

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 777**

51 Int. Cl.:

A61L 27/06	(2006.01)
A61L 27/10	(2006.01)
A61L 27/34	(2006.01)
A61L 27/54	(2006.01)
A61L 27/56	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.09.2013 PCT/EP2013/069355**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2014 WO14044704**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2013 E 13766000 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2897656**

54 Título: **Armazón recubierto con hidrogel**

30 Prioridad:

18.09.2012 SE 1251043

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.04.2017

73 Titular/es:

**CORTICALIS AS (100.0%)
Haakonsvei 5
1450 Nesoddtangen, NO**

72 Inventor/es:

**LYNGSTADAAS, PETTER, S.;
HAUGEN, HÅVARD, J. y
TIAINEN, HANNA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 608 777 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Almacén recubierto con hidrogel

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a implantes médicos que tienen una estructura de almacén. En particular, la presente invención describe un almacén de dióxido de titanio que tiene un recubrimiento de hidrogel que comprende una sustancia biológicamente activa y sus usos.

Antecedentes de la invención

10 Afecciones tales como traumatismos, tumores, cánceres, periodontitis y osteoporosis pueden conducir a la pérdida ósea y a un crecimiento y volumen de los huesos reducidos. Por estas y otras razones, es de gran importancia encontrar métodos para mejorar el crecimiento de los huesos y para recuperar su anatomía.

15 La formación de tejido óseo natural a partir de células osteogénicas con ayuda de un almacén tridimensional ofrece una alternativa a los autoinjertos y aloinjertos para reparar y regenerar el hueso perdido. Un almacén bien construido proporciona una superficie adecuada para que las células se fijen y se adhieran a un retículo poroso y bien interconectado, guiando el desarrollo de hueso nuevo, soportando la migración, proliferación y diferenciación de las células formadoras de hueso y la vascularización del tejido de crecimiento hacia dentro. Aunque se han desarrollado varios polímeros y materiales biocerámicos para su uso en ingeniería de tejidos óseos, sus malas propiedades mecánicas han limitado su uso para aplicaciones de soporte.

20 El dióxido de titanio (TiO₂) es un material biocompatible, del que también se ha informado que tiene propiedades bioactivas y un cierto grado de efecto bacteriostático. Por lo tanto, el TiO₂ cerámico se ha estudiado como material para propósitos de ingeniería de tejidos óseos. Se han desarrollado recientemente almacenes de TiO₂ altamente porosos y bien interconectados con alta resistencia mecánica que alcanzan valores de 90% de porosidad y de 1,63-2,67 MPa de resistencia a la compresión (Tiainen *et al.*, 2010) y sus propiedades de biocompatibilidad y osteoconductoras se han demostrado *in vitro* e *in vivo*.

25 Se han hecho intentos para, por ejemplo, mejorar la biocompatibilidad de los almacenes, para mejorar la osteointegración, inhibir la infección e inflamación recubriendo la estructura del implante con diferentes clases de moléculas biológicamente activas. Sin embargo, con el fin de poder realizar su función prevista en el implante después de la implantación, las moléculas biológicamente activas necesitan ser recubiertas sobre el implante de manera que permita su liberación, que no perjudique negativamente a su actividad biológica y que no cause reacciones negativas en el cuerpo, etc.

30 Los hidrogeles se han utilizado para diferentes aplicaciones en ingeniería de tejidos, tales como agentes de relleno de espacios, como vehículos de administración para moléculas bioactivas, y como estructuras tridimensionales que organizan las células y presentan estímulos para dirigir la formación de un tejido deseado. Un hidrogel comprende típicamente un retículo de cadenas de polímeros que son hidrófilas y altamente absorbentes y pueden contener más de 99,9% de agua. El alginato es un ejemplo de un polímero elegido para formar hidrogeles para ingeniería de
35 tejidos, habiendo sido utilizado en una variedad de aplicaciones médicas, incluyendo la encapsulación de células y/o factores de crecimiento y la estabilidad y administración de fármacos. El alginato es un copolímero polisacárido lineal e hidrófilo de ácido β-D-manurónico (M) y monómeros de ácido α-L-glucurónico (G). El gel de alginato se forma cuando cationes divalentes, tales como Ca²⁺, Ba²⁺ o Sr²⁺ interactúan cooperativamente con bloques de monómeros de G creando puentes iónicos entre diferentes cadenas de polímeros. Debido a las propiedades favorables de un biomaterial, tales como no toxicidad, biodegradabilidad, y facilidad de procesamiento en la forma deseada en
40 condiciones fisiológicas normales, el alginato se ha estudiado ampliamente en ingeniería de tejidos, incluyendo la regeneración de piel, cartílago, hueso, hígado y tejido cardíaco.

45 El quitosano es el derivado desacetilado de la quitina, un componente natural de cáscaras de gambas y cangrejos. Es un polímero catiónico biocompatible, dependiente del pH, que es soluble en agua hasta pH 6,2. El quitosano es más estable que los alginatos, pero se descompone rápidamente a bajo pH, por ejemplo en condiciones presentes en los tejidos inflamados, infectados o hipóxicos. También se cree que el quitosano por sí mismo tiene propiedades anti-inflamatorias. Otros hidrogeles como los almidones y geles a base de colágeno tienen características similares, pero se descomponen más rápidamente por factores tisulares locales como las colagenasas. Las celulosas son también dependientes del pH y se puede conformar en varias modificaciones químicas diferentes dependiendo del
50 uso, la resistencia mecánica etc. necesarios. Los polímeros de poli(ácido láctico) (PLA) y de poli(ácido glicólico) (PGA) se descomponen rápidamente en ácidos orgánicos (es decir, ácido láctico) que pueden tener efectos locales beneficiosos sobre los tejidos, infecciones y sobre la velocidad de descomposición de otros hidrogeles (por ejemplo, de quitosano) cuando se utilizan en combinaciones.

55 El ácido hialurónico es otro hidrogel importante con efectos biológicos. Es un constituyente importante del cartílago y se utiliza comúnmente en las articulaciones, para la curación de heridas y en los ojos. Es ligeramente anti-inflamatorio y se cree que estimula la regeneración de ciertos tipos de tejidos conjuntivos, como cartílagos, los ligamentos y células de la córnea. El polietilenglicol (PEG) es un hidrogel muy biocompatible que es muy flexible con

5 respecto a la resistencia, la reticulación para velocidades de descomposición diseñadas etc., y un gel que puede ser unido químicamente a las moléculas biológicas para proporcionar un vehículo de liberación prolongada y controlada que puede ser diseñado para una multitud de afecciones. La mezcla y la gelificación de algunos PEG difieren de la mayoría de los otros hidrogeles en que no pueden ser simplemente disueltos en agua y dejar que gelifique en presencia de iones (como casi todos los hidrogeles biológicos, como quitosano, celulosas, almidones, colágenos y agarosas), sino que necesita un reactivo químico como el mercaptoetanol para formar retículos estables y convertirse en un gel. Sin embargo otros conjugados de PEG también pueden llegar a gelificar por diferentes medios, tales como luz UV, reticulación por interacciones iónicas, adición de sales de cationes divalentes y reacciones de condensación (las reacciones de condensación entre grupos hidroxilo o amina con ácidos carboxílicos o sus derivados se aplican con frecuencia para la síntesis de polímeros para producir poliésteres y poliamidas, respectivamente, PEG).

Sin embargo, todavía hay necesidad en el campo de los implantes médicos y la ingeniería de tejidos de estructuras de implantes que proporcionen, por ejemplo, una estructura de soporte, que sea biocompatible y/o que mejore la integración del implante en un cuerpo.

15 Sumario de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un almacén de dióxido de titanio adecuado como estructura de soporte, tal como un implante médico, que sea biocompatible y/o que tenga mejores propiedades de integración.

Este objeto se obtiene por la presente descripción que en un aspecto se refiere a un almacén de dióxido de titanio, en donde al menos parte de la superficie de dicho almacén de dióxido de titanio está provista de un recubrimiento de hidrogel que comprende al menos una sustancia biológicamente activa. Dicho almacén de dióxido de titanio puede ser representado por un almacén de dióxido de titanio recubierto con hidrogel. El recubrimiento de hidrogel comprende típicamente al menos un polímero seleccionado del grupo que consiste en: alginato, quitosano, ácido hialurónico, polietilen- glicol (PEG), celulosa, poli(ácido acrílico) (PAA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), PLA-PGA, PLA-PEG, dextrano, dextrano-PEG, almidón, geles a base de colágeno, agarosas, ácido plurónico, sulfato de heparano, glicosaminoglicanos, poli(óxido de etileno) (PEO), copolímero de óxido de etileno y óxido de propileno (P(EO-co-PO)), y *Pluronic*/poloxámero aunque se pueden usar también otros polímeros que son capaces de formar hidrogel como se describe en otra parte de la presente memoria. El hidrogel se forma típicamente usando un polímero que tiene un peso molecular de aproximadamente 1000 a 1.000.000 g/mol, tal como 1000-200.000 g/mol.

30 La presente invención se refiere también a un método para producir un almacén de dióxido de titanio que comprende un recubrimiento de hidrogel, que comprende una sustancia biológicamente activa descrita en la presente memoria, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) proporcionar un almacén de dióxido de titanio,
 - 35 b) proporcionar una solución de polímero que comprende una(s) sustancia(s) biológicamente activa(s) y aproximadamente 1-10% p/v de un polímero seleccionado del grupo que consiste en: alginato, quitosano, ácido hialurónico, polietilenglicol (PEG), celulosa, poli(ácido acrílico) (PAA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), PLA-PGA, PLA-PEG, dextrano, dextrano-PEG, almidón, geles a base de colágeno, agarosas, ácido plurónico, sulfato de heparano, glicosaminoglicanos, poli(óxido de etileno) (PEO), copolímero de óxido de etileno y óxido de propileno (P(EO-co-PO)), y *Pluronic*/poloxámero, a al menos parte de dicho almacén de dióxido de titanio y, a continuación centrifugar el almacén de dióxido de titanio ,
 - 40 c) efectuar la gelificación del polímero proporcionado al almacén de dióxido de titanio en la etapa b); y
 - d) secar opcionalmente el almacén de dióxido de titanio,
- en donde las etapas b) y c) se repiten opcionalmente al menos una vez.

45 La presente invención se refiere también a un almacén de dióxido de titanio que comprende un recubrimiento de hidrogel que comprende una sustancia biológicamente activa obtenible u obtenido por este método.

La presente invención se refiere también a un implante médico que comprende el almacén de dióxido de titanio que comprende un recubrimiento de hidrogel que comprende a su vez una sustancia biológicamente activa y dicho almacén para su uso como implante médico.

50 También se describe el almacén de dióxido de titanio recubierto con el hidrogel o un implante médico que lo comprende para la regeneración, reparación, sustitución y/o restauración de tejidos, tal como hueso y el almacén recubierto con hidrogel o un implante médico que lo comprende para su uso en la regeneración, reparación, sustitución y/o restauración de tejido, tal como hueso.

También se describe el uso de un almacén de dióxido de titanio recubierto con hidrogel para la preparación de un implante médico para la regeneración, reparación, sustitución y/o restauración de tejidos.

5 También se describe un método para la regeneración, reparación, sustitución y/o restauración de tejidos que comprende la implantación en un sujeto que lo necesite de un almacén de dióxido de titanio recubierto con hidrogel o un implante médico que comprende dicho almacén.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, los dibujos, los ejemplos y las reivindicaciones.

Definiciones

10 "Almacén" en el presente contexto se refiere a una estructura de poros abiertos. Los términos almacén/armazones se abrevian por "AR" en la presente memoria y dibujos. Por "almacén de dióxido de titanio" se entiende un almacén que comprende predominantemente dióxido de titanio como material de construcción para la estructura de almacén, es decir, el dióxido de titanio es la principal sustancia responsable de la formación de la estructura de almacén. Por consiguiente, el almacén de dióxido de titanio tiene más de 50% en peso de dióxido de titanio, tal como aproximadamente 51% en peso, 60% en peso, 70% en peso, 80% en peso, 90% en peso, 95% en peso, 96% en peso, 97% en peso, 98 % en peso, 99% en peso o 100% en peso de dióxido de titanio, tal como aproximadamente 51 a 100% en peso, 60 a 100% en peso, 60 a 90% en peso, 70 a 100% en peso, 70 a 90% en peso, 80 a 90% en peso u 80 a 95 % en peso de dióxido de titanio. El almacén de dióxido de titanio puede comprender o consistir por lo tanto en dióxido de titanio como el material de construcción para el almacén.

20 Por "diámetro de poros" en el contexto de la presente invención se pretende significar el diámetro hidráulico de un poro sin sus paredes circundantes. El diámetro hidráulico es bien conocido por los expertos en la técnica y se define como 4 veces el área de un poro dividida por la longitud circunferencial del poro.

25 "Puntal de dimensión fractal" es una cantidad estadística que da una indicación de como aparece completamente un fractal para llenar el espacio, a medida que se acerca hacia escalas cada vez más finas. Hay muchas definiciones específicas de la dimensión fractal y ninguna de ellas debe ser tratada como la universal. Un valor de 1 corresponde a una línea recta. Cuanto mayor sea el número, más compleja es la estructura de la superficie. La dimensión fractal se calcula en la presente invención utilizando el método de Kolmogorov o "de recuento de cajas" (Liebovitch *et al.*, 1989). Se calcula tanto en 2D como en 3D en SkyScan CTAn, Kontich, Bélgica. La superficie o volumen se divide en una serie de cuadrados o cubos iguales, y se cuenta el número de cuadrados que contienen parte de la superficie del objeto. Esto se repite en un intervalo de tamaños de cajas, tal como 3-100 píxeles. El número de cajas que contienen la superficie se representa gráficamente frente a la longitud de caja en un gráfico log-log, y la dimensión fractal se obtiene a partir de la pendiente de la regresión log-log.

30 "La porosidad total" en el presente contexto se define como todos los compartimentos dentro de un cuerpo que no sea un material, por ejemplo, el espacio no ocupado por ningún material. La porosidad total incluye tanto los poros cerrados como los abiertos.

35 Por "volumen interior del puntal " se entiende el volumen del lumen interior del puntal.

Por "sinterización", "sinterizar" y similares se entiende un método para fabricar objetos a partir de polvo, calentando el material (por debajo de su punto de fusión) hasta que sus partículas se adhieren entre sí. La sinterización se utiliza tradicionalmente para la fabricación de objetos de cerámica, y también ha encontrado usos en campos como la pulvimetalurgia.

40 Un "dispositivo médico protésico", "implante médico "," implante" y similares, en el presente contexto se refiere a un dispositivo destinado a ser implantado en el cuerpo de un animal vertebrado, tal como un mamífero, por ejemplo un mamífero humano. Los implantes en el presente contexto se pueden usar para reemplazar partes de anatomía y/o restaurar cualquier función del cuerpo. Ejemplos de tales dispositivos incluyen, aunque sin limitación, implantes dentales e implantes ortopédicos. En el presente contexto, los implantes ortopédicos incluyen en su alcance cualquier dispositivo destinado a ser implantado en el cuerpo de un animal vertebrado, en particular un mamífero, tal como un ser humano, para la preservación y restauración de la función del sistema músculo-esquelético, particularmente articulaciones y huesos, incluyendo el alivio del dolor de estas estructuras. En el presente contexto, el implante dental incluye dentro de su alcance cualquier dispositivo destinado a ser implantado en la cavidad bucal de un animal vertebrado, en particular un mamífero, tal como un ser humano, en los procedimientos de restauración dental. En general, un implante dental se compone de una o varias piezas de implante. Por ejemplo, un implante dental comprende normalmente un elemento fijo o acoplado a piezas secundarias del implante, tales como un pilar y/o una restauración dental, tal como un corona, puente o dentadura. Sin embargo, cualquier dispositivo, como un elemento fijo dental, destinado a su implantación se puede denominar simplemente implante, incluso si se van a conectar al mismo otras piezas. Los implantes dentales y ortopédicos también pueden denominarse dispositivos protésicos dentales y ortopédicos como se desprende de lo anterior.

55 En el presente contexto, "sujeto" se refieren a cualquier animal vertebrado, tales como aves, reptiles, mamíferos, primates y seres humanos.

Por "cerámica" en el presente contexto se entiende objetos de material en polvo inorgánico tratado con calor para formar una estructura solidificada.

5 Por "sustancia biológicamente activa" se entiende una sustancia que puede influir en un proceso biológico, es decir, tiene una actividad biológica. Una sustancia biológicamente activa puede ser una molécula pequeña, tal como un ion inorgánico o una molécula más grande, tal como una proteína, e incluso una estructura compleja, tal como una célula. Se describen a continuación ejemplos de sustancias biológicamente activas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención. Una sustancia biológicamente activa también puede ser denominada en el presente contexto una "biomolécula".

10 Por "tejido blando" es en el contexto de la presente invención se entiende tejidos que conectan, soportan o rodean otras estructuras y órganos del cuerpo, que no son hueso. El tejido blando incluye ligamentos, tendones, fascia, piel, tejidos fibrosos, grasa, membranas sinoviales, epitelio, músculos, nervios y vasos sanguíneos.

Por "tejido duro" en el contexto de la presente invención se entienden tejidos mineralizados, tales como hueso, dientes y cartílagos. Los tejidos mineralizados son tejidos biológicos que incorporan minerales en matrices blandas.

Breve descripción de los dibujos.

15 **Figura 1.** Microestructura de alginato al 2% (A y B) y alginato al 2% que contiene péptido sintético (C y D) gelificado por CaCl_2 300 mM. Observación por microscopía electrónica de barrido (abreviadamente SEM por la expresión inglesa *Scanning Electron Microscopy*) a 25 aumentos (A y C) y 100 aumentos (B y D). Este gel no está presente sobre un armazón de dióxido de titanio y no está preparado por el método para la producción de un armazón de dióxido de titanio que comprende un recubrimiento de alginato descrito en esta memoria. Por lo tanto, este gel adopta una estructura porosa.

Figura 2. Perfil de liberación del péptido 2 marcado con FITC después de 21 días de incubación a 37°C. El gráfico de barras muestra la cantidad de péptido liberado después de cada punto de tiempo. El gráfico de líneas representa la cantidad acumulada de péptido liberado hasta 21 días. Los valores representan la media \pm error estándar de la media (abreviadamente en lo sucesivo EEM).

25 **Figura 3. A. Parte superior:** Número de células adherentes cuando se siembran diferentes cantidades de células (30×10^3 , 60×10^3 , 100×10^3 y 200×10^3 células/pocillo) después de 1 y 5 días de cultivo. Los valores representan la media \pm EEM. **Parte inferior:** Imagen representativa de células osteoblásticas adheridas a hidrogeles de alginato al 2% cuando se siembran 100×10^3 células/pocillo obtenida por SEM a 200 aumentos. **B.** Unión de osteoblastos sobre el recubrimiento de alginato al 2%. Las imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de células adherentes cuando se siembran 30×10^3 (A y B), 60×10^3 (C y D), 100×10^3 (E y F) y 200×10^3 (G y H) células/pocillo después de 1 (A, C, E, G) y 5 (B, D, F, H) días de cultivo. Los núcleos celulares se presentan en blanco (tinción con DAPI) (columna de la izquierda) y los filamentos de actina se presentan en blanco (faloidina-FITC) (columna de la derecha). La escala de la barra representa 150 micrómetros.

35 **Figura 4.** La actividad de lactato-deshidrogenasa (abreviadamente en lo sucesivo LDH, por la expresión inglesa *Lactate Dehydrogenase Activity*) medida a partir de medios de cultivo recogidos 24 horas después de la siembra de células MC3T3-E1 sobre hidrogeles de alginato sin péptido (-) o hidrogeles de alginato que contenían 50 $\mu\text{g/mL}$ bien sea de Emdogain (EMD) o los péptidos sintéticos (P2, P5 y P6). El control alto (100%) consistía en medio de cultivo celular procedente de células sembradas sobre plástico con cultivo de tejidos e incubado con Triton X-100 al 1%. El control bajo (0%) consistía en medio de cultivo celular procedente de células sembradas sobre plástico con cultivo de tejidos e incubado con ácido acético al 0,1%-PBS. El porcentaje de actividad de la LDH se calculó usando la siguiente ecuación: citotoxicidad (%) = (valor experimental - control bajo)/(control alto - control bajo) \cdot 100. Los valores representan la media \pm EEM. Las diferencias entre grupos se determinaron por el ensayo de Mann-Whitney * $p < 0,05$ frente al hidrogel de alginato de control (-), # $p < 0,05$ frente a hidrogel de alginato que contenía EMD.

45 **Figura 5A-D.** Expresión de los genes relacionados con la adhesión de células después del cultivo de las células MC3T3-E1 sobre hidrogeles de alginato al 2% sin péptido (-, grupo de control), que contenían los péptidos sintéticos o EMD (50 $\mu\text{g/mL}$) durante 14 y 21 días. Los datos representan los niveles de mRNA relativos de los genes diana normalizados con genes de referencia, expresados como porcentaje del hidrogel de alginato de control a los 14 días de cultivo, que se fijó en 100%. Los valores representan la media \pm EEM. Las diferencias entre grupos se determinaron por la prueba t de Student; (*) $p \leq 0,05$ frente al hidrogel de alginato de control (-), (#) $p \leq 0,05$ frente a EMD.

55 **Figura 6A-F.** Expresión de los genes relacionados con la diferenciación de osteoblastos después del cultivo de las células MC3T3-E1 en geles de alginato al 2% sin péptido (-, grupo de control), que contenían los péptidos sintéticos o EMD (50 $\mu\text{g/mL}$) durante 14 y 21 días. Los datos representan los niveles de mRNA relativos de los genes diana normalizados con genes de referencia, expresados como porcentaje del hidrogel de alginato de control a los 14 días de cultivo, que se fijó en 100%. Los valores representan la media \pm EEM. Las diferencias entre grupos se determinaron por la prueba t de Student; (*) $p \leq 0,05$ frente al hidrogel de alginato de control (-), (#) $p \leq 0,05$ frente a EMD.

- Figura 7.** Perfil de liberación del péptido 2 (SEQ ID NO 1) a partir de armazones recubiertos con P2- hidrogel de alginato después de 21 días de incubación a 37°C. El gráfico de barras muestra la cantidad de péptido liberado después de cada punto de tiempo. El gráfico de líneas representa la cantidad acumulada de péptido liberado hasta 21 días. Los valores representan la media \pm la desviación típica (DT).
- 5 **Figura 8.** Actividad de LDH medida en el medio de cultivo recogido después de 48 horas de cultivo. Los valores representan la media \pm EEM. Ensayo de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$): (a) frente a un armazón (AR) regular y (b) frente a un armazón recubierto con hidrogel de alginato de control (-).
- Figura 9.** Visualización por SEM de armazones de TiO₂ recubiertos con hidrogel de alginato al 2% (armazón con alginato de control) a 10 kV y 40 Pa. Las Figuras A y B muestran la microestructura de los armazones de TiO₂ justo después del proceso de recubrimiento con una capa de hidrogel de alginato al 2% a 50 aumentos (A) y 300 aumentos (B). Las Figuras C y D muestran células cultivadas sobre armazones con alginato de control después de 7 días de cultivo a 50 aumentos (C) y 300 aumentos (D).
- 10 **Figura 10.** Visualización por SEM de células MC3T3-E1 que crecen sobre armazones regulares (A y B), armazones con alginato de control (C y D) y armazones recubiertos con P2-hidrogel de alginato (E y F) después de 7 (A, C y E) y 21 (B, D y F) días de cultivo. Los armazones se observaron por SEM a 10 kV, 40 Pa y 50 aumentos.
- 15 **Figura 11.** Número de células que habían crecido sobre los armazones después de 7 días de cultivo. El contenido de DNA se analizó tinción con fluorescencia Hoechst y se correlacionó con una curva patrón lineal. Los valores representan la media \pm EEM. Ensayo de Mann-Whitney: (a) $p \leq 0,05$ frente a armazón regular (AR) y (b) frente a armazón recubierto con hidrogel de alginato de control (-).
- 20 **Figura 12A-D.** Niveles relativos de expresión de mRNA de *Itgb1*(A), *itGb3*(B), *Fn1*(C) e *Itga8* (D) en células MC3T3-E1 cultivadas sobre armazones de TiO₂ durante 7 (\square) y 21 días (\blacksquare). Los armazones regulares (AR) se utilizaron como grupo de referencia. Los datos representan el número (veces) de cambios de genes diana normalizados con los genes de referencia (*GAPDH* y *18S*), expresados como porcentaje de las células cultivadas sobre armazones regulares (AR) el día 7, que se establecieron en 100%. Los valores representan la media \pm EEM. Prueba *t* de Student: (a) $p \leq 0,05$ frente a un armazón regular (AR) y (b) frente a un armazón con alginato de control (-).
- 25 **Figura 13A-H.** Niveles relativos de expresión de mRNA de A) osterix (*Osx*), B) la proteína morfogenética ósea 2 (*Bmp2*), C) colágeno-1 (*Col1-I*), D) interleuquina 6 (*Il-6*), E) osteopontina (*Opn*), F) sialoproteína ósea (*Bsp*), G) fosfatasa alcalina (*Alp*) y H) osteocalcina (*Oc*) en células MC3T3-E1 cultivadas sobre armazones de TiO₂ durante 7 (\square) y 21 días (\blacksquare). Los armazones regulares (AR) se utilizaron como grupo de referencia. Los datos representan el número (veces) de cambios de genes diana normalizados con genes de referencia (*Gapdh* y *18S*), expresados como porcentaje de las células cultivadas sobre armazones regulares (AR) el día 7, que se fijó en 100%. Los valores representan la media \pm EEM. Prueba *t* de Student: (a) $p \leq 0,05$ frente a un armazón regular (AR) y (b) frente a un armazón con alginato de control (-).
- 30 **Figura 14.** Caracterización por microscopía electrónica de barrido de armazones de TiO₂ recubierto con alginato. La visualización por microscopía electrónica de barrido de la capa de alginato (flechas) que recubre la superficie del puntal de los armazones TiO₂ a 250 aumentos (A) y 1500 aumentos (B, C).
- 35 **Figura 15.** Visualización con ácido peryódico de Schiff de armazones de TiO₂ recubiertos con alginato y no recubiertos. Tinción con ácido peryódico de Schiff de armazones de TiO₂ recubiertos con alginato (A, B) y no recubiertos (C, D). El alginato (rojo) está distribuido por todo el armazón como se observa en la vista desde la parte superior (A) y en el centro (B).
- 40 **Figura 16.** Liberación de simvastatina. El perfil de liberación de SIM de armazones de TiO₂ recubiertos con alginato que contenían SIM 2,4 mM y 0,6 mM después de 19 días de incubación a 37°C. El gráfico de barras muestra la cantidad de SIM liberada después de cada punto de tiempo. El gráfico de líneas representa la cantidad acumulada de SIM liberada hasta 19 días. Los valores representan la media \pm DT.
- 45 **Figura 17A-C.** Ensayo de actividad de lactato-deshidrogenasa. La actividad de la LDH en el medio de cultivo de armazones con SIM 10 nM y 10 μ M se muestra en comparación con armazones sin SIM para el donante 1 (A), el donante 2 (B) y el donante 3 (C) medida cada dos días hasta 14 días. Ninguna de las concentraciones de SIM causó un aumento significativo en la actividad de la LDH en comparación con el efecto de los armazones recubiertos con alginato sin SIM. Los valores representan la media \pm DT.
- 50 **Figura 18A-C.** Ensayo de actividad de fosfatasa alcalina (abreviadamente en lo sucesivo ALP por la expresión inglesa *Alkaline Phosphatase*). La actividad de la ALP (eje y) en medio de cultivo de los armazones con SIM 10 nM y 10 μ M se muestra en porcentaje de control, armazones sin SIM, para el donante 1 (A), el donante 2 (B) y el donante 3 (C) a los 2, 8, 14 y 21 días. La actividad de ALP no cambió significativamente en el medio de cultivo en ninguno de los puntos de tiempo medidos, para armazones con SIM 10 nM o 10 μ M en comparación con armazones sin SIM.
- 55 Los valores representan la media \pm DT.

Figura 19A-C. Inmunoensayo: Cuantificación de las proteínas segregadas. La secreción de TNFRSF11B, VEGFA y BGLAP al medio de las células de cultivo desde los armazones con SIM 10 nM y 10 μ M se muestra en porcentaje de de control, armazones sin SIM, a los 2, 8, 14 y 21 días. Los valores representan la media \pm DT.

5 **Figura 20.** Análisis por RT-PCR en tiempo real. Los niveles relativos de expresión de mRNA de BGLAP se muestran en las células cultivadas sobre armazones con SIM 10 nM y 10 μ M en comparación con armazones sin SIM y normalizados con el gen de referencia GAPDH gen a los 7, 14 y 21 días. Los valores representan la media \pm DT.

10 **Figura 21A-C.** Visualización por microscopía confocal de barrido láser de la deposición de colágeno tipo I en armazones de TiO₂ recubiertos con alginato con o sin simvastatina. El análisis inmunocitoquímico por fluorescencia de colágeno tipo I en osteoblastos humanos primarios cultivados sobre armazones de TiO₂ recubiertos con alginatos. El colágeno tipo I se detecta en la mayoría de las células cultivadas sobre armazones con SIM 10 nM (A), SIM 10 μ M (B) y sin SIM (C). Las fibrillas de colágeno extracelular sólo se ven en armazón sin SIM (C). Superficie del armazón de TiO₂ con colágeno de tipo I y DNA.

15 **Figura 22.** Visualización con ácido peryódico/Pan-cadherina de armazones recubiertos y no recubiertos con alginato. Tinción con ácido peryódico de Schiff de armazones de armazón recubiertos con alginato (B) y no recubierto (A). El alginato (rojo) está distribuido por todo el armazón como se observa en la sección transversal (B). Doble tinción con ácido peryódico de Schiff/Pan-cadherina de un armazón recubierto con alginato (D) y no recubierto (C) sembrado de células a los 2 días. La capa de alginato que contenía células está cubriendo el armazón (D).

20 **Figura 23.** Visualización por naranja de acridina/bromuro de etidio de un armazón recubierto con alginato sembrado de células. Tinción con naranja de acridina/bromuro de etidio de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano sembradas sobre armazón recubierto con alginato el día 2. La mayoría de las células sobrevivieron al proceso de recubrimiento con alginato. Las células vivas se tiñen de verde, las células muertas se tiñen de rojo.

25 **Figura 24A-D.** Ensayos de actividad de lactato-deshidrogenasa y del contenido total de proteínas. La actividad de lactato-deshidrogenasa y el contenido total de proteínas en el medio de cultivo procedente de armazones recubiertos con alginato sembrados de células con (EMD-alginato) o sin Emdogain (alginato) se muestra en porcentaje de control, armazones no recubiertos sembrados de células, para células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano (abreviadamente en lo sucesivo hAD-MSC por la expresión inglesa *human adipose-derived mesenchymal stem cells*) (A, C), y osteoblastos humanos primarios (abreviadamente en lo sucesivo hOST por *humanosteoblasts*) (B, D) medido cada dos días hasta 14 días. Los valores representan la media \pm DT. Análisis estadístico: (a) $p \leq 0,05$ frente a un armazón recubierto con alginato sin Emdogain, y (b) $p \leq 0,05$ frente a un armazón no recubierto sembrado de células.

30 **Figura 25.** Visualización por microscopía confocal de barrido láser de RUNX2 y SOX9. Análisis inmunocitoquímico por fluorescencia de RUNX2 y SOX9 en células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano cultivadas sobre armazón recubierto con alginato con Emdogain (A) y armazón no recubierto (B). RUNX2 se detecta en la mayoría de las células cultivadas sobre armazones con Emdogain (A). Sin embargo, RUNX2 y SOX9 se detectan por igual en las células cultivadas sobre armazón no recubierto (B). RUNX2 (verde), SOX9 (rojo), superficie del armazón de TiO₂ (blanco).

Figura 26. Sección transversal de un armazón de TiO₂ recubierto con una capa de alginato producido por el método de la presente invención que muestra una estructura de poros abiertos. El diámetro de la sección es 3 mm.

Descripción detallada de la invención

40 La presente invención describe un armazón de dióxido de titanio, en el que al menos parte de la superficie de dicho armazón de dióxido de titanio está provista de un recubrimiento de hidrogel, comprendiendo dicho recubrimiento de hidrogel al menos una sustancia biológicamente activa (en adelante también denominada una biomolécula).

45 El armazón de dióxido de titanio con el recubrimiento de hidrogel que comprende al menos una sustancia biológicamente activa, en el contexto de la presente invención, puede también denominarse un "armazón de dióxido de titanio que comprende un recubrimiento de hidrogel", un "armazón de dióxido de titanio recubierto con hidrogel" y similares. La superficie a la que se proporciona el hidrogel puede ser una o más partes o la totalidad de la superficie exterior del armazón de dióxido de titanio, pero también la superficie de parte o la mayoría de los poros interiores del armazón (las paredes de los poros). Ha de entenderse que el recubrimiento de hidrogel comprende al menos una sustancia biológicamente activa, a no ser que esté expresamente claro por el contexto que no está presente dicha sustancia biológicamente activa. La presencia del recubrimiento de hidrogel del armazón de dióxido de titanio permite la administración de sustancia biológicamente activa que puede mejorar la integración, la biocompatibilidad etc., de los armazones. Sin embargo, la(s) sustancia(s) que constituye(n) el recubrimiento de hidrogel puede(n) también por sí mismas tener una actividad biológica.

55 Un hidrogel se puede definir como un gel que contiene agua. El recubrimiento de hidrogel descrito en la presente memoria comprende un retículo de cadenas de polímero que son hidrófilas y altamente absorbentes y por lo tanto el recubrimiento de hidrogel adopta un estado similar a un gel cuando está húmedo. Sin embargo, ha de entenderse que se requiere una cierta cantidad de humedad para que el recubrimiento de hidrogel adopte este estado similar a

gel. Por lo tanto, cuando un almacén de dióxido de titanio recubierto con hidrogel está, por ejemplo, seco o conservado en un lugar seco, el hidrogel estará más bien en la forma de una capa de película delgada deshidratada (también conocida como un "xerogel"). Sin embargo, una vez que el almacén de dióxido de titanio recubierto con hidrogel se somete a un ambiente más húmedo, tal como cuando se implanta en un cuerpo o cuando se sumerge en una solución acuosa, esta capa de película adoptará de nuevo un aspecto de hidrogel. A menos que sea expresamente evidente por el contexto, cuando en la presente invención se hace referencia a un hidrogel, se debe entender que abarca formas de gel tanto secas como húmedas.

El hidrogel se forma a partir de un polímero de alto peso molecular que tiene un peso molecular de alrededor de 1000- 1.000.000 g/mol, tal como 1000-200 000 g/mol, tal como alginato, quitosano, ácido hialurónico, polietilenglicol (PEG) celulosa, poli(ácido acrílico) (PAA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), PLA-PGA, PLA-PEG, dextrano, dextrano-PEG, almidón, geles a base de colágeno, agarosas, ácido plurónico, sulfato de heparano, glicosaminoglicanos, poli(óxido de etileno) (PEO), copolímero de óxido de etileno y óxido de propileno (P(EO-co-PO)), y *Pluronic*/poloxámero.

El quitosano es más estable que los alginatos, pero se descompone rápidamente a pH bajo, por ejemplo en las condiciones presentes en tejidos inflamados, infectados o hipóxicos. Se cree también que el quitosano por sí mismo tiene propiedades anti-inflamatorias. Otros hidrogeles como almidones y geles a base de colágeno tienen características similares, pero se descomponen más rápidamente por factores tisulares locales como colagenasas. Las celulosas también son dependientes del pH y se pueden configurar en varias modificaciones químicas diferentes dependiendo del uso, resistencia mecánica etc., según sea necesario. El PLA y el PGA se descomponen rápidamente en ácidos orgánicos (es decir, ácido láctico) que pueden tener efectos locales beneficiosos sobre los tejidos, las infecciones y sobre la velocidad de descomposición de otros hidrogeles (por ejemplo, de quitosano) cuando se utilizan en combinaciones. El ácido hialurónico es otro hidrogel importante con efectos biológicos. Es un constituyente importante de los cartílagos y se utiliza comúnmente en las articulaciones, para la curación de heridas y en los ojos. Es ligeramente anti-inflamatorio y se cree que estimula la regeneración de ciertos tipos de tejidos conjuntivos, como cartílagos, ligamentos y células de la córnea. El PEG es un hidrogel muy biocompatible que es muy flexible con respecto a la resistencia, reticulación para las velocidades de descomposición diseñadas etc., y un gel que puede estar unido químicamente a moléculas biológicas para proporcionar un vehículo de liberación prolongada y controlada que puede ser diseñado para una multitud de afecciones.

Otros ejemplos de polímeros que se pueden usar para formar el hidrogel incluyen, aunque sin limitación: poli(óxido de propileno) (PPO), poli(óxido de butileno) (PBO), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), metacrilato de hidroxietilo, poli(metacrilato de etilenglicol), acrilamida de ácido acrílico, N-isopropilacrilamida, poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(acrilamida) (PAAm), poli(N-vinilpirrolidona) (PNVP), poli(metacrilato de hidroxietilo) PHEMA), poli(óxido de etileno) (PEO), poli(etilenglicol)-monometil-éter (PEGME), metil-celulosa, tal como carboximetil-celulosa, poli(metacrilato de hidroxietilo) (PHEMA) copolimerizado con NVP-ácido metacrílico (MAA), metacrilato de butilo (BMA), metacrilato de metilo (MMA), metacrilato de 3-metoxi-2-hidroxipropilo (MHPM), PHEMA/poli(tereftalato de etileno) (PTFE), PHEMA, P(HEMA-co-MMA), P(HEMA-b-siloxano), PVA, poli(ácido acrílico) (PAA), poli(metacrilato de glicerilo), HEMA, policianoacrilatos, ácido fumárico-PEG, ácido sebácico/1,3-bis(p-carboxifenoxi)propano (P(CPP-SA)) PHEMA, PVA, PNVP, poli(etileno-co-acetato de vinilo) (PEVAc), poli(acrilamida) (PAAm), poli(metacrilato de dietilaminoetilo) (PDEAEMA), poli(metacrilato de dimetilaminoetilo), (PDMAEMA), poli(ácido metacrílico-injertado-poli(etilenglicol)), (P(MAA-g-EG)), poli(ácido acrílico-injertado-poli(etilenglicol)) (P(PAA-g-EG)), poli(N-isopropil-acrilamida) (PNIPAAm), PNIPAAm/PAA, poli(alginato de glicol), geles a base de colágeno (gelatinas), y sulfato de heparano y sus análogos y otros glicosaminoglicanos.

El hidrogel puede actuar como vehículo para la sustancia biológicamente activa, pero algunos polímeros también puede tener una actividad biológica por sí mismos (por ejemplo, quitosano, sulfato de heparano, ácido hialurónico y colágeno) o ser descompuestos en metabolitos biológicamente activos por procesos naturales en un cuerpo (por ej. análogos de PLA, PGA, colágenos y sulfato de heparano).

El polímero es típicamente un polímero de alto peso molecular, es decir, un polímero que tiene un peso molecular (M_w) de alrededor de 1000-1.000.000 g/mol, tal como de aproximadamente 1000-200.000 g/mol, 10.000-600.000 g/mol, 10.000-100.000 g/mol, 100.000-300.000 g/mol, 250.000-600.000 g/mol, 50.000-150.000 g/mol, 50.000-200.000 g/mol o 50.000-100.000 g/mol. El recubrimiento de hidrogel puede comprender uno o más tipos de polímeros que se mezclan entre sí cuando se prepara el hidrogel. Alternativamente, el hidrogel puede estar constituido por diferentes capas de hidrogel que pueden comprender diferentes polímeros o diferentes mezclas de polímeros.

