

Estudio de los efectos angiogénicos de materiales biocerámicos vítreos de tercera generación

Luis A. Haro Durand^{1,2}, Adrián Góngora², Martín Gomez²,
José M. Porto López³, Aldo R. Boccaccini⁴, M. Paola Zago⁵,
Alberto Baldi² y Alejandro Gorustovich¹

Resumen

El proceso angiogénico es crítico para la reparación y regeneración de tejidos. El objetivo del presente estudio *in vitro* fue evaluar los efectos pro-angiogénicos de los productos iónicos de disolución de vidrios bioactivos del sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ (45S5) y modificado por boro (45S5.2B) sobre células endoteliales humanas. En comparación al control, las células estimuladas con los productos iónicos de disolución del vidrio 45S5.2B evidenciaron mayor capacidad de proliferación, migración y nivel de expresión de citoquinas IL6 y bFGF. La actividad pro-angiogénica observada, señala que el vidrio bioactivo 45S5.2B tendría potencial aplicación en diferentes estrategias de medicina regenerativa e ingeniería de tejidos que requieran un alto grado de vascularización.

Palabras clave: angiogénesis - biomateriales - células endoteliales - vidrio bioactivo

Introducción

Los biomateriales han sido categorizados, según el comportamiento biológico desencadenado por los mismos, en: biomateriales de primera, segunda y tercera generación. Los materiales de primera generación han demostrado un comportamiento bioinerte (no-bioactivo), mientras que los de segunda y ter-

cera generación poseen propiedades bio-activas (Hench, Polak, 2002: 1014-1017). La nueva generación de materiales bioactivos, denominada tercera generación, comprende a todos aquellos materiales biorreabsorbibles y/o biodegradables que tienen la capacidad de estimular respuestas celulares específicas a nivel molecular como resultado de la liberación de iones a partir de los mismos (Hench,

¹ Grupo Interdisciplinario en Materiales, IESIING-UCaSal, INTECIN, UBA-CONICET, Salta, Argentina.

² IByME, CONICET, Buenos Aires, Argentina.

³ División Cerámicos, INTEMA-CONICET, Mar del Plata, Argentina.

⁴ Institute of Biomaterials, University of Erlangen-Nuremberg, Germany.

⁵ IPE, CONICET, Salta, Argentina.

Polak, 2002: 1014-1017). Dentro de este contexto, es de destacar el creciente interés en el estudio de los efectos biológicos de los productos de disolución de materiales biocerámicos vítreos (Hoppe et al., 2011: 2757-2774). Evidencia científica reciente sugiere que los vidrios bioactivos estimularían la angiogénesis (Gorustovich et al., 2010: 199-207). Sin embargo, hasta el presente no han sido evaluados los efectos angiogénicos de los productos de disolución liberados a partir de los mismos. Dado que ha sido establecido que el boro (B) desempeñaría funciones en la angiogénesis y reparación tisular (Gorustovich et al., 2008: 441-447) este hecho constituiría la base racional de su incorporación en la composición de los vidrios bioactivos factibles de ser utilizados en ingeniería de tejidos como así también mediante su implantación *in situ* en procedimientos de medicina y odontología regenerativa. Considerando los antecedentes mencionados, el objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos *in vitro* de los productos iónicos de disolución de vidrios bioactivos del sistema SiO_2 -CaO- Na_2O - P_2O_5 (45S5) y modificado por boro (45S5.2B) sobre la capacidad de proliferación, migración y expresión de citoquinas proangiogénicas de células endoteliales humanas.

Materiales y Métodos

Cultivo de células

Se utilizaron células endoteliales derivadas de la vena del cordón umbilical humano (HUVECs, del inglés *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) cedidas por la Dra. M. Schattner (Academia Nacional de Medicina). Las mismas fueron cultivadas entre los repiques +3 y +8 en frascos T75 en medio M199 con 10 % de SFB, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina suplementado con bFGF y VEGF en una concentración final de 2 ng/mL y 10 ng/mL respectivamente y mantenidas en incuba-

dora gaseada con 5% de CO_2 en aire a 37°C. Para los repiques las células fueron lavadas con PBS e incubadas 5 minutos a 37°C con 1 mL de una dilución de 0,017 % p/v de tripsina y 0,18 mM de EDTA en PBS, inmediatamente después se les agregó 10 mL del mismo medio para diluir la tripsina, y fueron centrifugadas a 200g por 5 min, el sobrenadante fue descartado, las células se resuspendieron en el volumen apropiado de medio y fueron contadas en una cámara de *Neubauer* para ser utilizadas en los distintos ensayos.

