2 inhibe la diferenciación miogénica de las células y la deriva hacia el linaje osteoblástico¹⁰. Cabe destacar que los niveles de BMPs necesarios para producir efectos en los cultivos de mioblastos son relativamente altos. Esto no es sorprendente ya que en los mioblastos C2C12 se necesitan entre 100 y 300 ng/ml para estimular la producción de osteocalcina y la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP).

Otros factores, como miembros de la familia TGF- β tienen un efecto sobre el crecimiento y la diferenciación de una variedad de células y juegan un papel importante en la formación de hueso y en su reparación. El TGF- β puede inducir o inhibir la formación de hueso nuevo dependiendo de la concentración, la densidad celular o el estado de diferenciación en el que se encuentran los osteoblastos e inducen la expresión de marcadores como la ALP¹¹.

La metaloproteasa de la matriz MMP2 también conocida como gelatinasa A tiene una actividad centrada en la destrucción del colágeno, cualidad positiva para la osteoinducción ya que facilita la angiogénesis del nuevo hueso en formación, la

liberación de factores como TGF- β y el reclutamiento de células mesenquimales de la médula ósea¹².

Para realizar estudios in vitro y corroborar los efectos osteogénicos de la DBM se suele utilizar como marcador temprano de la diferenciación de células osteogénicas la actividad ALP. Las células osteoblásticas normalmente expresan tres veces más actividad ALP que cultivos similares con células fibroblásticas, aunque estas últimas doblan su actividad ALP en presencia de DBM debido a la capacidad de ésta de diferenciarlas en células similares a los osteoblastos. También se ha demostrado un aumento de la actividad ALP incubando con BMPs ya que éstas también tienen la capacidad de diferenciar los fibroblastos en células osteoblásticas⁹.

Se ha comprobado que hay una correlación entre los resultados obtenidos in vivo midiendo el contenido de calcio tras la implantación de la DBM con la actividad ALP de las células expuestas a DBM en el estudio in vitro. Así, si la DBM induce bajos niveles de formación de hueso nuevo (remineralización) en el ensayo in vivo, también induce bajos niveles de actividad ALP en el ensayo in vitro. En cambio, si la DBM induce altos niveles de formación de hueso nuevo en el estudio in vivo, también induce altos niveles de actividad ALP en el ensayo in vitro¹³.

Para realizar estudios in vivo y para su aplicación clínica, la DBM en polvo es difícil de utilizar y para ello se utiliza en combinación con otros materiales para así facilitar su manipulación, preparación y aplicación en el defecto óseo. El formato más utilizado es la masilla moldeable que puede ser colocada en los defectos óseos. Hay una gran variedad de excipientes que se han utilizado para formular DBM. Diferentes casas comerciales optan por sustancias diferentes. Por ejemplo, el Grafton Putty® se combina con glicerol, el DBX Putty® se combina con hialuronato cálcico y el Allomatrix Putty® se combina con hemihidrato de sulfato de calcio y carboximetilcelulosa^{14,15}.

En el presente trabajo se ha evaluado la actividad osteogénica de la DBM formulada 3 excipientes diferentes: glicerol, ácido hialurónico y metacrilato de

gelatina (GelMA) que tienen propiedades que a priori parecen adecuadas para ser utilizados como excipientes.

El **glicerol** es usado en algunas formas comerciales de DBM, como el Grafton®. Se trata de una molécula de bajo peso molecular muy soluble en agua. El glicerol experimenta una marcada reducción de su viscosidad cuando la temperatura se eleva desde la temperatura ambiente (25 °C) hasta la temperatura del tejido del paciente, que suele rondar los 37 °C. Así, la combinación de su alta solubilidad en agua y reducida viscosidad en el tejido hace que el aloinjerto fluya inmediatamente después de su colocación en la fractura ósea. La concentración de glicerol a la cual formular la DBM es un misterio ya que las casas comerciales no proporcionan dicha información, pero se ha demostrado su eficacia al ser formulaciones ya comercializadas y usadas en el ámbito clínico.

El **ácido hialurónico** es un glucosaminoglucano de alto peso molecular encontrado en la matriz extracelular de los tejidos conectivos y presente en los sitios de lesión de muchos tejidos. Se trata de un compuesto biocompatible, bioabsorbible y no resulta tóxico ni inmunogénico. Su composición química es óptima para su utilización en muchas aplicaciones médicas como portador de productos biológicos. La DBM formulada con ácido hialurónico mantiene sus propiedades, pero la adición del excipiente supone una reducción de la cantidad de DBM por unidad de volumen que podría tener un impacto en la osteoinductividad del aloinjerto¹⁶.

El **GelMA** es un hidrogel de metacrilamida de gelatina fotopolimerizable que contiene los componentes de matriz extracelular modificados, ya que la gelatina es un material hecho de colágeno desnaturalizado que contiene proteínas de unión celular y metaloproteinasas de matriz¹⁷, por lo que es un material muy atractivo para aplicaciones de ingeniería de tejidos¹⁸. Se trata de un hidrogel estable a 37 °C con una viabilidad celular a largo plazo que permite la migración de las células y la remodelación del tejido recién formado¹⁹.