Variando la(s) molécula(s) biológicamente activa(s) en el hidrogel y el(los) polímero(s) se construye la capa de hidrogel respectiva y/o el(los) polímero(s) en las diferentes capas de hidrogel, pudiéndose obtener la función biológica deseada del hidrogel dependiendo de la función prevista del almacén dióxido de titanio recubierto con hidrogel en un sujeción.

Cuando el hidrogel es un hidrogel de alginato, el alginato puede ser por ejemplo, alginato de sodio, alginato de potasio, alginato de calcio y alginato de estroncio. El alginato es un copolímero lineal con bloques homopoliméricos de β -D-manuronato (M) unidos en (1-4) y sus residuos de α -L-guluronato (G) epímeros en C-5 respectivamente,

unidos covalentemente entre sí en diferentes secuencias o bloques. Los monómeros pueden aparecer en bloques homopoliméricos de residuos G consecutivos (bloques G), residuos M consecutivos (bloques M) o alternando residuos M y G (bloques MG). Las características del alginato cambian por diferente relación entre los bloques M y G, así como su secuencia. El alginato puede comprender un mínimo de aproximadamente 60% de monómeros de guluronato.

El hidrogel está presente sobre la superficie exterior del almacén de dióxido de titanio, pero también puede penetrar, en diferentes grados, en el almacén y recubrir las paredes de los poros interiores del almacén o llenar el espacio de los poros del almacén.

El recubrimiento de hidrogel puede tener un espesor en húmedo de al menos 1 μm , tal como 1-20 μm o 1-10 μm . Dicho hidrogel delgado puede recubrir al menos parte de la superficie exterior del almacén de dióxido de titanio, pero también puede recubrir las paredes de los poros interiores del almacén. El recubrimiento de hidrogel puede comprender una o más capas de hidrogel formadas posteriormente. Por consiguiente, el recubrimiento de hidrogel puede estar constituido por 1-10 capas de hidrogel, tales como 2-6, 2-4, 3 o 4 capas. Puede ser ventajoso un espesor fino del recubrimiento de hidrogel puesto que dicho recubrimiento delgado no bloqueará sustancialmente las aberturas de los poros del almacén de dióxido de titanio, incluso si el diámetro de los poros, por supuesto se reduce un poco debido al recubrimiento de hidrogel. Algo del bloqueo inicial de los poros de almacén puede ocurrir incluso cuando se prepara un recubrimiento de hidrogel fino, pero en un entorno biológico, se observará una cierta degradación del recubrimiento del hidrogel bloqueante en aquellos poros que permanezcan bloqueados inmediatamente después del proceso de recubrimiento (véase el Ejemplo 2). La falta sustancial de bloqueo de los poros es ventajosa ya que el crecimiento de células en el almacén de dióxido de titanio se puede mejorar con ello puesto que los poros, a pesar del recubrimiento de hidrogel, son fácilmente accesibles para la penetración por células y tejidos.

Otra ventaja de un recubrimiento de hidrogel fino que también se forma en las paredes de los poros de almacén es que habrá una relación muy grande de superficie a volumen, en comparación con el caso en el recubrimiento de hidrogel se forma básicamente sólo sobre la superficie exterior del almacén. Esto afectará al perfil de liberación de la sustancia biológicamente activa incluida en el recubrimiento de hidrogel. Además, incluso si el recubrimiento de hidrogel se separara en escamas desde la superficie exterior del almacén de dióxido de titanio, si el hidrogel está presente también en el interior del almacén, no se pierde todo el hidrogel del almacén por la descamación, sino que todavía estaría presente en el interior del almacén hidrogel con biomolécula(s).

El tamaño de la biomolécula puede afectar a la elección del número de capas de hidrogel y/o al espesor total de la capa de hidrogel. Una biomolécula más pequeña (es decir, que tenga un M_w inferior, tal como doxiciclina) se difunde fuera del recubrimiento de hidrogel más rápidamente que una biomolécula más grande. Por lo tanto, si es deseable una liberación retardada de una biomolécula más pequeña, se requiere un recubrimiento de hidrogel más grueso. Por otra parte, para una biomolécula más grande, la velocidad de liberación del recubrimiento de hidrogel es más dependiente de la degradación del hidrogel y la biomolécula no se difunde fuera del recubrimiento de hidrogel tan rápidamente como una biomolécula más pequeña. Por lo tanto, se puede usar un recubrimiento de hidrogel más delgado para una biomolécula más grande. Conociendo el tamaño de la biomolécula y la velocidad de liberación deseable, se puede ajustar por tanto el espesor del recubrimiento de hidrogel, para lograr la velocidad de liberación deseable.

Alternativamente, el hidrogel puede llenar el espacio interior del almacén de dióxido de titanio, es decir, llenar los poros en diferentes grados (así como opcionalmente estar presente en la superficie exterior del almacén de dióxido de titanio). Esto puede ser particularmente ventajoso cuando las células (por ejemplo ciertos tipos de células, considerados en la presente memoria), tales como células madre, van a ser incorporadas en el almacén de dióxido de titanio, ya que esto permite que un gran número de células se deposite dentro de los poros de los almacenes. Por ejemplo se puede llenar con un recubrimiento de hidrogel aproximadamente 50-100%, 60-100%, 70-100%, 80-100%, 90-100% o 90-99% del volumen total de poros en el interior del almacén de dióxido de titanio.

El método para producir almacén(es) de dióxido de titanio recubierto(s) con hidrogel descrito en la presente memoria proporciona un almacén de dióxido de titanio en el que al menos parte del almacén está provista de un recubrimiento de hidrogel que comprende una(s) sustancia(s) biológicamente activa(s). Por tanto, la presente invención, también se refiere a un almacén de dióxido de titanio que comprende un recubrimiento de hidrogel que a su vez comprende una(s) sustancia(s) biológicamente activa(s), obtenible u obtenido por los métodos descritos en la presente memoria.

Métodos para formar el recubrimiento de hidrogel que comprende una(s) sustancia(s) biológicamente activa(s)

Un ejemplo de un método para producir el armazón de dióxido de titanio descrito en la presente memoria que comprende un recubrimiento de hidrogel que a su vez comprende una sustancia biológicamente activa, es un método que comprende las etapas de:

- a) proporcionar un armazón de dióxido de titanio,
 - 5 b) proporcionar una solución de polímero que comprende una(s) sustancia(s) biológicamente activa(s) y aproximadamente 1-10% p/v de un polímero seleccionado del grupo que consiste en: alginato, quitosano, ácido hialurónico, polietilenglicol (PEG), celulosa, poli(ácido acrílico) (PAA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), PLA-PGA, PLA-PEG, dextrano, dextrano-PEG, almidón, geles a base de colágeno, agarosas, ácido plurónico, sulfato de heparano, glicosaminoglicanos, PEO, P(EO-co-PO), y
 - 10 *Pluronic*/poloxámero, a al menos parte de dicho armazón de dióxido de titanio y a continuación centrifugar el armazón de dióxido de titanio,
 - c) efectuar la gelificación del polímero proporcionado al armazón de dióxido de titanio en la etapa b); y
 - d) secar opcionalmente el armazón de dióxido de titanio,
- en donde las etapas b) y c) se repiten opcionalmente al menos una vez.

- 15 El método también puede consistir en las etapas anteriores a)-d), en donde las etapas b) y c) se repiten opcionalmente al menos una vez. Cuando se repiten las etapas b) y c) se construye un recubrimiento de hidrogel que comprende dos o más capas de hidrogel.

El armazón de dióxido de titanio de la etapa a) es un armazón de dióxido de titanio como se describe en la presente memoria.

- 20 La solución de polímero es una solución acuosa que comprende al menos uno de los polímeros citados en la presente memoria por ser adecuado para formar el hidrogel (o un polímero que tiene una función similar) a una concentración de aproximadamente 1-10% p/v. La solución de polímero se puede preparar disolviendo el polímero en agua destilada o un tampón adecuado, tal como una solución salina tamponada con fosfato, agitando hasta que se disuelve el polímero, preferiblemente a temperatura ambiente, por ejemplo durante 1 hora a toda la noche (por
- 25 ejemplo, 1-24 horas). La(s) sustancia(s) biológicamente activa(s) es una sustancia biológicamente activa como se describe en la presente memoria y se añade preferiblemente a la solución de polímero. La concentración de la sustancia biológicamente activa, cuando se añade a la solución de polímero, depende por supuesto de la sustancia biológicamente activa específica y/o su función prevista en el cuerpo. Típicamente, la concentración en la solución de polímero es del orden de microgramos, aunque puede variar desde 1 ng/mL-1 mg/mL, tal como 500 ng/mL-500
- 30 µg/mL o 0,5-500 µg/mL.

- A fin de proporcionar la solución de polímero al armazón de dióxido de titanio, dicho armazón de dióxido de titanio se puede sumergir en una solución de polímero. Esto puede tener lugar bajo agitación, por ejemplo, mediante un agitador orbital a aproximadamente 100 rpm/min. La agitación ayuda a dispersar la solución de polímero en el
- 35 retículo de poros del armazón. Típicamente, el armazón de dióxido de titanio se sumerge durante un periodo de tiempo de aproximadamente 10 minutos a 2 horas, tal como 1-2 horas, por ejemplo, 1 hora. La inmersión se lleva a cabo típicamente a temperatura ambiente.

Después de la inmersión en una solución de polímero, la solución en exceso se elimina preferible y típicamente por centrifugación cuidadosa del armazón de dióxido de titanio, tal como a aproximadamente 200-300 x g, durante un corto periodo de tiempo, tal como 0,5-2 minutos, por ejemplo, 1 minuto.

- 40 Con el fin de efectuar la gelificación del polímero en la etapa c), se pueden utilizar métodos estándares, conocidos por los expertos en la técnica. Dependiendo del polímero específico utilizado para preparar el armazón de dióxido de titanio recubierto con hidrogel, la gelificación en la etapa c) se puede efectuar de diferentes maneras, tal como cambiando el pH o la temperatura, por adición de una sal, exposición a la luz de ciertas longitudes de onda, el uso de agentes de reticulación etc.
- 45 Cuando se usa alginato como polímero, en la etapa c) el armazón de dióxido de titanio se provee con una solución de sal de catión divalente. La solución de sal de catión divalente (también denominada en la presente memoria "solución de catión divalente") es una solución acuosa que comprende al menos una sal de un catión divalente, tal como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} o Sr^{2+} . Ejemplo de sales de cationes divalentes adecuadas incluyen, aunque sin limitación:, CaCl_2 , SrCl_2 , SrCO_3 , SrPO_4 , CaCO_3 , CaPO_4 , MgCl_2 , MgCO_3 y MgPO_4 . La concentración de la sal de catión divalente
- 50 en esta solución es típicamente de aproximadamente 15-500 mM, tal como aproximadamente 15-150 mM, 20-500 mM, 20-100 mM, 20-400 mM, 200-400 mM, 250-350 mM, 30-80 mM, 40-60 mM, 45-55 mM o aproximadamente 50 mM. Preferiblemente, la concentración es aproximadamente 20-100 mM. Preferiblemente, la sal de catión divalente es CaCl_2 . Para proporcionar el armazón de dióxido de titanio con la solución de catión divalente, el armazón de dióxido de titanio se puede sumergir en la solución de catión divalente durante un periodo de tiempo de, por ejemplo
- 55 10 minutos a 2 horas, tal como 1-2 horas, por ejemplo, 1 hora. Esto puede tener lugar bajo agitación, por ejemplo, por un agitador orbital a aproximadamente 100 rpm/min. Alternativamente se pueden usar otros medios para

proporcionar la solución de catión divalente, por ejemplo, tal como pulverizar el armazón de dióxido de titanio con la solución. Después de proporcionar la solución de catión divalente al dióxido de titanio, el armazón se lava opcionalmente, por ejemplo, con agua destilada para eliminar la solución de catión divalente en exceso. La solución de sal de catión divalente en exceso puede ser eliminada alternativamente o además por una cuidadosa centrifugación del armazón de dióxido de titanio, tal como a aproximadamente 200-300 x g, durante un corto período de tiempo, tal como 0,5-2 minutos, por ejemplo, 1 minuto. Si se aplica una etapa de centrifugación, el lavado opcional tiene lugar preferiblemente después de la centrifugación. Además, las sustancias biológicamente activas se pueden añadir a la solución de catión divalente (por ejemplo, en las mismas concentraciones que cuando se añadieron a la solución de polímero), aunque éstas se añaden preferiblemente a la solución de alginato. Cuando el polímero es quitosano o PEG, la gelificación se puede efectuar también como se describe para efectuar la gelificación del alginato.

Cuando se utiliza quitosano como polímero, la gelificación (etapa c)) se puede efectuar por un cambio en el pH, o por reticulación por interacciones iónicas. El quitosano es el derivado desacetilado de la quitina, un componente natural de cáscaras de gambas y cangrejos. Es un polímero catiónico biocompatible, dependiente del pH, que es soluble en agua hasta pH 6,2. La gelificación del quitosano se puede efectuar, por ejemplo por un aumento del pH hasta un pH básico, tal como aproximadamente pH 8 o más. El pH inicial de la solución de quitosano puede ser de 3 a menos de 8, tal como aproximadamente 5,5. La alcalinización de soluciones acuosas de quitosano por encima de un pH de 8 conduce a la formación de un precipitado de tipo gel hidratado. La separación de fases se produce por neutralización de los grupos amino del quitosano y la consiguiente eliminación de las fuerzas electrostáticas repulsivas entre cadenas, que posteriormente permite la extensa unión por puentes de hidrógeno y las interacciones hidrófobas entre cadenas. Cuando la gelificación del quitosano se efectúa por el uso de reticulación por interacciones iónicas, se proporciona una sal de catión divalente al armazón de dióxido de titanio obtenido en la etapa b) de una manera similar a descrita para el alginato.

Cuando se usa poli(etilenglicol) (PEG) como polímero en la etapa b), la gelificación se puede efectuar, por ejemplo, por reticulación por interacciones iónicas, proporcionando una solución de sal de catión divalente al armazón de dióxido de titanio obtenido en la etapa b) de una manera similar a descrita para el alginato. La gelificación será más rápida y creará un gel más denso con mayor concentración de sal divalente. Las reacciones de condensación entre los grupos hidroxilo o amino con ácidos carboxílicos o sus derivados se aplican frecuentemente para la síntesis de polímeros para producir poliésteres y poliamidas, respectivamente, PEG. Sin embargo, están disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica numerosos otros métodos para efectuar la gelificación de PEG.

Cuando se prepara un hidrogel de Pluronic, tal como por uso de gelificación de poloxámero ésta se puede efectuar por un aumento de la temperatura. En este caso, la temperatura de partida cuando se va a efectuar la gelificación ha que ser 10°C o menos. La temperatura se eleva a aproximadamente 35-45°C, tal como 37°C, lo que provocará una gelificación del polímero y la formación de un hidrogel de Pluronic.

Cuando se ha de preparar un hidrogel a base de ácido hialurónico, en la etapa c) el armazón de dióxido de titanio se sumerge en una solución que comprende un agente de reticulación químico, tal como polietilenglicol derivatizado con tetra-tiol (PEG-SH₄). (MW 10.000) en el intervalo de concentración de aproximadamente 0,01 a 10 g/L.

[Cuando se ha de formar un hidrogel de un poli(óxido de etileno) (PEO), la gelificación de la etapa c) se puede efectuar por polimerización dependiente de la temperatura por un aumento de la temperatura desde 20°C hasta 37°C, o una disminución de la temperatura desde 50°C hasta 37°C. Alternativamente, el armazón de dióxido de titanio obtenido en la etapa b) puede ser expuesto a la irradiación con luz a una longitud de onda de 200-400 nm para efectuar la gelificación de la etapa c) cuando se ha de formar un hidrogel de PEO.

La etapa d) se puede llevar a cabo durante un período de tiempo de aproximadamente 0,5 horas a varios días. Por ejemplo, se puede realizar durante una noche, por ejemplo, durante 0,5-24 horas, 5-10 horas o tan sólo 1 hora. Típicamente, esta etapa se realiza a temperatura ambiente.

El método para producir un armazón de dióxido de titanio recubierto con hidrogel descrito en la presente memoria proporciona un armazón de dióxido de titanio provisto de un recubrimiento de hidrogel que comprende una(s) sustancia(s) biológicamente activa(s). Esta memoria también se refiere, por tanto, al armazón de dióxido de titanio descrito en la presente memoria, que comprende un recubrimiento de hidrogel que comprende a su vez una(s) sustancia(s) biológicamente activa(s), obtenible u obtenido por el método anterior.

Cuando se utiliza el método anterior para preparar el armazón de dióxido de titanio recubierto con hidrogel al menos parte de la superficie exterior del armazón será provista con el recubrimiento de hidrogel. Sin embargo, puesto que el armazón de dióxido de titanio adopta una estructura porosa, por el método anterior, también se dejará penetrar la solución de polímero en los poros del armazón y en consecuencia, el recubrimiento de hidrogel también se forma en la superficie de al menos parte de los poros dentro del armazón. La profundidad en la que se formará el recubrimiento de hidrogel en los poros del armazón, dependerá por supuesto, de factores tales como la porosidad del armazón (una mayor porosidad facilitará la penetración del polímero y permitirá que el recubrimiento se forme más profundamente en el interior del armazón), la concentración de polímero y/o del método utilizado para efectuar la gelificación en la etapa c), la velocidad de centrifugación etc. Sin embargo, el presente método permite que al

menos parte de la superficie (las paredes) de al menos los poros exteriores del almacén de dióxido de titanio sean recubiertas con un recubrimiento de hidrogel. Típicamente, el recubrimiento de hidrogel está presente en toda la estructura de almacén, cuando un almacén de dióxido de titanio recubierto con hidrogel se analiza por microscopía electrónica de barrido (SEM). Por el método anterior, el recubrimiento de hidrogel, por tanto, no sólo se forma en la superficie exterior del almacén de dióxido de titanio, sino también en un grado variable sobre la superficie de los poros en el interior del almacén. Típicamente, la mayoría de las superficies de los poros sobre las que se proporciona el recubrimiento de hidrogel será revestida con el recubrimiento de hidrogel.

Por supuesto, sólo parte del almacén de dióxido de titanio puede estar provista de la solución de polímero. Es importante destacar que, para que se forme el recubrimiento de hidrogel la parte del almacén sobre la que se desea tal formación de recubrimiento de hidrogel, debe ser sometida tanto a la solución de polímero como al método para efectuar la gelificación.

Por el presente método, es posible formar un recubrimiento de hidrogel delgado sobre el almacén de dióxido de titanio puesto que la centrifugación de la etapa b) permite que se deposite una capa muy delgada de solución de polímero sobre la superficie exterior y también en el interior de los poros del almacén de dióxido de titanio. También, sin desear vincularse a ninguna teoría, el recubrimiento de hidrogel puede ser el resultado de la baja densidad de la solución de polímero utilizada, la que permite su penetración en los poros del almacén. El método anterior permite que cada capa de hidrogel del recubrimiento de hidrogel tenga típicamente un espesor en húmedo de al menos 1 µm, tal como aproximadamente 3 µm, sobre las superficies que recubre. Sin embargo, repitiendo las etapas b) y c) del método, se puede formar un recubrimiento de hidrogel que consista en dos o más capas de hidrogel. Por tanto, el método anterior se puede usar para controlar el espesor del recubrimiento de hidrogel repitiendo las etapas b) y c), tal como 2-100, 2-10, 2-6, 2-4, 3 o 4 veces, hasta que se obtenga un recubrimiento de hidrogel del espesor deseado.

También, el método anterior permite que se forme un recubrimiento de hidrogel que tenga un espesor más uniforme. Además, el recubrimiento de hidrogel formado por este método es sustancialmente no poroso, en comparación con un hidrogel de alginato preparado por simple mezclamiento de alginato y una solución de sal de catión divalente que tenga cierta porosidad (véase por ejemplo el gel preparado en el Ejemplo 1 y representado en la Fig. 1). La razón para la falta sustancial de porosidad del recubrimiento de hidrogel cuando se prepara sobre un almacén de dióxido de titanio por el método descrito anteriormente, es probablemente el delgado recubrimiento de la solución de polímero formado sobre el almacén de dióxido de titanio después de la centrifugación de la etapa b).

También, el método anterior permite la formación de un recubrimiento de hidrogel que comprende una o más capas de hidrogel repitiendo las etapas b) y c). Si se prefiere, esto también permite la formación de diferentes capas de hidrogel con diferentes sustancias biológicamente activas y/o tipos de polímeros en las diferentes capas.

Cuando el polímero utilizado es PEG, quitosano o alginato, también es posible realizar la etapa c) antes de la etapa b). Sin embargo, en ese caso, no se forma un delgado recubrimiento de hidrogel. Más bien, en este caso, el recubrimiento de hidrogel rellena la mayoría de los poros interiores del almacén de dióxido de titanio. Aunque no forma parte de la presente invención, esto puede ser particularmente ventajoso cuando células, tales como células madre, han de ser incorporadas en el almacén de dióxido de titanio, ya que esto permite que sean depositadas en el interior de los poros de los almacenes un gran número de células. Cuando la etapa c) se lleva a cabo antes que la etapa b) puede ser superfluo repetir las etapas c) y b), puesto que la mayoría de los poros del almacén de dióxido de titanio se llenarán con recubrimiento de hidrogel ya después de realizar las etapas c) y b) una sola vez.

Al realizar el método anterior, se produce un almacén de dióxido de titanio recubierto con hidrogel como se describe en la presente memoria. La presente invención se refiere también, por tanto, a un almacén de dióxido de titanio recubierto con hidrogel como se define en la presente memoria, obtenible u obtenido por la realización del procedimiento anterior.

Aplicaciones del almacén de dióxido de titanio recubierto con hidrogel

Los hidrogeles se han utilizado para diferentes aplicaciones en la ingeniería de tejidos, tales como agentes de relleno de espacios, como vehículos de administración para las moléculas bioactivas, y como estructuras tridimensionales que organizan células y presentan estímulos para dirigir la formación de un tejido deseado y el recubrimiento de hidrogel descrito en la presente memoria se puede usar ventajosamente para cualquiera de dichos fines. Los almacenes de dióxido de titanio de la presente invención se pueden usar también ventajosamente para la siembra de células, antes o después de ser recubiertos con un hidrogel por un método descrito en la presente memoria.

El almacén de dióxido de titanio que comprende un recubrimiento de hidrogel se utiliza normalmente como un implante médico, ya sea solo o formando una parte de un implante. Como es evidente a partir de otras partes de esta memoria, la estructura del almacén de dióxido de titanio utilizada permite la adaptación de estructuras de implantes, específicamente adaptadas al sitio de implantación y a la función destinada del implante. Esta invención se refiere también, por tanto, a un almacén de dióxido de titanio que comprende un recubrimiento de hidrogel para su uso como un implante médico. El almacén de dióxido de titanio recubierto con hidrogel comprende una estructura

- porosa que tiene una buena biocompatibilidad y que puede estimular el crecimiento de las células y la fijación del
 almacén o del implante que comprende el almacén. La estructura porosa permite el crecimiento hacia dentro de las
 células en el almacén, lo que permite de este modo la regeneración del tejido. La gran área superficial del almacén
 facilita también el crecimiento de las células en la estructura y con ello la fijación del almacén y la regeneración de
 tejidos. Puesto que el almacén de dióxido de titanio propiamente dicho está hecho de un material que tiene una
 buena biocompatibilidad, se reducen las reacciones adversas al almacén cuando se implantan en un sujeto.
- El almacén de dióxido de titanio que comprende un recubrimiento de hidrogel puede ser implantado en un sujeto, en
 donde las células crecerán en la estructura de almacén. También es posible sembrar y dejar crecer las células sobre
 el almacén de dióxido de titanio recubierto con hidrogel antes de la implantación. La estructura macroporosa
 interconectada del almacén de dióxido de titanio es especialmente adecuada para la ingeniería de tejidos y
 principalmente la ingeniería de tejidos óseo, una alternativa interesante para las terapias de reparación ósea
 actualmente disponibles. A este respecto, la siembra de células derivadas de médula ósea sobre el almacén de
 dióxido de titanio se realiza usando métodos convencionales, que son bien conocidos por los expertos en la técnica
 (véase, por ejemplo Maniopoulos *et al.* 1988). Las células se siembran sobre el almacén de dióxido de titanio
 recubierto con hidrogel y se cultivan en condiciones de crecimiento adecuadas. Los cultivos se alimentan con medios
 apropiados para establecer su crecimiento. También es posible sembrar el almacén de dióxido de titanio con células,
 tales como células madre, tales como células madre mesenquimatosas, antes de proporcionar el recubrimiento de
 hidrogel al almacén (véase el Ejemplo 10 que es un método ilustrativo para realizar dicha siembra de células sobre
 un hidrogel de alginato).
- Los hidrogeles que se asocian para que tengan un efecto positivo sobre la formación de huesos y la administración
 de fármacos en huesos son, por ejemplo, quitosano, PEG, poloxámeros, tales como Pluronic, hidrogeles basados en
 ácido hialurónico, hidrogel de poli(óxido de etileno) (PEO) y sulfatos de heparina.
- Se pueden cultivar células de varios tipos en todo el almacén de dióxido de titanio recubierto con hidrogel. Más
 precisamente, los tipos de células incluyen células madre hematopoyéticas o mesenquimatosas, y también incluyen
 células que producen tejido cardiovascular, muscular o cualquier tejido conjuntivo. Las células pueden ser de origen
 humano o de otro animal. Sin embargo, el almacén de dióxido de titanio recubierto con hidrogel es especialmente
 adecuado para el crecimiento de células osteogénicas, células precursoras de huesos, células progenitoras, células
 madre, células pluripotentes, células multipotentes, células vasculares (endoteliales), especialmente células que
 elaboran la matriz ósea. Para la ingeniería de tejidos, las células pueden ser de cualquier origen. Las células son
 ventajosamente de origen humano. Un método de cultivar células en un almacén de dióxido de titanio recubierto con
 hidrogel permite que las células osteogénicas sembradas, por ejemplo, penetren en el almacén de dióxido de titanio
 para elaborar la matriz ósea, durante la etapa *in vitro*, con una distribución penetrante en la estructura del almacén
 de dióxido de titanio. La penetración celular osteogénica y, como resultado, la elaboración de matriz ósea puede ser
 aumentada por medios mecánicos, ultrasónicos, electrónicos o un campo eléctrico.
- El almacén de dióxido de titanio recubierto con hidrogel es útil cada vez que se necesita una estructura para actuar
 como un marco para el crecimiento de células, tal como para la regeneración de un tejido. El almacén de dióxido de
 titanio recubierto con hidrogel es particularmente útil para la regeneración de estructuras de huesos y cartílagos.
 Ejemplos de situaciones en las que puede ser necesaria la regeneración de dichas estructuras incluyen
 traumatismos, extirpación quirúrgica de huesos o dientes o en relación con la terapia del cáncer.
- Ejemplos de estructuras en un sujeto en el que pueden ser reemplazadas total o parcialmente incluyen, aunque sin
 limitación: huesos craneofaciales, incluyendo el arco cigomático, huesos del oído interno (en particular, el martillo, el
 estribo y el yunque, arco dentoalveolar maxilar y mandibular, paredes y suelo de las órbitas de los ojos, paredes y el
 suelo de los senos nasales, los huesos del cráneo y defectos en los huesos del cráneo, cavidad ósea de la
 articulación de la cadera (*Fossa acetabuli*), p. ej. en el caso de las displasias de las articulaciones de las caderas,
 fracturas complicadas de los huesos largos incluyendo (aunque sin limitación) húmero, radio, cúbito, fémur, tibia y
 peroné, vértebras, huesos de manos y pies, huesos de dedos y pies, rellenos de cavidades de extracción (de
 extracciones de piezas dentales), reparación de defectos periodontales y reparación de defectos de perimplantes.
 Además, el almacén de dióxido de titanio recubierto con hidrogel es útil para el relleno de todos los tipos de defectos
 óseos resultantes de (la eliminación de) tumores, cánceres, infecciones, traumatismos, cirugía, malformaciones
 congénitas, enfermedades hereditarias, enfermedades metabólicas (por ejemplo, osteoporosis y diabetes).
- El almacén de dióxido de titanio recubierto con hidrogel preparado por el método descrito o un implante médico que
 comprende dicho almacén se puede utilizar para la regeneración, reparación, sustitución y/o restauración de tejidos,
 tal como hueso. Esta invención se refiere también, por tanto, al almacén de dióxido de titanio recubierto con hidrogel
 o un implante médico que lo comprende para su uso para la regeneración, reparación, sustitución y/o restauración
 de tejidos, tal como hueso.
- El almacén de dióxido de titanio recubierto con hidrogel obtenible o obtenido por el método de la presente invención
 se puede usar también para la preparación de un implante médico para la regeneración, reparación, sustitución y/o
 restauración de tejidos, tal como hueso. El almacén de dióxido de titanio recubierto con hidrogel se puede usar
 también para la preparación de un implante médico para la regeneración, reparación, sustitución y/o restauración de
 tejidos, tal como hueso.

El almacén de dióxido de titanio recubierto con hidrogel obtenible u obtenido por el método de la presente invención o un implante médico que lo comprende se puede usar también en un método para la regeneración, reparación, sustitución y/o restauración de tejidos que comprende la implantación en un sujeto que lo necesite del almacén o implante médico que comprende dicho almacén de dióxido de titanio recubierto con hidrogel.

5 Sustancias biológicamente activas (biomoléculas)

Como se mencionó anteriormente, la solución de hidrogel y/o la solución de catión divalente pueden comprender uno o más tipos diferentes de sustancia(s) biológicamente activa(s). Por tanto, la(s) sustancia(s) biológicamente activa(s) se puede(n) incorporar en el recubrimiento de hidrogel. Por consiguiente, el recubrimiento de hidrogel puede actuar como un vehículo para una sustancia biológicamente activa y consiguientemente las sustancias biológicamente activas ser administradas por el almacén de dióxido de titanio recubierto con alginato por medio del recubrimiento de hidrogel. El recubrimiento de hidrogel puede comprender un tipo de sustancia biológicamente activa o una mezcla de dos o más sustancias biológicamente activas. Como se ha mencionado anteriormente, cuando el recubrimiento de hidrogel se prepara repitiendo las etapas b) y c) del método que se describe en esta memoria, las diferentes capas pueden comprender diferentes sustancias biológicamente activas.

La sustancia biológicamente activa puede ser cualquier sustancia que tenga una actividad biológica en el cuerpo, tal como una molécula bioactiva sintética o natural, un fármaco natural o sintético y/o una célula viva. También se pueden incorporar iones Inorgánicos, biológicamente activos, tales como calcio, cromo, fluoruro, oro, yodo, potasio, magnesio, manganeso, selenio, azufre, estaño, sodio, zinc, estroncio, nitrato, nitrito, fosfato, cloruro, sulfato, carbonato, carboxilo u óxido.

La sustancia biológicamente activa también puede ser una célula. Ejemplos de células vivas para su incorporación en el recubrimiento de hidrogel incluyen, aunque sin limitación, células madre mesenquimatosas, células óseas, células pluripotentes, células precursoras de huesoso, células vasculares, células vasculares precursoras y/o células estromales.

Ejemplos de sustancias biológicamente activas incluyen también, aunque sin limitación, bioadhesivos naturales o recombinantes; factores de fijación a células naturales o recombinantes; biopolímeros naturales, recombinantes o sintéticos; proteínas de la sangre naturales o recombinantes; enzimas naturales o recombinantes; proteínas de la matriz extracelular naturales o recombinantes; biomoléculas de la matriz extracelular naturales o sintéticas; moléculas de señal, factores de crecimiento y hormonas naturales o recombinantes; péptidos naturales, recombinantes y sintéticos, hormonas peptídicas sintéticas; ácidos desoxirribonucleicos naturales, recombinantes o sintéticos; ácidos ribonucleótidos naturales, recombinantes o sintéticos; receptores naturales o recombinantes; inhibidores de enzimas; fármacos; aniones y cationes biológicamente activos; vitaminas; monofosfato de adenosina (AMP), difosfato de adenosina (ADP) o trifosfato de adenosina (ATP); biomoléculas marcadoras; aminoácidos; ácidos grasos; nucleótidos (bases de RNA y DNA), azúcares, sustancias antimicrobianas, tales como tetraciclinas, y pequeñas moléculas orgánicas biológicas, tales como estatinas y/o bifosfonatos.

Los péptidos y las proteínas adecuados para incorporación en el recubrimiento de hidrogel, en particular, incluyen péptidos y proteínas que se sabe afectan al crecimiento celular y/o a las osteointegración de implantes. Se ha demostrado que un cierto número de péptidos naturales inducen la precipitación de minerales y pueden ser por lo tanto adecuadamente incorporados en el recubrimiento de hidrogel. Los ejemplos incluyen colágeno 1 y 2, amelogenina, ameloblastina, sialoproteína ósea, enamelina y ansocalcina. La deposición y crecimiento de apatitas en los tejidos mineralizados endoesqueléticos es un proceso guiado por proteínas ricas en poliprolina. Las repeticiones de poliprolina son una característica común de las proteínas de la matriz extracelular de los tejidos duros, desempeñando un papel en la compactación de la matriz de proteínas, la variabilidad conformacional, la longitud de cristales de apatita y unión a dominios de proteínas implicados frecuentemente en episodios de señalización. Por ejemplo, el derivado de la matriz del esmalte (abreviadamente en lo sucesivo EMD por la expresión inglesa *Enamel Matrix Derivative*) es un extracto de material de dientes fetales de porcino usado para estimular biomiméticamente el crecimiento de tejido blando y duro. También se ha demostrado que el EMD tiene una diversidad de otras actividades biológicas, tales como la inhibición de la inflamación e infección. Un producto comercial que comprende EMD es Straumann®Emdogain (Straumann AG, Peter Merian-Weg 12, CH 4052 Basilea, Suiza). El EMD contiene una gran cantidad de amelogenina, que es una proteína que se puede incorporar adecuadamente en la matriz de hidrogel, como se ha mencionado anteriormente.

Otros ejemplos de péptidos adecuados para la incorporación en el recubrimiento de hidrogel incluyen péptidos basados en los péptidos de consenso descritos en la solicitud de patente internacional WO 2008/078167, que inducen la biomineralización.

Los péptidos P2 (SEQ ID NO 1), P5 (SEQ ID NO 2) y P6 (SEQ ID NO 3), utilizados en el apartado experimental, son ejemplos de péptidos basados en las secuencias de consenso del documento WO 2008/078167 que se pueden incorporar adecuadamente en el recubrimiento de hidrogel. Otros ejemplos de tales secuencias son: P1 (SEQ ID NO 4: PLV PSY PLV PSY PLV PSY PYP PLPP), P3 (SEQ ID NO 5: PLV PSQ PLV PSQ PLV PSQ PQP PLPP) y P4 (SEQ ID NO 6: PLV PCC PLV PLV PCC PLV PCC PCP PLPP).

La velocidad de difusión de sustancias biológicamente activas, incorporadas opcionalmente en el recubrimiento de hidrogel se ve afectada por el peso molecular y el tamaño de las sustancias biológicamente activas (definidos por radios de Stokes) en comparación con los poros del recubrimiento de hidrogel y depende de la naturaleza química de la sustancia biológicamente activa (interacciones molécula-hidrogel, la polarización, es decir, las sustancias hidrófilas pueden difundirse muy rápidamente mientras que las sustancias hidrófobas se difunden lentamente a través del gel de hidrogel). Se puede encontrar en un sujeto un perfil de liberación por ráfagas de la sustancia biológicamente activa durante el primer día o primeros días después de la implantación del almacén de dióxido de titanio recubierto con hidrogel para una sustancia biológicamente activa más pequeña, tales como los péptidos utilizados en el apartado experimental de este memoria. Ajustando el tamaño de los poros del recubrimiento de hidrogel (véase anteriormente) y teniendo en cuenta las propiedades de la sustancia biológicamente activa (tales como, peso molecular, forma, polaridad etc.) se puede ajustar la velocidad de liberación de una sustancia biológicamente activa incorporada.

La sustancia biológicamente activa puede ser típicamente una sustancia que promueve la integración del almacén de dióxido de titanio en un sujeto.

La concentración de la sustancia biológicamente activa en el hidrogel es típicamente del orden de microgramos, aunque puede variar desde 1 ng/mL-100 mg/mL, tal como 50 ng/mL /50 mg/mL, 100 ng/mL-50.000 ng/mL. Por supuesto, la concentración de la sustancia biológicamente activa en el hidrogel dependerá de la sustancia específica, su función prevista en un sujeto etc.

El almacén de dióxido de titanio

El almacén de dióxido de titanio de la presente invención es un almacén reticulado que puede funcionar como soporte estructural que permite la formación de tejido creando un espacio tridimensional para la fijación y crecimiento hacia dentro de las células. El dióxido de titanio del almacén proporciona un almacén que es biocompatible y al que se le puede dar diferentes formas para proporcionar soporte mecánico y un marco para el crecimiento celular. Por lo tanto, el almacén de dióxido de titanio proporciona una estructura adecuada para ser utilizada en la ingeniería de tejidos, tal como la regeneración de huesos.

El almacén de dióxido de titanio adecuado para uso en el contexto de la presente invención es un almacén formado básicamente de dióxido de titanio, es decir, el dióxido de titanio es el principal componente estructural del almacén de dióxido de titanio. El almacén de dióxido de titanio debe adoptar una estructura de poros abiertos.

El almacén de dióxido de titanio es típicamente un almacén macroporoso que comprende macroporos e interconexiones. Los macroporos del almacén de dióxido de titanio tienen un diámetro de poros en el intervalo entre aproximadamente 10-3000 μm , tal como 20-2000 μm , aproximadamente 30-1500 μm o aproximadamente 30-700 μm . Es importante que el almacén de dióxido de titanio permita el crecimiento hacia dentro de las estructuras más grandes, tales como los vasos sanguíneos y hueso trabecular, es decir, también comprende poros con un diámetro de aproximadamente 100 μm o más. Es importante que al menos algunos de los poros estén interconectados y/o parcialmente interconectados.

El diámetro de los poros puede afectar a la velocidad y grado de crecimiento de las células en el almacén de dióxido de titanio y por tanto, a la constitución del tejido resultante. El sistema macroporoso ocupa normalmente al menos 50% del volumen del almacén de dióxido de titanio. El volumen de los macroporos y microporos en los almacenes de dióxido de titanio puede variar dependiendo de la función del almacén de dióxido de titanio. Si el objetivo de un tratamiento es reemplazar mucha estructura ósea y el almacén de dióxido de titanio se puede mantener sin carga durante el tiempo de curado, el almacén de dióxido de titanio puede estar hecho con un sistema macroporoso que ocupe hasta 90% del volumen total de almacén.

El almacén de dióxido de titanio tiene típicamente una porosidad total de aproximadamente 40-99%, tal como 70-90%.

El puntal de dimensión fractal del almacén de dióxido de titanio es típicamente de aproximadamente 2,0-3,0, tal como de aproximadamente 2,2-2,3. El espesor del puntal afecta a la resistencia de los almacenes de dióxido de titanio, mientras más gruesos son los puntales del almacén de dióxido de titanio más resistente es el almacén de dióxido de titanio.

El almacén de dióxido de titanio tiene normalmente un volumen del puntal interno de aproximadamente 0,001-3,0 μm^3 , tal como aproximadamente 0,8-1,2 μm^3 . Cuanto menor sea el volumen y mayor el número fractal se tiene un almacén más resistente.

Los expertos en la técnica entenderán que la superficie del almacén de dióxido de titanio tiene una estructura en los niveles microscópico y nanoscópico. Esta estructuras microscópica y nanoscópica se puede modificar por las condiciones de fabricación. Los diámetros de poros en el nivel microscópico están típicamente en el intervalo de 1-10 μm . Los diámetros de poros en nivel nanoscópico son típicamente menores de 1 μm .