Productos iónicos de disolución

Los productos iónicos de disolución fueron obtenidos a partir de la incubación 1% p/v de partículas de vidrio bioactivo 45S5 (<5 μm) (composición en % en peso 45% SiO_2 , 24,5% Na_2O , 24,5% CaO, 6% P_2O_5) y 45S5.2B con 2% de B_2O_3 , en medio M199 durante 24 h en un agitador orbital a 37°C. Los medios condicionados fueron centrifugados, filtrados con filtro de 0,22 μm y luego se obtuvo una dilución 1:6 para ser utilizada en los diferentes experimentos. La determinación de los iones solubles (Si, B, Ca, Na y P) lixiviados a partir de los vidrios bioactivos en estudio se realizó mediante espectrometría de emisión óptica con plasma inductivo (ICP-OES) en el *Ultratrace Elements Laboratory*, Grand Forks Human Nutrition Research Center, Grand Forks, ND, USA.

Ensayo de proliferación

Las células HUVECs fueron tripsinizadas, contadas en cámara de *Neubauer* y sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 3500 células por pocillo en 100 μL de medio M199 conteniendo 10% de SFB y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina. A las 2 h, se agregaron por cuadruplicado 50 μL del mismo medio M199 condicionado con los productos iónicos de disolución de los vidrios bioactivos y bFGF (2 ng/mL) o VEGF (10 ng/mL) (R&D Systems),

medio M199 con bFGF ó VEGF como controles positivos o medio M199 sin condicionar con productos iónicos y sin factor de crecimiento como control negativo. A las 24 h se adicionó 25 μL por pocillo del mismo medio, conteniendo metil- $[\text{}^3\text{H}]$ -timidina a una concentración final 2,5 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$, la incubación prosiguió 48 h adicionales. El ensayo se detuvo por el agregado de 50 μL de cloruro de guanidinio 6M. Las células se lisaron completamente mediante 3 ciclos de congelación y descongelación. El ADN celular fue recogido en filtros Whatman GFC mediante un cosechador (*Cell Harvester 8*, Nunc), fijado con etanol 96%, secado al aire y la radioactividad incorporada, fue determinada en presencia de 1 mL de solución centelladora (OptiPhase Hi Fase 3, *Wallac Scintillation Products*) en un contador de centelleo líquido (Packard 1600 TR, Canberra Company).

Ensayo de migración

Las células HUVECs fueron sembradas a confluencia en placas de cultivo de 96 wells y luego de que se las dejara toda la noche para asegurar su adherencia a la superficie del well, se realizó una «herida» con una punta de tip, luego de generada la «herida», las células fueron lavadas tres veces con PBS para remover restos celulares y células desprendidas y se las cultivó durante 10 h en medio M199 condicionado con productos iónicos de disolución y/o bFGF. Como control negativo se utilizó medio M199 sin condicionar con productos iónicos de disolución y sin bFGF. Se tomaron imágenes fotográficas inmediatamente luego de realizada la «herida» (tiempo cero) y luego de 10 h. La migración celular fue cuantificada utilizando un analizador de imágenes (Image J). El promedio del área de la «herida» se expresó como el porcentaje de recubrimiento (% R) de 5 wells tratados de la misma manera usando la ecuación $\% R = [1 - (T_t/T_0)] \times 100$, donde

T_0 es el área de la «herida» al tiempo 0 y T_t es el área de la «herida» a las 10 h.

ELISA

Se realizó un ensayo de ELISA para determinar los niveles de secreción de 8 citoquinas proangiogénicas (EA-1011, Signosis). Resumidamente: Las células HUVECs fueron crecidas a confluencia en placas de cultivo de 6 wells, luego de alcanzada la monocapa de células, las mismas fueron estimuladas con los productos iónicos de disolución por 48 h, luego de ese tiempo se extrajo el sobrenadante de cultivo y se prosiguió según protocolo del ELISA comercial.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó un ANOVA de una vía y como prueba *post hoc* la prueba de comparaciones múltiples de Duncan, estableciéndose como significativo un $p < 0,05$.