5. Objetivos y planteamiento experimental

El objetivo general del proyecto en el que se enmarca este Trabajo Fin de Grado es el desarrollo de una metodología sencilla que permita la obtención de DBM en un banco de tejidos convencional y su formulación con un excipiente que, además de facilitar su manipulación e implantación, potencie su actividad osteoinductora.

El objetivo específico del trabajo ha sido determinar las condiciones óptimas de formulación de la DBM para obtener la consistencia apropiada (gel, pasta maleable) que facilite su manipulación y estudiar *in vitro* el efecto de dichas formulaciones, analizando el efecto sobre la inducción de la diferenciación osteogénica en la línea celular de mioblastos de ratón C2C12.

Para cumplir con los objetivos planteados, en primer lugar se ha estudiado la DBM de distintos donantes para comprobar que inducen la diferenciación osteogénica de las células musculares y ver si son óptimas para ser usadas en la investigación, así como cuantificar los niveles de proteína BMP2 en los extractos proteicos de la DBM, ya que se ha comprobado que ésta induce la diferenciación osteogénica de células musculares.

A continuación, se ha formulado la DBM con los tres excipientes elegidos. En primer lugar, se han estudiado diferentes concentraciones con la que formular la DBM teniendo en cuenta la inducción osteogénica y la consistencia y aspecto de la pasta. Una vez elegida la mejor concentración, se han estudiado los distintos excipientes con el fin de seleccionar el mejor, el que sea capaz de potenciar las propiedades osteoinductoras de la DBM y que la haga apta para su uso clínico.

6. Materiales y métodos

6.1. Preparación de la DBM.

La DBM se preparó a partir de hueso cortical de fémur de diferentes donantes, después de recibir el consentimiento informado y aprobación ética. Los huesos se obtuvieron a partir de donantes vivos según los protocolos vigentes en el Banco de Tejidos y que se ajustan a los estándares de la Asociación Española de Bancos de Tejidos. Una vez recogidos en quirófano en condiciones asépticas, los huesos fueron congelados a -80 °C sin manipulación previa. Posteriormente fueron fragmentados, molidos y tamizados, con el fin de conseguir un tamaño de partícula entre 250 y 800 µm. Una vez obtenido el polvo de cortical, éste se sometió a un lavado con PBS, etanol 70%, etanol absoluto y PBS (Biowest, Nuaille, France), para el tratamiento desengrasante de la muestra. A continuación, se desmineralizó con HCl 0,5N (Sigma, St. Louis, MO, USA) mediante 3 lavados de una hora cada uno. Posteriormente, se lavó exhaustivamente con agua MilliQ cada muestra, añadiendo 50 ml de agua MilliQ a cada muestra unas 8-9 veces. Por último, se liofilizó cada muestra para eliminar toda el agua retenida.

6.2. Preparación de los excipientes y formulación de la DBM.

Para las formulaciones se utilizó glicerol (Sigma, St. Louis, MO, USA) previamente autoclavado y ácido hialurónico (Bioibérica, Barcelona, Spain) al 2% peso/peso con PBS dejando en agitación 24 horas antes de la utilización.

El GelMA se sintetizó disolviendo 10 gramos de gelatina en polvo (Sigma, St. Louis, MO, USA) en 100 ml de tampón de fosfato salino de Dulbecco (DPBS) (Biowest, Nuaille, France) a 50 °C añadiendo lentamente 1ml de metacrilato anhídrido (Sigma, St. Louis, MO, USA). La mezcla se mantuvo en agitación durante 3 horas a 50 °C. A continuación, la solución se dializó con agua destilada, que se cambiaba dos veces al día, con tubos de diálisis de 12-14 kDa incubados a 37 °C. La solución final se liofilizó hasta un peso constante y se guardó a -80 °C hasta su uso²⁰.

Para realizar los experimentos se utilizó GelMA al 10% con PBS añadiendo a continuación un 0.5% peso/volumen de 2-hidroxi-1-(4-(hidroxietoxi)fenil) -2-metil-1-propanona (I2959) (Sigma, St. Louis, MO, USA) como fotoiniciador. Una vez formulada la pasta, fue expuesta a luz ultravioleta durante 10 segundos para activar la polimerización¹⁸.

Estos excipientes se utilizaron para realizar formulaciones con DBM a diferentes concentraciones de DBM (% p/p) de 0%, 10%, 20%, 30%, 50% y 80% mezclando ambos componentes hasta conseguir una pasta homogénea con la que tratar las células.