Una estructura de almacén de dióxido de titanio en el presente contexto tiene típicamente un diámetro de microporos y macroporos combinados de aproximadamente 10-3000 μm , tal como desde 20-2.000 μm , 30-1500 μm o 30-700 μm . El diámetro de poros también puede ser superior a 40 μm , con poros interconectados de al menos 20 μm .

- 5 El tamaño y la forma del almacén de dióxido de titanio se deciden dependiendo de su uso previsto. El tamaño y la forma del almacén de dióxido de titanio se pueden ajustar, ya sea en la etapa de producción o por modificación posterior de un almacén preparado. Los almacenes de dióxido de titanio, por tanto, pueden ser adaptados fácilmente para su uso específico en un sujeto específico. Normalmente, el tamaño, la forma, etc., del almacén de dióxido de titanio se ajusta antes de ser recubierto con un recubrimiento de hidrogel.
- 10 Típicamente, el almacén de dióxido de titanio se puede producir por un método de inmersión de una estructura de esponja de polímero en una suspensión de dióxido de titanio (véanse, por ejemplo los métodos descritos en la solicitud de patente internacional WO/08078164, permitiendo que la suspensión solidifique sobre la esponja y realizando una o más etapas de sinterización para eliminar la esponja y crear una estructura de almacén fuerte. Por tanto, el almacén de dióxido de titanio puede ser, por ejemplo, un almacén de dióxido de titanio descrito en la
- 15 solicitud de patente internacional WO/08078164. Dicho método puede incluir las etapas de:
- a) preparar una suspensión de dióxido de titanio,
 - b) proporcionar la suspensión de la etapa a) a una estructura porosa combustible, tal como una estructura de polímero poroso, tal como una estructura de esponja
 - c) permitir que la suspensión solidifique sobre la estructura porosa combustible,
 - 20 d) eliminar la estructura porosa combustible de la suspensión de dióxido de titanio solidificada, en donde la etapa d) se puede realizar por :
 - i) sinterización lenta de la estructura porosa combustible con la suspensión de óxido de metal solidificada hasta aproximadamente 500°C y mantenimiento de esta temperatura durante al menos 30 minutos,
 - 25 ii) sinterización rápida hasta aproximadamente como mínimo 1.500°C o hasta aproximadamente 1.750°C a aproximadamente 3°K/minuto y mantenimiento de esta temperatura durante al menos 10 horas, y
 - iii) enfriamiento rápido hasta la temperatura ambiente por lo menos a 3°K /minuto.

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Apartado experimental

30 Ejemplo 1: Ejemplo de referencia: Preparación de hidrogel de alginato con y sin sustancia biológicamente activa.

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos de péptidos sintéticos ricos en prolina.

Péptido	Secuencia (Extremo N a Extremo C)	AA polares	AA hidrófobos
P2 (SEQ ID NO 1)	PLVPSQPLVPSQPLVPSQPPLPP	7 (S, Q)	18 (P, L, V)
P5 (SEQ ID NO 2)	PLVPSSPLVPCCLVPCCPSPPLPP	3 (S)	22 (P, L, V, C)
P6 (SEQ ID NO 3)	PHQPMQPQPPVHPMQPLPPQPPLPP	7(H,Q)	18 (P, M, V, L)
Aminoácidos (AA); péptido 2 (P2); péptido 5 (P5); péptido 6 (P6); S = Ser; P = Pro; L = Leu; V = Val; Q = Gln; M = Met; H = His; C = Cys.			

1. Materiales y métodos

35 1.1. Preparación de péptidos y derivados de la matriz de esmalte

El derivado de la matriz del esmalte (EMD) fue amablemente suministrado por Straumann GmbH (Basilea, Suiza). El EMD se disolvió hasta 10 mg/mL en ácido acético al 0,1% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria). Se diseñaron tres péptidos sintéticos (Tabla 1) como se describe con detalle en estudios anteriores (Rubert M. *et al.*, 2011).

Los péptidos fueron adquiridos a Eurogentec (Seraing, Bélgica). Los péptidos sintéticos se disolvieron hasta 5 o 10 mg/mL (en el caso del péptido 2 marcado con FITC) en ácido acético al 0,1% en PBS. Se prepararon partes alícuotas para evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación y se conservaron a -20°C hasta su uso.

1.2. Preparación de hidrogeles de alginato

5 El alginato de sodio (Pronova UP LVG®) - un alginato de baja viscosidad en donde un mínimo del 60% de los monómeros son guluronato - se adquirió a NovaMatrix (FMC BioPolímer AS, Noruega), El alginato de sodio se utilizó sin purificación adicional. Se preparó alginato de sodio al dos por ciento (p/v) en PBS y se agitó a 180 rpm a temperatura ambiente durante una noche hasta obtener un hidrogel de alginato homogéneo. La solución de alginato se mezcló con los péptidos sintéticos o EMD a una concentración final de 50 µg/mL. La solución de alginato que
10 contenía péptidos sintéticos/EMD se distribuyó a continuación en una placa de cultivo de 24 pocillos y se pulverizó con CaCl₂ 300 mM por medio de un atomizador de pintura con aerógrafo (Precisso®, Madrid, España). Después de 1-2 horas de incubación a temperatura ambiente el hidrogel de alginato estaba completamente gelificado.

1.3. Caracterización de la morfología del hidrogel de alginato por microscopía electrónica de barrido

15 Se observaron las morfologías de hidrogeles de alginato al 2% de control y de hidrogeles de alginato al 2% que contenían el péptido sintético 2 (50 µg/mL) usando un microscopio electrónico de barrido (SEM, Hitachi S-3400N, Hitachi High-Technologies Europe GmbH, Krefeld, Alemania). Se observó la microestructura de los hidrogeles de alginato (no liofilizados y liofilizados). Para la liofilización de los hidrogeles de alginato las muestras se congelaron a -80°C seguido de liofilización a -35°C. Luego las muestras se congelaron en N₂ para permitir un corte muy preciso en secciones transversales utilizando un escalpelo afilado. Las estructuras de los hidrogeles de alginato se observaron con 25 y 100 aumentos utilizando 10 kV y 40 Pa. Se utilizó un detector de electrones secundarios del ambiente
20 (abreviadamente en lo sucesivo ESED por la expresión inglesa *Environmental Secondary Electron Detector*) para imágenes de 25 aumentos y se utilizó un detector de electrones retrodispersados (abreviadamente BSED por la expresión inglesa *Backscattered Electron Detector*) para las imágenes de 100 aumentos. El diámetro de cada poro se midió usando el programa informático del SEM, Hitachi S-3400N.

1.4. Perfil de liberación de péptidos

25 JPara estudiar el perfil de liberación de péptidos, se marcó P2 con FITC. La liberación del péptido contenido en el hidrogel de alginato al 2% (50 µg/mL) se cuantificó por espectroscopia de fluorescencia. En primer lugar, los hidrogeles de alginato se lavaron con medio de cultivo para eliminar el exceso de CaCl₂. Luego se añadieron 750 µL de medio de cultivo celular al hidrogel de alginato cargado con el péptido. Las muestras se incubaron a 37°C y CO₂ al 5% durante 21 días y se cambió dos veces por semana el medio de cultivo celular. En puntos de tiempo prefijados (24 h, 4 d, 7 d, 11 d, 14 d, 18 d y 21 d), se recogieron los líquidos sobrenadantes y se analizaron por espectroscopia de fluorescencia (λ de excitación 490 nm y λ de emisión 525 nm) para determinar la cantidad de péptido liberado al medio. También se midió la cantidad de péptido liberado durante la etapa de lavado. El experimento se realizó tres veces, y cada muestra se analizó por triplicado.

35 Las unidades de fluorescencia relativa se correlacionaron con la cantidad de péptido liberado utilizando una curva patrón lineal para cada punto de tiempo.

1.5. Cultivo de células MC3T3-E1.

40 La línea celular osteoblástica de ratón MC3T3-E1 (DSMZ, Braunschweig, Alemania) se mantuvo como se ha descrito anteriormente (Tiainen H. et al., 2011). Antes de la siembra, placas de cultivo de 24 pocillos que contenían hidrogeles de alginato reticulados se lavaron con 750 µL de medio de cultivo para eliminar el exceso de CaCl₂. Después de la evaluación de la eficiencia de la adhesión celular sobre gel de alginato al 2% usando diferentes densidades de células, para los experimentos finales, las células se sembraron a una densidad de 100.000 células/pocillo. El medio se renovó dos veces por semana. El medio de cultivo se recogió 24 horas después de la siembra para estudiar la viabilidad celular. Las células se recogieron los días 14 y 21 para analizar la expresión de los genes de adhesión y los marcadores relacionados con la osteogenia utilizando RT-PCR en tiempo real. Los cultivos se observaron rutinariamente utilizando microscopía óptica (Leica DMIRB, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Alemania).

1.6. Adhesión de las células a gel de alginato al 2%

50 Se evaluó la adhesión de células sobre el hidrogel de alginato uno y cinco días después de la siembra con el fin de determinar la mejor densidad de siembra para los experimentos. Se analizaron densidades de 30×10^4 a 200×10^4 células/pocillo. Las células que se adhirieron sobre el hidrogel de alginato se lisaron por un método de congelación-descongelación en agua destilada desionizada. Los lisados celulares se utilizaron para la determinación de la cantidad de DNA utilizando el ensayo de fluorescencia Hoechst 33 258. Las muestras se mezclaron con 20 µg/mL de colorante fluorescente Hoechst 33 258 (Sigma, St. Quentin Fallavier, Francia) en tampón TNE, y la intensidad de la fluorescencia se midió a longitudes de onda de excitación y emisión de 356/465 nm utilizando un lector de microplacas multifuncional (Cary Eclipse Fluorescence Spectromephotometer, Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos). Las unidades de fluorescencia relativa se correlacionaron con el número de células utilizando una curva patrón lineal.

5 Las células MC3T3-E1 adheridas sobre los hidrogeles de alginato después de uno y cinco días de cultivo se visualizaron por microscopía confocal (Leica TCS SPE Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemania). En resumen, las células sembradas sobre los hidrogeles de alginato se fijaron con formaldehído al 4% en PBS a 4°C durante 10 minutos. Para la tinción, las células se permeabilizaron en Triton al 0,2% y el material autofluorescente se bloqueó con BSA al 3% en PBS. El citoesqueleto de las células se tiñó usando 5 µg/mL de FITC-faloidina (Sigma, St. Quentin Fallavier, Francia) y los núcleos con DAPI (Sigma, Schnellendorf, Alemania). Además, se observó la adhesión celular y la unión de 100×10^3 células sembradas inicialmente sobre hidrogeles de alginato al 2% después de la fijación de células con formaldehído al 4% en PBS a 4°C durante 10 minutos, seguido por la visualización usando SEM y ESED a 10 kV, 200 aumentos y 40 Pa.

10 1.7. Viabilidad celular

La actividad de la LDH determinada en el medio de cultivo después de 24 horas fue tomada como un indicador de fugas por membranas o lisis celular. La actividad de la enzima citosólica se estimó como se ha descrito previamente (Rupert M *et al.*, 2011).

Tabla 2. Secuencia de genes relacionados con marcadores de osteoblastos.

Gen	Secuencia del cebador
18S	S 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3' (SEQ ID NO 7)
	A 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3' (SEQ ID NO 8)
GAPDH	S 5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3' (SEQ ID NO 9)
	A 5'-CACATTGGGGGTAGGAACAC-3' (SEQ ID NO 10)
<i>Itga8</i>	S 5'-TCGCCTGGGAGGAGGCGAAA-3' (SEQ ID NO 11)
	A 5'-TCTTAACCGCTGTGCTCCCCG-3' (SEQ ID NO 12)
<i>Itgb1</i>	S 5'-AGCAGGCGTGGTTGCTGGAA-3' (SEQ ID NO 13)
	A 5'-TTTCACCCGTGTCCCACTTGGC-3' (SEC ID N° 14)
<i>Itgb3</i>	S 5'-AGGGGAGATGTGTTCCGGCCA-3' (SEQ ID NO 15)
	A 5'-ACACACAGCTGCCGCACTCG-3' (SEQ ID NO 16)
<i>Fn1</i>	S 5'-GCTGCCAGGAGACAGCCGTG-3' (SEQ ID NO 17)
	A 5'-GTCTTGCCGCCCTTCGGTGG-3' (SEQ ID NO 18)
<i>Bmp2</i>	S 5'-GCTCCACAAACGAGAAAAGC-3' (SEQ ID NO 19)
	A 5'-AGCAAGGGGAAAAGGACT-3' (SEQ ID NO 20)
<i>Coll-I</i>	S 5'-AGAGCATGACCGATGGATTC-3' (SEQ ID NO 21)
	A 5'-CCTTCTTGAGGTTGCCAGTC-3' (SEC ID N° 22)
<i>Bsp</i>	S 5'-GAAAATGGAGACGGCGATAG-3' (SEQ ID NO 23)
	A 5'-ACCCGAGAGTGTGGAAAGTG-3' (SEQ ID NO 24)
<i>Alp</i>	S 5'-AACCCAGACACAAGCATTTC-3' (SEQ ID NO 25)

Gen	Secuencia del cebador
	A 5'-GAGAGCGAAGGGTCAGTCAG-3' (SEQ ID NO 26)
Oc	S 5'-CCGGGAGCAGTGTGAGCTTA-3' (SEQ ID NO 27)
	A 5'-TAGATGCGTTTGTAGGCGGTC -3' (SEQ ID NO 28)
Opn	S 5'-TCTGCGGCAGGCATTCTCGG-3' (SEQ ID NO 29)
	A 5'-GTCACCTTCACCGGGAGGGAGGA-3' (SEC ID N° 30)

1.8. Aislamiento de RNA total y expresión de genes de marcadores de osteoblastos por RT-PCR en tiempo real

El efecto de los péptidos sintéticos y EMD cargados en hidrogeles de alginato sobre la expresión génica se estudió después de 14 y 21 días de tratamiento sobre células MC3T3-E1 pre-osteoblastos.

- 5 El RNA total se aisló usando Tripure® (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), de acuerdo con el protocolo del fabricante. El RNA total se cuantificó a 260 nm usando un espectrofotómetro Nanodrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.).

10 La misma cantidad de RNA (350 ng) se transcribió de forma inversa a cDNA utilizando el kit de alta capacidad RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, Foster City, CA), según el protocolo del proveedor. Las partes alícuotas de cada cDNA se congelaron (-20°C) hasta que se llevaron a cabo las reacciones de PCR.

15 La PCR en tiempo real se realizó en el LightCycler 480® (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) usando detección con verde SYBR. La PCR en tiempo real se llevó a cabo para dos genes de referencia (18SrRNA y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH)) y diez genes diana (integrina alfa 8 (*Itga8*), integrina beta 1 (*Itgb1*), integrina beta 3 (*Itgb3*), fibronectina 1 (*Fn1*), proteína morfogenética ósea 2 (*Bmp2*), colágeno tipo I (*Coll-I*), sialoproteína ósea (Bsp), fosfatasa alcalina (*Alp*), osteocalcina (*Oc*) y osteopontina (*Opn*)).

Las secuencias de los cebadores se detallan en la Tabla 2. Las condiciones de reacción y la cuantificación relativa se han realizado como se ha descrito previamente (Tiainen H *et al.*, 2011).

1.9. Análisis estadístico

20 Todos los datos se presentan como valores medios \pm EEM. Las diferencias entre grupos se evaluaron por el ensayo de Mann-Whitney o por la prueba *t* de Student dependiendo de su distribución normal. Para medir la correlación entre las diferentes variables, se utilizó el análisis de correlación de Pearson. Se utilizó el programa SPSS® para Windows (Chicago, IL) versión 17.0. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos a valores de *p* \leq 0,05.

Resultados

25 Microestructura de alginatos

30 La figura 1 muestra la microestructura de una sección transversal de un hidrogel de alginato al 2% liofilizado (Figuras 1A) y B)) e hidrogel de alginato al 2% que contenía péptido sintético (Figuras 1C) y D)). Como se ve en las imágenes de SEM, aunque el hidrogel de alginato que contenía el péptido sintético mostró una estructura más irregular que el hidrogel de alginato al 2%, en todos los geles analizados se observó una estructura porosa e interconectada. Ambos hidrogeles reticulados presentaban una estructura porosa e interconectada con un diámetro de poros de $42,9 \pm 3,5 \mu\text{m}$ y $44,7 \pm 4,1 \mu\text{m}$, para hidrogel de alginato al 2% sin o con péptido sintético, respectivamente.

Administración de péptidos desde hidrogel de alginato al 2%

35 El perfil de liberación de péptido desde hidrogeles de alginato al 2% se representa en la Figura 2. Se observó una liberación por ráfagas del péptido durante las primeras 24 horas de incubación (54,67%). Además, como se ve en el perfil de liberación acumulativa, 25,8% de péptido se liberó lentamente hasta 11 días, seguido por una liberación prolongada en el tiempo hasta 21 días. Al final del experimento (después de 21 días) no había sido liberado el 5,6% del péptido total teóricamente contenido en el hidrogel de alginato. Debe señalarse que 12,7% del péptido cargado se liberó durante la etapa de lavado de los hidrogeles de alginato con medio de cultivo para eliminar el exceso de CaCl_2 .

40 Adhesión y proliferación de células

Se observó una baja velocidad de adhesión celular sobre los hidrogeles de alginato, ya que más de la mitad de las células sembradas no se adhirió al gel después de la siembra. Sin embargo, las células se fijaron al hidrogel de alginato y proliferaron sobre el cultivo celular (Figura 3). Además, las células se visualizaron por microscopía confocal con el fin de verificar la capacidad de los osteoblastos de fijarse y extenderse sobre superficies de hidrogeles de alginato. Las imágenes confocales muestran un aumento en el número de núcleos acompañado por un aumento en la tinción con actina, tanto en número de células sembradas como en aumento desde el día 1 hasta el día 5 (Figuras 3A)-H)). Por otra parte se apreciaron por SEM filopodios celulares de osteoblastos cultivados sobre el hidrogel de alginato

Efecto de hidrogel de alginato cargado con péptidos sintéticos sobre la viabilidad celular

No se encontraron efectos tóxicos en células cultivadas sobre hidrogeles de alginato que contenían péptidos sintéticos, tanto después de 24 horas (Figura 4) como después de un periodo a largo plazo (datos no mostrados). P2 aumentó significativamente la viabilidad celular después de 24 horas en comparación con EMD, mientras que P5 mostró efectos tóxicos significativamente menores en comparación con EMD y gel de alginato sin tratar.

Efecto del hidrogel de alginato cargado con péptidos sintéticos sobre la expresión génica de marcadores de la adhesión celular.

La expresión de *Itga8* aumentó en las células tratadas con P5 en comparación con el control después de 21 días de cultivo (Figura 5A)). Los niveles de mRNA de *Itgb1* se redujeron significativamente después del tratamiento con P2 y P6 durante 14 días en comparación con el control. Después de 21 días, las células tratadas con P6 redujeron significativamente los niveles de mRNA de *Itgb1* en comparación con EMD (Figura 5B)). *Itgb3* y *Fn1* disminuyeron significativamente después de 14 días de tratamiento con P2 y P6 en comparación con el control (Figuras 5C) y D)), y no se observaron diferencias después de 21 días.

Efecto del hidrogel de alginato cargado con péptidos sintéticos sobre la expresión génica de marcadores de osteoblastos

Los niveles relativos de mRNA de *Bmp2* aumentaron significativamente después de 14 días de tratamiento con P6, mientras que disminuyeron después de 21 días de tratamiento con P2 en comparación con EMD. Aunque el tratamiento con EMD indujo una disminución significativa de los niveles de mRNA de *Bmp2* después de 14 días de cultivo celular en comparación con el control, se encontró un aumento en los niveles de mRNA de *Bmp2* después de 21 días, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística (Figura 6A)).

La expresión del gen *Col1* disminuyó significativamente después de 14 días de tratamiento con cualquiera de los péptidos sintéticos en comparación con el control (Figura 6B)). No se encontraron diferencias en los niveles de mRNA de *Bsp* entre los distintos tratamientos (Figura 6C). Los niveles de mRNA de *Alp* disminuyeron significativamente después del tratamiento con P6 durante 14 días y 21 días y con P2 después de 21 días de tratamiento en comparación con el control (Figura 6D)). Después de 14 días de cultivo de células, se detectaron aumentos de niveles de mRNA de *Oc* en células cultivadas sobre gel de alginato al 2% y que contenían péptidos sintéticos en comparación con las células tratadas con EMD. Después de 21 días, las células tratadas con P5 o P6 aumentaron los niveles de mRNA de *Oc* en comparación con el control (Figura 6 E)). La expresión de *Opn* disminuyó significativamente después de 14 días de cultivo con P2 y P6 en comparación con el control. Después de 21 días, los niveles de mRNA de *Opn* aumentaron significativamente con cualquiera de los péptidos sintéticos y EMD en comparación con el control. El tratamiento con EMD aumentó notablemente los niveles de expresión de mRNA de *Opn* en comparación con el tratamiento con P2 y P6 (Figura 6F)).

Discusión

Se ha demostrado previamente que los péptidos sintéticos ricos en poliprolina induce la formación y la mineralización óseas *in vitro* y disminuyen la resorción ósea *in vivo*. El objetivo de este estudio fue desarrollar una formulación adecuada con un hidrogel para el tratamiento local con estos péptidos sintéticos para promover la formación y la mineralización óseas, ya sea solas o como un recubrimiento biodegradable para implantes del esqueleto.

En el presente estudio, las células fueron expuestas a gel de alginato que contenía diferentes péptidos sintéticos y cultivadas durante un periodo a largo plazo con el fin de evaluar el efecto de los péptidos sobre la respuesta biológica de los osteoblastos. La formulación óptima del hidrogel tiene que permitir la formación de una estructura compacta para una administración controlada, local y específica de moléculas bioactivas. Tales características están regidas por la propiedad física (por ejemplo mecánica, degradación, formación de gel), la propiedad de transporte de masa (por ejemplo, difusión) y los requisitos de interacción biológica (por ejemplo, adhesión celular y señalización) de cada aplicación específica.

Los estudios anteriores llevados a cabo utilizando gel de alginato (Protanal LF200M, FMC Polymers, Oslo, Noruega) a diferentes concentraciones de polímero (1%, 2%, 3%, 6% y 10%) han demostrado una disminución del tamaño de los poros a medida que aumenta la concentración de polímero, lo que da como resultado la concentración de 2%

como la formulación más prometedora para actuar como vehículo de péptidos. Teniendo esto en cuenta, el hidrogel de alginato al 2% fue reticulado iónicamente con CaCl_2 300 mM y seleccionado como el material de elección.

El análisis por SEM de la microestructura de ambos geles de alginato con y sin péptidos sintéticos después de un proceso de liofilización describió una estructura porosa e interconectada con un diámetro de poros de 42-44 μm ; sin embargo, se observó una estructura compacta con un tamaño de poros de aproximadamente 1 μm de diámetro después del análisis por SEM de geles no liofilizados (datos no mostrados). La velocidad de difusión de las proteínas se ve afectada por el peso molecular y el tamaño de las especies en difusión (definido por los radios de Stokes) en comparación con estos poros y depende de la naturaleza química de la proteína (interacciones molécula-alginato, polarización, es decir, los fármacos hidrófilos pueden difundirse muy rápidamente mientras que los fármacos hidrófobos se difunden lentamente a través de los poros del gel). Debido al hecho de que los péptidos sintéticos utilizados en el presente estudio son péptidos pequeños con una longitud de 25 aminoácidos (peso molecular en el intervalo de 2509,17-2782,34 Da), se debe esperar una velocidad de difusión rápida a través del gel. En consecuencia, en el presente estudio, el péptido cargado en hidrogeles de alginato al 2% presentaba una liberación por ráfagas durante las primeras 24 horas de incubación seguida por una liberación progresiva y prolongada durante el período de 21 días.

También se examinó la eficiencia de gel de alginato para la adhesión y la proliferación celulares puesto que el alginato se ha descrito como un sustrato inerte con insuficiente interacción con proteínas para la fijación a células, y se ha sugerido que las células de mamíferos no pueden interactuar con los hidrogeles de alginato no modificados. De hecho, para obtener una superficie adhesiva altamente específica, la mayoría de los estudios con hidrogel de alginato acoplan covalentemente al polímero una proteína de la matriz extracelular (abreviadamente en lo sucesivo ECM por la expresión inglesa *ExtraCellular Matrix*) completa o una secuencia peptídica capaz de unirse a los receptores celulares. De hecho, algunos estudios han informado que la modificación de alginato con un péptido que contiene RGD promovía la adhesión y expansión celulares, mientras que se observó una adhesión celular mínima sobre hidrogeles de alginato no modificados. Sin embargo, el presente estudio muestra que el hidrogel de alginato no modificado (Pronova UP LVG®) permite la fijación y expansión celulares. Las diferencias entre los estudios descritos parecen ser debidas a la relación descrita entre la composición y pureza de los geles de alginato utilizados y la capacidad de las células para proliferar sobre sus superficies. En el presente estudio el alginato usado contenía un mínimo de 60% de fracciones G, permitiendo por lo tanto, la fijación y expansión celulares. La densidad de siembra óptima para los estudios *in vitro* se evaluó por la cuantificación del DNA. Los resultados mostraron que 100×10^3 células/pocillo era la densidad con mayor eficiencia tanto en la adhesión celular como en la proliferación celular y, por lo tanto, fue la elegida para estudios adicionales. El hidrogel de alginato mostró ser no tóxico para las células MC3T3-E1, presentando algún tipo de efecto protector sobre la viabilidad celular en comparación con células cultivadas sobre plástico para cultivo de tejidos. Además, se validó que los péptidos sintéticos administrados como una formulación de hidrogel no son citotóxicos, de acuerdo con los resultados obtenidos en los estudios anteriores después del tratamiento con células a corto y a largo plazo.

La adhesión estable de células osteoblásticas está mediada en gran parte por integrinas, receptores heterodiméricos compuestos de subunidades α y β que dimerizan en combinaciones específicas e interactúan con las proteínas de la matriz extracelular. Se ha demostrado que los osteoblastos expresan diferentes receptores de integrinas dependiendo del material en el que se cultivan. Además de su papel en la adhesión celular, las integrinas regulan la organización del citoesqueleto y median la transducción de señales, y por lo tanto regulan la expresión de genes que controlan la proliferación, diferenciación y remodelación de la matriz.

Con el fin de investigar si los péptidos sintéticos pueden afectar a la expresión de las integrinas y la adhesión celular sobre los hidrogeles de alginato, se estudiaron los niveles de expresión de mRNA de *Itga8*, *Itgb1*, *Itgb3* y la proteína de la matriz extracelular *Fn1*. La expresión de *Itgb1*, *Itgb3* y *Fn1* disminuyó significativamente después de 14 días de tratamiento con los péptidos sintéticos, especialmente para P2 y P6. La subunidad de $\beta 1$ -integrina se encuentra en los receptores de huesos para el colágeno, mediando la fibronectina y la laminina la adhesión de osteoblastos a ECM, mientras que $\alpha v \beta 3$ -integrina mediaría la adhesión a *Opn* y vitronectina. Es interesante el hallazgo de que la expresión de la $\alpha v \beta 3$ -integrina estimula la proliferación celular e inhibe la mineralización de la matriz en las células osteoblásticas; y que FN - una proteína de la ECM abundante que se une a un gran número de integrinas, incluyendo las subunidades de $\beta 1$ -integrina y $\beta 3$ -integrina -, es así mismo altamente expresada en las primeras etapas de la osteogénesis, mientras que durante la maduración de las células se reduce su acumulación en la matriz. Además, el tratamiento con los péptidos sintéticos aumentó significativamente la expresión de *Itga8* después de 21 días de tratamiento, y marcadamente cuando las células fueron tratadas con P5. Se ha demostrado que *Itga8* interactúa con osteopontina (*Opn*), una proteína segregada por los osteoblastos e implicada en la adhesión y la proliferación celulares, cuya expresión aumenta después de que se ha iniciado la mineralización. En este caso, el análisis de la correlación bilateral de los niveles de expresión del mRNA de *Itga8* y *Opn* mostró una correlación de Pearson de 0,678 ($p < 0,01$). Estos resultados podrían indicar que las células tratadas con los péptidos sintéticos están en una etapa posterior de maduración celular en comparación con el grupo de control, y están en línea con los resultados de la expresión de los marcadores de osteoblastos analizados. Se ha descrito que la secuencia corta de PPXPP en la región del extremo C de los péptidos participa en la actividad de transactivación de factores de transcripción y/o co-activadores. El modo de acción de los péptidos sintéticos podría implicar la interacción con un receptor capaz de influir en las cascadas de señalización intracelular, y que la exposición de sus extremos C que contienen la región rica en prolina (PPLPP) conservada puede ser de importancia en la actividad de señalización de

los péptidos sintéticos. Los péptidos sintéticos muestran la firma de estructuras bien empaquetadas y compactas que carecen de elementos de estructura secundaria, como se esperaba debido al rico contenido en prolinas y exponen su tramo PPLPP de una manera adecuada para las interacciones. Mientras que el péptido 2 y el péptido 6 presentan dos bucles distintos, el péptido 5 tiene diferente topología de bucles que hace posible un contacto entre los extremos C y N. Por lo tanto, el hecho de que estas diferencias estructurales en la accesibilidad del extremo C y la rigidez estructural de esta corta secuencias de consenso (PPXPP) entre diferentes péptidos pudiera afectar a la interacción con un receptor puede explicar la expresión diferencial de genes de adhesión.

Por un lado se encontró que la osteocalcina, el más específico y el último de los marcadores de osteoblastos expresados con un papel en la mineralización, fue inducida significativamente después de 14 y 21 días de tratamiento con los péptidos sintéticos formulados en comparación con gel de alginato no tratado y tratado con EMD, es decir, de acuerdo con los resultados obtenidos cuando se administran en el medio de cultivo. En consecuencia, *Opn*, una sialoproteína producida en diversas etapas de diferenciación con mayores niveles expresados después de que ha sido iniciada la mineralización, fue significativamente sobre-regulada después de 21 días de tratamiento tanto con EMD como con péptidos sintéticos en comparación con el control. Por otro lado, en los puntos de tiempo estudiados, no se observaron diferencias en la expresión de los genes relacionados con la osteogénesis (*Coll-1*, *Bmp2*, *Bsp* y *Alp*), puesto que estos genes están regulados en las etapas más tempranas que la osteocalcina durante la diferenciación de los osteoblastos, principalmente en la fase de proliferación y maduración de la matriz. Es interesante observar que todos los estudios que se han realizado hasta el momento con los péptidos sintéticos han demostrado repetidamente un aumento en los niveles de mRNA de la osteocalcina, tanto *in vitro* como *in vivo*. La relevancia de este marcador se ha demostrado en un reciente estudio *in vivo* (Monjo M. *et al.*, 2012), donde el mejor marcador predictivo para la osteointegración de los implantes de TiO₂ fue entre todos la osteocalcina. Se sugiere que los péptidos sintéticos mejoran las propiedades del hidrogel de alginato para la fijación celular y que las células cultivadas sobre el hidrogel formulado con péptidos sintéticos estaban en una etapa más madura del proceso de diferenciación que las células cultivadas sobre el hidrogel de control y el hidrogel formulado con EMD.

Puede plantearse la hipótesis de que el modo de acción de los péptidos sintéticos podría implicar la interacción con un receptor capaz de influir en las cascadas de señalización intracelular en los estados iniciales de la diferenciación celular para estimular finalmente la diferenciación de los osteoblastos y que la accesibilidad y la rigidez estructural de esta corta secuencia de consenso (PPXPP) puede ser importante en la actividad de señalización de los péptidos sintéticos. Además, a partir de los presentes resultados, se planteó la hipótesis de que los péptidos podrían unirse a las integrinas expresadas sobre la superficie celular, lo que en primer lugar podría aumentar la fijación de los osteoblastos sobre la superficie del hidrogel de alginato y en segundo lugar modularía la expresión de los genes relacionados con el fenotipo de los osteoblastos maduros.

Conclusión

En conclusión, los resultados demuestran que el hidrogel de alginato al 2% es una formulación adecuada para la administración local de péptidos sintéticos ricos en poliprolina, induciendo la expresión de integrina alfa 8, osteopontina y osteocalcina en células MC3T3-E1. Estos hidrogeles de alginato modificados con péptidos pueden representar una nueva generación de vehículos inyectables con una sustancia biológicamente activa para aplicaciones de ingeniería de tejidos óseos y son prometedores para uso como recubrimientos biodegradables para implantes en el esqueleto, tales como armazones de dióxido de titanio.

Ejemplo 2: Preparación de un armazón de dióxido de titanio recubierto con alginato

Materiales y métodos

2.1. Preparación del péptido sintético 2 (P2).

El péptido 2 sintético rico en prolina (P2) (H₂N-PLVPSQPLVPSQPLVPSQPQPPLPP-COOH) (SEQ ID NO 1) fue adquirido a Eurogentec (Seraing, Bélgica). Se suministró un vial que contenía 7,2 mg del péptido sintético seleccionado en forma de pellet liofilizado y se disolvió hasta 10 mg/mL en ácido acético al 0,1% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria).

Se prepararon partes alícuotas para evitar repetir los ciclos de congelación-descongelación y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

2.2. Preparación de alginato al 2% que contiene péptido 2.

El alginato de sodio (Pronova UP LVG®) – un alginato de baja viscosidad en el que un mínimo del 60% de los monómeros son guluronato – fue adquirido a NovaMatrix (FMC BioPolymer AS, Noruega).

El alginato de sodio se utilizó sin más purificación. Se disolvió una cantidad (2%, p/v) de alginato de sodio en agua destilada agitando durante 3 horas a temperatura ambiente para obtener una solución homogénea de alginato. Se añadió una concentración fija (50 µg/mL) de P2 a la solución y se agitó durante 1 hora.

2.3. Fabricación de armazones de TiO₂ recubiertos con alginato al 2% que contiene P2.

Los armazones porosos de TiO₂ se produjeron por replicación de esponjas de polímero como ha sido descrito anteriormente (Tiainen H., *et al.*, 2010), con un tamaño de 9 mm de diámetro y 8 mm de alto. A continuación, los armazones de TiO₂ se recubrieron con una capa de gel de alginato al 2% con o sin P2. En resumen, los armazones de TiO₂ se sumergieron en una solución al 2% de alginato con o sin P2 con agitación a 100 rpm en un agitador orbital (IKA Vibrax VXR basic, Staufen, Alemania) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los armazones se centrifugaron luego a 252 x g durante 1 minuto. Las muestras se sumergieron en CaCl₂ 50 mM durante 1 hora para permitir la gelificación. Los armazones se lavaron entonces con dH₂O para eliminar el exceso de CaCl₂. Finalmente, las muestras se dejaron secar durante una noche a la temperatura ambiente. Los armazones recubiertos con una capa de gel de alginato al 2% (armazón de alginato de control) se utilizaron como grupo de control, mientras que los armazones de TiO₂ no recubiertos (sin alginato, AR) se utilizaron también como grupo de control.

2.4. Perfil de liberación del péptido 2 desde armazones de TiO₂ recubiertos con gel de alginato al 2%.

Armazones de TiO₂ recubiertos con alginato al 2% que contenía el péptido 2 (armazón recubierto con P2-alginato) se colocaron sobre placas de 48 pocillos (Nunc GmbH & Co. KG, Langensfeld, Alemania) que contenían 1 mL de agua destilada (pH 7,4). Con el fin de imitar las condiciones del cultivo celular, las muestras se agitaron en un agitador orbital a 200 rpm (IKA® Schüttler MTS 2, Alemania) durante 6 horas a 37°C y en condiciones de humedad (usando un recipiente de agua destilada). A continuación, las muestras se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada durante 21 días. En los puntos de tiempo prefijados (2d, 5d, 7d, 9d, 12d, 14d, 16d, 19d y 21d), se recogió el agua destilada y se añadió a cada pocillo agua destilada de nueva aportación. Se analizaron las absorbancias de las muestras por un espectrofotómetro UV-Vis (PerkinElmer® Lambda 25 UV/Vis Systems, EE.UU.) a una longitud de onda de 206 nm para determinar la cantidad de péptido liberado. En paralelo, se utilizaron como control armazones de TiO₂ recubiertos con una capa de gel de alginato al 2% para restar los valores de la absorbancia obtenidos a partir de productos de degradación del alginato.

Las unidades de absorbancia relativa se correlacionaron con la cantidad de péptido liberado utilizando una curva patrón lineal para cada punto de tiempo y a continuación se calculó el P2 acumulativo liberado. El experimento se realizó por triplicado.

2.5. Cultivo de células MC3T3-E1 sobre armazones de TiO₂ recubiertos y no recubiertos.

Armazones (AR) de TiO₂ no recubiertos y recubiertos con alginato al 2% con o sin péptido (P2 y control (-)) se colocaron en placas de 48 pocillos (Nunc GmbH & Co. KG, Langensfeld, Alemania.) en condiciones estériles. Las células se sembraron a una densidad de 200.000 células/armazón y se mantuvieron en α -MEM (PAA Laboratories, Pasching, Austria) suplementado con FBS al 10% (PAA Laboratories, Pasching, Austria) y 100 U de penicilina/mL y 100 μ g de estreptomycin/mL (PAA Laboratories, Pasching, Austria). Con el fin de garantizar una distribución homogénea de las células en el interior del armazón, se utilizó un método de siembra agitado (Takahashi Y., *et al.*, 2003). En resumen, después de añadir 1 mL de suspensión celular a los armazones, las placas se agitaron en un agitador orbital (Unitron, Infors HT, Basilea, Suiza) durante 6 horas a 180 rpm a 37°C y en condiciones de humedad. A continuación, las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% durante 21 días. El medio de cultivo (1 mL) se repuso cada dos días.

Se recogió el medio de cultivo después de 48 horas de tratamiento para el ensayo de citotoxicidad (actividad de la LDH).

Para evaluar la capacidad de proliferación celular en este sistema 3D, se estudió también el número de células después de 7 días por cuantificación del DNA usando tinción de Hoechst. En paralelo, se visualizó también la fijación de las células MC3T3-E1 en el armazón por SEM después de 7 y 21 días de cultivo.

La expresión de marcadores relacionados con la maduración de los osteoblastos y la diferenciación después de 7 y 21 días de cultivo celular se evaluaron por RT-PCR en tiempo real.

2.6. Visualización por SEM de armazones de TiO₂ recubiertos con alginato al 2%.

Se observó la morfología de armazones de TiO₂ recubiertos con alginato utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM, Hitachi S-3400N, Hitachi High-Technologies Europe GmbH, Krefeld, Alemania). Se utilizó además el SEM para visualizar la adhesión celular en la estructura del armazón de TiO₂ después de 7 y 21 días de cultivo. En resumen, las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con glutaraldehído al 4% en PBS durante 2 horas. A continuación, se retiró la solución de fijación y las células se lavaron dos veces con agua destilada. A intervalos de 30 minutos, se deshidrataron las células por adición de soluciones de etanol al 50%, 70%, 90% y 100%. Se retiró el etanol y las células se dejaron a temperatura ambiente para que se evaporara el etanol remanente. Se observaron los armazones a 10 kV y 40 Pa utilizando de nuevo un detector de electrones secundarios y retrodispersados. Las imágenes presentadas son de un área representativa.

2.7. Viabilidad celular.

La actividad de la lactato-deshidrogenasa (LDH) determinada en el medio de cultivo después de 48 horas se tomó como un indicador de la supervivencia celular. La actividad de la enzima citosólica se determinó de acuerdo con las instrucciones del kit del fabricante (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

5 Los resultados se presentaron con relación a la actividad de la LDH en el medio de las células cultivadas en armazones no recubiertos, que se fijó en el 100%.