Resultados y Discusión

La concentración iónica del medio M199 y M199 condicionado con productos iónicos de disolución de los vidrios bioactivos 45S5 y 45S5.2B se detalla en la tabla 1. En comparación a los controles, las células endoteliales HUVECs evidenciaron una mayor respuesta proliferativa en presencia de los productos de disolución del vidrio bioactivo 45S5.2B, observándose un incremento significativo de la misma con la utilización del medio suplementado con bFGF ($p < 0,05$). Mientras que los productos de disolución del vidrio bioactivo 45S5 mostraron un efecto inhibitorio sobre la proliferación de HUVECs (Figura 1A). Además, se evidenció un aumento estadísticamente significativo en la respuesta migratoria de las células endoteliales ante el estímulo con los productos de disolución del vidrio bioactivo 45S5.2B, logrando cerrar la «herida» en aproximadamen-

te un 60% del área total a las 10 h post-estimulación (Figura 1B). En relación a la producción de citoquinas proangiogénicas, se observó un aumento en los niveles de expresión de IL6 y bFGF en las células endoteliales tratadas con los productos de disolución del vidrio bioactivo

45S5.2B (Figura 2). La sobreexpresión de dichas citoquinas, entre otros factores, explicaría la respuesta proliferativa y migratoria de HUVECs observada ante los productos de disolución del vidrio bioactivo 45S5.2B.

	Si	B	P	Ca	Na
M199	0	0.041	28.9	64.8	3345
45S5	0	0.033	28.7	70.8	3352
45S5.2B	0	0.595	27.1	66.2	3340

Tabla 1. Concentración iónica (µg/mL) del medio M199 y M199 condicionado con productos iónicos de disolución de vidrios bioactivos

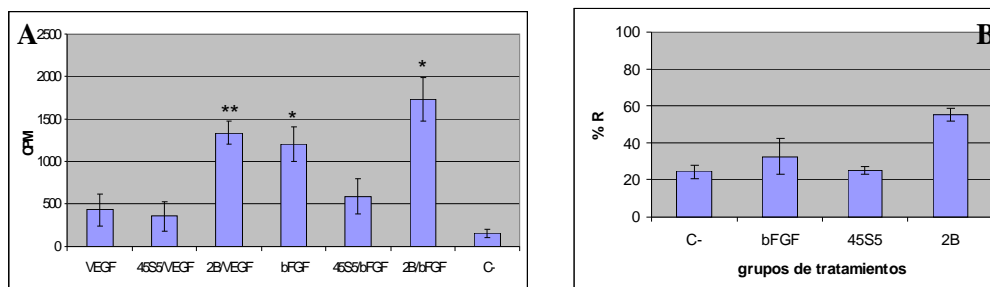


Figura 1. Respuesta proliferativa (A) y migratoria (B) de las células endoteliales (*p<0,05) (**p<0,01)

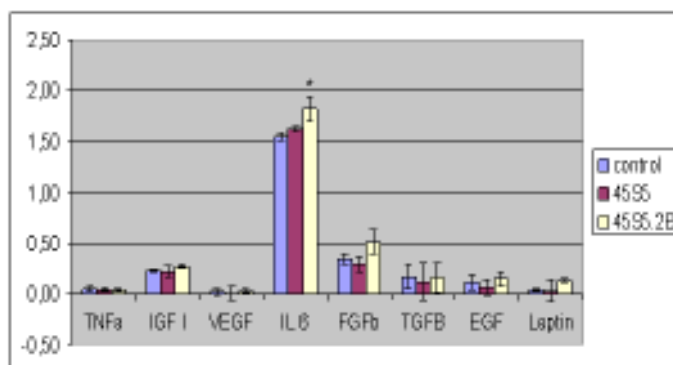


Figura 2. Niveles de expresión de citoquinas proangiogénicas (*p<0,05)

Conclusiones

El vidrio bioactivo 45S5.2B posee actividad pro-angiogénica y esta propiedad podría ser aprovechada en diferentes estrategias de medicina regenerativa e ingeniería de tejidos que requieran un alto grado de vascularización.

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó con financiamiento otorgado por el Consejo de Investigaciones de la UCASal (Res 572/11).

Referencias bibliográficas

Gorustovich, Alejandro; Tammy Steimetz, Forrest H Nielsen, María B Guglielmotti.

A histomorphometric study of alveolar bone healing in rats fed a boron-deficient diet. *The Anatomical Record*. New York, USA: Wiley InterScience, 2008.

Gorustovich, Alejandro; Judith A Roether, Aldo R. Boccaccini. Effect of bioactive glasses on angiogenesis: a review of in vitro and in vivo evidences. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. New Rochelle, NY: Mary Ann Liebert, Inc, 2010.

Hench, Larry L y Julia M Polak. Third-generation biomedical materials. *Science*. Palo Alto, CA: HighWire Press, 2002.

Hoppe, Alexander; Nusret S Güldal, Aldo R Boccaccini. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*. London: Elsevier, 2011.