6.3. Cultivo celular.

Las línea celular de células musculares C2C12 (ATCC® CRL-1772™, Manassas, VA, USA) se utilizó para los ensayos in vitro. Las células fueron cultivadas rutinariamente a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂ y mantenidas en medio RPMI (Biowest, Nuaille, France) suplementado con un 10% de suero de ternero fetal (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) y 50 IU penicilina/ml y 50µg estreptomicina/ml (Biowest, Nuaille, France). Las células se subcultivaron antes de llegar a la confluencia con PBS y tripsina (Biowest, Nuaille, France). Para realizar los experimentos se utilizaron placas de 24 pocillos con una concentración de 50000 células por pocillo.

Las células fueron tratadas con DBM sola y con DBM formulada con los diferentes excipientes. En el primer caso, se añadió a cada pocillo unos 5 mg de DBM, ya que se ha comprobado que esta cantidad ya induce diferenciación osteogénica. En el caso de las DBM formuladas, se trató las células con 22 mg de pasta por pocillo.

6.4. Cuantificación de la BMP2.

Los extractos proteicos de las DBM de diferentes donantes se analizaron para cuantificar la BMP2 usando un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Para realizar la extracción se utilizó una solución de Guanidina HCl 4M / 50 mM Tris-

HCl/ 10mM EDTA pH=6,9 (Sigma, St. Louis, MO, USA). La extracción se llevó a cabo en una proporción 300 mg de matriz ósea desmineralizada por 5 ml de solución. La mezcla se mantuvo en agitación rotatoria durante 24 horas a 4 °C. Pasado ese tiempo se centrifugaron las muestras, se dializó el sobrenadante frente a PBS y se cuantificó la concentración proteica. Las alícuotas de 50 µl de los extractos proteicos se incubaron durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente y se midió la cantidad de BMP2 según las instrucciones descritas en el kit del fabricante (Quantikine Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

6.5. Viabilidad celular.

La actividad lactato deshidrogenasa (LDH) se utilizó para medir la citotoxicidad de las diferentes formulaciones de la DBM. Después de 48 horas de incubación de las células C2C12 con las formulaciones de DBM se recogió el medio de cultivo, se centrifugó a 250 g durante 5 min a 4 °C y el sobrenadante se almacenó a 4 °C hasta el momento de realizar la medición. La actividad LDH se determinó espectrofotométricamente con las instrucciones del kit (Cytotoxicity Detection kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Los resultados se representan respecto a células incubadas solo con medio de cultivo (0% de toxicidad) y respecto a células incubadas con medio de cultivo con Tritón X-100 al 1% (100% de toxicidad) (Sigma, St. Louis, MO, USA).

6.6. Actividad fosfatasa alcalina (ALP).

La actividad ALP se utilizó como marcador de diferenciación de las células musculares C2C12 hacia el linaje osteogénico.

Después de 48 horas de incubación de las células con las formulaciones de DBM, se eliminó el medio de cultivo de los pocillos y se añadió 100 µl de PBS tritón X-100 al 0.1 % para conseguir el lisado de las células. A continuación, las muestras fueron sometidas a dos ciclos de congelación (en nitrógeno líquido) y descongelación (en un baño a 37 °C) y posteriormente fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 5 minutos

a 4 °C. A continuación, se cogió una alícuota de 25 µl de células de cada muestra por duplicado y se le añadió 100µl de p-Nitrofenil Fosfato (PnPP) (Sigma, St. Louis, MO, USA) como sustrato. La reacción se detuvo 30 minutos después de una incubación a 37 °C. La actividad se midió, por la escisión del PnPP que confiere un color amarillo a la muestra, leyendo la absorbancia a 405 nm. En paralelo a las muestras se preparó una curva con fosfatasa alcalina que fue construida mezclando 1µl de ALP (Promega, Madison, WI, USA) con 5 mL de tampón y luego realizando diluciones en serie de 1:5.

6.7. Análisis estadístico.

Todos los datos se presentan como la media de los valores \pm SEM (error estándar de la media). El efecto de los tratamientos se evaluó mediante un análisis ANOVA y las diferencias entre grupos se evaluaron mediante el test de *t de Student*. El análisis estadístico se realizó usando el programa estadístico SPSS para Windows versión 17 (SPSS, Chicago, IL USA). Los resultados se consideraron significativos con un valor de $P \leq 0.05$. Para realizar los gráficos se utilizó el programa GraphPad v 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

7. Resultados y discusión

En estudios previos realizados en el grupo de investigación se había optimizado la técnica de obtención de la DBM, ensayando diferentes condiciones de molienda, lavado y desmineralización; y se había puesto a punto el test in vitro con las células C2C12 para evaluar su actividad osteoinductora mediante la evaluación de la actividad ALP, utilizando DBM comercial.

Durante el desarrollo del presente TFG en primer lugar se comprobó la actividad osteoinductora de DBM obtenida a partir de diferentes donantes y DBM comercial mediante el test in vitro optimizado. Después de un cultivo de 48 horas de las células C2C12 con las diferentes DBM se midió la actividad ALP. En la *figura 1* se pueden observar los resultados obtenidos. Se ve que la DBM de todos los donantes tienen una capacidad de inducción osteogénica similar o mayor que la DBM comercial, dependiendo del donante. De esta forma se puede decir que las DBM analizadas inducen diferenciación osteogénica de las células musculares, por ello, podrían ser utilizadas para seguir adelante con la investigación.