2.8. Determinación del número de células.

10 Células que habían crecido en los armazones 3D se lisaron por un método de congelación-descongelación en agua destilada desionizada. Los lisados celulares se utilizaron para la determinación de la cantidad del DNA utilizando el ensayo de fluorescencia de Hoechst 33258. Las muestras se mezclaron con 20 µg/mL de colorante fluorescente de Hoechst 33258 (Sigma, St. Quentin Fallavier, Francia) en tampón de TNE y se midió la intensidad de la fluorescencia a longitudes de onda de excitación y emisión de 356/465 nm utilizando un lector de microplacas multifuncional (Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer, Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos). Las unidades de la fluorescencia relativa se correlacionaron con el número de células utilizando una curva patrón lineal.

2.9. Aislamiento del RNA y análisis por RT-PCR en tiempo real.

15 El RNA total se aisló usando Tripure® (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), de acuerdo con el protocolo del fabricante. El RNA total se cuantificó a 260 nm usando un espectrofotómetro Nanodrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.). La misma cantidad de RNA total (850 ng) se transcribió inversamente a cDNA a 42°C durante 60 minutos usando un kit de RNA-to-cDNA de alta capacidad (Applied Biosystems, Foster City, CA), de acuerdo con el protocolo del proveedor. Se congelaron partes alícuotas de cada cDNA (-20°C) hasta que se realizaron las reacciones de PCR.

25 Se realizó la PCR en tiempo real en LightCycler 480® (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) usando detección con verde SYBR. La PCR en tiempo real se realizó para dos genes de referencia (18SrRNA y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (*Gapdh*)) y 12 genes diana (integrina alfa 8 (*Itga8*), integrina beta1 (*Itgb1*), integrina beta 3 (*Itgb3*), fibronectina 1 (*Fn1*), osterix (*Osx*), proteína morfogenética ósea 2 (*Bmp2*), colágeno-I (*Coll-I*), interleuquina-6 (*Il-6*), sialoproteína ósea (*Bsp*), fosfatasa alcalina (*Alp*), osteocalcina (*Oc*) y osteopontina (*Opn*)).

Las secuencias de los cebadores se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Secuencias de los cebadores de los genes relacionados con marcadores de osteoblastos utilizados en la PCR en tiempo real.

Gen	Secuencia de los cebadores
18S	S 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3' (SEQ ID NO 7)
	A 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3' (SEQ ID NO 8)
Gapdh	S 5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3' (SEQ ID NO 9)
	A 5'-CACATTGGGGGTAGGAACAC-3' (SEQ ID NO 10)
Itgb1	S 5'-AGCAGGCGTGGTTGCTGGAA-3' (SEQ ID NO 13)
	A 5'-TTTCACCCGTGTCCCACTTGGC-3' (SEQ ID NO 14)
Itgb3	S 5'-AGGGGAGATGTGTTCCGGCCA-3' (SEQ ID NO 15)
	A 5'-ACACACAGCTGCCGCACTCG-3' (SEQ ID NO 16)
Fn1	S 5'-GCTGCCAGGAGACAGCCGTG-3' (SEQ ID NO 17)
	A 5'-GTCTTGCCGCCCTTCGGTGG-3' (SEQ ID NO 18)
Itga8	S 5'-TCGCCTGGGAGGAGCGAAA-3' (SEQ ID NO 11)
	A 5'-TCTTAACCGCTGTGCTCCCCG-3' (SEQ ID NO 12)

Gen	Secuencia de los cebadores
<i>Osx</i>	S 5'-ACTGGCTAGGTGGTGGTCAG-3' (SEQ ID NO 31)
	A 5'-GGTAGGGAGCTGGGTAAAGG-3' (SEQ ID NO 32)
<i>Bmp2</i>	S 5'-GCTCCACAAACGAGAAAAGC-3' (SEQ ID NO 33)
	A 5'-AGCAAGGGGAAAAGGACACT-3' (SEQ ID NO 34)
<i>Coll-1</i>	S 5'-AGAGCATGACCGATGGATTC-3' (SEQ ID NO 21)
	A 5'-CCTTCTTGAGGTTGCCAGTC-3' (SEQ ID N° 22)
<i>Il-6</i>	S 5'-ACTTCCATCCAGTTGCCTTC-3' (SEQ ID NO 35)
	A 5'-TTTCCACGATTTCCAGAGA-3' (SEQ ID NO 36)
<i>Bsp</i>	S 5'-GAAAATGGAGACGGCGATAG-3' (SEQ ID NO 23)
	A 5'-ACCCGAGAGTGTGGAAAGTG-3' (SEQ ID NO 24)
<i>Alp</i>	S 5'-AACCCAGACACAAGCATTCC-3' (SEQ ID NO 25)
	A 5'-GAGAGCGAAGGGTCAGTCAG-3' (SEQ ID NO 26)
<i>Oc</i>	S 5'-CCGGGAGCAGTGTGAGCTTA-3' (SEQ ID NO 27)
	A 5'-TAGATGCGTTTGTAGGCGGTC-3' (SEQ ID NO 28)
<i>Opn</i>	S 5'-TCTGCGGCAGGCATTCTCGG-3' (SEQ ID NO 29)
	A 5'-GTCACCTTTCACCGGGAGGGAGGA-3' (SEQ ID NO 30)

Cada reacción contenía 7 μ L del colorante Lightcycler-FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (que contenía Fast Start Taq polimerasa, tampón de reacción, mezcla de dNTP, colorante SYBRGreen I y $MgCl_2$), 0,5 μ M de cada uno, los cebadores específicos con sentido y antisentido y 3 μ L de la dilución de cDNA en un volumen final de 10 μ L. El programa de amplificación consistió en una etapa de preincubación para la desnaturalización del cDNA molde (10 minutos, 95°C), seguido de 45 ciclos que consistían en una etapa de desnaturalización (10 segundos, 95°C), una etapa de reasociación (8-10 segundos, 60°C, excepto para *Osx* que fue de 5 segundos a 68°C y para *Alp* que fue de 8 segundos a 65°C) y una etapa de extensión (10 segundos, 72°C).

Después de cada ciclo, la fluorescencia se midió a 72°C (λ de excitación 470 nm, λ de emisión 530 nm). En cada ensayo se realizó un control negativo sin cDNA molde.

Las eficiencias en tiempo real se calcularon a partir de los gradientes dados en el programa informático LightCycler 480 usando diluciones en serie, que muestran todos los índices de eficiencia de la PCR en tiempo real de los transcritos investigados y la alta linealidad cuando se usan diferentes concentraciones. Los productos de la PCR se sometieron a un análisis de la curva de fusión en el LightCycler y posteriormente a electroforesis en gel de agarosa al 2%/TAE para confirmar la especificidad de la amplificación, la T_m y el tamaño del amplicón, respectivamente.

Se calculó la cuantificación relativa después de la PCR dividiendo la concentración del gen diana en cada muestra por la media de la concentración de los dos genes de referencia en la misma muestra, utilizando el método avanzado de cuantificación relativa proporcionado por el programa informático de análisis LightCycler 480 versión 1.5 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

2.10. Estadística

Todos los datos se presentan como valores medios \pm EEM. Se realizó un ensayo de Kolmogorov-Smirnov para adoptar distribuciones paramétricas o no paramétricas para los ensayos de normalidad, se evaluaron las diferencias entre grupos por el ensayo de Mann-Whitney o la prueba t de Student dependiendo de su distribución normal. Se usó el programa SPSS® para Windows (Chicago, IL, EE.UU.), versión 17.0. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos a valores de $p \leq 0,05$.

Resultados

Liberación de péptidos.

El perfil de liberación de péptidos desde armazones recubiertos con P2-alginato se representa en la Figura 7. Se observó una liberación por ráfagas del péptido durante los primeros 2 días de incubación (42,8% de la cantidad acumulativa del P2 liberado después de 21 días). Después de 5 días, la cantidad de péptido liberada disminuyó hasta 9,4% (de la cantidad acumulativa liberada hasta 21 días), seguido de una liberación de péptido más lenta pero prolongada en el tiempo hasta 21 días de incubación. Además, la liberación acumulativa sugiere que, después de 21 días de incubación, todavía había P2 atrapado en el gel de alginato al 2%.

Actividad de la LDH.

Como se muestra en la Figura 8, no se observaron efectos tóxicos en ninguno de los grupos experimentales estudiados. En todos los grupos ensayados se determinó un porcentaje similar de la viabilidad celular, lo que indica que, tanto los armazones con alginato de control (-) como los armazones recubiertos con P2-alginato (P2) no mostraron efectos tóxicos sobre las células después de 48 horas de cultivo celular.

Visualización por SEM de armazones de TiO₂ recubiertos con gel de alginato al 2%.

Se observaron por SEM armazones de TiO₂ recubierto con alginato. Como se muestra en las figuras 9A y 9B, algunos poros de los armazones de TiO₂ estaban bloqueados después del proceso de recubrimiento con alginato, aunque, después de la siembra de las células y 7 días de incubación en condiciones de cultivo celular estándares (37°C y en una atmósfera humidificada), estaban desbloqueados casi todos los poros (Figura 9C y 9D). Por tanto, se observó cierta degradación del gel de alginato bloqueante en los poros que permanecieron bloqueados inmediatamente después del proceso de recubrimiento.

Aunque la cantidad de células que crecen sobre armazones de TiO₂ no recubiertos (AR) fue mayor (Figura 10A y 10B) que sobre armazones de TiO₂ recubiertos con alginato (Figura 10C-10F), las células fueron capaces de penetrar y adherirse a los armazones recubiertos con gel de alginato al 2% con o sin P2.

En todos los grupos experimentales se observó un aumento del día 7 al día 21 en el número de células que crecen sobre los armazones.

Número de células.

Se usó la cuantificación del DNA para determinar el número de células que crecen sobre los armazones de TiO₂ después de 7 días de cultivo (Figura 11). De acuerdo con las imágenes de SEM, después de 7 días de cultivo, el número de células fue significativamente menor en cualquiera de los armazones de TiO₂ recubiertos con alginato en comparación con los armazones de TiO₂ (AR). Por lo tanto, en comparación con AR, se encontró una reducción del 61% y del 49% en el número de células sobre los armazones recubiertos con alginato sin y con P2, respectivamente. Aunque los datos no alcanzaron significación estadística, los armazones recubiertos con P2 mostraron 32% más de células que los armazones con alginato de control (-).

Expresión de genes de marcadores relacionados con la adhesión a células.

Como se muestra en la Figura 12, los niveles relativos de mRNA de *Itb1* disminuyeron significativamente en las células que crecieron sobre armazones recubiertos con alginato (ya sea con o sin P2) en comparación con los armazones de TiO₂ (AR) después de 7 días de cultivo. No obstante, después de 21 días de cultivo celular no se observaron diferencias entre los grupos. Después de 21 días, los niveles de mRNA de *Itgb3* aumentaron en las células que crecieron sobre los armazones recubiertos con alginato (ya sea con o sin P2) en comparación con los armazones de TiO₂ (AR). Los mayores niveles de mRNA de *Fn1* fueron encontrados en las células que crecieron sobre armazones recubiertos con alginato al 2% después de 21 días, y en las células que crecieron sobre armazones recubierto con P2-alginato en comparación con los armazones no recubiertos, aunque los datos del último grupo no alcanzaron significación estadística. El mRNA de *Itga8* aumentó significativamente en las células que crecieron sobre armazones recubiertos con P2-alginato en comparación con armazones de alginato de control después de 21 días de cultivo.

Expresión de genes de diversos marcadores de diferenciación de osteoblastos.

La Figura 13 muestra niveles relativos de mRNA en varios genes marcadores de diferenciación de osteoblastos. Después de 21 días de cultivo, los niveles de mRNA de *osterix* aumentaron en las células que crecieron sobre los armazones recubiertos con alginato (ya sea con o sin P2) en comparación con los armazones no recubiertos. Los

niveles de mRNA de *Bmp2* e *Il-6* aumentaron significativamente en células cultivadas sobre armazones recubiertos con P2-alginato en comparación tanto con armazones no recubiertos como con armazones recubiertos con alginato después de 21 días de cultivo celular. Los niveles de mRNA de *Coll-I*, un marcador relacionado con la proliferación celular, aumentaron significativamente en células cultivadas sobre armazones recubiertos con P2-alginato en comparación con los armazones recubiertos con alginato después de 7 días de cultivo celular. Después de 21 días de cultivo, *Coll-I* aumentó significativamente tanto en armazones recubiertos con alginato como en armazones recubiertos con P2-alginato en comparación con armazones no recubiertos. No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de mRNA de *Opn*, *Bsp*, *Alp* y *Oc* entre los grupos experimentales en cualquiera de los puntos de tiempo estudiados.

10 Discusión

En el presente experimento, se demostró la idoneidad de un armazón de dióxido de titanio recubierto con un recubrimiento de alginato, con y sin una sustancia biológicamente activa, para el uso en aplicaciones de tejidos óseos de soporte para promover la formación y mineralización ósea. Se ha documentado que los armazones de TiO₂ tenían una resistencia a la compresión de hasta 2,6 MPa (Tiainen H., *et al.* 2010) y mostraban una excelente resistencia mecánica en un estudio *in vivo* en cerdos.

En la ingeniería de los tejidos óseos, la estructura del armazón debe proporcionar un microambiente óptimo para la osteogénesis. La porosidad del armazón, la interconectividad de los poros en el retículo, la relación entre el área superficial y el volumen y las propiedades físico-químicas de la superficie determinan la migración y diferenciación celular, el crecimiento hacia dentro del hueso, la vascularización y la transferencia de masa entre las células y el medio ambiente. El uso de armazones de TiO₂ muy porosos que utiliza un método de siembra de células con agitación ha demostrado conseguir una buena fijación y distribución de las células preosteoblásticas del ratón. En el presente estudio, los armazones de TiO₂ recubiertos con una capa de alginato al 2% muestran una microestructura adecuada para su uso como armazón para el crecimiento tridimensional de células.

Aunque unos pocos poros permanecían bloqueados inmediatamente después del proceso de recubrimiento, casi todos los poros se desbloquearon después de 7 días de incubación a 37°C debido a las propiedades de biodegradabilidad del alginato, proporcionando así que se abran ventanas para que penetren y migren las células en la estructura. No se observaron diferencias en la viabilidad celular entre armazones de TiO₂ recubiertos y no recubiertos. Se encontró una liberación por ráfagas del P2 durante las primeras horas de incubación, seguida de una liberación progresiva y prolongada durante el período de 21 días, siguiendo el mismo patrón que en los hidrogeles de alginato solos.

Los armazones de TiO₂ proporcionaron una superficie adecuada para que los osteoblastos se adhirieran, migraran y proliferaran. Aunque la cantidad de células en los armazones de TiO₂ recubiertos con alginato era menor que en los armazones de TiO₂ no recubiertos, los armazones recubiertos con alginato permitían la progresión y diferenciación celular. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos que documentaron que el alginato es un sustrato inerte para la fijación celular y que los péptidos sintéticos ricos en secuencias de prolina aumentan las propiedades de fijación a las células del hidrogel de alginato. Por lo tanto, aunque no significativamente, los armazones de TiO₂ recubiertos con alginato al 2% que contenían péptido sintético 2 mostraron una tendencia a mejorar la fijación a las células (+32%) después de 7 días en comparación con los armazones de TiO₂ recubiertos con alginato.

Está documentado que la composición de biomaterial regula la fijación a las células y la organización del citoesqueleto con efectos a largo plazo sobre la maduración de las células y la mineralización de los osteoblastos. De acuerdo con la eficiencia en la fijación a las células observada por SEM y la cuantificación del DNA en los diferentes grupos, los niveles de mRNA de *Itgb1* disminuyeron en células que crecieron sobre armazones de TiO₂ recubiertos con alginato en comparación con las que crecieron sobre armazones no recubiertos. Además, los niveles de mRNA de *Itgb3* y *Fn1* (que son altamente expresados en las primeras etapas de la osteogénesis y se reducen durante el proceso de maduración celular) aumentaron significativamente en las células que crecieron sobre armazones de TiO₂ recubiertos con alginato en comparación con los armazones no recubiertos después de 21 días de cultivo. Por otra parte, la expresión de *Itga8*, una integrina que desempeña un papel durante la etapa de mineralización por medio de la unión a la osteopontina, fue inducida por los armazones recubiertos con P2-alginato en comparación con los armazones recubiertos con alginato, lo que sugería que el P2 podía influir sobre los procesos de mineralización. Las integrinas no sólo están implicadas en la fijación de las células a la superficie del material, sino que también median en las vías de transducción de señales induciendo la formación y mineralización ósea. Curiosamente, las expresiones de genes como *Itgb3*, *Fn1*, *Coll-I* y *Osx* que están relacionados con las primeras etapas de la diferenciación de osteoblastos, y que normalmente están sobre-reguladas a corto plazo y sub-reguladas después, aumentaron en el punto de tiempo más largo estudiado (21 días) en las células que crecieron sobre armazones de TiO₂ recubiertos con alginato en comparación con las células que crecieron sobre armazones no recubiertos. Es posible que la secuencia temporal de los primeros marcadores relacionados con la diferenciación de osteoblastos varíe cuando las células MC3T3-E1 crezcan sobre armazones no recubiertos o sobre armazones recubiertos con alginato, de modo que las células que crecieron sobre superficies recubiertas con alginato mostraron una mejor diferenciación celular en la proliferación en comparación con armazones de TiO₂ no recubiertos, debido probablemente a las dificultades iniciales de adhesión celular al alginato. Aunque el recubrimiento con alginato parece que afecta a la adhesión y proliferación celular sobre los armazones, la adquisición de una matriz madura y

organizada (ECM) competente para la mineralización fue confirmada por un notable aumento de los niveles de mRNA de *Alp* y *Bsp* desde el día 7 al 21 para cualquiera de los grupos. Una vez ha finalizado la síntesis, organización y maduración de la ECM, la expresión de *Oc* está sobreexpresada conduciendo a la mineralización. Los resultados mostraron un ligero aumento de los niveles de mRNA de *Oc* después de 21 días de cultivo, por tanto, se puede llegar a la conclusión de que las células estaban justo al comienzo del proceso de mineralización. Además, de acuerdo con nuestros resultados con los niveles de expresión génica de *Opn* y *Bsp*, el aumento de la relación de mRNA de *Bsp/Opn* en las células osteoblásticas podría ser indicativo de la estimulación de la mineralización de la ECM, como se había documentado previamente con células MC3T3-E1 sembradas sobre armazones TiO₂ no recubiertos.

La adición de P2 al alginato mejoró las propiedades de proliferación y diferenciación celular en comparación con los armazones recubiertos con alginato, como se puede apreciar por la cantidad de células medidas por el contenido del DNA y los mayores niveles de expresión de *Bmp2*, *Coll-I* e *Il-6*. Hasta ahora, los péptidos sintéticos ricos en secuencias de poliprolina han mostrado repetidamente un aumento de los niveles de mRNA de osteocalcina, en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, en los que los implantes de titanio se recubrieron con el péptido, y aún más cuando se cargaron en un hidrogel de alginato para su uso como soporte para administración local. Por tanto, en su conjunto, esto nos permite sugerir que los armazones recubiertos con P2-alginato promoverían mayor diferenciación y mineralización celular en un ambiente *in vivo*.

Conclusión

En conclusión, los resultados demuestran que los armazones de TiO₂ recubiertos con alginato pueden actuar como una matriz para la administración de sustancias biológicamente activas, tal como un péptido sintético rico en secuencias de prolina, que induzca la diferenciación celular de osteoblastos. La combinación de las propiedades físicas y osteoconductoras de los armazones de TiO₂ con efectos osteogénicos de una sustancia biológicamente activa, tal como un péptido sintético rico en prolina, sobre la formación y mineralización ósea pueden representar una nueva estrategia para la regeneración del tejido óseo en aplicaciones de soporte.

25 Ejemplo 3: Fabricación de armazones de TiO₂ recubiertos con gel de quitosano que contiene P2

Se produjeron armazones de TiO₂ porosos por replicación en esponjas de polímero como ha sido descrito anteriormente (Tiainen H., *et al.*, 2010), con un tamaño de 9 mm de diámetro y 8 mm de alto.

A continuación, los armazones se recubrieron con una capa de quitosano al 2% a pH 5,5 con o sin P2 (SEQ ID NO 1). El quitosano es el derivado desacetilado de la quitina, un componente natural de las cáscaras de gambas y cangrejos. Es un polímero catiónico biocompatible, dependiente del pH, que es soluble en agua hasta pH 6,2. En resumen, los armazones de TiO₂ se sumergieron en una solución con o sin P2 con agitación a 100 rpm en un agitador orbital (IKA Vibrax VXR basic, Staufen, Alemania) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los armazones se centrifugaron a continuación a 252 x g durante 1 minuto. Las muestras se sumergieron en una solución acuosa que tenía un pH de 8,0 para permitir la gelificación. La alcalinización de soluciones acuosas de quitosano por encima de este pH conduce a la formación de un precipitado de tipo gel hidratado. La separación en fases resulta de la neutralización de los grupos amina del quitosano y la consiguiente eliminación de las fuerzas electrostáticas de repulsión entre cadenas, lo que permite posteriormente la unión por hidrógeno extensa y las interacciones hidrófobas entre cadenas. Los armazones se lavaron entonces con dH₂O para eliminar el exceso. Finalmente, las muestras se dejaron secar durante una noche a temperatura ambiente.

40 Ejemplo 4: Fabricación de armazones de TiO₂ recubiertos con gel de Pluronic que contiene P2.

Se produjeron armazones de TiO₂ porosos por replicación en esponjas de polímero como ha sido descrito anteriormente (Tiainen H., *et al.*, 2010), con un tamaño de 9 mm de diámetro y 8 mm de alto. A continuación, los armazones se recubrieron con una capa de Poloxamer 407 al 20% (Pluronic® F127) con o sin P2 (SEQ ID NO 1). Los armazones de TiO₂ se sumergieron en una solución con o sin P2 (SEQ ID NO 1) con agitación a 100 rpm en un agitador orbital (IKA Vibrax VXR basic, Staufen, Alemania) durante 1 hora a 10°C. Los armazones se centrifugaron a continuación a 252 x g durante 1 minuto a 10°C. Las muestras se dejaron luego a 37°C para permitir la gelificación.

Ejemplo 5: Fabricación de armazones de TiO₂ recubiertos con gel de poli(ácido acrílico) (PAA) que contiene P2.

Se produjeron armazones de TiO₂ porosos por replicación en esponjas de polímero como ha sido descrito anteriormente (Tiainen H., *et al.*, 2010), con un tamaño de 9 mm de diámetro y 8 mm de alto. A continuación, los armazones se recubrieron con una capa de poli(ácido acrílico) (PAA) de alto peso molecular al 3% con o sin P2 (SEQ ID NO 1). El PAA es un polímero bioadhesivo. Los armazones de TiO₂ se sumergieron en una solución de PAA con o sin P2 (SEQ ID NO 1) con agitación a 100 rpm en un agitador orbital (IKA Vibrax VXR basic, Staufen, Alemania) durante 1 hora a 4°C. Los armazones se centrifugaron a continuación a 252 x g durante 1 minuto a 4°C. Las muestras se dejaron luego a 37°C para permitir la gelificación.

Ejemplo 6: Fabricación de armazones de TiO₂ recubiertos con hidrogel de metilcelulosa y de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) que contiene P2.

Se produjeron armazones de TiO₂ porosos por replicación en esponjas de polímero como ha sido descrito anteriormente (Tiainen H., *et al.*, 2010), con un tamaño de 9 mm de diámetro y 8 mm de alto. A continuación, los armazones se recubrieron con una capa de metilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) al 8% y NaCl al 1% en peso con o sin P2 (SEQ ID NO 1). Los armazones de TiO₂ se sumergieron en la solución con o sin P2 (SEQ ID NO 1) con agitación a 100 rpm en un agitador orbital (IKA Vibrax VXR basic, Staufen, Alemania) durante 1 hora a 10°C. Los armazones se centrifugaron a continuación a 252 x g durante 1 minuto a 10°C. Las muestras se dejaron luego a 37°C para permitir la gelificación.

Ejemplo 7: Fabricación de armazones de TiO₂ recubiertos con gel de poli(ácido acrílico) (PAA)-g-poloxámero que contiene P2.

Se produjeron armazones de TiO₂ porosos por replicación en esponjas de polímero como ha sido descrito anteriormente (Tiainen H., *et al.*, 2010), con un tamaño de 9 mm de diámetro y 8 mm de alto. A continuación, los armazones se recubrieron con una capa de copolímeros de injerto de PAA-g-poloxámero al 2,5% con o sin P2 (SEQ ID NO 1). Los armazones de TiO₂ se sumergieron en una solución con o sin P2 (SEQ ID NO 1) con agitación a 100 rpm en un agitador orbital (IKA Vibrax VXR basic, Staufen, Alemania) durante 1 hora a 3°C a pH 7,4. Los armazones se centrifugaron a continuación a 252 x g durante 1 minuto a 3°C. Las muestras se dejaron luego a 37°C para permitir la gelificación.

Ejemplo 8: Fabricación de armazones de TiO₂ recubiertos con gel de PEO y de P(EO-co-PO) que contiene P2.

Se produjeron armazones de TiO₂ porosos por replicación en esponjas de polímero como ha sido descrito anteriormente (Tiainen H., *et al.*, 2010), con un tamaño de 9 mm de diámetro y 8 mm de alto. A continuación, los armazones se recubrieron con una capa de solución acuosa de PEO (5 mL, 5% p/v) o P(EO-co-PO) que contenía el fotoiniciador cloruro de (4-benzoilbencil)trimetilamonio (BBTMAC) (5% de la masa del polímero se vertió en un armazón de TiO₂ con o sin P2 (SEQ ID NO 1)). Los armazones de TiO₂ se sumergieron luego en una solución con o sin P2 (SEQ ID NO 1) con agitación a 100 rpm en un agitador orbital (IKA Vibrax VXR basic, Staufen, Alemania) durante 0,5 horas a temperatura ambiente. Los armazones se centrifugaron a continuación a 252 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente. A continuación se irradiaron las muestras con UV en un sistema de curado con luz Dimax, modelo 5000 Flood, durante 2 minutos para permitir la gelificación a 200-400 nm.

Ejemplo 9: Preparación de un armazón de dióxido de titanio recubierto con alginato para administración local de simvastatina

1. Sumario

Armazones de dióxido de titanio (TiO₂) altamente porosos se sumergieron en una solución de alginato que contenía simvastatina (SIM) (es decir, una sustancia biológicamente activa). La microestructura de los armazones, visualizada por microscopía electrónica de barrido y tinción con ácido peryódico de Schiff, reveló una capa de alginato uniformemente distribuida que cubría la superficie de los puntales de los armazones de TiO₂. Se observó una liberación de SIM progresiva y prolongada durante 19 días. No se observaron efectos citotóxicos sobre los osteoblastos por los armazones con SIM en comparación con los armazones sin SIM. La expresión de marcadores de osteoblastos (colágeno tipo I alfa 1, fosfatasa alcalina, osteoprotegerina, osteocalcina y factor de crecimiento endotelial vascular A) se cuantificó utilizando RT-PCR en tiempo real. La secreción de osteoprotegerina, factor de crecimiento endotelial vascular A y osteocalcina se analizó por inmunoensayo múltiple (Luminex). Aumentó significativamente la expresión y secreción relativas de osteocalcina por células cultivadas sobre armazones con SIM 10 µM en comparación con armazones sin SIM después de 21 días. Además, la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular A aumentó significativamente a partir de células cultivadas sobre armazones con SIM tanto de 10 nM como de 10 µM, en comparación con los armazones sin SIM el día 21. En conclusión, los resultados indican que armazones de TiO₂ recubiertos con SIM pueden soportar una liberación prolongada de SIM e inducir la diferenciación de osteoblastos. La combinación de las propiedades físicas de los armazones de TiO₂ con el efecto osteogénico de la SIM puede representar una nueva estrategia para la regeneración ósea en defectos en los que se desea o no está disponible una carga inmediata. Por tanto, este ejemplo es una realización ilustrativa que demuestra que los armazones de dióxido de titanio recubiertos con alginato de la presente invención se pueden usar para administrar una sustancia biológicamente activa, tal como para proporcionar un efecto positivo sobre el crecimiento de los osteoblastos.

2. Materiales y métodos

2.1. Fabricación de armazones de TiO₂ recubiertos con hidrogel de alginato que contiene SIM

Se produjeron armazones de TiO₂ porosos, con un tamaño de 9 mm de diámetro y 8 mm de alto, por replicación en esponjas de polímero como se ha descrito anteriormente (Tiainen H., *et al.*, 2010). En resumen, espumas de polímeros se impregnaron con una suspensión de TiO₂, se secaron y posteriormente se sinterizaron a 1500°C durante 40 horas. Se añadió a los armazones una segunda capa de suspensión de TiO₂ y se volvió a sinterizar a la misma temperatura que se ha mencionado anteriormente. El área superficial total de los armazones, determinada por tomografía micro-computerizada (1172 micro-CT Imaging System, SkyScan, Kontich, Bélgica), era 20.295 cm².

Los armazones producidos se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos. La SIM (Krebs Biochemicals & Industries, Andhra Pradesh, India) se disolvió en etanol al 100% antes de ser añadido alginato de sodio Pronova UP LVG al 2% (p/v) (FMC BioPolymer, Sandvika, Noruega) en agua Milli-Q a concentraciones deseadas para crear armazones de TiO₂ recubiertos con alginato que contiene SIM. La solución de alginato con o sin SIM se esterilizó antes de su uso con un filtro de jeringa con un tamaño de poros de 0,22 µm (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suiza).

Los armazones de TiO₂ se sumergieron en solución de alginato con o sin SIM con agitación a 100 rpm en un agitador orbital durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido por centrifugación a 300 x g durante 1 minuto para eliminar el exceso de solución de alginato. Posteriormente, los armazones se sumergieron en CaCl₂ 50 mM con o sin SIM con agitación a 100 rpm en un agitador orbital durante 1 hora. Los armazones recubiertos con alginato se lavaron finalmente con agua Milli-Q para eliminar el exceso de CaCl₂ y se secaron al aire durante una noche. Los armazones recubiertos con hidrogel de alginato al 2% sin SIM, se utilizaron como grupo de control.

2.2. Caracterización de armazones de TiO₂ recubiertos con hidrogel de alginato que contiene SIM

Los armazones recubiertos con alginato se pulverizaron con oro (Cressington Sputter Coater 108 auto, Cressington Scientific Instruments, Watford, Inglaterra) y su microestructura se visualizó por microscopía electrónica de barrido (SEM) (TM-1000, Hitachi High-Technologies, Tokio, Japón) con iones secundarios retrodispersados a un voltaje de aceleración de 15 kV. El recubrimiento de alginato se evaluó por tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS). En resumen, los armazones se lavaron con agua Milli-Q y se oxidaron en solución de ácido peryódico al 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) durante 5 minutos. A continuación, los armazones se lavaron con agua Milli-Q y se dejaron con el reactivo de Schiff (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) durante 15 minutos. Finalmente, los armazones se empaparon en agua del grifo templada durante 5 minutos y posteriormente se fotografiaron (Nikon Digital Camera D700, Sendai Nikon Corporation, Miyagi, Japón).

2.3. Cuantificación de la liberación de SIM desde armazones de TiO₂ recubiertos con alginato

Armazones recubiertos con alginato y armazones recubiertos con alginato que contiene SIM (2,4 mM, 0,6 mM) se mantuvieron a 37°C en 1 mL de agua Milli-Q en una atmósfera humidificada durante 19 días para determinar el perfil de liberación de la SIM. En los puntos de tiempo prefijados (0,25 días, 2 días, 4 días, 6 días, 8 días, 10 días, 13 días, 15 días, 17 días, 19 días) se sustituyó el agua Milli-Q, y se cuantificó la cantidad de la SIM liberada usando un espectrofotómetro UV-Vis (PerkinElmer Lambda 25 UV/Vis System, PerkinElmer, Waltham, MA, EE.UU.). Se analizó la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 238 nm y las unidades de la absorbancia relativa estaban correlacionadas con la cantidad de la SIM liberada para cada punto de tiempo utilizando una curva patrón lineal. Los valores de absorbancia de los armazones recubiertos con alginato sin SIM se utilizaron como control para restar los valores de fondo obtenidos de los productos de degradación del alginato. El experimento se realizó por triplicado.

2.4. Cultivo de células y siembra de osteoblastos humanos primarios

Osteoblastos humanos primarios (Cambrex Bio Science, Walkersville, MD, EE.UU.) de tres donantes, dos de fémur (varones de 16 y 10 años) y uno de tibia (varón de 41 años) se cultivaron en medio de cultivo de osteoblastos suplementado con suero fetal bovino al 10%, sulfato de gentamicina al 0,1% y antibiótico anfotericina-B y ácido ascórbico al 0,1% (Lonza Walkersville, MD, EE.UU.) en frascos de cultivo de 75 cm² a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%. Las células de los pases 7-9 se sembraron sobre armazones a una densidad de 400.000 células/mL. Con el fin de asegurar una distribución celular homogénea en todo el armazón, se utilizó un método de siembra con agitación (Takahshi, et al., 2003). Los armazones empapados con medio de cultivo se colocaron en placas de cultivo de 48 pocillos. Después de añadir a los armazones 1 mL de suspensión celular, las placas se agitaban en un agitador orbital a 200 rpm durante 6 horas a 37°C. Los armazones sembrados de células se transfirieron a nuevas placas de cultivo en un medio de cultivo de 1 mL y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% durante 21 días. El medio de cultivo fue reemplazado cada dos días. El medio recogido se guardó para su uso en los ensayos de citotoxicidad, actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) y expresión de las proteínas. Los armazones se recogieron después de 7, 14 y 21 días de cultivo para su uso en RT-PCR en tiempo real e inmunocitoquímica.

2.5. Ensayo de citotoxicidad

Se estimó la citotoxicidad de los armazones que contienen SIM basándose en la actividad de la enzima citosólica lactato-deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo. Se determinó la actividad de la LDH en el medio recogido cada dos días hasta 14 días, de acuerdo con las instrucciones del kit de detección de citotoxicidad del fabricante (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Se incubaron 50 µL de muestra con la mezcla de reacción del kit durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia de las muestras se midió a 492 nm en un lector de placas (Biochrom Asys Expert 96 Microplate Reader, Biochrom, Holliston, MA, EE.UU.).

2.6. Ensayo de la actividad de la ALP

La capacidad de la ALP para hidrolizar sustratos de fosfato de p-nitrofenilo (pNPP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) en el producto final amarillo, p-nitrofenol, se utilizó para cuantificar la actividad de la ALP en el medio de

cultivo después de 2, 8, 14 y 21 días de cultivo. De cada muestra se tomaron 25 µL de medio y se incubaron con 100 µL de solución de pNPP en una placa de 96 pocillos durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, posteriormente se añadieron a cada pocillo 50 µL de NaOH 3M para detener la reacción. Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de placas (Biochrom Asys Expert 96 Microplate Reader, Biochrom, Holliston, MA, EE.UU.) y la actividad de la ALP se cuantificó utilizando una curva patrón basándose en la fosfatasa alcalina intestinal de ternero (Promega, Madison, WI, EE.UU.).

2.7. Inmunoensayo: Cuantificación de las proteínas segregadas

Partes alícuotas del medio de cultivo recogido se concentraron 8 veces utilizando un filtro centrífugo PES 3K modificado (VWR, Radnor, PA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó una evaluación por perfiles de multianálisis de los niveles de proteína en el medio de cultivo celular concentrado en el sistema Luminex 100/200 (Luminex, Austin, TX, EE.UU.) utilizando la tecnología xMAP. Los datos de fluorescencia adquiridos fueron analizados por el programa informático xPONENT 3.1 (Luminex, Austin, TX, EE.UU.). La cantidad de osteoprotegerina (TNFRSF11B), osteocalcina (BGLAP) y el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA) en el medio de cultivo se midió usando el panel de huesos humanos y los kits de citoquinas/quimioquinas humanas (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) después de 2, 8, 14 y 21 días de cultivo. Todos los análisis se realizaron de acuerdo con los protocolos del fabricante.

2.8. Aislamiento del RNA y análisis por RT-PCR en tiempo real

Se aisló el RNA total de los armazones sembrados de células utilizando el mini-kit de RNA Qiagen (Qiagen, Hilden, Alemania) con ligeras modificaciones al protocolo del fabricante. En resumen, los armazones se sumergieron en tampón de lisis durante 1 hora a 4°C seguido de agitación en un agitador orbital a 300 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se desecharon los armazones y el tampón de lisado se sometió a ultrasonidos (Sonics Vibracell VC130PB, CT, EE.UU.) a 2 W durante 30 segundos. Los procedimientos restantes siguieron el protocolo proporcionado por el fabricante.

Se sintetizó cDNA con el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Fermentas, San Leon-Rot, Alemania), utilizando cebadores oligo dT. Se realizó la PCR en tiempo real en CFX 384 Real-Time System (Bio-Rad, Hercules, California, EE.UU.) utilizando SsoAdvanced SYBR® Green Supermix. Se aplicó una amplificación en tres etapas (40 ciclos: 5 segundos, 95°C, 60 segundos, 60°C, 30 segundos, 72°C). No se usó ningún control de amplificación ni control de moldes. Se realizó la RT-PCR en tiempo real para gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH), colágeno tipo I alfa 1 (COL1A1), fosfatasa alcalina (ALPL), osteoprotegerina (TNFRSF11B), osteocalcina (BGLAP) y factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA). Las secuencias de los cebadores se recogen en la Tabla 4. Los datos de la RT-PCR en tiempo real se analizaron utilizando el método de eficiencia $\Delta\Delta CT$ corregido (Pfaffl, *et al.*, 2001).

Tabla 4. Secuencias de los cebadores utilizados para ensayos por RT-PCR en tiempo real

Gen	Secuencia del cebador
GAPDH	Izquierda: CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC (SEQ ID NO: 37)
	Derecha: ACGACCAAATCCGTTGACTC (SEQ ID NO: 38)
COL1A1	Izquierda: CATCTCCCCTTCGTTTTTGA (SEQ ID NO: 39)
	Derecha: CCAAATCCGATGTTTCTGCT (SEQ ID NO: 40)
ALPL	Izquierda: GACAAGAAGCCCTTCACTGC (SEQ ID NO: 41)
	Derecha: AGACTGCGCCTGGTAGTTGT (SEQ ID NO: 42)
TNFRSF11B	Izquierda: TGGGAGCAGAAGACATTGAA (SEQ ID NO: 43)
	Derecha: GTGTCTTGGTCGCCATTTTT (SEQ ID NO: 44)
VEGFA	Izquierda: TCTTCAAGCCATCCTGTGTG (SEQ ID NO: 45)
	Derecha: ATCTGCATGGTGATGTTGGA (SEQ ID NO: 46)
BGLAP	Izquierda: GCAAGTAGCGCCAATCTAGG (SEQ ID NO: 47)

Gen	Secuencia del cebador
	Derecha: GCTTCACCCTCGAAATGGTA (SEQ ID NO: 48)

2.9. Inmunocitoquímica y microscopía confocal de barrido láser

Después de 21 días de cultivo, los armazones se cortaron por la mitad utilizando un bisturí y se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4%/D-manitol al 4,6% durante 15 minutos y posteriormente se almacenaron en PFA al 1%/D-manitol al 4,6% hasta su posterior tratamiento. Los armazones fijados se sometieron a la recuperación de epítomos inducida por calor calentando a 95°C en anhídrido citracónico al 0,05% en agua Milli-Q (pH 7,4) durante 15 minutos, se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-colágeno tipo I humano de ratón (I-8H5, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, EE.UU.) diluido hasta 1 µg/mL en seroalbúmina bovina (BSA) al 1,25% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con Triton X al 0,2% durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido por incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente en IgG anti-ratón de burro conjugada con Cy3 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EE.UU.) diluido en BSA al 2,5%/Tween-20 al 0,05%/PBS a una concentración de 2 mg/mL. Los armazones teñidos en su totalidad sembrados de células se contratiñeron utilizando DAPI, se colocaron sobre un cubreobjetos y se cubrieron con medio de montaje fluorescente Dako (Dako, Glostrup, Dinamarca). Se realizó una microscopía confocal de barrido láser (CLSM) con un microscopio confocal de barrido láser FluoView 1000 (Olympus, Center Valley, PA, EE.UU.). Las superficies de los armazones se visualizaron utilizando CLSM en modo de reflexión. Las imágenes se analizaron usando ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EE.UU.).