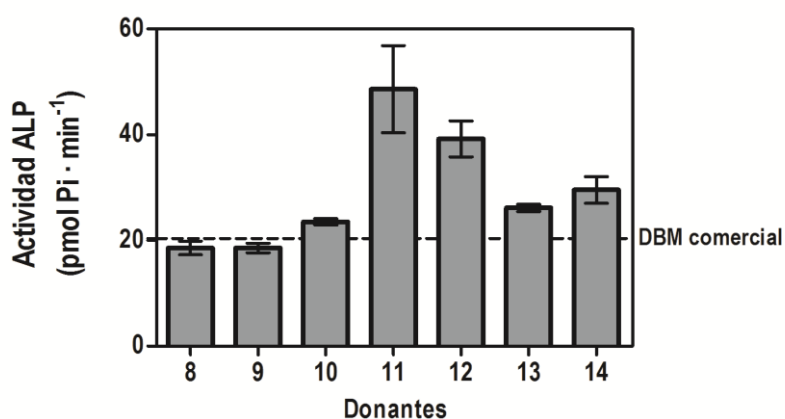


Figura 1. Evaluación de la inducción osteogénica en células C2C12 por DBM. Las células musculares C2C12 se cultivaron según lo descrito en el apartado de Materiales y Métodos y la actividad ALP como marcador de la inducción osteogénica se midió después de 48h de cultivo con DBM, obtenidas de 7 donantes diferentes. El experimento se realizó por cuadruplicado, para cada donante. Los datos representan la media \pm error estándar de la media.

Un estudio de Zang *et al*⁶ ya corroboró que la DBM aumentaba la actividad ALP en células musculares, y por ello, la inducción osteogénica en dichas células. Además, cabe destacar que estudios similares al nuestro llevados a cabo por otros autores ya demostraron la gran variabilidad que existe entre los diferentes donantes²¹. De este modo, los resultados obtenidos en relación a la inducción osteogénica de la DBM son los esperados.

A continuación, se eligieron tres de los donantes para medir el contenido de BMP2 de los distintos extractos de DBM, ya que se sabe que esta proteína le confiere la capacidad de osteoinducción y es crucial para las propiedades de la DBM⁹. La *figura 2* muestra la cantidad de BMP2 por gramo de proteína obtenido para cada uno de los donantes. Puede observarse bastante variabilidad entre ellos, al igual que con la actividad ALP de las diferentes DBM estudiadas anteriormente. Así, se tendría que seguir estudiando la actividad ALP de distintas DBM y ver si existe alguna correlación con la cantidad de BMP2 de la misma¹⁰, ya que posiblemente la cantidad de dicha proteína ayuda a potenciar las propiedades osteoinductoras de la DBM.

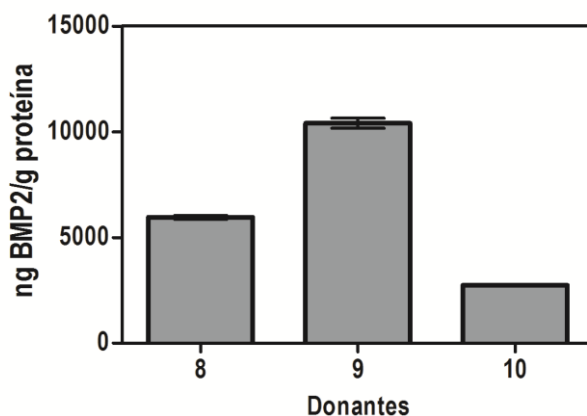


Figura 2. Evaluación de la cantidad de proteína BMP2 por gramo de proteína. Se evaluó la BMP2 de extractos de DBM de tres donantes diferentes y el experimento se realizó por quintuplicado, para cada donante los datos representan la media \pm error estándar de la media.

Un estudio de Willdemann *et al*¹² cuantificó la cantidad de BMP2 de diferentes DBM comerciales obteniendo cantidades de proteína superiores a las obtenidas en

este estudio. Esta diferencia pueden deberse a la calidad de las DBM analizadas, ya que se trata de DBM comerciales aptas para el uso terapéutico y cuyo proceso de obtención se encuentra perfectamente optimizado. Cabe destacar que en esta investigación también se pudo observar la variabilidad entre distintos lotes de DBM comerciales, así como se ha dado en el presente experimento, en el que DBM de diferentes donantes contiene distintas cantidades de BMP2.

Una vez realizados estos estudios se centró la atención en formular la DBM con un excipiente que le confiriera las características óptimas para ser comercializada y utilizada en el ámbito clínico. La DBM es un polvo que necesita ser formulado para obtener la consistencia adecuada, que mantenga o mejore sus propiedades osteoinductoras para su uso terapéutico en humanos. Para ello se diseñaron estudios con glicerol, ácido hialurónico y GelMA con el fin de seleccionar el mejor excipiente y la concentración adecuada con la que formular la DBM.