2.10. Estadística

Los datos obtenidos por los análisis de la citotoxicidad, la actividad de la ALP, la expresión génica y la secreción de proteínas pasaron el ensayo de normalidad (Shapiro-Wilk) y se compararon entre los grupos utilizando el ensayo de Holm-Sidak después de un ANOVA unidireccional paramétrico (SigmaPlot 12.3, Systat Software, San Jose, CA, EE.UU.). Una probabilidad $\leq 0,05$ se consideró significativa.

3. Resultados

3.1. Caracterización de armazones de TiO₂ recubiertos con hidrogel de alginato al 2%

El análisis por SEM de los armazones recubiertos con alginato reveló que la técnica de inmersión-centrifugación dio como resultado una distribución uniforme del alginato, recubriendo la superficie de los puntales de los armazones de TiO₂ (Fig. 14; A-C). Sólo se observaron variaciones menores en la distribución del alginato, cuando se visualizaron por tinción con PAS la parte superior (Fig. 15A) y el centro (Fig. 15 B) del armazón de TiO₂.

3.2. Liberación de simvastatina

Se investigó la liberación de SIM en armazones con SIM 2,4 mM y 0,6 mM. Se detectó una liberación lenta prolongada de SIM para ambas concentraciones. Sin embargo, los armazones con SIM 2,4 mM dieron como resultado un periodo de liberación más largo de 17 días en comparación con la liberación de 15 días observada en armazones con SIM 0,6 mM (Fig. 16). La liberación acumulativa sugirió que SIM permanecía atrapada en el alginato incluso después de 19 días de incubación. No se pudo detectar una liberación continuada ya que la concentración después de este punto era inferior al límite de detección.

3.3. Actividad de LDH

Se analizó el efecto citotóxico de la SIM de los armazones recubiertos con alginato en un amplio intervalo de concentraciones (2,4 mM, 0,6 mM, 24 µM, 10 µM, 1 µM, 0,1 µM y 10 nM). Se encontró que la SIM era altamente citotóxica para los osteoblastos a las concentraciones mayores (por encima de 10 µM), cuando se sembraron las células sobre los armazones (datos no mostrados). Se realizó un estudio de citotoxicidad a los 14 días para las concentraciones de SIM menores (10 µM y 10 nM) para investigar el efecto sobre la viabilidad de los osteoblastos cuando se exponían a la SIM durante un período de tiempo prolongado. En general se detectó una mayor actividad de LDH en el medio de armazones con SIM 10 µM en comparación con los armazones con SIM 10 nM durante el período de 14 días. Ninguna de las concentraciones de SIM provocó un aumento significativo de la actividad de LDH en comparación con el efecto de los armazones recubiertos con alginato sin SIM. Se observó alguna variación en los perfiles de la actividad de LDH, lo que indica las diferencias dependientes de los donantes en la respuesta celular a la SIM (Fig. 17; A-C).

3.4. Efecto de los armazones de TiO₂ recubiertos con alginato que contiene SIM sobre la diferenciación de osteoblastos

El cultivo de osteoblastos sobre armazones que contienen SIM no cambió significativamente la actividad de la ALP en el medio de cultivo en cualquiera de los puntos de tiempo medidos, tanto en el caso de los armazones con SIM 10 nM como con SIM 10 μ M, cuando se compara con armazones sin SIM (Fig. 18; A-C).

5 No se observaron diferencias significativas en el contenido de TNFRSF11B del medio de cultivo en cualquier punto de tiempo, tanto en el caso de los armazones con SIM 10 nM como con SIM 10 μ M, en comparación con los armazones sin SIM (Fig. 19A). Sin embargo, el contenido de VEGFA en el medio de cultivo aumentó significativamente a partir de células cultivadas en armazones tanto con SIM 10 nM como con SIM 10 μ M, en comparación con los armazones sin SIM el día 21 (Fig. 19B). La secreción de BGLAP aumentó significativamente a partir de células sobre armazones con SIM 10 μ M en comparación con armazones sin SIM, mientras que no se observaron diferencias significativas en células cultivadas sobre armazones con SIM 10 nM, en comparación con armazones sin SIM después de 21 días de cultivo (Fig. 19C).

10 Después de 21 días de cultivo, la expresión relativa de BGLAP fue significativamente mayor en las células cultivadas sobre armazones con SIM 10 μ M, en comparación con los armazones sin SIM y normalizada para GAPDH. No se observaron diferencias significativas en la expresión de los niveles de mRNA de ALPL, COL1A1, TNFRSF11B o VEGFA entre los grupos experimentales en cualquiera de los puntos de tiempo estudiados (Fig. 20). Para evaluar el efecto de la SIM sobre la deposición de colágeno tipo I, se realizó la visualización por CLSM de los armazones teñidos. El colágeno tipo I se detectó intracelularmente en la mayoría de las células en todos los armazones. Sin embargo, las fibrillas de colágeno extracelulares estaban casi ausentes en los armazones con SIM independientemente de la concentración (Fig. 21; A-B), mientras que se observaron retículos ricos en fibrillas de colágeno tipo I en los armazones sin SIM (Fig. 21; C).

5. Conclusión

En conclusión, el estudio muestra que armazones de TiO₂ recubiertos con alginato pueden actuar como una matriz para la administración de SIM induciendo la diferenciación celular de osteoblastos. Los armazones recubiertos con alginato que contenía SIM 10 μ M tenían baja citotoxicidad y aumentaban significativamente la secreción de VEGFA y BGLAP de los osteoblastos cultivados sobre los armazones. La combinación del efecto osteogénico local de la SIM y las propiedades físicas de los armazones de TiO₂ puede representar una nueva estrategia para la regeneración de tejidos óseos en huesos de soporte.

30 Ejemplo 10: Preparación de un armazón de dióxido de titanio recubierto con alginato para administración local de Emdogain (EMD) y para soporte de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano

1. Materiales y métodos

1.1. Fabricación de armazones de dióxido de titanio

35 Se produjeron armazones de TiO₂ porosos, con un tamaño de 9 mm de diámetro y 4 mm de alto, por replicación en esponjas de polímero como se ha descrito anteriormente (Tiainen H., *et al.*, 2010). En resumen, espumas de polímero se impregnaron con una suspensión de TiO₂, se secaron y posteriormente se sinterizaron a 1500°C durante 40 horas. Los armazones producidos se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

1.2. Aislamiento, caracterización y cultivo de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano

40 Se aislaron hAD-MSC de tejidos grasos subcutáneos. Para confirmar su carácter mesenquimatoso, las células se caracterizaron respecto a su expresión de antígenos de superficie y la capacidad para diferenciarse selectivamente en linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico en respuesta a estímulos ambientales. Se evaluaron las siguientes proteínas marcadoras:

45 CD14(-), CD19(-), CD34(+), CD45(-), CD44(+), CD73(+), CD90(+), CD105(+), HLA-DR(-) e IgG(-). El fenotipo de la diferenciación osteogénica de las células se evaluó por la actividad/expresión del mRNA del factor de transcripción relacionadas con el dominio runt 2 (*RUNX2*), del colágeno tipo I alfa 1 (*COL1A1*), de la fosfatasa alcalina (*ALPL*) y por evaluación histológica con tinción con rojo de alizarina. La diferenciación condrogénica se analizó evaluando la expresión del mRNA de SRY (región determinante del sexo Y)-box 9 (*SOX9*), del colágeno tipo II alfa 1 (*COL2A1*) y del agregano (*ACAN*). La diferenciación adipogénica se determinó por la expresión del mRNA de receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (*PPARG*) y por visualización histológica con tinción con rojo oleoso.

1.3. Cultivo de osteoblastos humanos (hOST) primarios

50 Se cultivaron hOST (Cambrex Bio Science, Walkersville, MD, EE.UU.) procedentes de tres donantes varones, uno de tibia y dos de fémur, respectivamente, en un medio de cultivo de osteoblastos suplementado con suero fetal bovino al 10%, sulfato de gentamicina al 0,1% y antibiótico anfotericina-B y ácido ascórbico al 0,1% (Lonza Walkersville, MD, EE.UU.) en frascos de cultivo de 75 cm² a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%. En el momento de la siembra de las células, los hOST de la tibia habían alcanzado el pase 9 y los hOST de los dos donantes de fémur habían alcanzado el pase 6 y 8, respectivamente.

1.4. Siembra de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano y osteoblastos humanos primarios

Armazones empapados previamente con medio de cultivo se colocaron en placas de cultivo de 24 pocillos y la suspensión celular se añadió gota a gota sobre la parte superior de los armazones a una densidad de 2×10^5 células/armazón en 1 mL de medio de cultivo. Con el fin de asegurar una distribución celular homogénea en todo el armazón, se utilizó un método de siembra con agitación (Takahashi, *et al.*, 2003). Después de la siembra, las placas se agitaron en un agitador orbital a 200 rpm durante 6 horas a 37°C en condiciones de humedad. Los armazones sembrados de células se transfirieron a nuevas placas de cultivo en 1 mL de medio de cultivo y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%. Al día siguiente, todos los armazones sembrados de células se sumergieron dos veces en solución al 4,6% de D-manitol, seguido por centrifugación a 300 x g durante 1 minuto. A continuación, los armazones con las células incrustadas se trataron de manera diferente según los grupos respectivos. Los armazones no recubiertos en el grupo de control se transfirieron inmediatamente a nuevas placas de cultivo en 1 mL de medio de cultivo y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% hasta 21 días. Los armazones en el grupo de alginato sin EMD se recubrieron con hidrogel de alginato sumergiéndolos durante 10 minutos en una solución recién preparada que consistía en 300 µL de alginato de sodio Pronova UP LVG al 2% (p/v) (FMC BioPolymer, Sandvika, Noruega), 600 µL de alginato de calcio Pronova UP LVG al 2% (p/v) (FMC BioPolymer, Sandvika, Noruega), 600 µL de ácido cítrico al 0,003% (p/v)/D-manitol al 4,6% y 300 µL de D-manitol al 4,6% seguido de centrifugación a 300 x g durante 1 minuto para eliminar el exceso de solución de alginato. Los armazones recubiertos con alginato se estabilizaron en una solución de CaCl₂ 50 mM y se transfirieron a nuevas placas de cultivo en 1 mL de medio de cultivo y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% hasta 21 días. Los armazones en el grupo de alginato con EMD se trataron de la misma manera que los armazones en el grupo de alginato sin EMD, excepto que 600 µL de ácido cítrico al 0,003% (p/v)/D-manitol al 4,6% contenían además 150 µg/mL de EMD (número de lote: EMD 9121, Institut Straumann, Basilea, Suiza), dando como resultado una concentración final de EMD de 50 µg/mL para toda la solución de alginato. Se incluyeron triplicados de cada donante, cada tratamiento, y durante los puntos de tiempo dos cosechas, en total de 54 armazones. El medio se cambió cada dos días y se guardó para su uso en los ensayos de citotoxicidad, actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), contenido total de proteínas y expresión. Los armazones se recogieron después de 14 y 21 días de cultivo para su uso en RT-PCR en tiempo real e inmunocitoquímica.

1.5. Visualización de armazones recubiertos con hidrogel de alginato y sembrados con células

El recubrimiento de alginato se visualizó por tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS). En resumen, los armazones se lavaron con agua Milli-Q y se oxidaron en solución de ácido peryódico al 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) durante 5 minutos. A continuación, los armazones se lavaron con agua Milli-Q y se colocaron en reactivo de Schiff (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) durante 15 minutos. Finalmente, los armazones se sumergieron en agua del grifo templada durante 5 minutos y posteriormente se fotografiaron. Además, se evaluó la adherencia de hAD-MSC en el recubrimiento de alginato por doble tinción con PAS/Pan-cadherina después de 2 días de cultivo. Los armazones se cortaron por la mitad con un bisturí y se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4%/D-manitol al 4,6% durante 15 minutos y posteriormente se conservaron en PFA al 1%/D-manitol al 4,6% hasta su tratamiento posterior. Los armazones fijados se tñeron en primer lugar de acuerdo con el método PAS y después por tinción con Pan-cadherina. En resumen, los armazones teñidos con PAS se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-Pan-cadherina humana de ratón (I-8H5, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, EE.UU.) diluido hasta 4 µg/mL en seroalbúmina bovina (BSA) al 1,25% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con Triton X al 0,2% durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente en IgG anti-ratón de burro conjugada con Cy3 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EE.UU.) diluida en BSA al 2,5%/Tween-20 al 0,05%/PBS hasta una concentración de 2 µg/mL. Los armazones teñidos en su totalidad y sembrados de células se contratiñeron con DAPI, se colocaron en un cubreobjetos y se cubrieron con medio de montaje fluorescente de Dako (Dako, Glostrup, Dinamarca). Se realizó una microscopía confocal de barrido láser (CLSM) con un microscopio confocal de barrido láser FluoView 1000 (Olympus, Center Valley, PA, EE.UU.). Las superficies de los armazones se visualizaron utilizando CLSM en modo de reflexión. Las imágenes se analizaron usando ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EE.UU.).

1.6. Ensayo de citotoxicidad

Se estimó la citotoxicidad de los armazones sembrados de células basándose en la actividad de la enzima citosólica, lactato-deshidrogenasa (LDH), en el medio de cultivo. La actividad de la LDH se determinó en el medio recogido cada dos días hasta los 14 días de cultivo, de acuerdo con las instrucciones del kit de detección de la citotoxicidad del fabricante (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Se incubaron 50 µL de muestra con 50 µL de la mezcla de reacción del kit durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia de la muestra se midió a 492 nm en un lector de placas (Biochrom Asys Expert 96 Microplate Reader, Biochrom, Holliston, MA, EE.UU.).

Además, se visualizó la viabilidad de hAD-MSC por tinción con naranja de acridina/bromuro de etidio a los 2 días de cultivo. Los armazones se cortaron por la mitad con un bisturí y se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4%/D-manitol al 4,6% durante 15 minutos y posteriormente se conservaron en PFA al 1%/D-manitol al 4,6% hasta su tratamiento posterior. La microscopía confocal de barrido láser se realizó en un FluoView 1000 CLSM (Olympus,

Center Valley, PA, EE.UU.). Las superficies de los armazones se visualizaron utilizando CLSM en modo de reflexión. Las imágenes se analizaron por ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EE.UU.).

1.7. Ensayo del contenido total de proteínas

5 Se determinó el contenido total de proteínas de los armazones sembrados de células en el medio de cultivo después de 2, 8, 14 y 21 días de cultivo con un kit de ensayo de proteínas con ácido bicinónico (BCA) (Thermo Scientific Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se incubaron 25 μ L de muestra con 200 μ L de reactivo de trabajo del kit durante 30 minutos en la oscuridad a 37°C. La absorbancia de la muestra se midió a 562 nm en un lector de placas (Biochrom Asys Expert 96 Microplate Reader, Biochrom, Holliston, MA, EE.UU.) y la cantidad total de proteínas se calculó por una curva patrón basada en BSA (Thermo Scientific Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EE.UU.).

1.8. Ensayo de actividad de la fosfatasa alcalina

15 La capacidad de la ALP para hidrolizar sustratos de fosfato de p-nitrofenilo (pNPP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) en el producto final amarillo, p-nitrofenol, se utilizó para cuantificar la actividad de la ALP en el medio de cultivo después de 2, 4, 6, 10, 16 y 20 días de cultivo para hAD-MSC y 4, 8, 12, 16 y 21 días de cultivo para los hOST. Se incubaron 25 μ L de muestra con 100 μ L de pNPP durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente y posteriormente se añadieron 50 μ L de NaOH 3M para detener la reacción. La absorbancia se midió a 405 nm en un lector de placas (Biochrom Asys Expert 96 Microplate Reader, Biochrom, Holliston, MA, EE.UU.) y la actividad de la ALP se cuantificó por una curva patrón basada en fosfatasa alcalina intestinal de ternero (Promega, Madison, WI, EE.UU.).

20 1.9. Aislamiento del RNA y análisis por RT-PCR en tiempo real

Se aisló el RNA total de los armazones sembrados de células por el mini-kit de RNA Qiagen (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. El cDNA se sintetizó con el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania), utilizando cebadores aleatorios. La PCR en tiempo real se realizó en Applied Biosystems 7300 Real-Time System (Life Technologies, Paisley, Reino Unido) con TaqMan® Universal Master Mix. El programa de amplificación consistió en una etapa de preincubación para la desnaturalización de cDNA molde (10 minutos, 95°C), seguido de 40 ciclos que comprendían una etapa de desnaturalización (15 segundos, 95°C) y una etapa de reasociación (60 segundos, 60°C). En cada ensayo se realizó un control negativo sin cDNA molde. Una RT-PCR en tiempo real para hAD-MSC se realizó en gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (*GAPDH*), *RUNX2*, *SOX9*, *PPARG*, *COL1A1*, osteoprotegerina (*TNFRSF11B*), fosfoproteína 1 segregada (*SPP1*), *ALPL* y osteocalcina (*BGLAP*). Una RT-PCR en tiempo real para los hOST se realizó en *GAPDH*, *COL1A1*, *TNFRSF11B*, *SPP1*, *ALPL* y *BGLAP*. Los datos de la RT-PCR en tiempo real se analizaron utilizando el método $\Delta\Delta$ CT (Pfaffl, *et al.* 2001).

1.10. Inmunoensayo: Cuantificación de las proteínas segregadas

35 Se realizó la determinación del perfil de los multianálisis de los niveles de proteína en el medio de cultivo en el sistema Luminex 100/200 (Luminex, Austin, TX, EE.UU.) empleando tecnología xMAP. Los datos adquiridos por fluorescencia se analizaron por el programa informático xPONENT 3.1 (Luminex, Austin, TX, EE.UU.). La cantidad de osteoprotegerina (*TNFRSF11B*), de fosfoproteína 1 (*SPP1*) segregada y osteocalcina (*BGLAP*) en el medio de cultivo se midió por el kit de panel de huesos humanos (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) después de 2, 8, 14 y 21 días de cultivo. Todos los análisis se realizaron de acuerdo con los protocolos del fabricante.

40 1.11. Inmunocitoquímica y microscopía confocal de barrido láser

Después de 14 y 21 días de cultivo, los armazones se cortaron por la mitad con un bisturí y se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4%/D-manitol al 4,6% durante 15 minutos y posteriormente se conservaron en PFA al 1%/D-manitol al 4,6% hasta su tratamiento posterior. Los armazones fijados se sometieron a una recuperación de epítomos inducida por calor calentando hasta 95°C en anhídrido citracónico al 0,05% en agua Milli-Q (pH 7,4) durante 15 minutos, se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-humanos de ratón (I-8H5, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, EE.UU.) diluidos hasta 1 μ g/mL en seroalbúmina bovina (BSA) al 1,25% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con Triton X al 0,2% durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente en IgG anti-ratón de burro conjugada con Cy3 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EE.UU.) diluida en BSA al 2,5%/Tween-20 al 0,05%/PBS hasta una concentración de 2 mg/mL. Los armazones teñidos en su totalidad y sembrados de células se contratiñeron con DAPI y se colocaron sobre un cubreobjetos con medio de montaje fluorescente Dako (Dako, Glostrup, Dinamarca). Se realizó una microscopía confocal de barrido láser con un FluoView 1000 CLSM (Olympus, Center Valley, PA, EE.UU.). Las superficies de los armazones se visualizaron utilizando CLSM en modo de reflexión. Las imágenes fueron analizadas por ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EE.UU.).

55 1.12. Estadística

Se compararon entre los grupos los datos obtenidos por análisis de la citotoxicidad, la actividad de ALP, la expresión génica, el contenido total de proteínas y la secreción utilizando el ensayo de Holm-Sidak seguido de ANOVA unidireccional paramétrico. Cuando fallaron los ensayos de igual varianza y/o normalidad, se realizó un ANOVA unidireccional de Kruskal-Wallis en rangos (SigmaPlot 12.3, Systat Software, San Jose, CA, EE.UU.). Se consideró significativa una probabilidad $\leq 0,05$.

2. Resultados

2.1. Caracterización de armazones recubiertos con alginato y sembrados con células

La tinción con PAS de los armazones recubiertos con alginato reveló una distribución uniforme del hidrogel de alginato, recubriendo la superficie entera de los puntales de los armazones de TiO₂ (Fig. 23A).

Además, la adherencia de hAD-MSC a los armazones de TiO₂ recubiertos con alginato se demostró por tinción doble con PAS/Pan-cadherina (Fig. 22D). Por otra parte, la mayoría de las hAD-MSC sembradas eran viables de acuerdo con la tinción con naranja de acridina/bromuro de etidio el día 2 de cultivo (Fig. 23).

2.2. Características de las células madre derivadas del tejido adiposo humano

Los patrones de expresión de los antígenos de superficie celulares CD14(-), CD19(-), CD34(+), CD45(-), CD44(+), CD73(+), CD90(+), CD105(+), HLA-DR(-) e IgG(-) sugirieron la ausencia de células de origen hematopoyético o endotelial. La osteodiferenciación y la diferenciación adipogénica se demostraron por visualización histológica con rojo de alizarina y rojo oleoso, respectivamente. Además, las células se diferenciaron selectivamente en células que en el cultivo se depositan en hueso, cartílago y tejido adiposo. Debido a su patrón de expresión de antígenos de superficie, la evaluación histológica y su potencial para diferenciar entre los linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico, las células se denominaron hAD-MSC.

2.3. Citocompatibilidad/actividad de la lactato-deshidrogenasa

Se realizó un estudio de citotoxicidad de 14 días de los armazones recubiertos con alginato con o sin EMD para investigar el efecto de alginato y EMD sobre la viabilidad de hAD-MSC y hOST. Generalmente se detectó una mayor actividad de la LDH en el medio procedente de armazones recubiertos con alginato con EMD en comparación con los armazones recubiertos con alginato sin EMD durante todo el periodo de 14 días. Ninguno de los armazones provocó un aumento significativo de la actividad de la LDH en comparación con el efecto de los armazones no recubiertos, excepto que los hAD-MSC procedentes de armazones recubiertos con alginato con EMD revelaron un aumento significativo de la actividad de la LDH en comparación con los armazones recubiertos con alginato sin EMD y con los armazones no recubiertos el día 12 (Fig. 24A). Por otra parte, se observó una disminución significativa de la actividad de la LDH en el medio de los hOST procedente de los armazones recubiertos con alginato con y sin EMD en comparación con los armazones no recubiertos a los 2, 4 y 14 días (Fig. 24B). Se observó alguna variación en los perfiles de actividad de la LDH de los hAD-MSC y los hOST, lo que indica diferencias dependientes del tipo de células en la respuesta celular al alginato y al EMD (Fig. 24; A-B).

2.4. Contenido total de proteínas

En general no se observaron diferencias significativas en el contenido total de proteínas del medio de cultivo de hAD-MSC en cualquier punto de tiempo para los armazones tanto con como sin EMD en comparación con los armazones no recubiertos, excepto que se detectó un aumento significativo en la cantidad total de proteínas en el medio procedente de armazones recubiertos con alginato con y sin EMD en comparación con armazones no recubiertos a los 8 días y se observó un aumento significativo de la cantidad total de proteínas en el medio procedente de los armazones recubiertos con alginato con EMD en comparación con los armazones recubiertos con alginato sin EMD y los armazones no recubiertos a los 12 días (Fig. 24C). Generalmente no se observaron diferencias significativas en el contenido total de proteínas del medio de cultivo de hOST en cualquier punto de tiempo tanto para los armazones con como sin EMD en comparación con los armazones no recubiertos, excepto que se detectó una disminución significativa de la cantidad total de proteínas en el medio procedente de armazones recubiertos con alginato con y sin EMD en comparación con los armazones no recubiertos a los 2 y 4 días (Fig. 24D).

2.5. Actividad de la fosfatasa alcalina

El cultivo de los hAD-MSC sobre armazones recubiertos con alginato con o sin EMD no cambió significativamente la actividad de la ALP en el medio de cultivo en cualquiera de los puntos de tiempo medidos, tanto para armazones con como sin EMD en comparación con los armazones no recubiertos, excepto en el caso del donante 1 en el que aumentó significativamente la actividad de la ALP en el medio procedente de células cultivadas sobre los armazones recubiertos con alginato con EMD en comparación con los armazones recubiertos con alginato sin EMD y los armazones no recubiertos el día 20, y en el caso del donante 3 en el que se redujo significativamente la actividad de la ALP en el medio procedente de células cultivadas sobre armazones con EMD en comparación con los armazones recubiertos con alginato sin EMD y los armazones no recubiertos el día 10.

El cultivo de los hOST sobre armazones recubiertos con alginato con o sin EMD no cambió significativamente la actividad de la ALP en el medio de cultivo en ninguno de los puntos de tiempo medidos, tanto para armazones con como sin EMD en comparación con los armazones no recubiertos, excepto que en el caso del donante 1 disminuyó significativamente la actividad de la ALP en el medio procedente de células cultivadas sobre los armazones recubiertos con alginato sin EMD en comparación con los armazones no recubiertos el día 4, en el caso del donante 2 disminuyó significativamente la actividad de la ALP en el medio procedente de células cultivadas sobre los armazones recubiertos con alginato sin EMD en comparación con los armazones no recubiertos el día 12, y en el caso del donante 3 disminuyó significativamente la actividad de la ALP en el medio procedente de células cultivadas sobre los armazones recubiertos con alginato con y sin EMD en comparación con los armazones no recubiertos a los 4 y 16 días. Se observó alguna variación en los perfiles de actividad de la ALP, lo que indica diferencias dependientes de los donantes en la respuesta celular a los armazones recubiertos con alginato con o sin EMD.

2.6. Análisis por RT-PCR en tiempo real

No se observaron diferencias significativas en la expresión de los niveles de mRNA de *COL1A1*, *TNFRSF11B*, *SPP1*, *ALPL* y *BGLAP* en hAD-MSC entre los grupos experimentales en ninguno de los puntos de tiempo estudiados. Además, no se observaron diferencias significativas en la expresión de los niveles de mRNA de *RUNX2*, *SOX9* y *PPARG* entre los grupos experimentales en ninguno de los puntos de tiempo estudiados.

No se observaron diferencias significativas en la expresión de los niveles de mRNA de *SPP1*, *ALPL* y *BGLAP* en los hOST entre los grupos experimentales en ninguno de los puntos de tiempo estudiados. Sin embargo, después de 14 días de cultivo, la expresión relativa de *COL1A1* aumentó significativamente en los hOST cultivados sobre armazones con EMD en comparación con los armazones sin EMD, armazones no recubiertos y normalizados para *GAPDH*. La expresión relativa de *TNFRSF11B* aumentó significativamente después de 14 días de cultivo en células cultivadas sobre armazones con EMD en comparación con los armazones no recubiertos y normalizados para *GAPDH*.

2.7. Visualización de *RUNX2* y *SOX9* por microscopía confocal de barrido láser

Para evaluar el efecto de EMD sobre la deposición de *RUNX2* y *SOX9*, se realizó una visualización por CLSM en armazones teñidos (Fig. 25).

2.8. Inmunoensayo: Cuantificación de las proteínas segregadas

No se observaron diferencias significativas en el contenido de *TNFRSF11B*, *SPP1* y *BGLAP* tanto en medios de cultivo de hAD-MSC como de hOST en ningún punto de tiempo procedentes de armazones con o sin EMD en comparación con los armazones no recubiertos. En el segundo donante no se observaron diferencias sustanciales en el contenido de *TNFRSF11B* del medio de cultivo en cualquier punto de tiempo procedente tanto de armazones con como sin EMD, y en el caso del primer donante no se detectaron diferencias sustanciales en el contenido de *TNFRSF11B* en el medio de cultivo a los 8, 14 y 21 días, tanto procedente de armazones con como sin EMD. Sin embargo, en el caso del tercer donante el contenido de *TNFRSF11B* en el medio de cultivo aumentó más en células cultivadas sobre armazones sin EMD en comparación con los armazones con EMD en todos los puntos de tiempo. En el primer y tercer donante no se observaron diferencias sustanciales del contenido de *SPP1* del medio de cultivo en cualquier punto de tiempo, tanto procedente de armazones con como sin EMD, excepto que en el caso del tercer donante se expresó más el contenido de *SPP1* en el medio de cultivo procedente de células cultivadas sobre armazones con EMD en comparación con armazones sin EMD a los 21 días. Además, en el segundo donante mejoró más el contenido de *SPP1* en el medio de cultivo procedente de células cultivadas sobre armazones con EMD en comparación con los armazones sin EMD a los 8 y 21 días. En el primer y tercer donante no se observaron diferencias sustanciales en el contenido de *BGLAP* del medio de cultivo en cualquiera de los puntos de tiempo, tanto procedente de los armazones con como sin EMD. Sin embargo, en el segundo donante mejoró más el contenido de *BGLAP* en el medio de cultivo de las células cultivadas sobre armazones con EMD en comparación con armazones sin EMD a los 2 y 8 días.

En el primer y segundo donante se expresó más el contenido de *TNFRSF11B* en el medio de cultivo procedente de células cultivadas sobre armazones con EMD en comparación con armazones sin EMD en todos los puntos de tiempo, en el caso del tercer donante se expresó más el contenido de *TNFRSF11B* en el medio de cultivo procedente de células cultivadas sobre armazones sin EMD en comparación con armazones con EMD a los 2 y 8 días. Sin embargo, en el tercer donante no se observaron diferencias sustanciales del contenido de *TNFRSF11B* en el medio de cultivo a los 14 y 21 días, tanto los procedentes de armazones con como sin EMD. En el primer donante aumentó el contenido de *SPP1* en el medio de cultivo procedente de células cultivadas sobre armazones con EMD en comparación con los armazones sin EMD en todos los puntos de tiempo. En el segundo donante aumentó más el contenido de *SPP1* en el medio de cultivo procedente de células cultivadas sobre armazones con EMD en comparación con los armazones sin EMD a los 2, 8 y 14 días. En el tercer donante no se observaron diferencias sustanciales del contenido de *SPP1* en el medio de cultivo a los 2 y 8 días, tanto procedentes de armazones con como sin EMD. En el primer donante aumentó más el contenido de *BGLAP* en el medio de cultivo procedente de células cultivadas sobre armazones sin EMD en comparación con los armazones con EMD a los 2 días. Sin embargo, en el primer donante aumentó más el contenido de *BGLAP* en el medio de cultivo procedente de células

cultivadas sobre armazones con EMD en comparación con armazones sin EMD a los 8 días. En el segundo donante aumentó más el contenido de BGLAP en el medio de cultivo procedente de células cultivadas en los armazones sin EMD en comparación con armazones con EMD a los 2 y 21 días. Sin embargo, en el segundo donante aumentó más el contenido de BGLAP en el medio de cultivo procedente de células cultivadas sobre armazones con EMD en comparación con los armazones sin EMD a los 14 días. En el tercer donante aumento más el contenido de BGLAP en el medio de cultivo procedente de células cultivadas en armazones con EMD en comparación con los armazones sin EMD a los 8, 14 y 21 días. Sin embargo, en el tercer donante aumentó más el contenido de BGLAP en el medio de cultivo procedente de células cultivadas sobre armazones sin EMD en comparación con los armazones con EMD a los 2 días.

5. Conclusión

En resumen, a partir de los resultados, se puede llegar a la conclusión de que hAD-MSD y los hOST tienen la capacidad de sobrevivir al procedimiento de recubrimiento para la administración de un derivado de EMD. Por otra parte, los hOST pueden diferenciarse en el linaje osteogénico dentro de los armazones recubiertos con alginato con EMD, que es importante antes de evaluar la eficacia *in vivo*.

15 Ejemplo 11: Fabricación de armazones de TiO₂ recubiertos con una capa radio-opaca de alginato que proporciona una estructura porosa abierta

Los armazones porosos de TiO₂ se produjeron por replicación de esponjas de polímeros como se ha descrito anteriormente (Tiainen H., et al., 2010), con un tamaño de 9 mm de diámetro y 8 mm de alto. A continuación, los armazones de TiO₂ se recubrieron con una capa de gel de alginato al 2% con un líquido radio-opaco de contraste (Omnipaque (iohexol), GE Healthcare). En resumen, los armazones de TiO₂ se sumergieron en solución al 2% de alginato con o sin P2 (SEQ ID NO 1) con agitación a 100 rpm en un agitador orbital (IKA Vibrax VXR basic, Staufen, Alemania) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los armazones se centrifugaron luego a 252 x g durante 1 minuto. Las muestras se sumergieron en CaCl₂ 50 mM durante 1 hora para permitir la gelificación. Los armazones se lavaron entonces con dH₂O para eliminar el exceso de CaCl₂. Finalmente, las muestras se dejaron secar durante una noche a temperatura ambiente. Los armazones recubiertos con una capa de gel de alginato al 2% (armazón de alginato de control) se utilizaron como grupo de control, mientras que los armazones de TiO₂ no recubiertos (sin alginato, AR) se utilizaron también como grupo de control. Los armazones se escanearon en un escáner microCT (SkyScan 1172, Kontich, Bélgica), se visualizaron en CTvox y se analizaron en CTan. El diámetro de los poros del armazón se redujo solamente 5% y el cambio de porosidad fue inferior al 3%. La interconectividad no cambió tras la aplicación de la capa de alginato demostrando que el armazón tenía todavía una estructura porosa abierta y sólo se bloquearon muy pocos poros (color oscuro) (Fig. 26). También era visible que todos los puntales estaban cubiertos con una capa fina (<10µm) de alginato.

Ha de entenderse que aunque la invención ha sido descrita junto con su descripción detallada, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que está definida por el alcance de las reivindicaciones que se acompañan. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

A menos que se describa expresamente lo contrario, cada una de las características preferidas descritas en la presente memoria se pueden usar en combinación con cualquiera y todas las otras características preferidas descritas en la presente memoria.

40 Referencias

Tiainen H, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Haugen HJ. Ultra-porous titanium oxide scaffold with high compressive strength. *J Mater Sci Mater Med* 2010; 21:2783-92.

Takahashi Y, Tabata Y. Homogeneous seeding of mesenchymal stem cells into nonwoven fabric for tissue engineering. *Tissue Eng* 2003; 9:931-8.

45 Tiainen H, Monjo M, Knychala J, Nilsen O, Lyngstadaas SP, Ellingsen J E and Haugen HJ. The effect of fluoride surface modification of ceramic TiO₂ on the surface properties and biological response of osteoblastic cells in vitro. *Biomed. Mater.* 2011; 6:045006.

Rubert M, Ramis JM, Vondrasek J, Gay'a A, Lyngstadaas SP and Monjo M. Synthetic peptides analogue to enamel proteins promote osteogenic differentiation of MC3T3-E1 and mesenchymal stem cells. *J. Biomater. Tissue Eng.* 2011; 1:198-209.

50 Monjo M, Ramis JM, Ronold HJ, Taxt-Lamolle SF, Ellingsen JE and Lyngstadaas SP. Correlation between molecular signals and bone bonding to titanium implants. *Clin. Oral Implants Res.* 2012 doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02496.x. Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell and tissue research* 1988; 254:317-30.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:e45-e.

5 Larry S. Liebovitch, Tibor Toth. A fast algorithm to determine fractal dimensions by box counting. *Physics Letters A*, Volume 141, Issues 8-9, 20 November 1989, Pages 386-390, ISSN 0375-9601, [http://dx.doi.org/10.1016/0375-9601\(89\)90854-2](http://dx.doi.org/10.1016/0375-9601(89)90854-2). (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0375960189908542>).