En primer lugar se formuló la DBM con cada uno de los excipientes a diferentes concentraciones de DBM (% p/p) de 0%, 10%, 20%, 30%, 50% y 80%. Se utilizó un solo donante para poder observar la consistencia de las diferentes pastas y también evaluar la inducción osteogénica de las mismas en las diferentes concentraciones para poder seleccionar la mejor. Como puede verse en la *figura 3*, a medida que aumenta la concentración de DBM, la actividad ALP también se ve incrementada. A pesar de que la inducción de la ALP fue máxima entre un 50-80%, al tener en cuenta la consistencia de la pasta, se eligió la DBM formulada al 30% para continuar con la investigación.

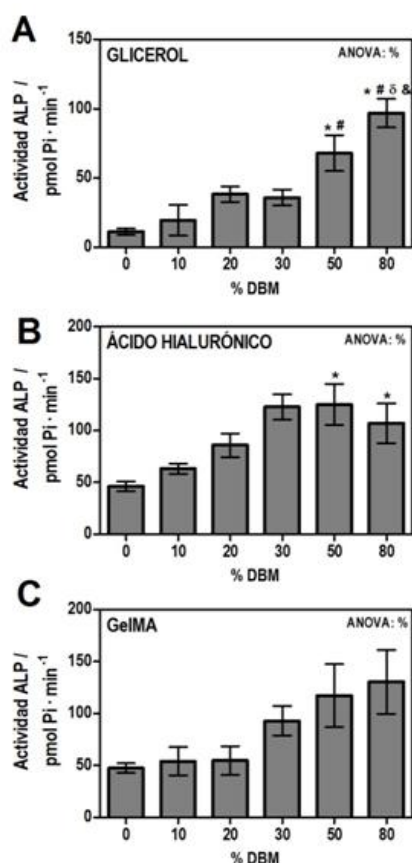


Figura 3. Evaluación de la inducción osteogénica en células C2C12 por DBM formulada con diferentes excipientes. Las células musculares C2C12 se cultivaron según lo descrito en el apartado de Materiales y Métodos y la actividad ALP se midió después de 48h de cultivo con DBM formulada como marcador de la inducción osteogénica. Se utilizaron tres excipientes a diferentes concentraciones (0%, 10%, 20%, 30%, 50% y 80% - DBM/excipiente): glicerol (A), ácido hialurónico (B) y GelMA (C) preparados según lo descrito en el apartado de Materiales y Métodos. Se utilizó un solo donante y los experimentos se realizaron por cuadruplicado, los datos representan la media \pm error estándar de la media. Las diferencias se evaluaron mediante ANOVA de un factor ($p < 0.05$): % indica un efecto del % de DBM en el gel. Test de t-student ($p < 0.05$): *, diferencias significativas vs. 0%; #, diferencias significativas vs. 10%; δ , diferencias significativas vs. 20%; &, diferencias significativas vs. 30%.

Ding *et al*²² realizó una investigación en células madre de las propiedades de la DBM formulada con un excipiente de fibroína de la seda y observó que la expresión de ALP era significativamente mayor a una concentración del 20% de DBM que a concentraciones mayores. Estos resultados se contrastan con los obtenidos en este trabajo en los que a medida que aumenta la concentración de DBM, aumentaba la actividad ALP. Estas variaciones pueden deberse al excipiente utilizado o simplemente que diferentes tipos celulares tengan unas necesidades diferentes para empezar su

diferenciación hacia el linaje osteoblástico. En contraposición y similar a nuestros resultados, otro estudio²¹ demostró que a mayor cantidad de DBM, mayor era la actividad ALP de las células, resultados que concuerdan con este trabajo.

A continuación se realizó un estudio de citotoxicidad para comprobar si alguno de los excipientes utilizados resultaba ser tóxico para las células. Para ello se midió la actividad LDH a partir del medio de cultivo de las células incubadas con cada uno de los excipientes. Para valorar la toxicidad en las células se utilizó un control negativo, células incubadas con medio de cultivo (0% toxicidad) y un control positivo, células incubadas con medio de cultivo con Tritón X-100 al 1%. Éste rompe las membranas celulares liberando la LDH al medio y servirá como valor del 100% de toxicidad. Los resultados obtenidos pueden observarse en la *figura 4A*, en las que se ven diferencias significativas de los excipientes respecto al control negativo, si bien todas presentan valores inferiores al valor máximo permitido (30%) para biomateriales evaluados in vitro según la ISO-10993:5, lo que indica que ningún excipiente sería tóxico para las células. Además, se pueden ver diferencias significativas entre el GelMA respecto al glicerol y al ácido hialurónico, mostrando el GelMA valores de citotoxicidad inferiores a los otros dos excipientes evaluados.