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Corticalis AS
- 5 <120> Armazón recubierto con hidrogel
- <130> PS54477PC00
- <150> SE 1251043-4
- 10 <151> 18-09-2012
- <160> 48
- <170> PatentIn versión 3.5
- 15 <210> 1
- <211> 25
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
- <223> Péptido biomineralizante sintético
- <400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Leu | Val | Pro | Ser | Gln | Pro | Leu | Val | Pro | Ser | Gln | Pro | Leu | Val | Pro |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
- <210> 2
- <211> 25
- <212> PRT
- 30 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Péptido biomineralizante sintético
- <400> 2
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Leu | Val | Pro | Ser | Ser | Pro | Leu | Val | Pro | Cys | Cys | Pro | Leu | Val | Pro |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
- <210> 3
- <211> 25
- <212> PRT
- 40 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Péptido biomineralizante sintético
- 45 <400> 3
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | His | Gln | Pro | Met | Gln | Pro | Gln | Pro | Pro | Val | His | Pro | Met | Gln | Pro |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
- <210> 4
- <211> 25
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 55 <220>
- <223> Péptido biomineralizante sintético

ES 2 608 777 T3

<220>
 <223> Péptido biomineralizante sintético

<400> 4
 Pro Leu Val Pro Ser Tyr Pro Leu Val Pro Ser Tyr Pro Leu Val Pro
 1 5 10 15

5 Ser Tyr Pro Tyr Pro Pro Leu Pro Pro
 20 25

<210> 5
 <211> 25
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido biomineralizante sintético

15 <400> 5
 Pro Leu Val Pro Ser Gln Pro Leu Val Pro Ser Gln Pro Leu Val Pro
 1 5 10 15

Ser Gln Pro Gln Pro Pro Leu Pro Pro
 20 25

<210> 6
 <211> 25
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido biomineralizante sintético

25 <400> 6
 Pro Leu Val Pro Cys Cys Pro Leu Val Pro Cys Cys Pro Leu Val Pro
 1 5 10 15

Cys Cys Pro Cys Pro Pro Leu Pro Pro
 20 25

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 7
 gtaaccggtt gaaccatt 20

40 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> cebador

<400> 8
 ccatccaatc ggtagtagcg 20

50 <210> 9
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> cebador

 <400> 9
 acccagaaga ctgtgatgg 20

 10 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> cebador

 <400> 10
 20 cacattgggg gtaggaacac 20

 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> cebador

 <400> 11
 30 tcgcctggga ggaggcgaaa 20

 <210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 12
 40 tcttaaccgc tgtgctccc g 21

 <210> 13
 <211> 20
 45 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador
 50
 <400> 13
 agcaggcgtg gttgctggaa 20

 <210> 14
 55 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 60 <223> cebador

 <400> 14
 tttcaccggt gtcccactg gc 22

 65 <210> 15
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> cebador

 <400> 15
 aggggagatg tgtccgcc a 21

 10 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> cebador

 <400> 16
 20 acacacagct gccgactcg 20

 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> cebador

 <400> 17
 30 gctgccagga gacagccgtg 20

 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 18
 40 gtcttgccgc ccttcggtg 20

 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador
 50
 <400> 19
 gctccacaaa cgagaaaagc 20

 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador
 60
 <400> 20
 agcaagggga aaaggacact 20

 <210> 21
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> cebador

 <400> 21
 agagcatgac cgatggattc 20

 10 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> cebador

 <400> 22
 20 ccttcttgag gtgccagtc 20

 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> cebador

 <400> 23
 30 gaaaatggag acggcgatag 20

 <210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 24
 40 acccgagagt gtggaaagt 20

 <210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador
 50
 <400> 25
 aaccagaca caagcattcc 20

 <210> 26
 55 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 60 <223> cebador

 <400> 26
 gagagcgaag ggtcagtcag 20

 65 <210> 27
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> cebador

 <400> 27
 ccgggagcag tgtgagctta 20

 10 <210> 28
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> cebador

 <400> 28
 tagatgcggt ttaggcggt c 21
 20
 <210> 29
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> cebador

 <400> 29
 30 tctgcggcag gcattctcgg 20

 <210> 30
 <211> 23
 <212> DNA
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 30
 40 gtcacttca ccgggaggga gga 23

 <210> 31
 <211> 20
 45 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador
 50
 <400> 31
 actggctagg tgggtgcag 20

 <210> 32
 55 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 60 <223> cebador

 <400> 32
 ggtagggagc tgggtaagg 20

 65 <210> 33
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> cebador

 <400> 33
 gctccacaaa cgagaaaagc 20

 10 <210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> cebador

 <400> 34
 20 agcaagggga aaaggacact 20

 <210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> cebador

 <400> 35
 30 acttccatcc agttgccttc 20

 <210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 36
 40 ttccacgat ttccagaga 20

 <210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador
 50
 <400> 37
 ctctgctcct cctgttcgac 20

 <210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 55 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador
 60
 <400> 38
 acgaccaa at ccggttgactc 20

 <210> 39
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> cebador

 <400> 39
 catctcccct tcgttttga 20

 10 <210> 40
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> cebador

 <400> 40
 20 ccaaatccga tgtttctgct 20

 <210> 41
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> cebador

 <400> 41
 30 gacaagaagc ccttactgc 20

 <210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 42
 40 agactgcgcc tgtagttgt 20

 <210> 43
 <211> 20
 45 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador
 50
 <400> 43
 tgggagcaga agacattgaa 20

 <210> 44
 55 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 60 <223> cebador

 <400> 44
 gtgtcttgt cgccatttt 20

 65 <210> 45
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> cebador

 <400> 45
 tcttcaagcc atcctgtgtg 20

 10 <210> 46
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> cebador

 <400> 46
 atctgcatgg tgatgtgga 20
 20
 <210> 47
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> cebador

 <400> 47
 30 gcaagtagcg ccaatctagg 20

 <210> 48
 <211> 20
 <212> DNA
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 48
 40 gcttcaccct cgaaatggta 20

 45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un almacén de dióxido de titanio, en donde al menos parte de la superficie de dicho almacén de dióxido de titanio está provista de un recubrimiento de hidrogel que comprende al menos una sustancia biológicamente activa, en donde dicho almacén de dióxido de titanio es obtenible u obtenido por un método que comprende las etapas de:
- a) proporcionar un almacén de dióxido de titanio,
 - b) proporcionar una solución de polímero que comprende una(s) sustancia(s) biológicamente activa(s) y aproximadamente 1-10% en p/v de un polímero que tiene un peso molecular (M_w) de 1000-1.000.000 g/mol, a al menos parte de dicho almacén de dióxido de titanio y a continuación centrifugar el almacén de dióxido de titanio,
 - c) efectuar la gelificación del polímero proporcionado al almacén de dióxido de titanio en la etapa b); y
 - d) secar opcionalmente el almacén de dióxido de titanio,
- en donde las etapas b) y c) se repiten opcionalmente al menos una vez.
- 15 2. Un almacén de dióxido de titanio de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho recubrimiento de hidrogel comprende al menos un polímero seleccionado del grupo que consiste en: alginato, quitosano, ácido hialurónico, polietilenglicol (PEG), celulosa, poli(ácido acrílico) (PAA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), PLA-PGA, PLA-PEG, dextrano, dextrano-PEG, almidón, geles a base de colágeno, agarosas, ácido plurónico, sulfato de heparano, glicosaminoglicanos, poli(óxido de etileno) (PEO), copolímero de óxido de etileno y óxido de propileno (P(EO-co-PO)) y Pluronic/poloxámero.
- 20 3. Un almacén de dióxido de titanio de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha sustancia biológicamente activa se selecciona del grupo que consiste en una molécula bioactiva natural o sintética, un fármaco natural o sintético y/o una célula viva.
- 25 4. Un almacén de dióxido de titanio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha sustancia biológicamente activa se selecciona del grupo que consiste bioadhesivos naturales o recombinantes; factores de fijación a células naturales o recombinantes; biopolímeros naturales, recombinantes o sintéticos; proteínas de la sangre naturales o recombinantes; enzimas naturales o recombinantes; proteínas de la matriz extracelular naturales o recombinantes; biomoléculas de la matriz extracelular naturales o sintéticas; moléculas de señal, factores de crecimiento y hormonas naturales o recombinantes; péptidos naturales, recombinantes y sintéticos, hormonas peptídicas sintéticas; ácidos desoxirribonucleicos naturales, recombinantes o sintéticos; ácidos ribonucleótidos naturales, recombinantes o sintéticos; receptores naturales o recombinantes; inhibidores de enzimas; fármacos; aniones y cationes biológicamente activos; vitaminas; monofosfato de adenosina (AMP), difosfato de adenosina (ADP) o trifosfato de adenosina (ATP); biomoléculas marcadoras; aminoácidos; ácidos grasos; nucleótidos (bases de RNA y DNA), azúcares, sustancias antimicrobianas, tales como tetraciclinas, y pequeñas moléculas orgánicas biológicas, tales como estatinas y bifosfonatos.
- 35 5. Un almacén de dióxido de titanio de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha célula viva se selecciona del grupo que consiste en células madre mesenquimatosas, células óseas, células pluripotentes, células precursoras de huesos, células vasculares, células precursoras vasculares y células estromales.
6. Un almacén de dióxido de titanio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho polímero tiene un peso molecular (M_w) de 1000-200.000 g/mol.
- 40 7. Un almacén de dióxido de titanio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el recubrimiento de hidrogel tiene un espesor en húmedo de al menos 1 μm , tal como 1-20 μm .
8. Un almacén de dióxido de titanio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en donde dicho alginato se selecciona del grupo que consiste en alginato de sodio, alginato de potasio, alginato de calcio y alginato de estroncio.
- 45 9. Un método para producir un almacén de dióxido de titanio que comprende un recubrimiento de hidrogel que comprende una sustancia biológicamente activa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, comprendiendo dicho método las etapas de:
- a) proporcionar un almacén dióxido de titanio,
 - b) proporcionar una solución de polímero que comprende una(s) sustancia(s) biológicamente activa(s) y aproximadamente 1-10% en p/v de un polímero seleccionado del grupo que consiste en: alginato, quitosano, ácido hialurónico, polietilenglicol (PEG), celulosa, poli(ácido acrílico) (PAA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), PLA-PGA, PLA-PEG, dextrano, dextrano-PEG, almidón, geles a base de colágeno,
- 50

agarosas, ácido plurónico, sulfato de heparano, glicosaminoglicanos, poli(óxido de etileno) (PEO), copolímero de óxido de etileno y óxido de propileno (P(EO-co-PO)) y Pluronic/poloxámero, a al menos parte de dicho armazón de dióxido de titanio y a continuación centrifugar el armazón dióxido de titanio,

c) efectuar la gelificación del polímero proporcionado al armazón de dióxido de titanio en la etapa b); y

5 d) secar opcionalmente el armazón de dióxido de titanio,

en donde las etapas b) y c) se repiten opcionalmente al menos una vez.

10. Un implante médico que comprende un armazón de dióxido de titanio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

10 11. Un armazón de dióxido de titanio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para uso como un implante médico.

12. Un armazón de dióxido de titanio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o un implante médico según la reivindicación 10, para uso para la regeneración, reparación, sustitución y/o restauración de tejido, tal como hueso.