Así, sabiendo que ningún excipiente es tóxico para las células se siguió con la investigación con la finalidad de seleccionar el mejor excipiente y con un mayor número de donantes, al trabajar solo con el porcentaje de DBM al 30%. La *figura 4B* muestra que la DBM formulada al 30% tanto con el glicerol como con el GelMA induce significativamente la actividad ALP respecto al excipiente solo, sin embargo no se encontraron diferencias entre la DBM formulada con ácido hialurónico y su control excipiente. Además, la DBM formulada con GelMA mostró una actividad ALP significativamente superior a la DBM formulada con ácido hialurónico.

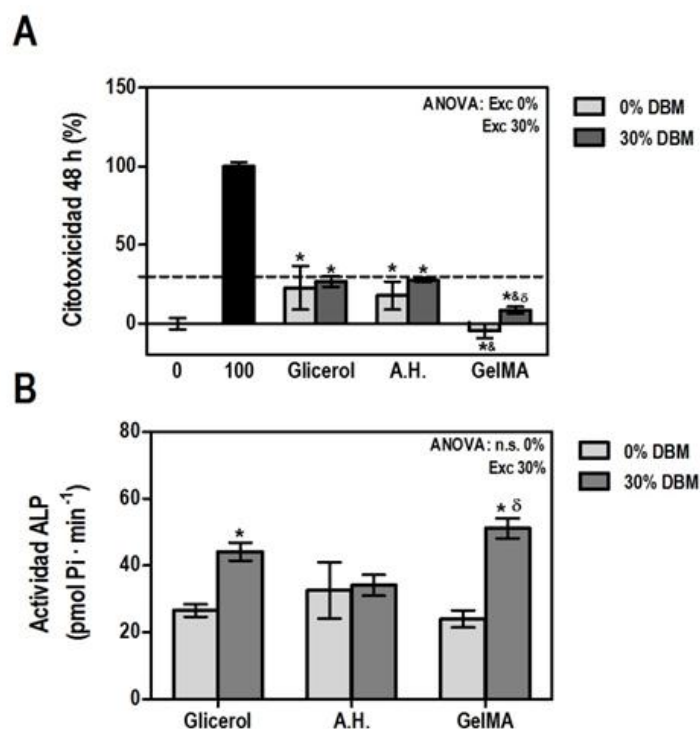


Figura 4. Evaluación de la citotoxicidad y la actividad ALP en células C2C12 incubadas con DBM formulada con diferentes excipientes. Las células C2C12 se cultivaron según lo descrito en el apartado de Materiales y Métodos y la citotoxicidad y la actividad ALP se midieron después de 48h de cultivo con DBM formulada con diferentes excipientes a una concentración del 30% de DBM y de los excipientes sin DBM al 0% de DBM. Se utilizaron siete donantes y los experimentos se realizaron por cuadruplicado, los datos representan la media \pm error estándar de la media. **A:** Actividad LDH medida a partir del medio de cultivo de las células incubadas con DBM formulada con los tres excipientes. El control negativo (0) son células incubadas con medio de cultivo y el control positivo (100) son células incubadas con medio de cultivo suplementado con 1% Tritón X-100. Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante ANOVA de un factor ($p < 0.05$): Exp; efecto del excipiente. Test de t de student ($p < 0.05$): *, diferencias significativas vs. 0; #, diferencias significativas vs. 100; &, diferencias significativas vs. glicerol; δ , diferencias significativas vs. H.A. **B:** Actividad ALP en células incubadas con DBM formulada con los tres excipientes. Las diferencias se evaluaron mediante ANOVA de un factor ($p < 0.05$): Exp; efecto del excipiente. Test de t de student ($p < 0.05$): *, diferencias significativas vs. 0%; δ , diferencias significativas H.A. vs. GelMA.

Un estudio de Boyan *et al*¹⁶ respalda los resultados obtenidos respecto al ácido hialurónico en el que no hay diferencia en la actividad ALP de la DBM formulada a una concentración de 30% de DBM y de 0% de DBM. En dicho estudio se investigó el uso del ácido hialurónico como excipiente de la DBM y se observó una gran variación entre donantes, hasta el punto en que el cultivo control tenía una igual o mayor inducción

osteogénica que el tratado con la formulación de DBM con ácido hialurónico, hecho que no condujo a ninguna conclusión clave sobre la validez del excipiente para su formulación con DBM.

En la *figura 5A*, se pueden ver las imágenes de las diferentes pastas formuladas con DBM al 30%. En el caso del glicerol se observa una textura muy líquida que no puede ser moldeada, por lo que no confiere a la DBM las propiedades físicas óptimas en esta concentración para ser aplicado en defectos óseos. Los otros excipientes testados sí confieren una textura de pasta a la DBM. En ambos casos la misma puede ser moldeable pero la pasta formulada con GelMA parece ser la mejor por su mayor consistencia y fácil maleabilidad.

Además, en la *figura 5B* se pueden observar imágenes del microscopio invertido donde se ve la morfología celular de las células C2C12 cultivadas durante 48 horas con DBM formulada al 30% con cada uno de los tres excipientes. En ningún caso se observó un efecto negativo de las distintas formulaciones de la DBM sobre la morfología celular.

La *figura 6* muestra los resultados de actividad ALP obtenidos en células C2C12 incubadas durante 48 horas con DBM sin formular y formulada con ácido hialurónico y GelMA por donante. Los resultados muestran que la DBM formulada al 30% con GelMA tiene una mayor inducción osteogénica respecto a la DBM sólo o formulada con ácido hialurónico para todos los donantes menos uno, resultados que confirman que el GelMA es el mejor de los excipientes estudiados para formular la DBM.

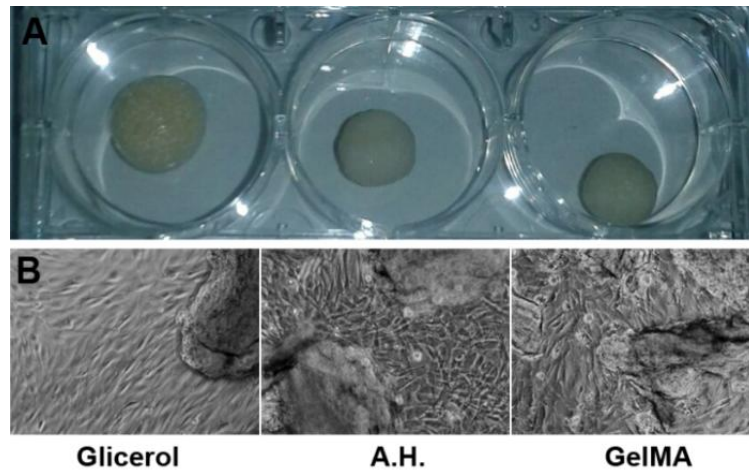


Figura 5. Imágenes representativas de las pastas obtenidas de la formulación de la DBM y de la morfología celular de las células cultivadas con DBM formulada con los tres excipientes. A: Imagen de las tres pastas obtenidas mediante la formulación de la DBM con cada uno de los excipientes a una concentración del 30% de DBM/excipiente. **B:** Imagen representativa de la morfología células de las células C2C12 tras estar cultivadas 48h con DBM formulada con los diferentes excipientes a una concentración del 30% de DBM/excipiente

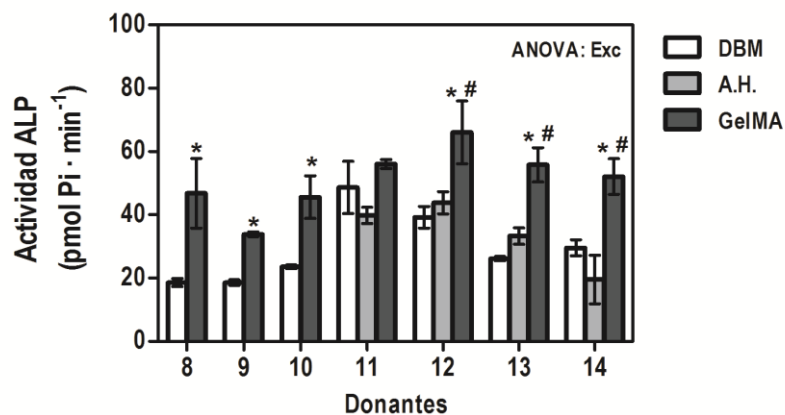


Figura 6. Evaluación de la inducción osteogénica en células C2C12 por DBM formulada con diferentes excipientes. Las células musculares C2C12 se cultivaron según lo descrito en el apartado de Materiales y Métodos y la actividad ALP se midió después de 48h de cultivo con DBM formulada como marcador de la inducción osteogénica. Se utilizó la DBM sola (DBM), y formulada a una concentración de 30% de DBM con ácido hialurónico (A.H.) y GelMA (GelMA). Cada una de las diferentes barras corresponde a una preparación de la DBM, se utilizaron siete donantes y los experimentos se realizaron por cuadruplicado, los datos representan la media \pm error estándar de la media. Las diferencias se evaluaron mediante ANOVA de un factor ($p < 0.05$), test t-student ($p < 0.05$): *, diferencias significativas vs. DBM; #, diferencias significativas vs. A.H.

8. Conclusiones

Todos los estudios realizados en este TFG se han hecho con el fin de potenciar las capacidades osteoinductoras de la DBM y conseguir formularla de la manera más similar posible a las de las marcas comerciales que están en el mercado hoy en día. Las principales conclusiones son:

1. Todas las muestras de DBM de los donantes analizados inducen actividad ALP en células musculares, indicativo de la diferenciación osteogénica.

2. Los extractos proteicos de DBM de los donantes analizados han mostrado niveles cuantificables de BMP2, aunque no en el rango de las DBM comerciales que contienen más proteína.

3. La concentración óptima a la que se debe formular la DBM, teniendo en cuenta la inducción osteogénica y la textura de las formulaciones realizadas es de DBM al 30%.