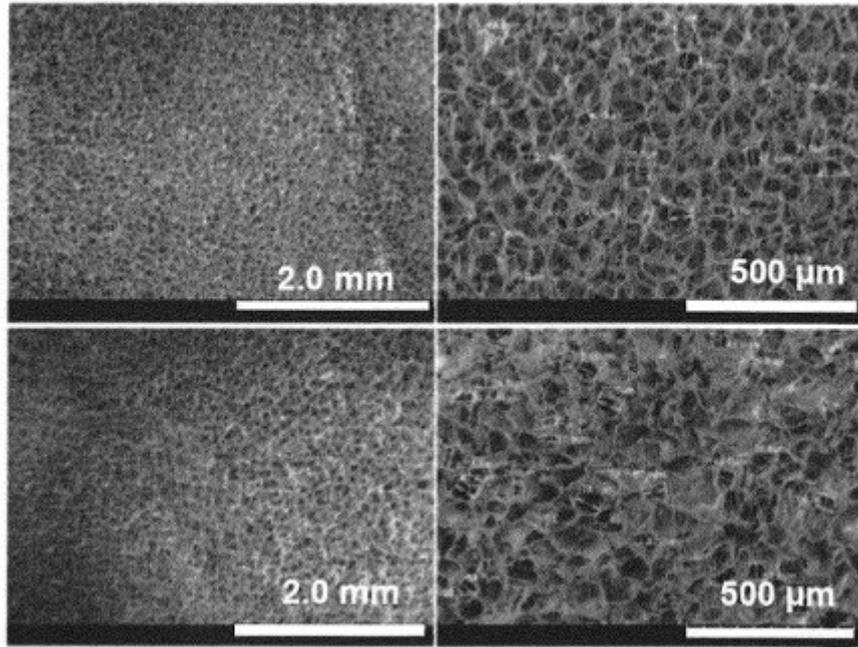


Fig. 1

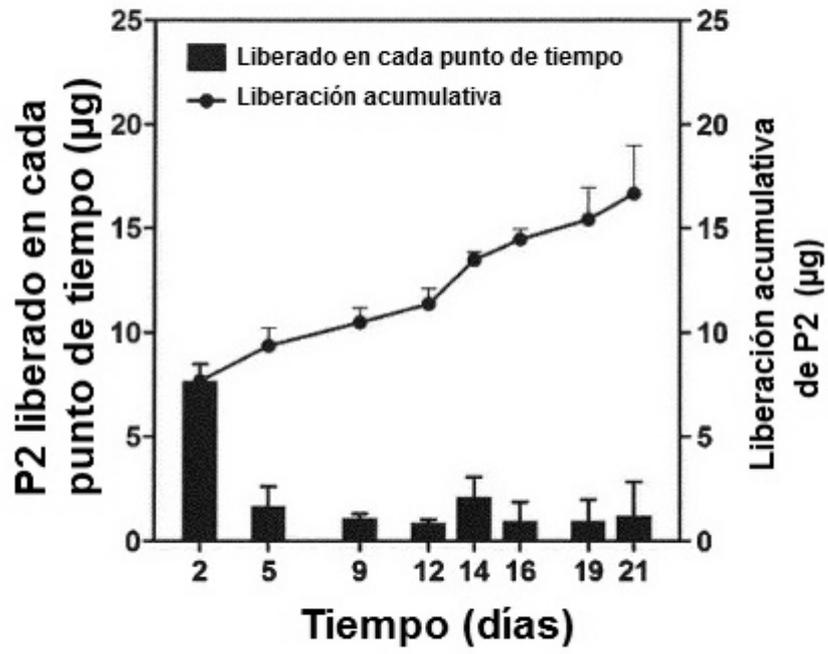


Fig. 2

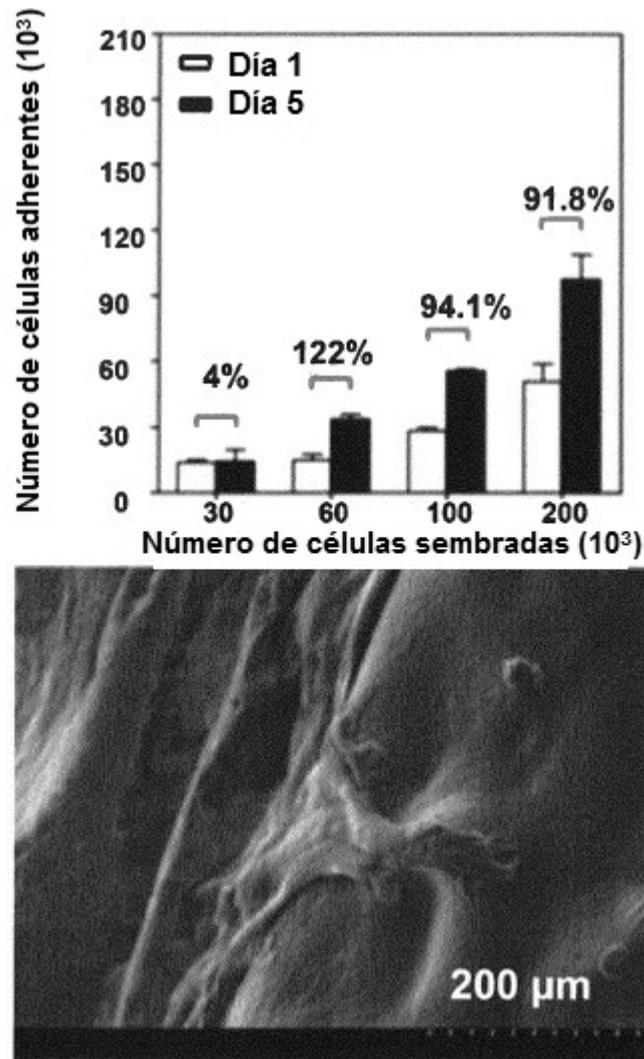


Fig. 3A

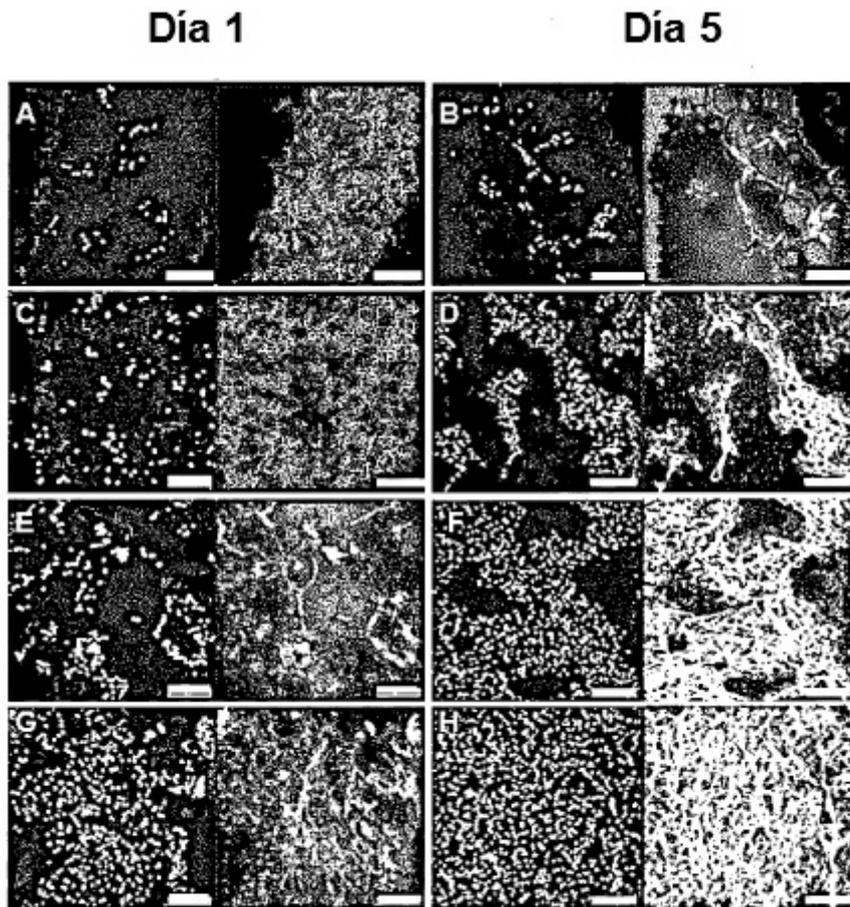


Fig. 3B

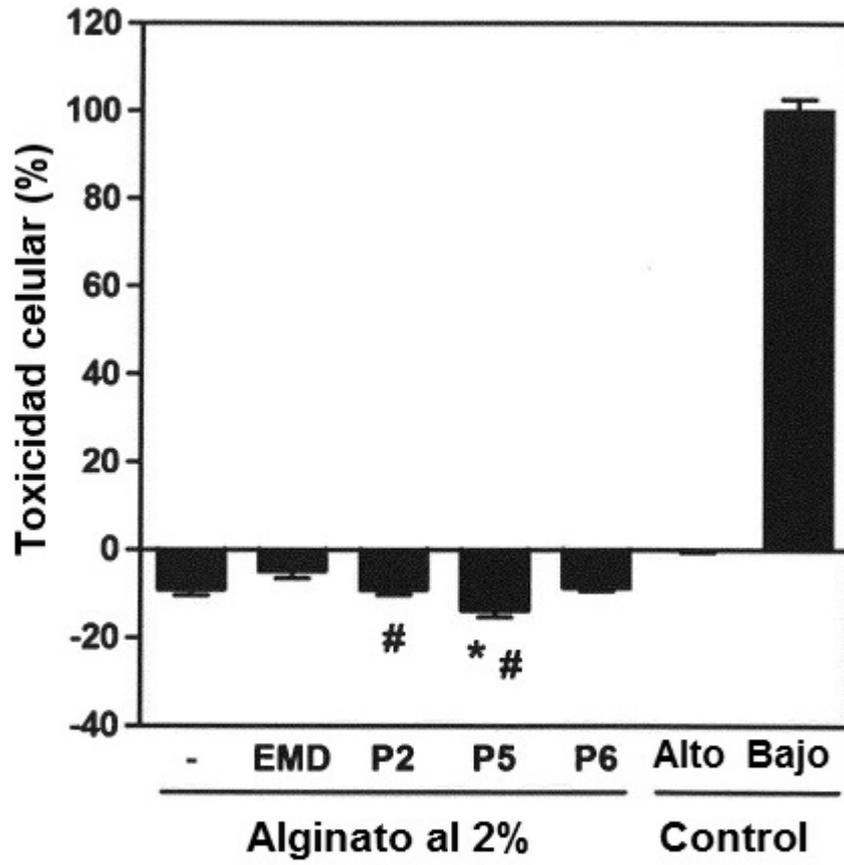


Fig. 4

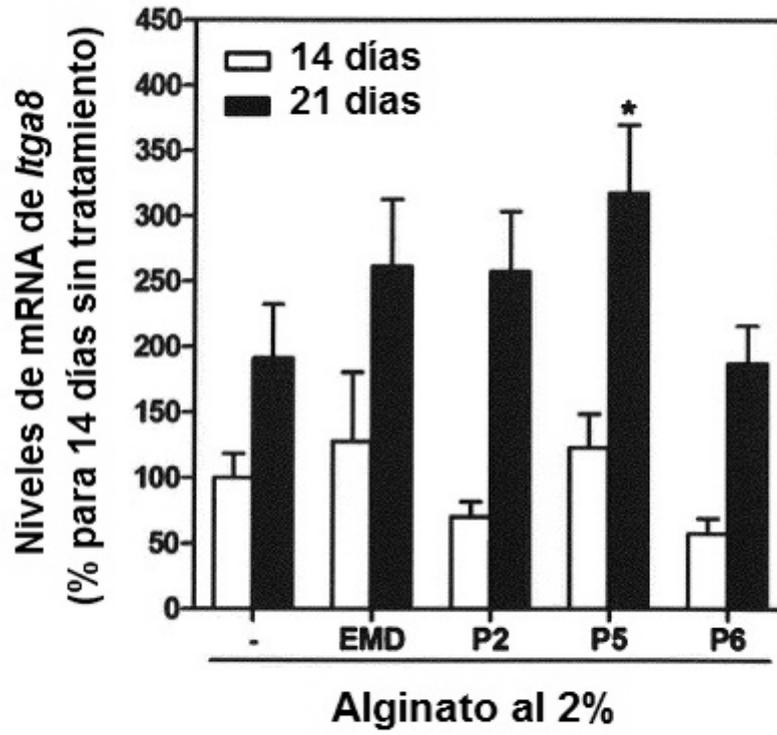


Fig. 5A

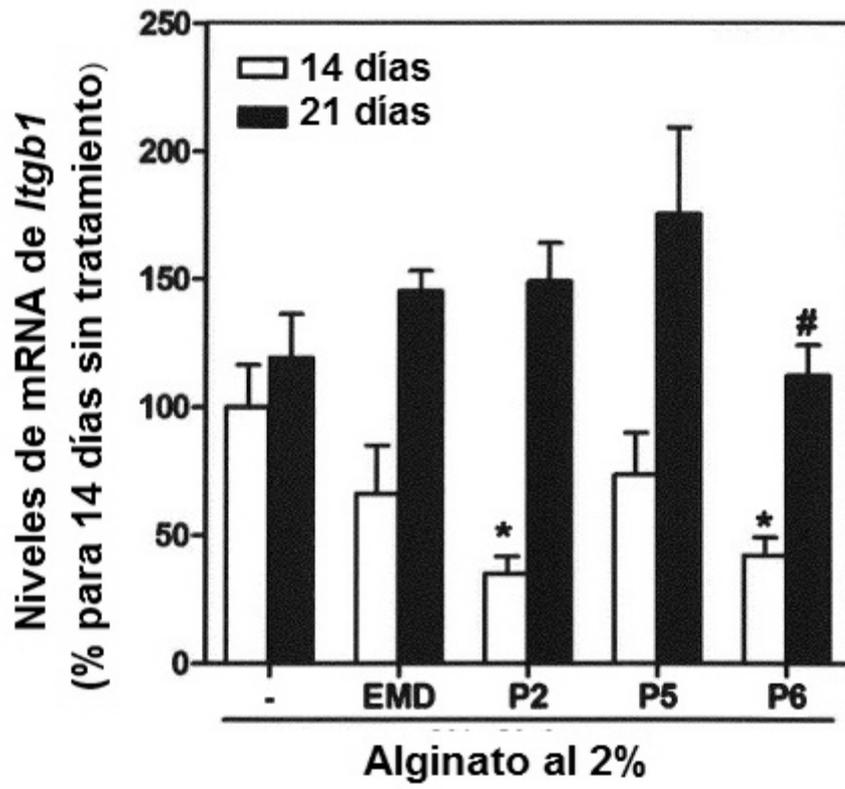


Fig. 5B

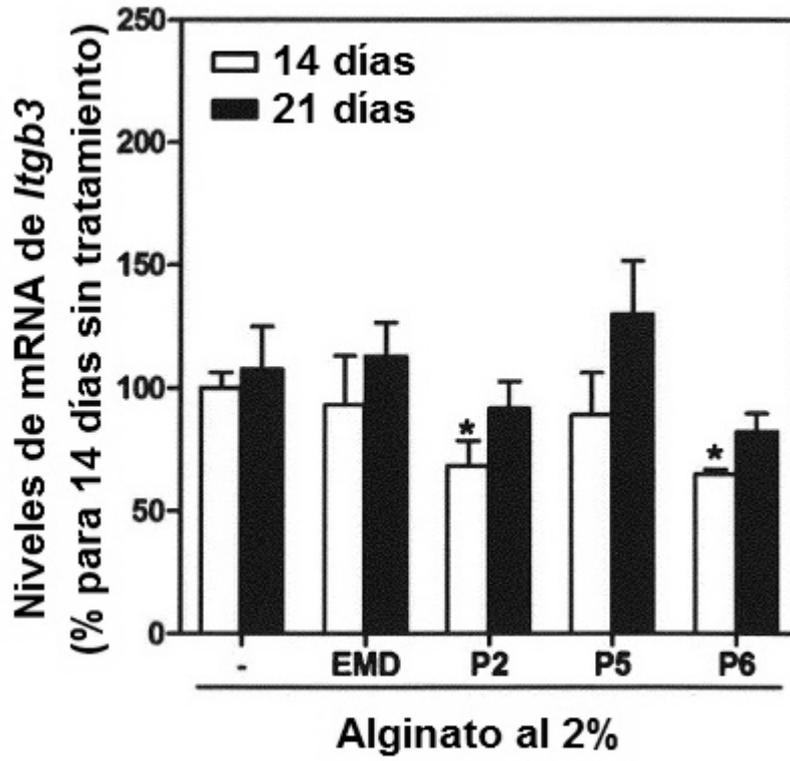


Fig. 5C

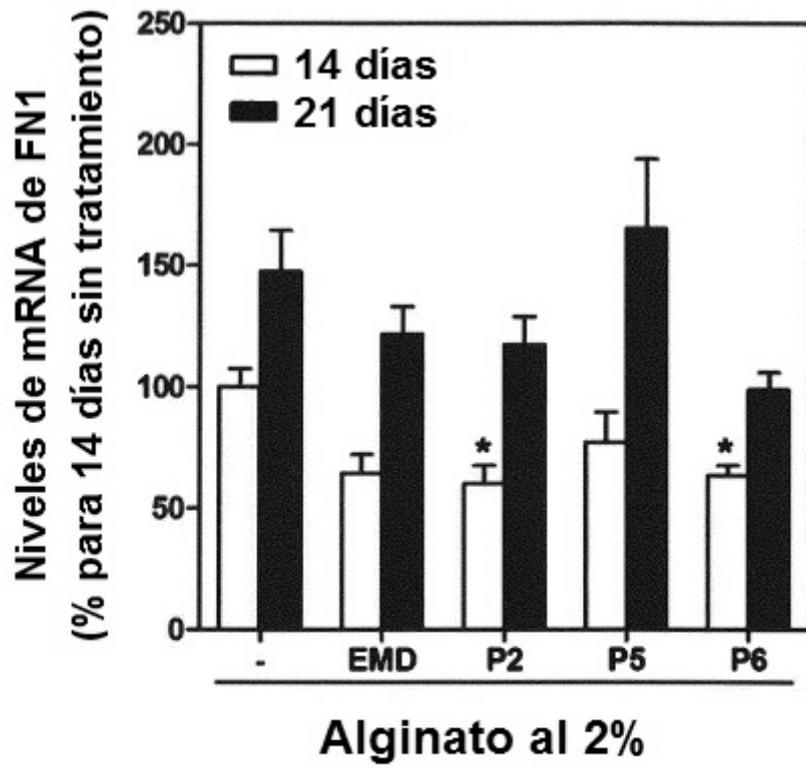


Fig. 5D

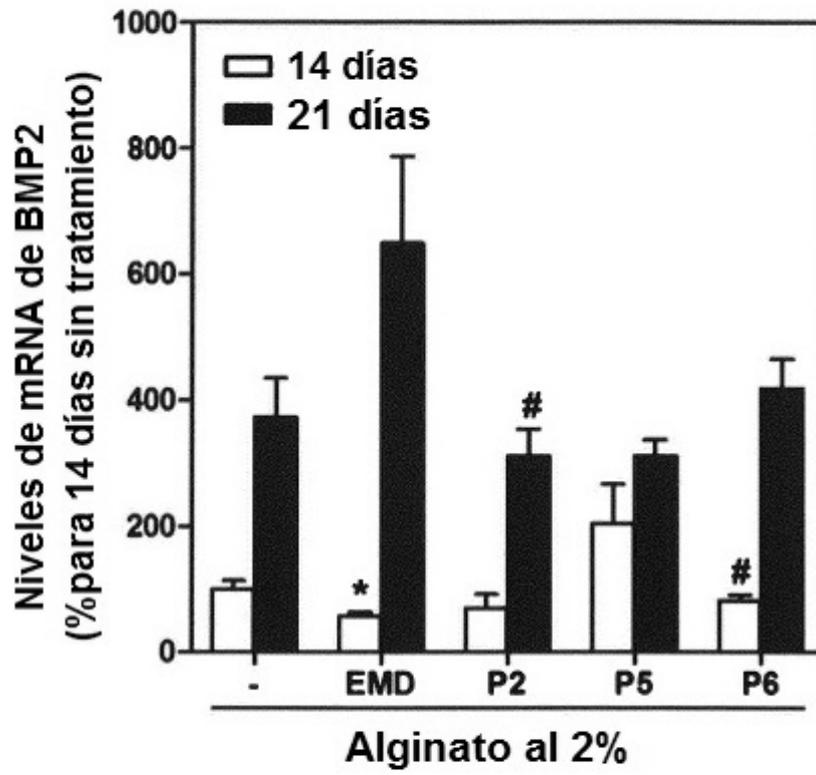


Fig. 6A

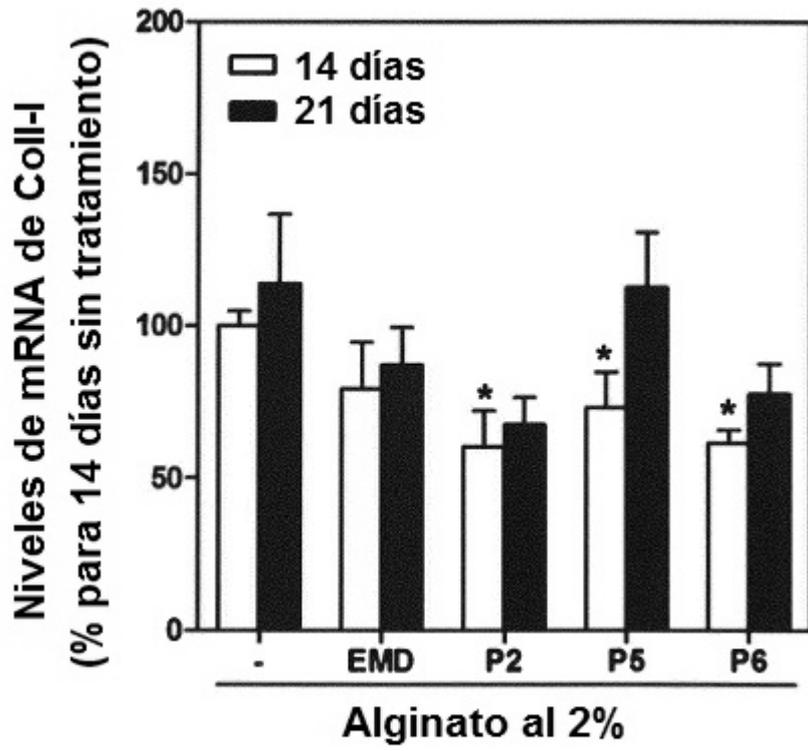


Fig. 6B

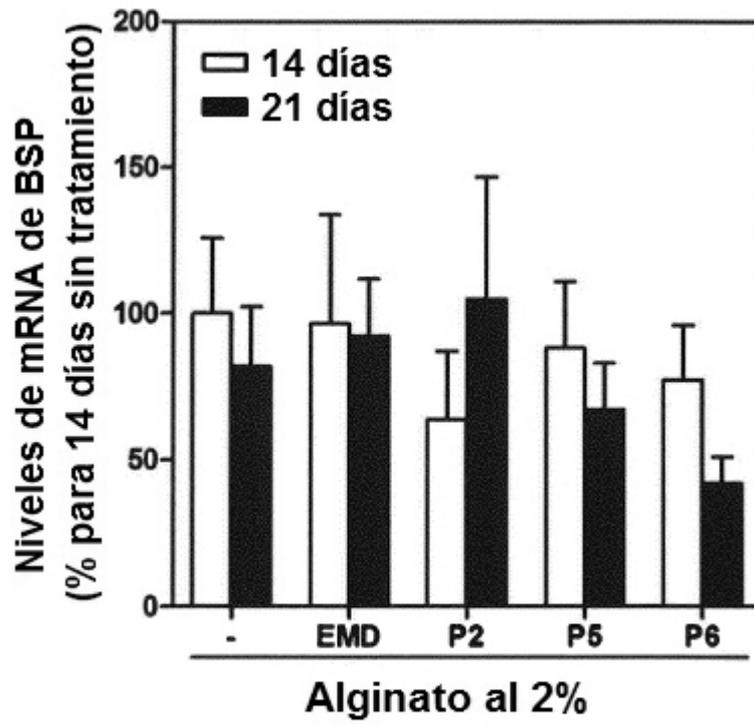


Fig. 6C

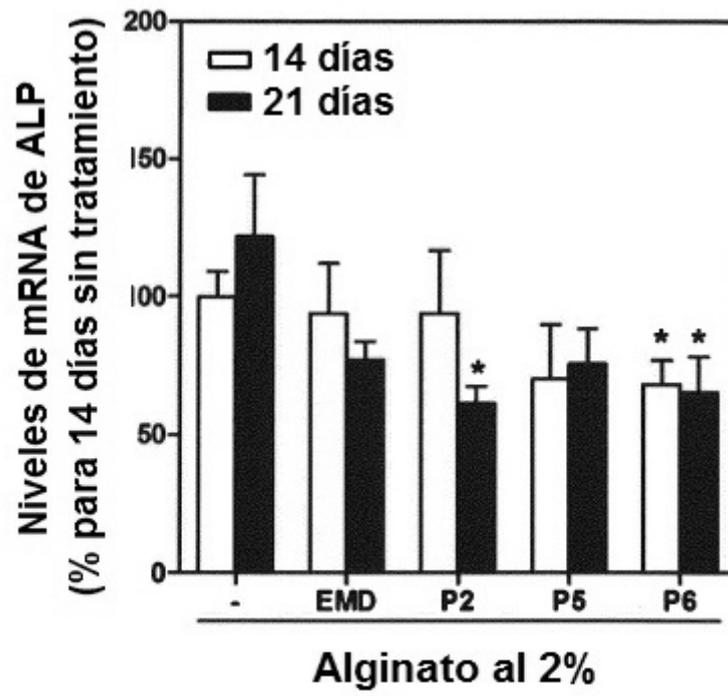


Fig. 6D

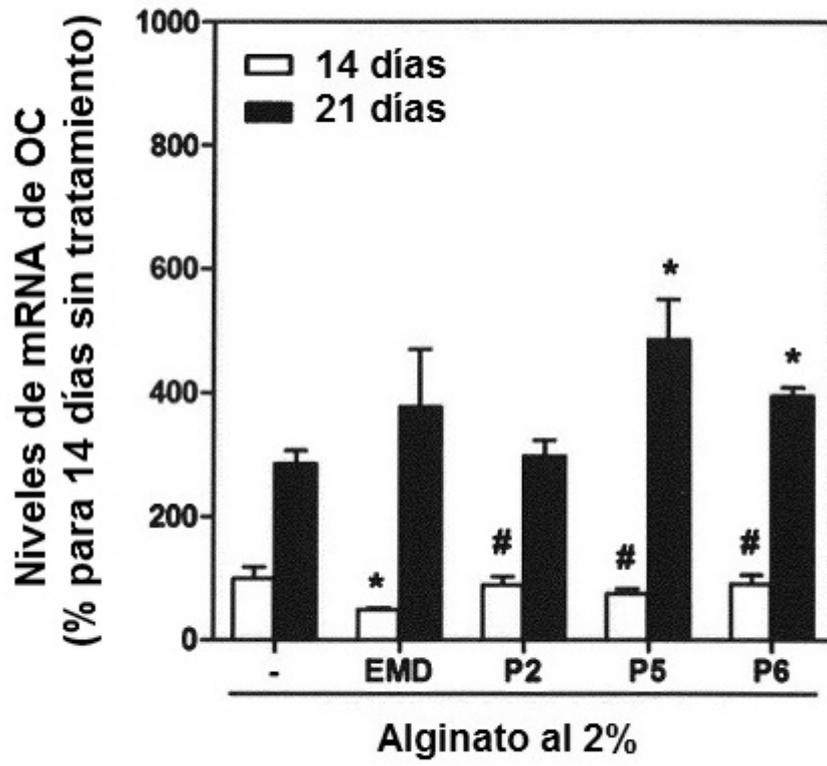


Fig. 6E

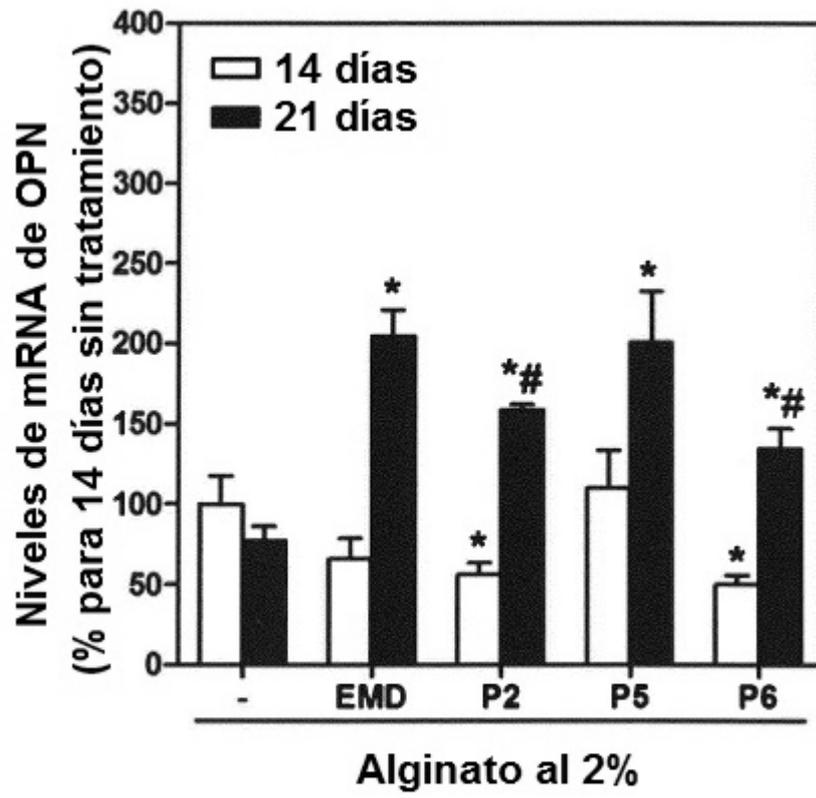


Fig. 6F

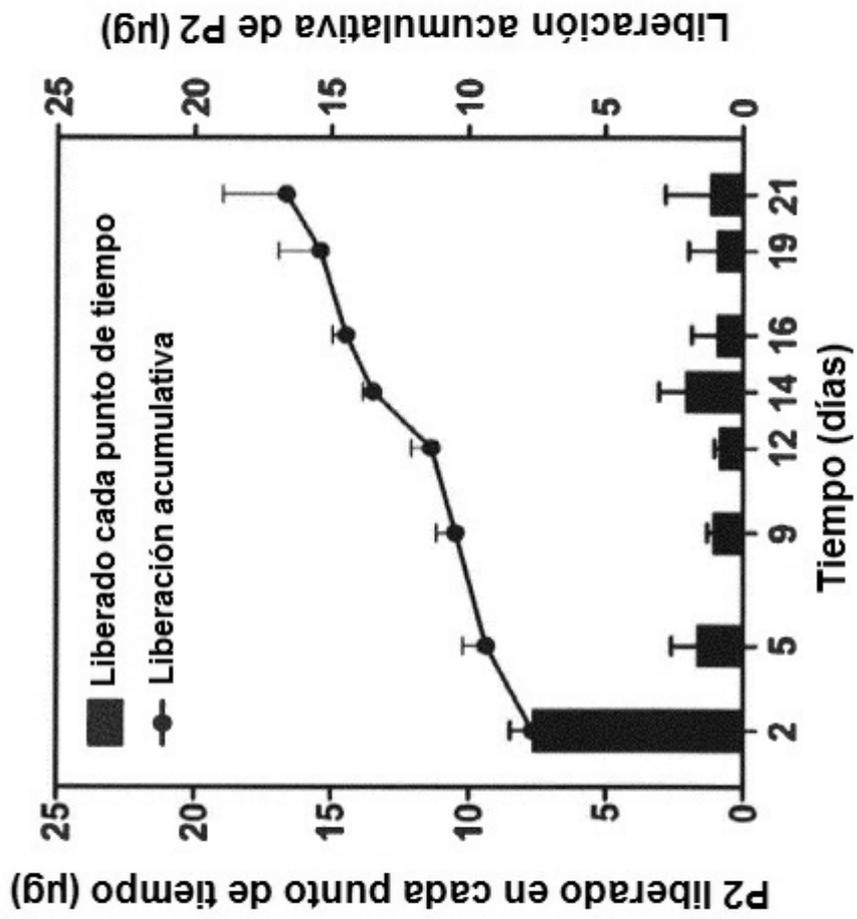


Fig. 7

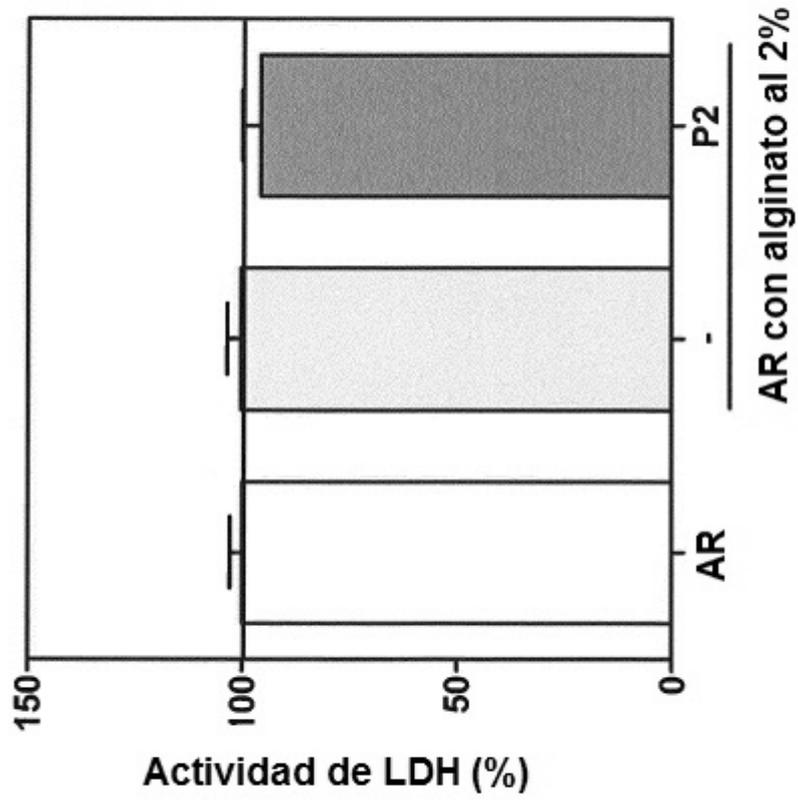


Fig. 8

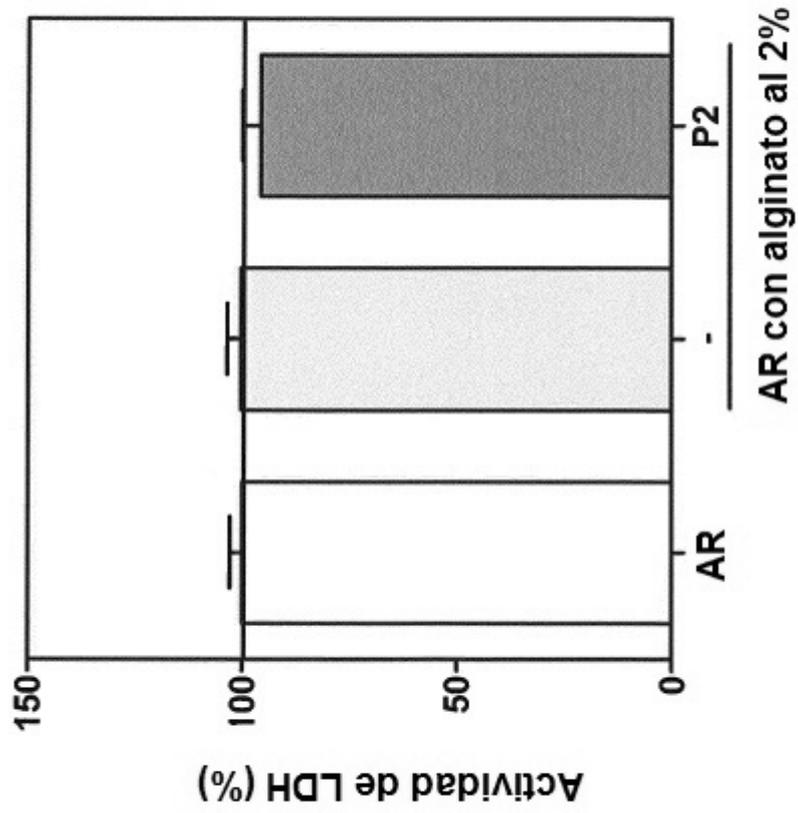


Fig. 8

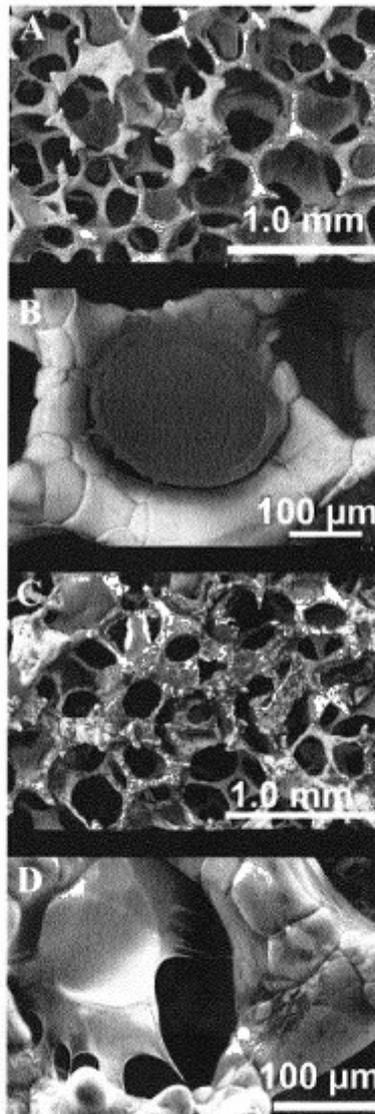


Fig. 9

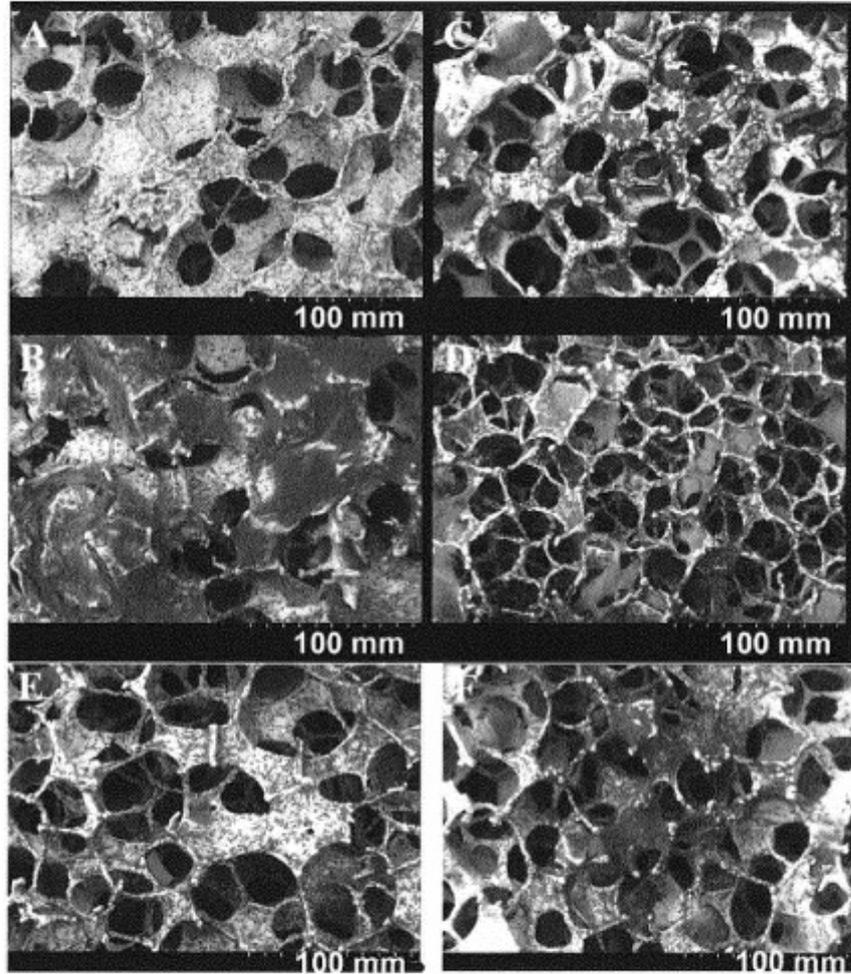


Fig. 10

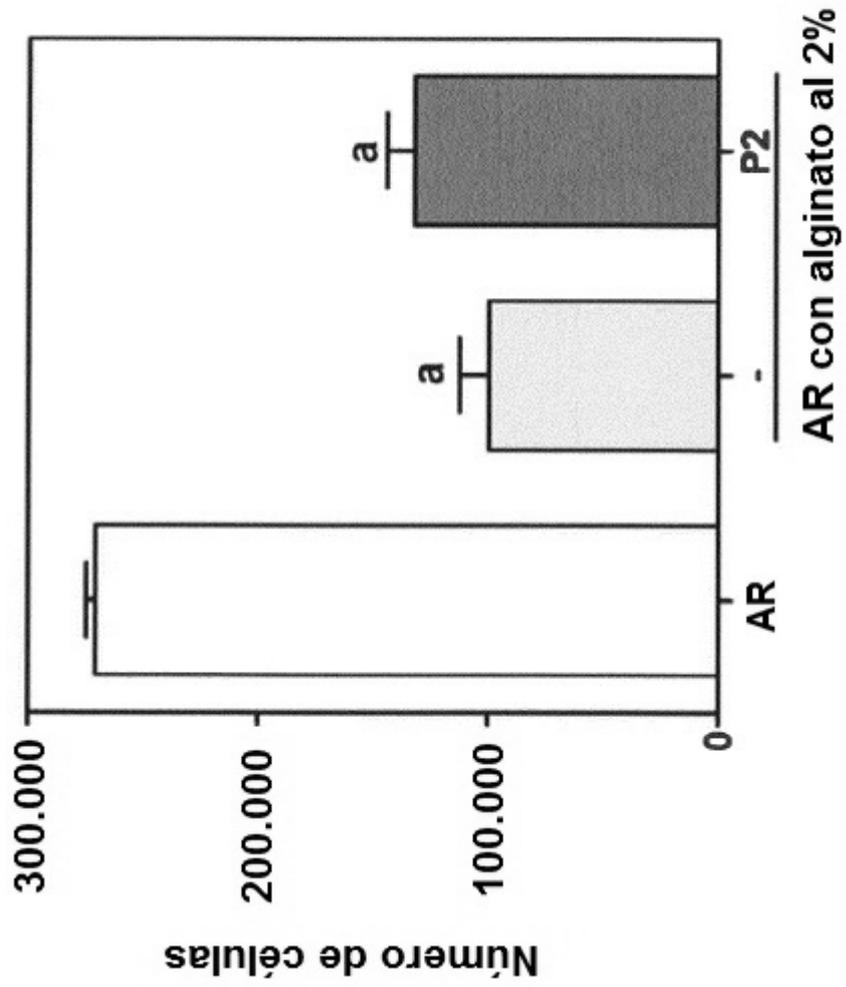


Fig. 11

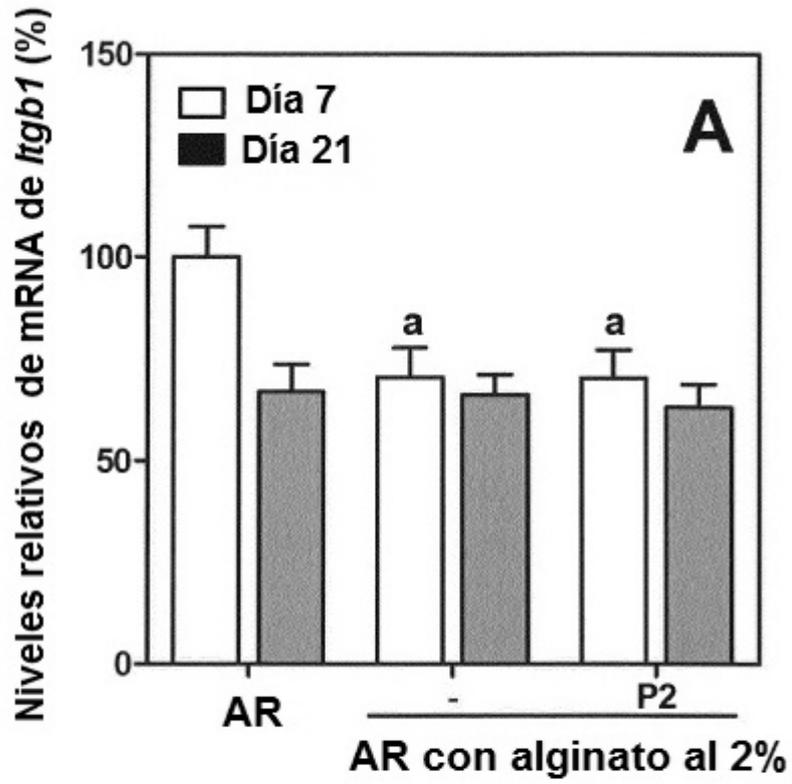


Fig. 12A

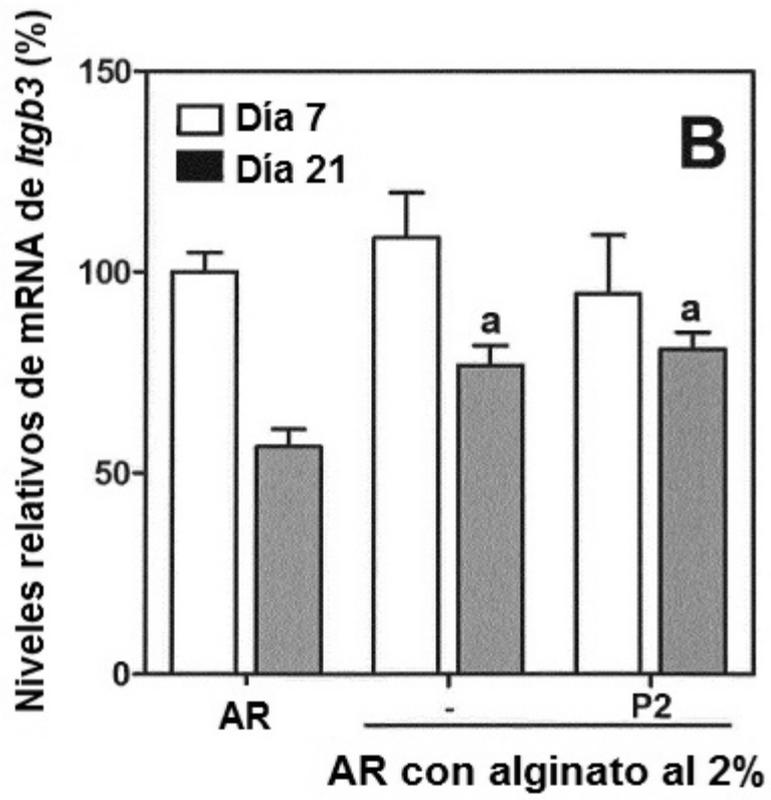


Fig. 12B

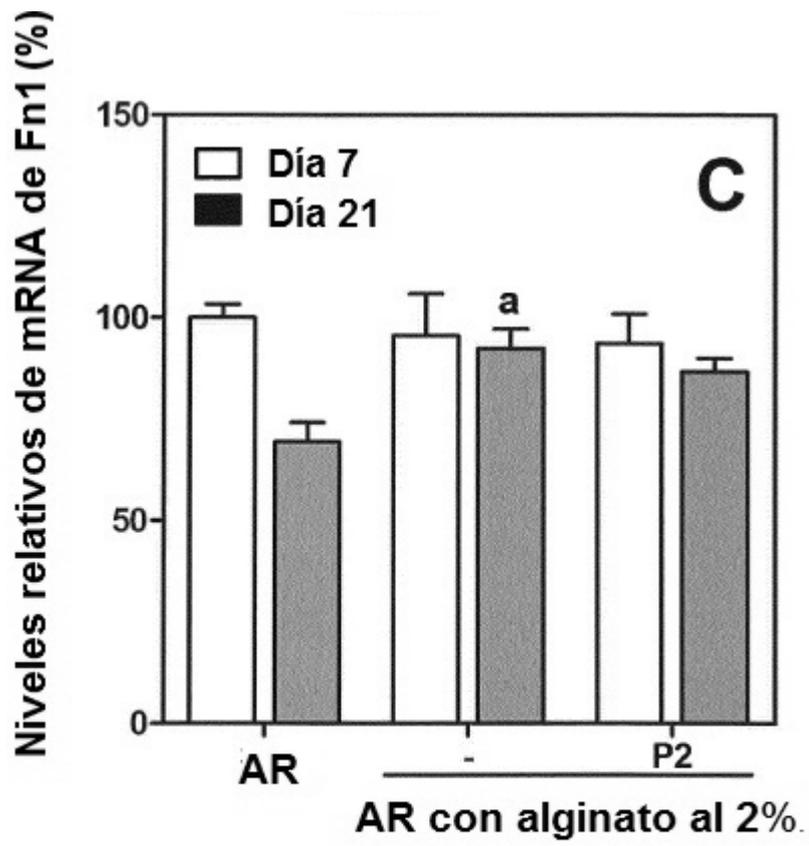


Fig. 12C

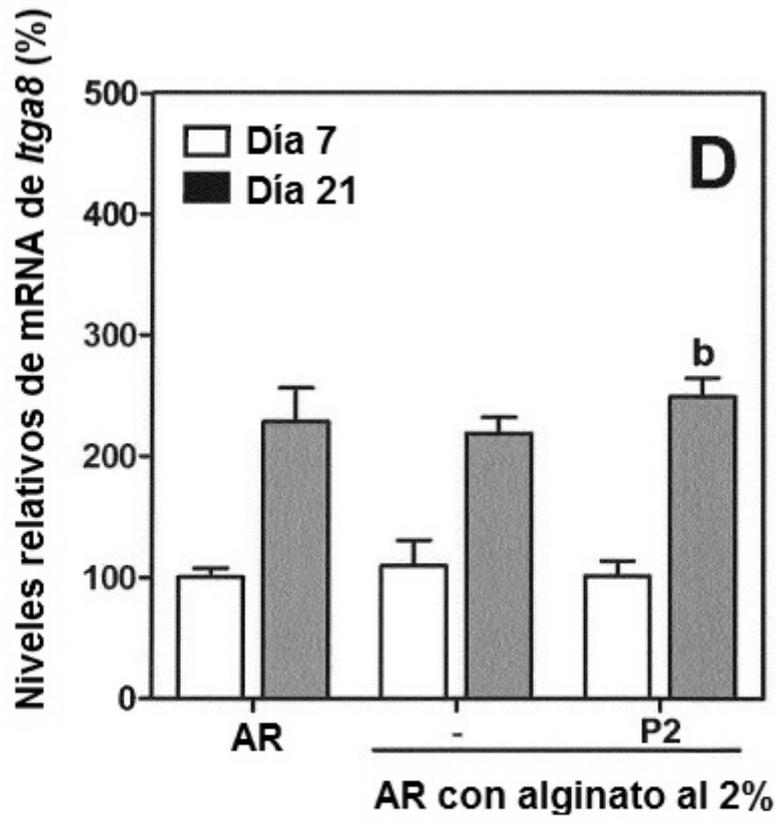


Fig. 12D

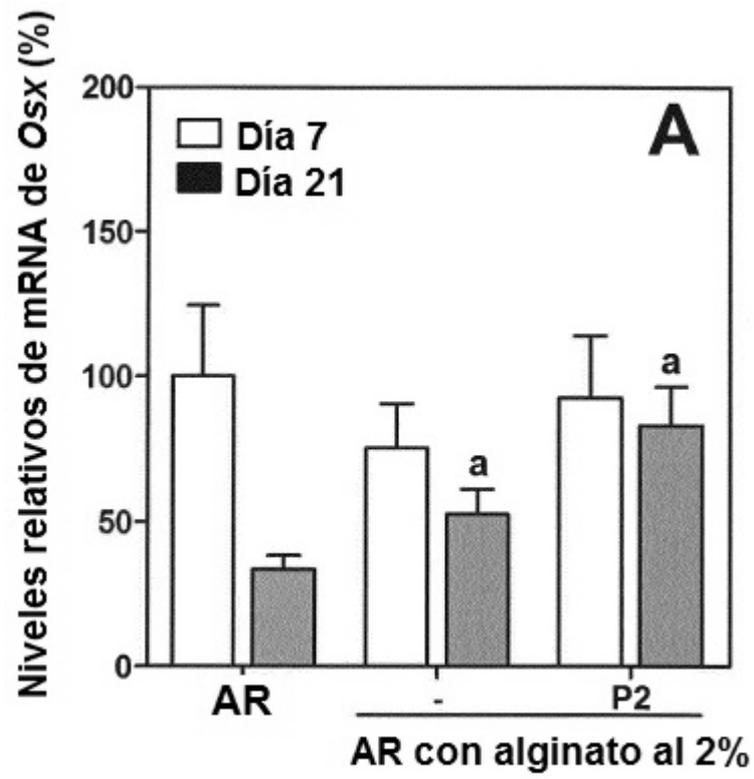


Fig. 13A

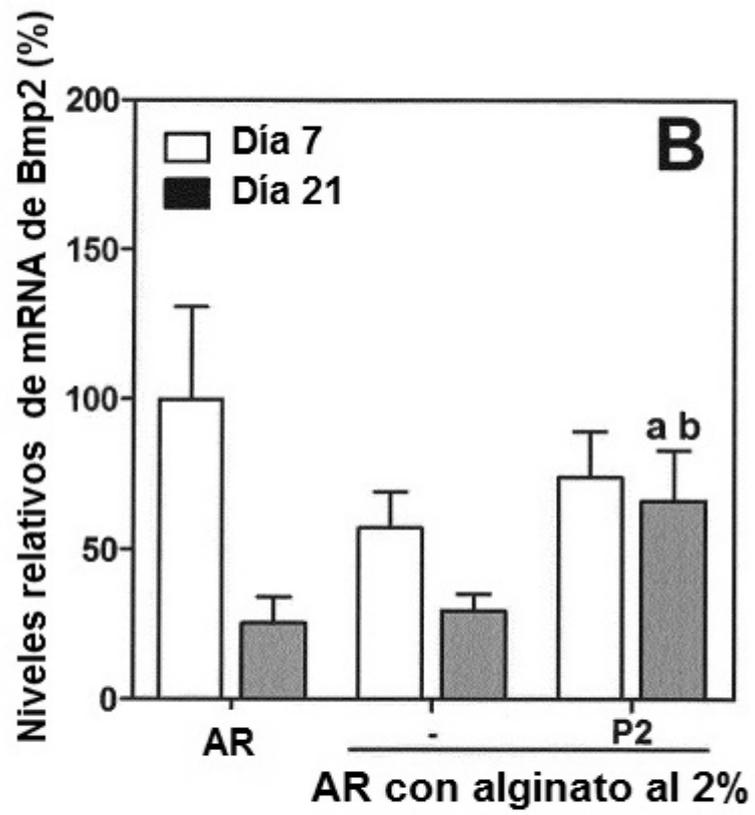


Fig. 13B

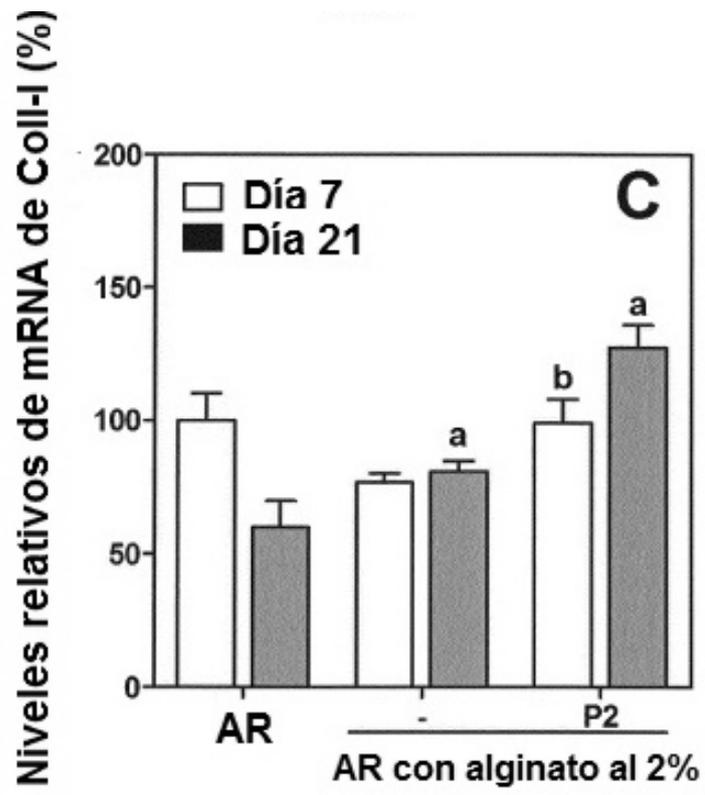


Fig. 13C

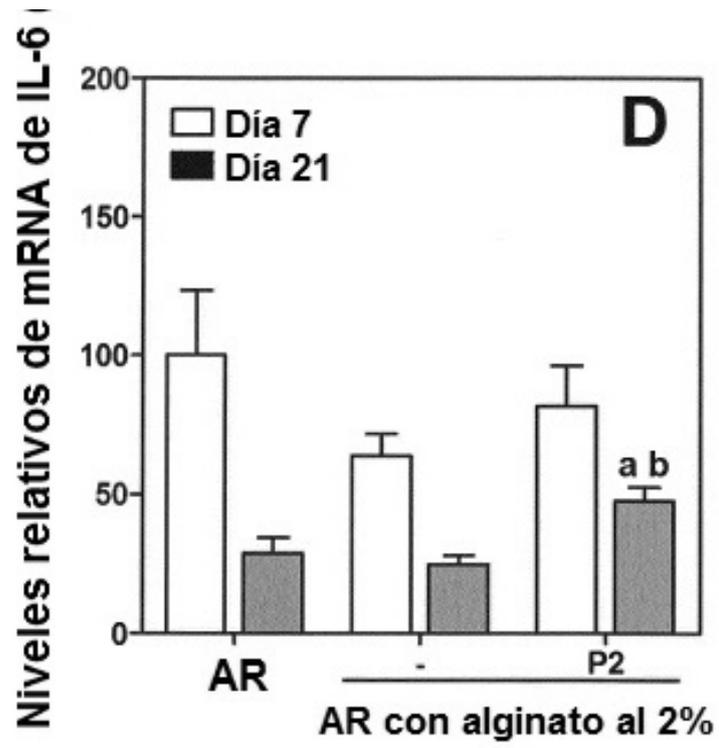


Fig. 13D

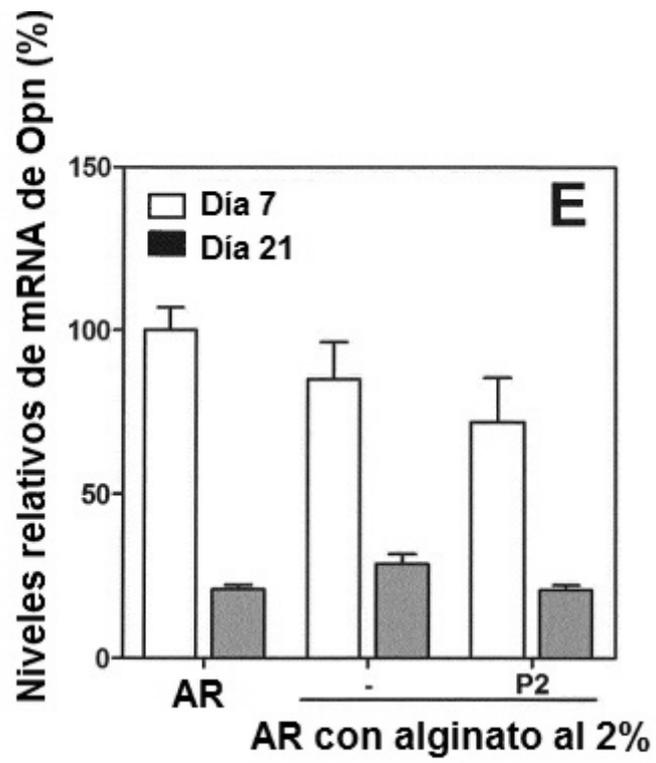


Fig. 13E

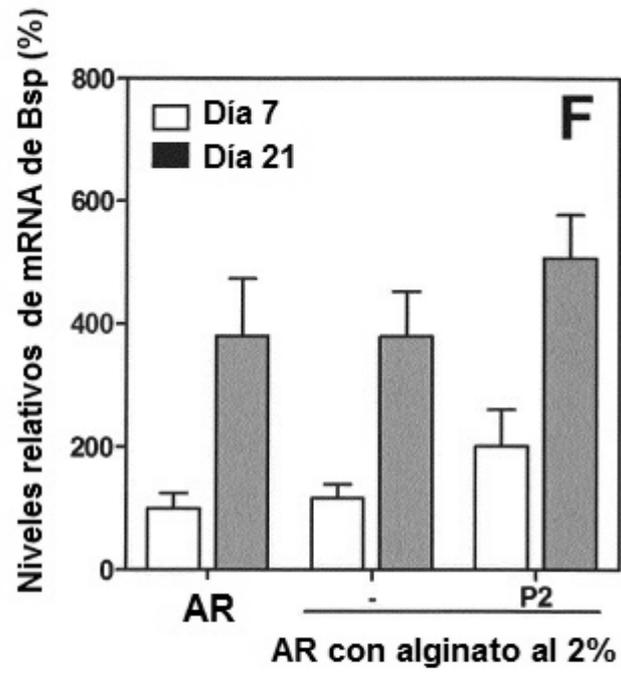


Fig. 13F

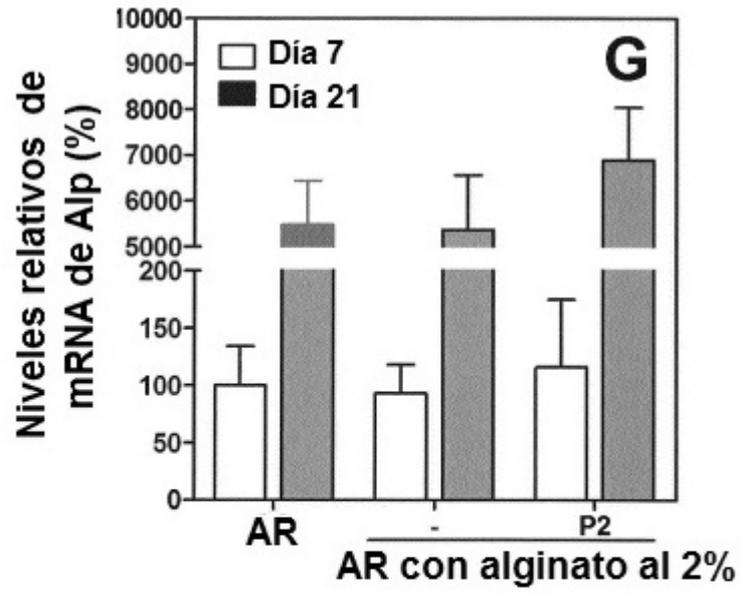


Fig. 13G

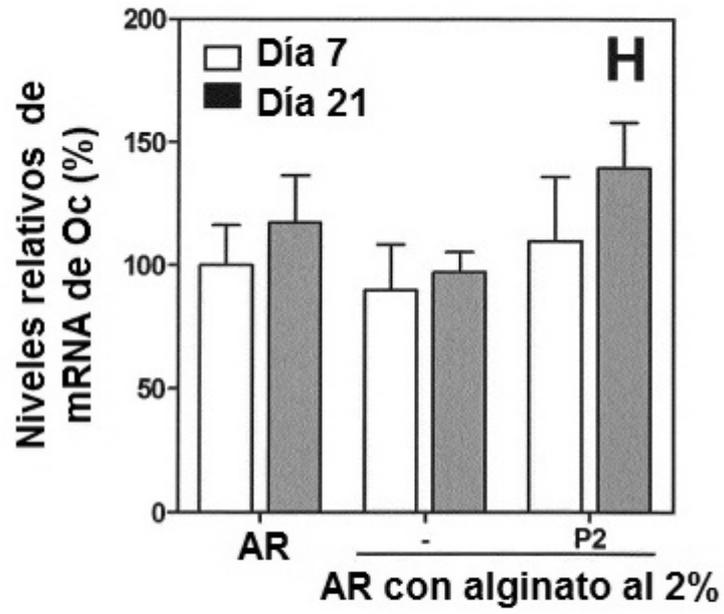


Fig. 13H

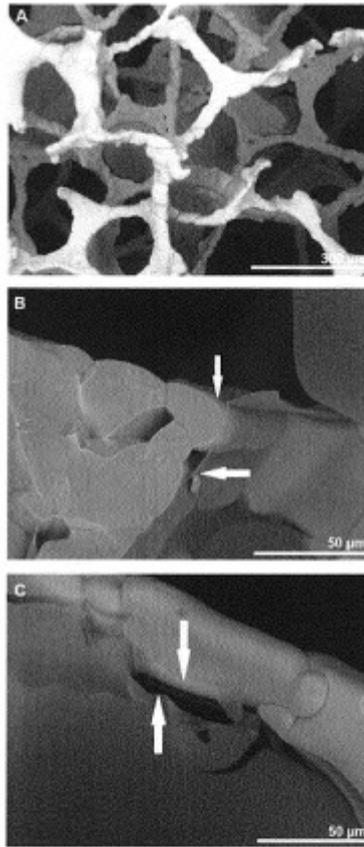


Fig. 14

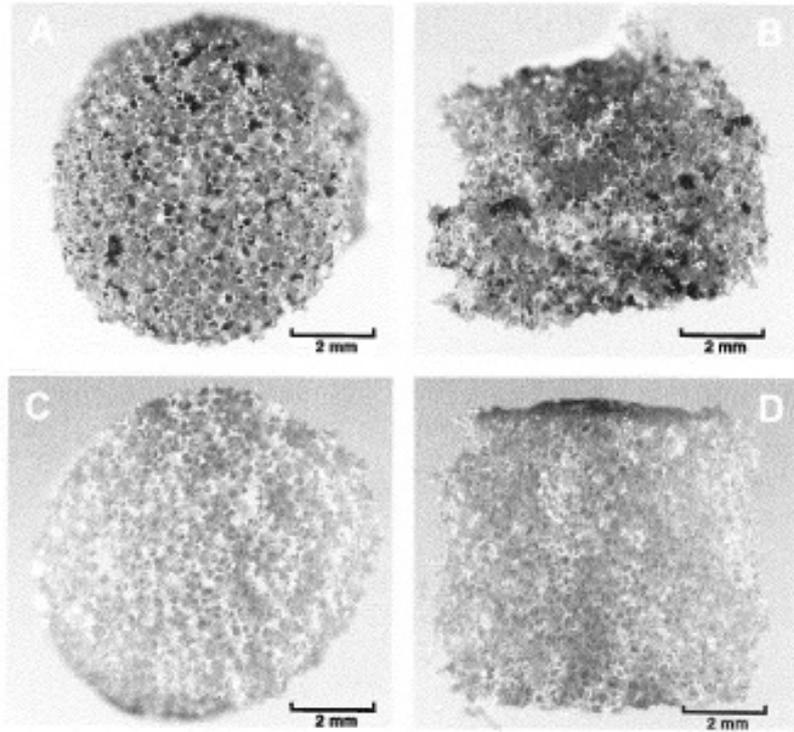


Fig. 15

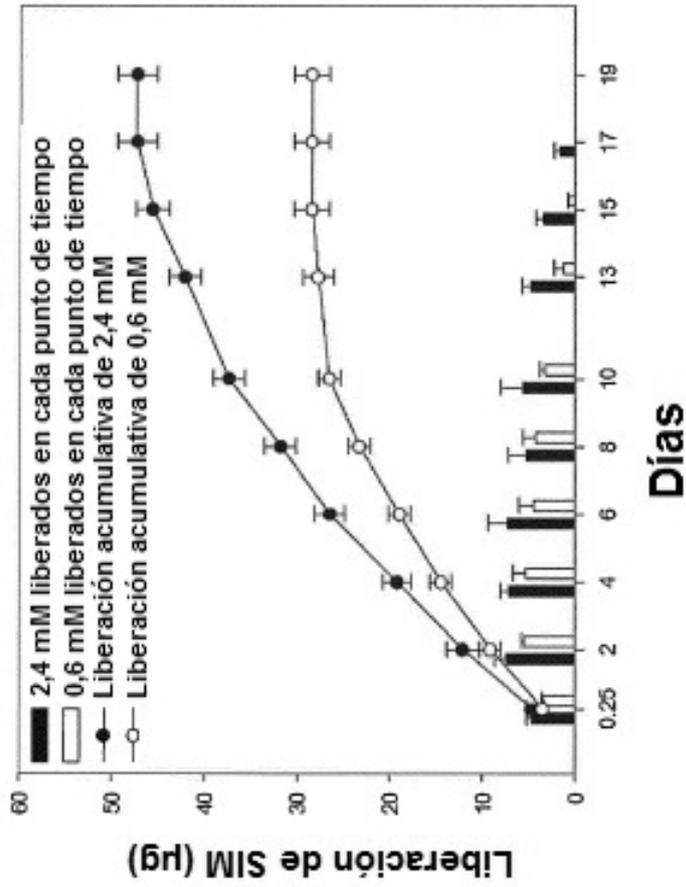
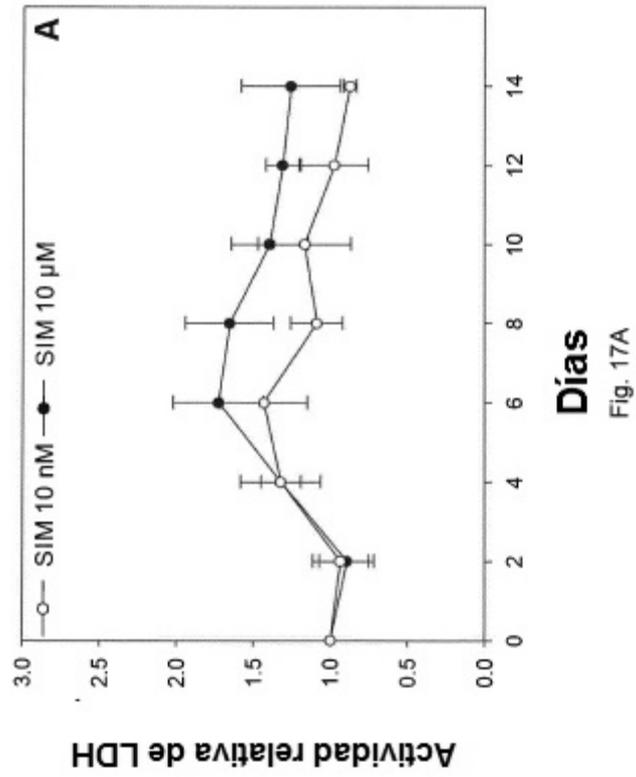