4. Ninguno de los tres excipientes utilizados (glicerol, ácido hialurónico y GelMA) es tóxico para las células, y el GelMA es el que presenta niveles menores de toxicidad.

5. La DBM formulada al 30% con GelMA es la formulación que potencia más las propiedades osteoinductoras de la DBM, ya que es la que muestra una actividad ALP superior. Además, la formulación con GelMA tiene unas características de consistencia y maleabilidad similares a las DBM comerciales que se usan en la terapia regenerativa ósea.

9. Bibliografía

1. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, Del-Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med oral, Patol oral y cirugía bucal*. 2006;11(2):151-157.
2. Solheim E. Osteoinduction by demineralised bone. *Int Orthop*. 1998;22(5):335-342.
3. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res*. 2000;(371):10-27.
4. Sáez-Torres Barroso C, Calvo Benito J, Martínez Serra J, Gayà Puig A. Extracción de proteína ligada a la matriz ósea: descripción de una técnica sencilla de extracción de BMP2 a partir de hueso de banco congelado. *Patol del Apar Locomot*. 2004;2(3):167-175.
5. Gruskin E, Doll B a, Futrell FW, Schmitz JP, Hollinger JO. Demineralized bone matrix in bone repair: history and use. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(12):1063-1077.
6. Zhang M, Powers RM, Wolfinbarger L. Effect(s) of the Demineralization Process on the Osteoinductivity of Demineralized Bone Matrix. *J Periodontol*. 1997;68(11):1085-1092.
7. Pietrzak WS, Dow M, Gomez J, Soulvie M, Tsiagalis G. The in vitro elution of BMP-7 from demineralized bone matrix. *Cell Tissue Bank*. 2012;13(4):653-661.
8. Pietrzak WS, Woodell-May JE, Mcdonald N. Assay of Bone Morphogenetic Protein-2, -4, and -7 in Human Demineralized Bone Matrix. *J Craniofac Surg*. 2006;17(1):84-90.
9. Honsawek S, Powers RM, Wolfinbarger L. Extractable bone morphogenetic protein and correlation with induced new bone formation in an in vivo assay in the athymic mouse model. *Cell Tissue Bank*. 2005;6(1):13-23.
10. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, et al. Bone Morphogenetic Protein-2 Converts the Differentiation Pathway of C2C12 Myoblasts into the Osteoblast Lineage. *J Cell Biol*. 1994;127(6):1755-1766.
11. Servin-Trujillo MA, Reyes-Esparza JA, Garrido-Fariña G, Flores-Gazca E, Osuna-Martinez U, Rodriguez-Fragoso L. Use of a graft of demineralized bone matrix along with TGF- β 1 leads to an early bone repair in dogs. *J Vet Med Sci*. 2011;73(9):1151-1161.

12. Wildemann B, Kadow-Romacker A, Haas NP, Schmidmaier G. Quantification of various growth factors in different demineralized bone matrix preparations. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2007;81(2):437-442.
13. Zhang M, Powers RM, Wolfinbarger L. A quantitative assessment of osteoinductivity of human demineralized bone matrix. *J Periodontol*. 1997;68:1076-1084.
14. Gimeno MD. Sustitutivos óseos en fracturas del radio distal. *Patol Del Apar Locomot*. 2007;5:82-90.
15. Wildemann B, Kadow-Romacker a, Pruss a, Haas NP, Schmidmaier G. Quantification of growth factors in allogenic bone grafts extracted with three different methods. *Cell Tissue Bank*. 2007;8(2):107-114.
16. Boyan BD, Ranly DM, McMillan J, Sunwoo M, Roche K, Schwartz Z. Osteoinductive ability of human allograft formulations. *J Periodontol*. 2006;77(9):1555-1563.
17. Ramón-Azcón J, Ahadian S, Obregón R, et al. Gelatin methacrylate as a promising hydrogel for 3D microscale organization and proliferation of dielectrophoretically patterned cells. *Lab Chip*. 2012;12(16):2959.
18. Nichol JW, Koshy ST, Bae H, Hwang CM, Yamanlar S, Khademhosseini A. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials*. 2010;31(21):5536-5544.
19. Visser J, Levett PA, te Moller NCR, et al. Crosslinkable hydrogels derived from cartilage, meniscus, and tendon tissue. *Tissue Eng Part A*. 2015;21(7-8):1195-1206.
20. Zuo Y, Liu X, Wei D, et al. Photo-Cross-Linkable Methacrylated Gelatin and Hydroxyapatite Hybrid Hydrogel for Modularly Engineering Biomimetic Osteon. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(19):10386-10394.
21. Han B, Tang B, Nimni ME. Quantitative and sensitive in vitro assay for osteoinductive activity of demineralized bone matrix. *J Orthop Res*. 2003;21(4):648-654.
22. Ding X, Wei X, Huang Y, et al. Delivery of demineralized bone matrix powder using a salt-leached silk fibroin carrier for bone regeneration. *J Mater Chem B*. 2015;3(16):3177-3188.