Fig. 16



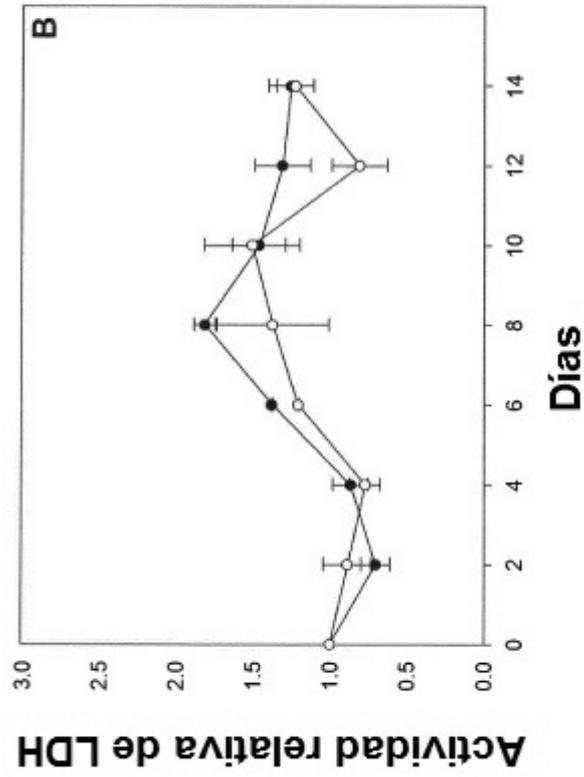


Fig. 17B

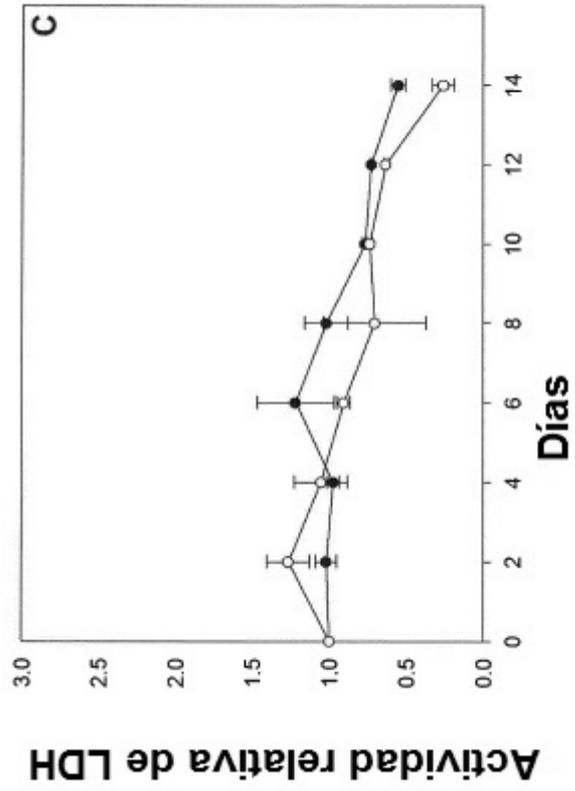


Fig 17C

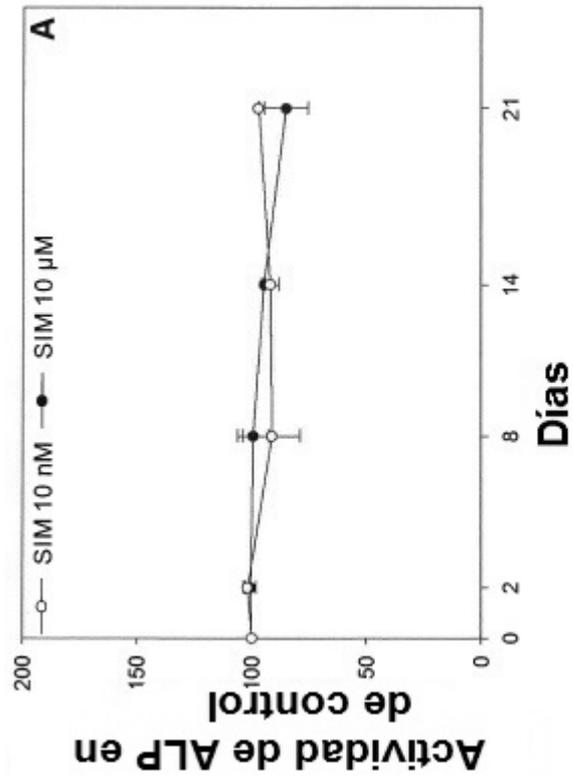


Fig. 18A

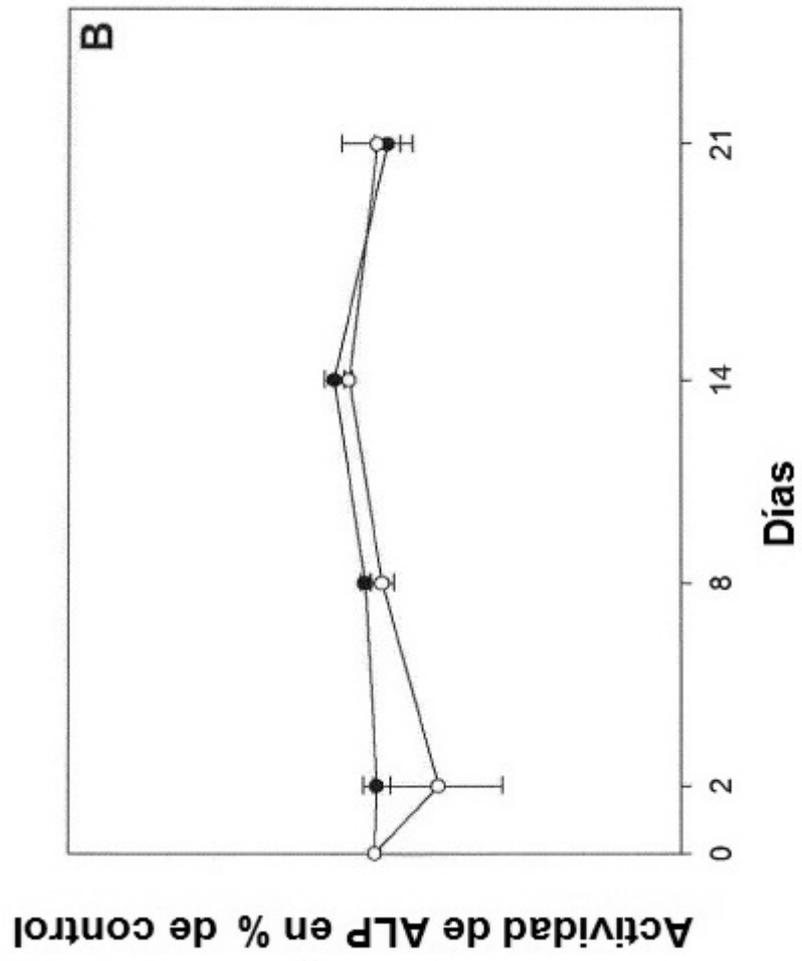


Fig 18B

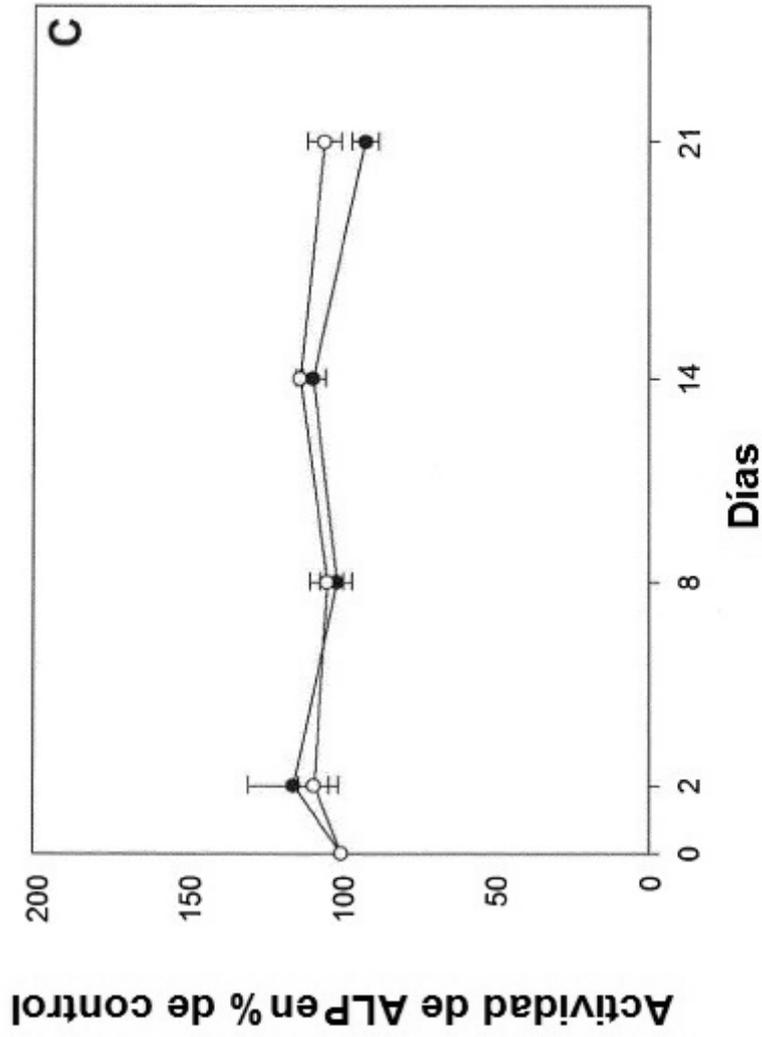


Fig. 18C

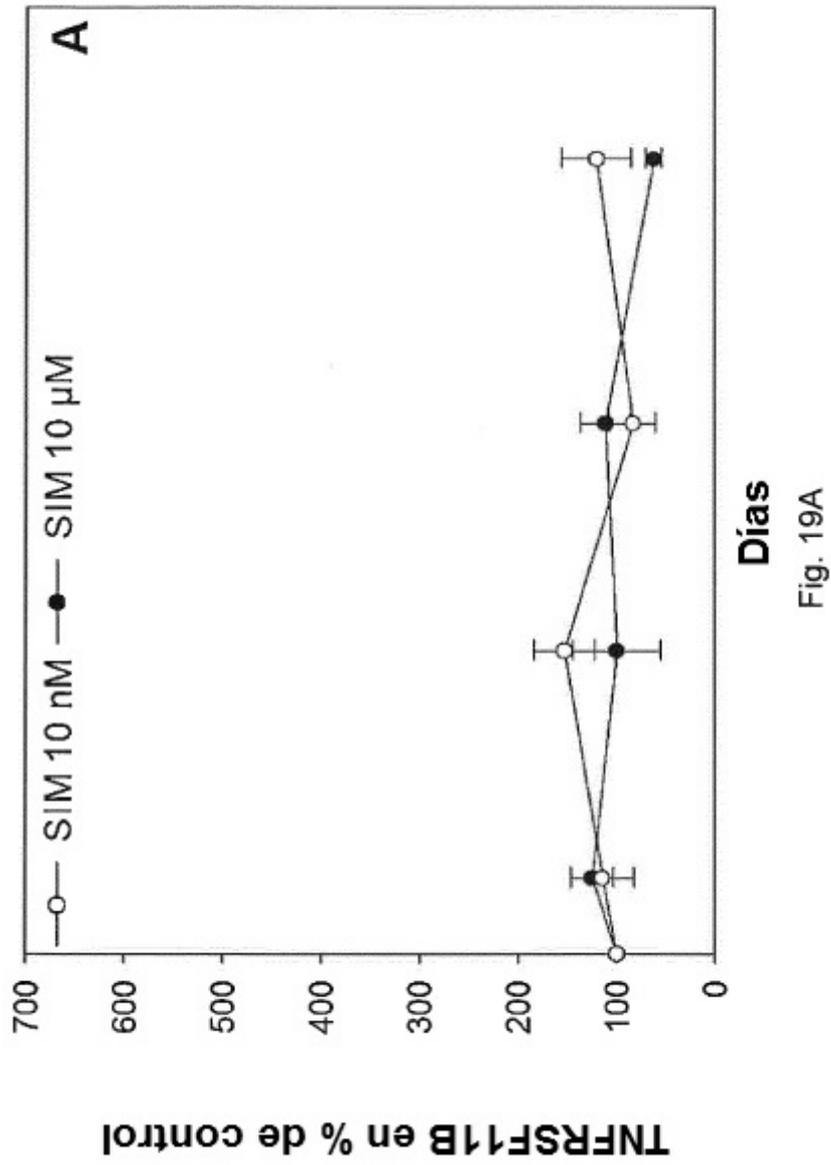


Fig. 19A

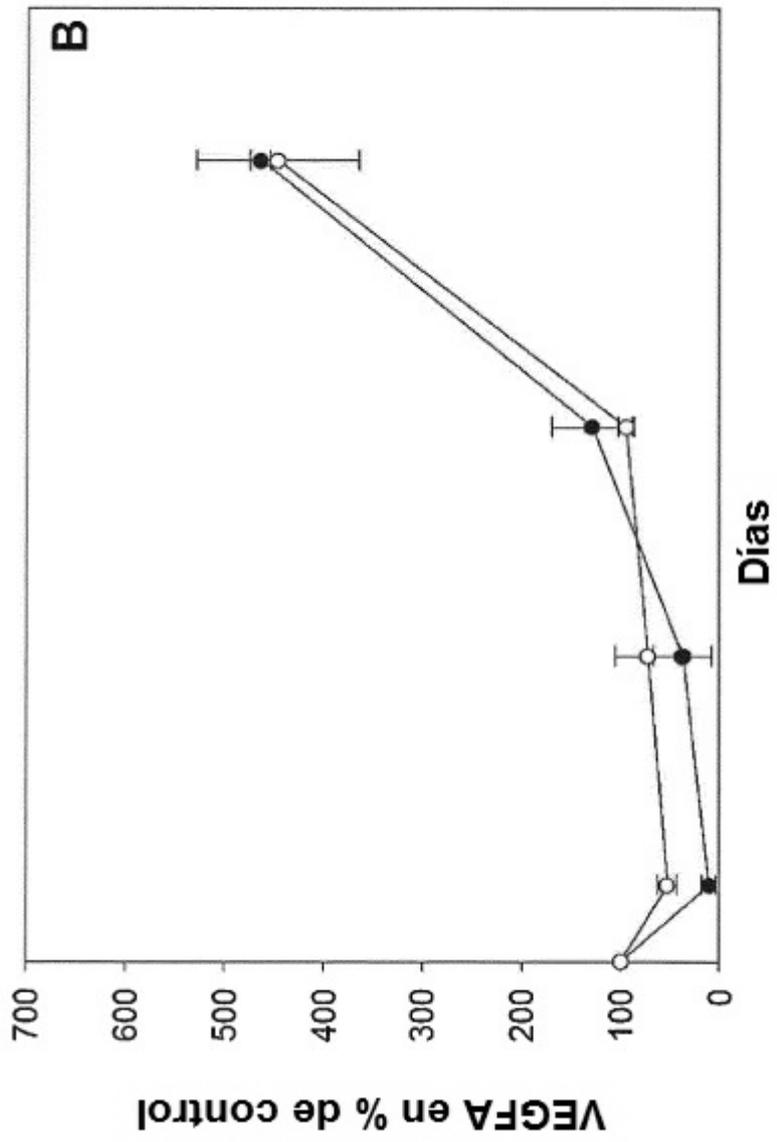


Fig. 19B

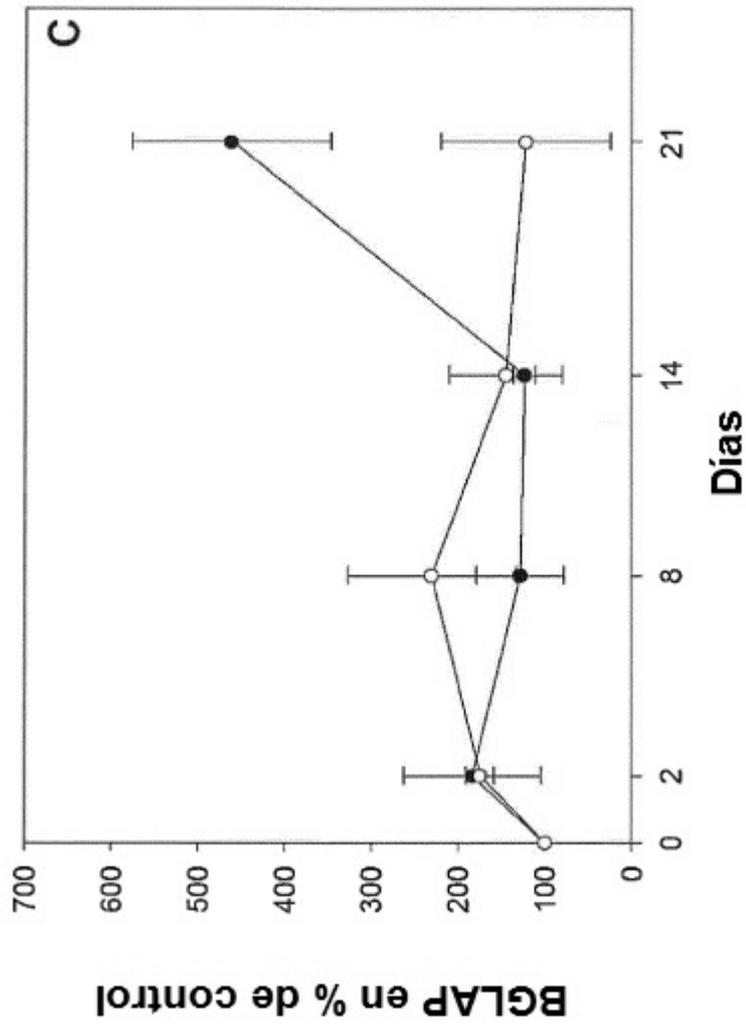


Fig. 19C

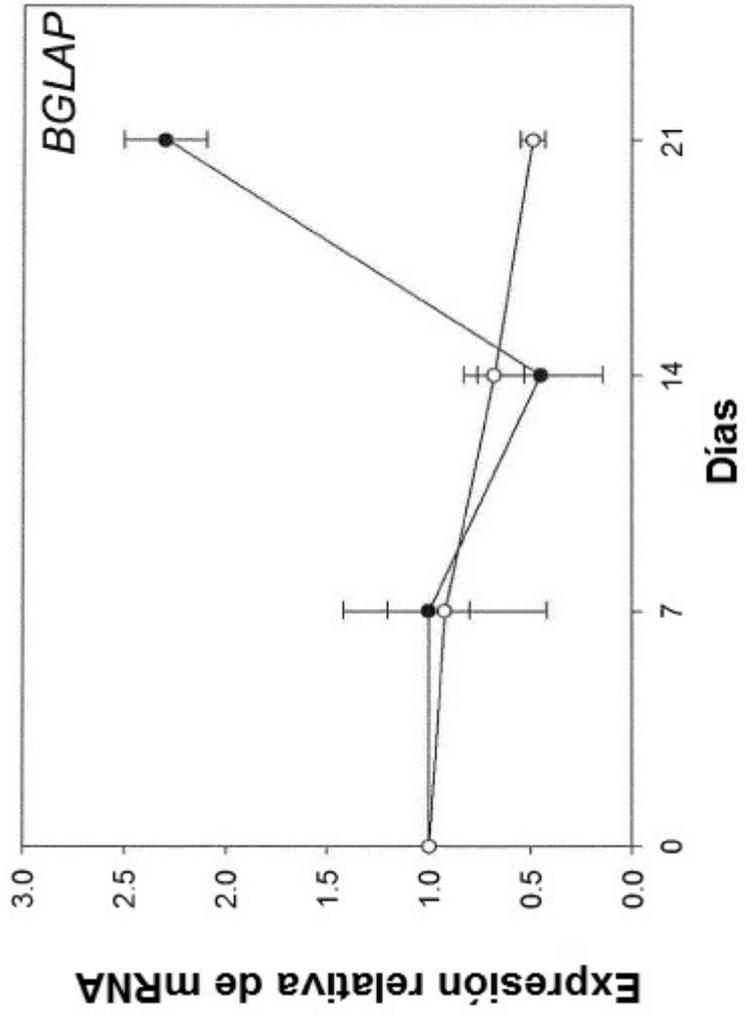


Fig. 20

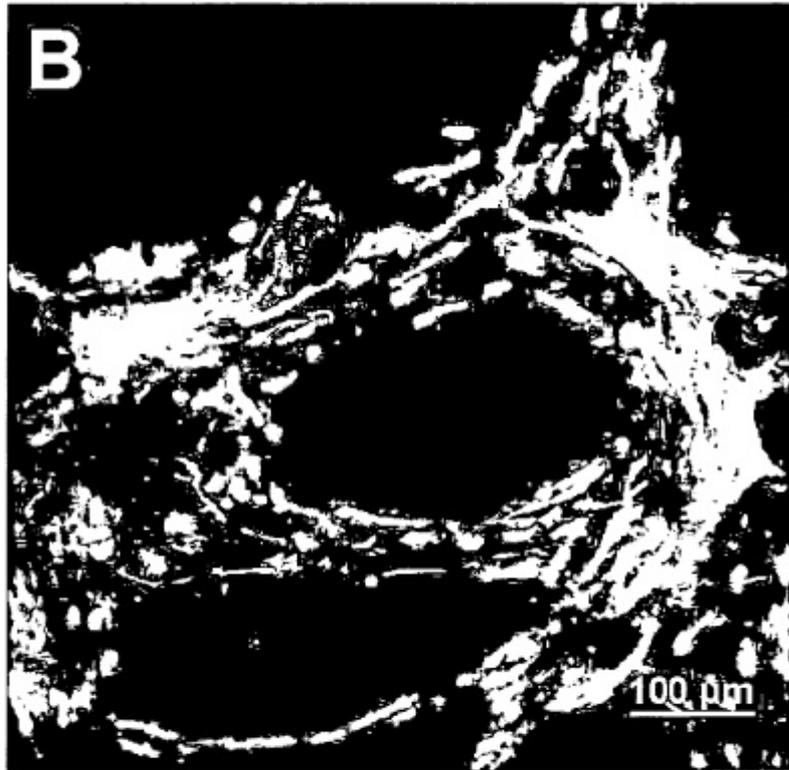


Fig. 21B

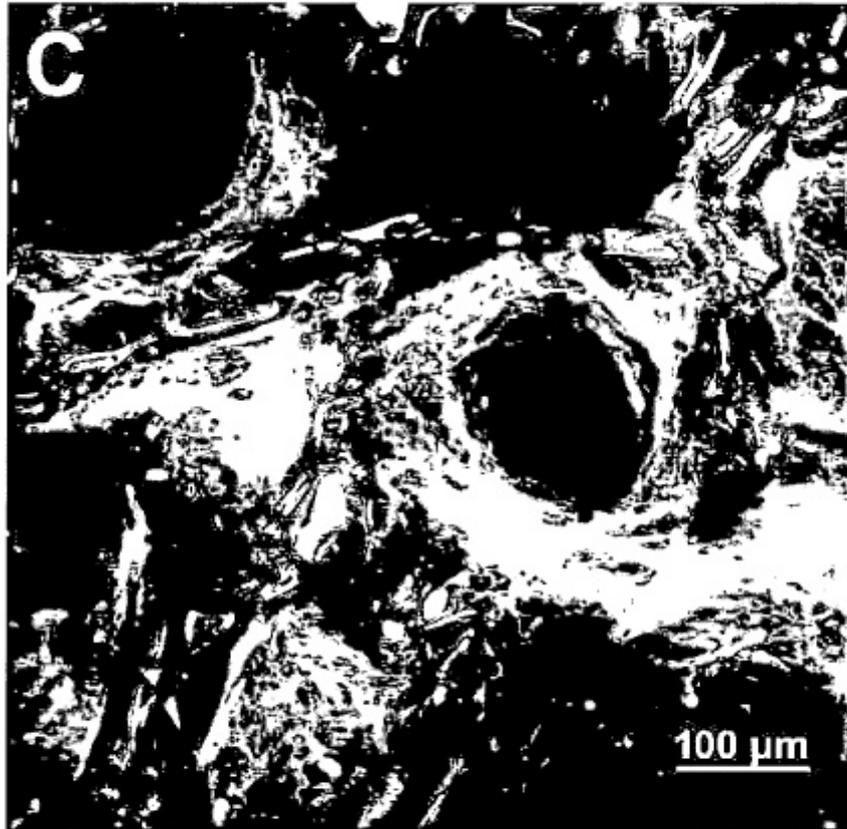


Fig. 21C

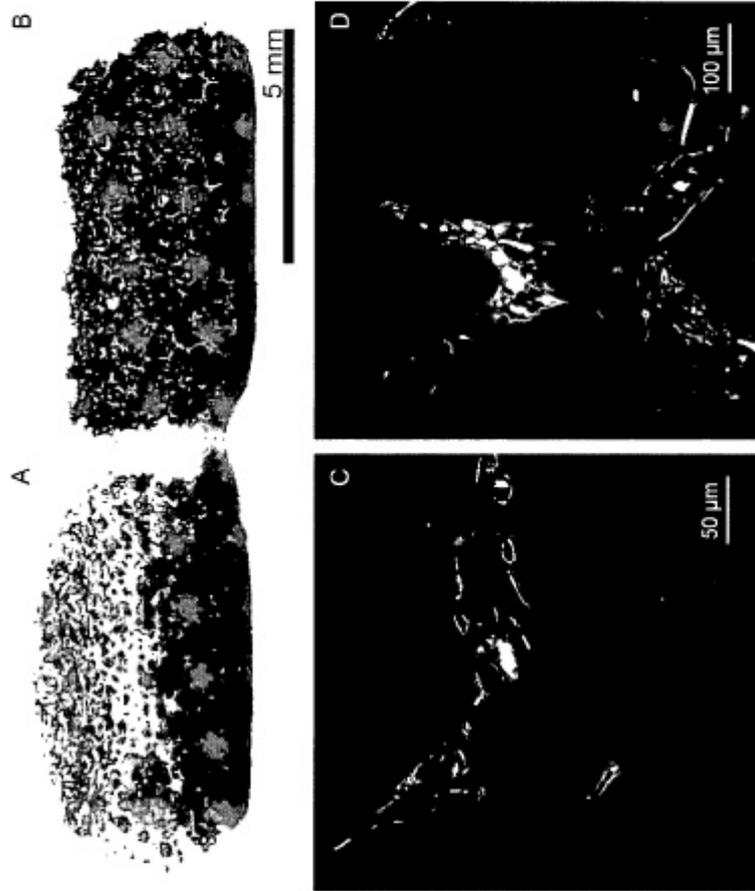


Fig. 22

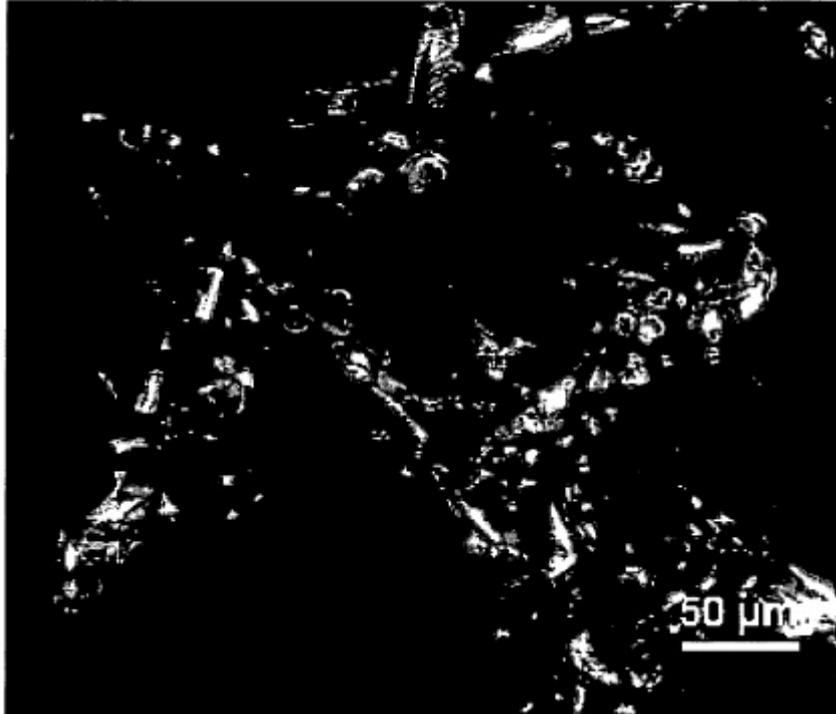


Fig. 23

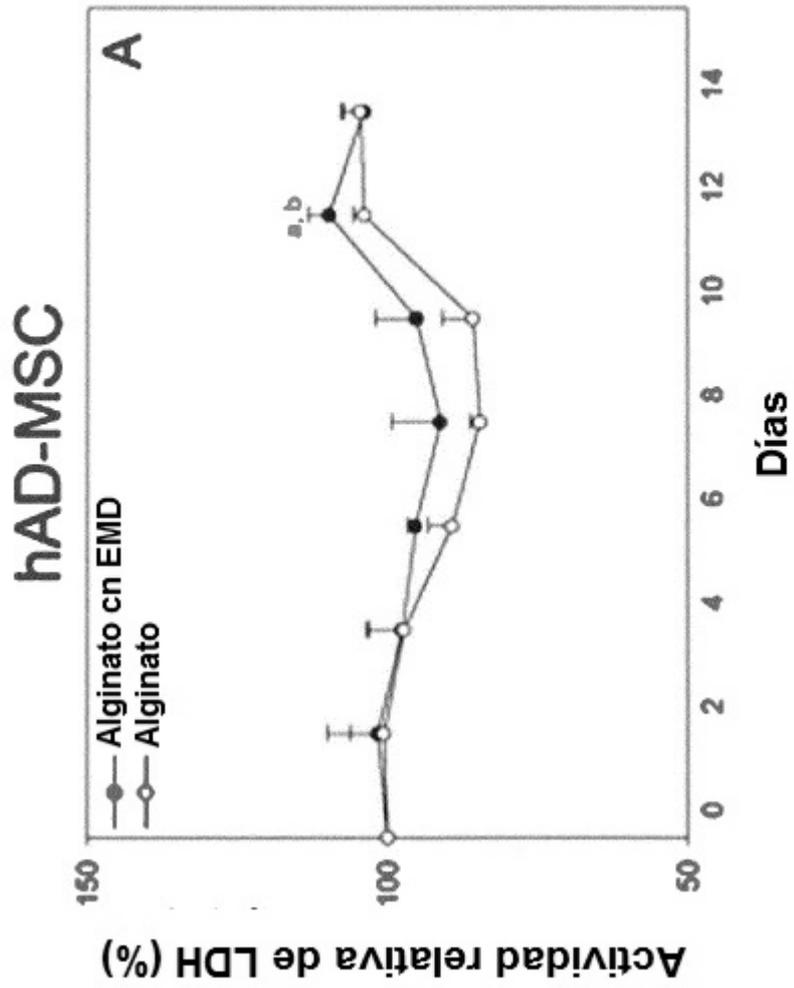


Fig. 24A

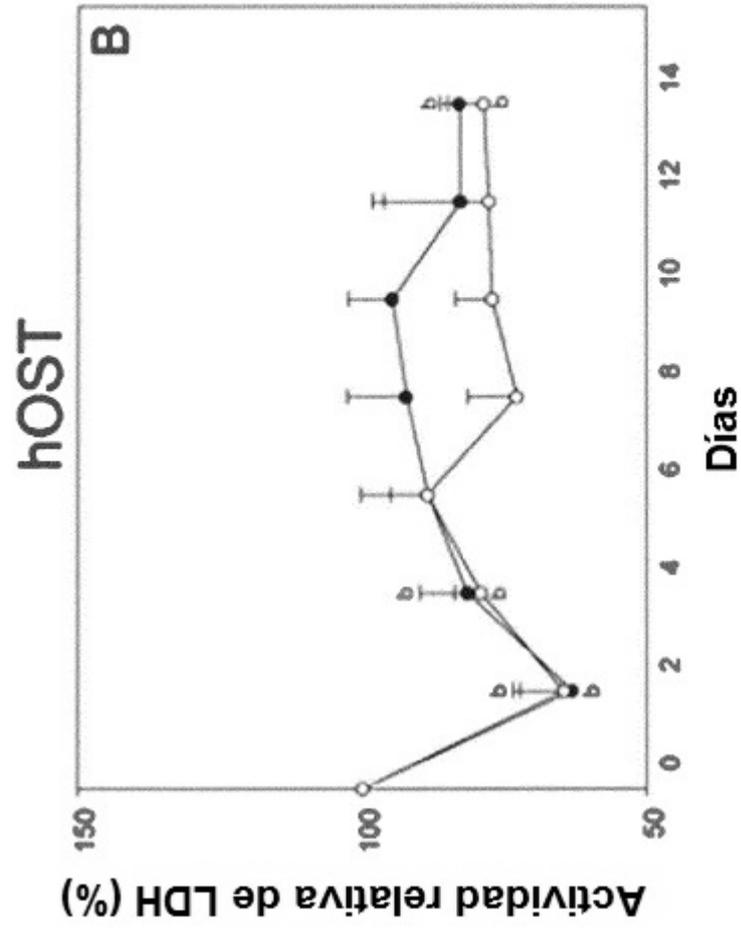


Fig. 24B

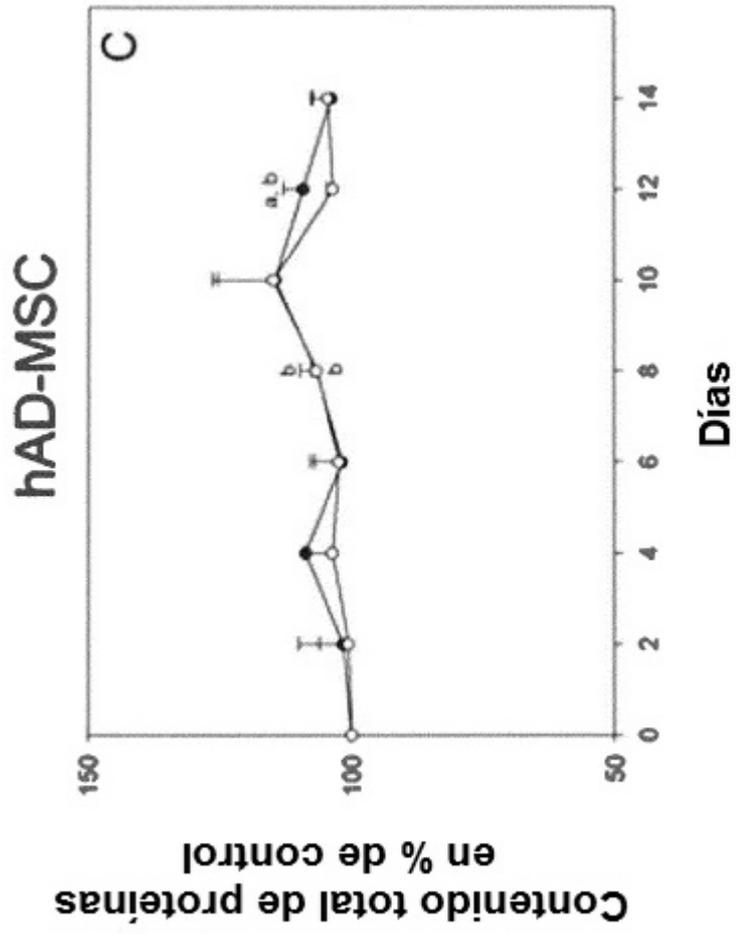


Fig. 24C

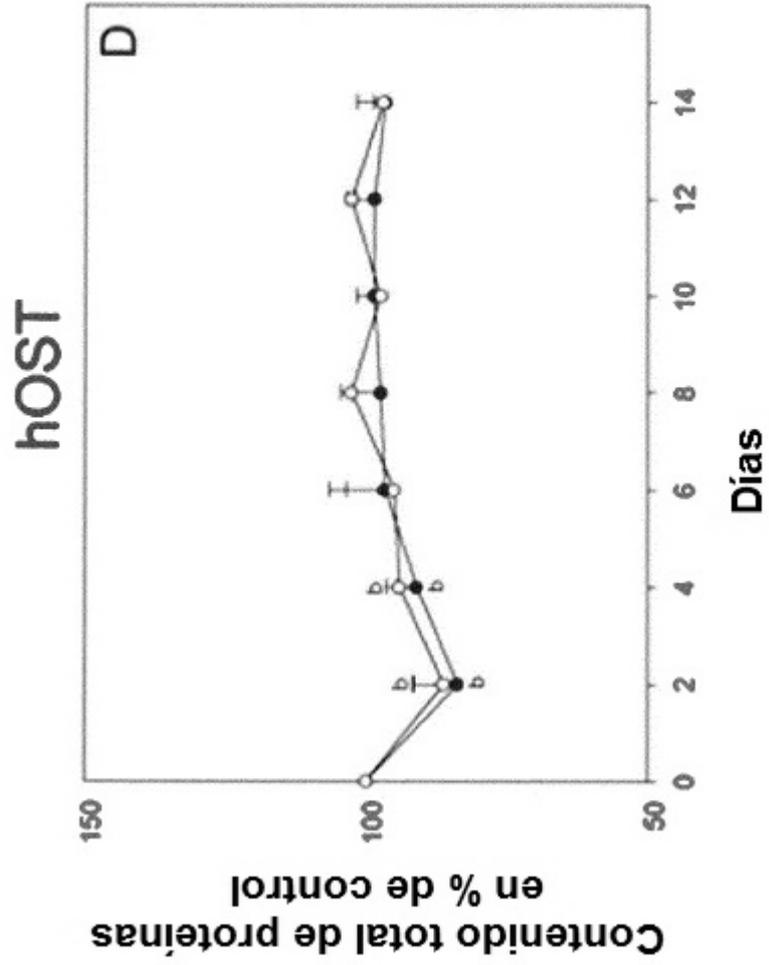


Fig. 24D

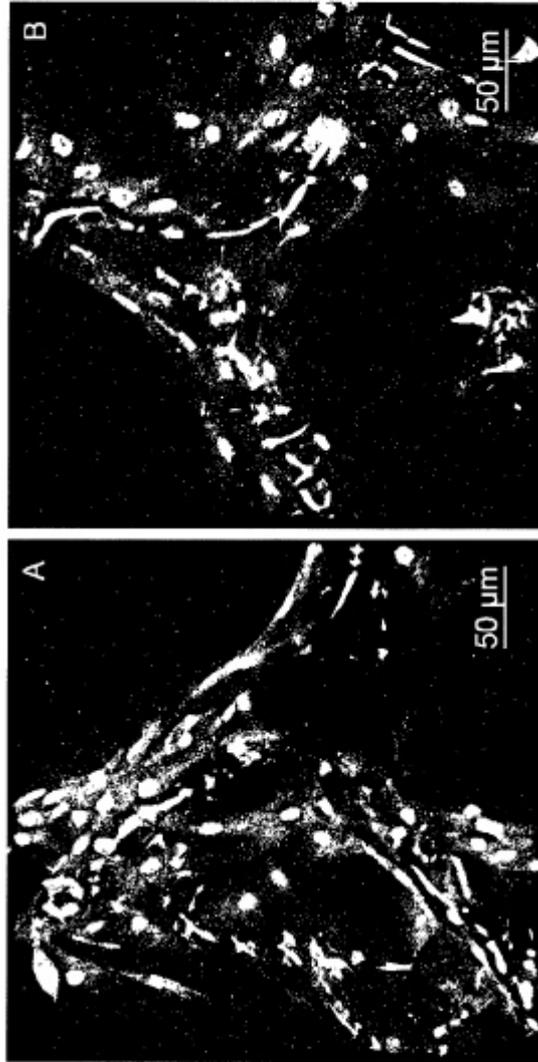


Fig. 25

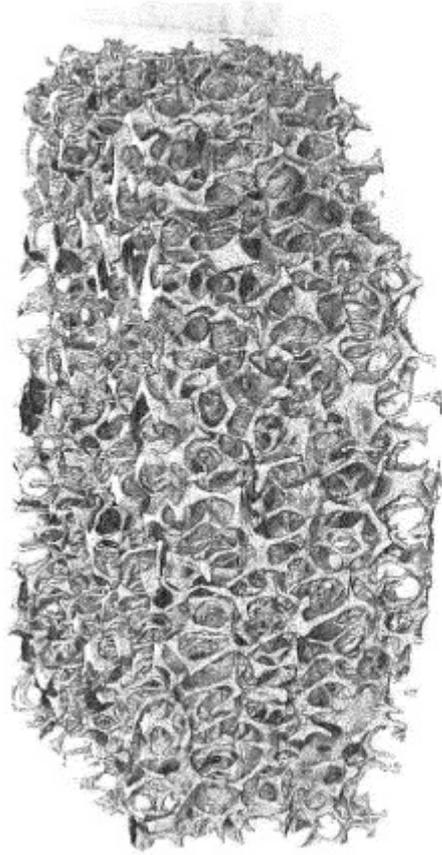


Fig. 26