

Lozano D¹, Trejo CG², Manzano M³, Doadrio JC³, Salinas AJ³, Dapía S⁴, Caeiro Rey JR⁵, Gómez-Barrena E⁶, Vallet-Regí M³, García-Honduvilla N², Buján J², Esbrit P¹

1 Laboratorio de Metabolismo Mineral y Óseo - Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz - Madrid

2 Departamento de Especialidades Médicas - Facultad de Medicina - Universidad de Alcalá - Alcalá de Henares - Madrid

3 Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica - Facultad de Farmacia - Universidad Complutense - Madrid

4 Trabeculae S.L. - Orense

5 Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) - Reticef - Santiago de Compostela

6 Departamento de Traumatología - Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz - Madrid

Efectos osteogénicos de la PTHrP (107-111) cargada en biocerámicas en un modelo de regeneración ósea tras un defecto cavitario en el fémur de conejo

Correspondencia: Daniel Lozano - Laboratorio de Metabolismo Mineral y Óseo - Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz - Avda. Reyes Católicos, 2 - 28040 Madrid (España)
Correo electrónico: dlozano@fjd.es

Fecha de recepción: 04/04/2012

Fecha de aceptación: 19/06/2012

Trabajo becado por la SEIOMM para asistir al Congreso de la ASBMR (Denver, 2009)

Resumen

Introducción: La proteína relacionada con la parthormona (PTHrP), un factor abundante en el tejido óseo, es un importante modulador de la formación ósea. Se ha demostrado que la PTHrP (107-111), conocida como osteostatina, cargada en el material cerámico mesoporoso SBA-15, ejerce acciones osteogénicas *in vitro*.

Objetivo: Comprobar si dicho material y una versión funcionalizada del mismo (C8-SBA-15) promueven la reparación ósea en un modelo de defecto cavitario en el fémur del conejo.

Material y métodos: Para ello se han llevado a cabo estudios histológicos e inmunohistoquímicos y de microtomografía computerizada (μ CT).

Resultados: Tras la implantación de los biomateriales no se observaron niveles significativos de inflamación ni resorción ósea (4 y 8 semanas). A las 8 semanas las biocerámicas no cargadas con la osteostatina se encontraban separadas de la médula ósea por una cápsula fibrosa, que disminuía de forma significativa en presencia del péptido. Se observó (por μ CT) un aumento de la neo-formación ósea a diferentes distancias de los biomateriales, principalmente en los cargados con la osteostatina. Además, estos resultados fueron confirmados por inmunohistoquímica de marcadores osteoblásticos.

Conclusión: Nuestros hallazgos sugieren que estas biocerámicas cargadas con la osteostatina son una buena estrategia para acelerar la regeneración ósea.

Palabras clave: PTHrP, osteostatina, biocerámicas, regeneración ósea, defecto cavitario.

Osteogenic effects of PTHrP (107-111) loaded in bioceramics in a model of bone regeneration after a cavitory defect in the femur of a rabbit

Summary

Introducción: Parathyroid hormone-related protein (PTHrP), which is abundant in bone tissue, is an important modulator of bone formation. It has been shown that PTHrP (107-111), called osteostatin, loaded into mesoporous ceramic material SBA-15 exerts osteogenic action *in vitro*.

Objective: To confirm if this material and a functionalised version of the same material (C8-SBA-15) promote bone regeneration in a model of a cavitory defect in a rabbit femur.

Materials and methods: Histological, immunohistochemical and computerised microtomography (μ CT) studies were carried out in order to achieve the aims of the study.

Results: After the implantation of the biomaterials no significant levels of inflammation or bone resorption were observed (at 4 and 8 weeks). At 8 weeks the bioceramics not loaded with osteostatin were found to be separated from the bone medulla by a fibrous capsule which diminished significantly in the presence of the peptide. An increase was observed (using μ CT) in bone neo-formation at different distances from the biomaterials, principally in those loaded with the osteostatin. These results were also confirmed by immunohistochemistry of osteoblast markers.

Conclusion: Our results suggest that the use of these osteostatin-loaded bioceramics are a good strategy for accelerating bone regeneration.

Key words: PTHrP, osteostatin, bioceramics, bone regeneration, cavitory defect.

Introducción

La proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) se identificó inicialmente en la hipercalcemia tumoral de origen humoral¹. Actualmente se sabe que la PTHrP y el receptor tipo 1 común para PTH/PTHrP (PTHR1) se expresan en una amplia variedad de tejidos, malignos y no malignos, donde la PTHrP ejerce efectos auto/paracrinos e intracrin². Si bien el fragmento 1-36 de la PTHrP, que presenta homología estructural con la PTH, ejerce acciones anabólicas en el hueso, estimulando la formación ósea³⁻⁶, los posibles mecanismos asociados son poco conocidos. El fragmento C-terminal de la PTHrP es un potente inhibidor de la actividad osteoclástica⁷⁻¹⁰. De hecho, el pentapéptido 107-111 de dicha proteína (llamado osteostatina), presenta una potente actividad antirresortiva *in vitro* e *in vivo*¹¹. Varios estudios *in vitro* han demostrado que la osteostatina aumenta la diferenciación de células osteoblásticas de ratón y de humano¹²⁻¹⁵, aunque su receptor en las células óseas es desconocido^{9,16}. Un estudio de nuestro laboratorio ha demostrado que el fragmento nativo de la PTHrP que contiene la secuencia 107-139 transactiva rápidamente el receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en células osteoblásticas¹⁷. Por otra parte, se ha demostrado que la administración diaria de este fragmento de la PTHrP durante dos semanas a ratones ovariectomizados protege de la pérdida de masa ósea observada en sus huesos largos, con efectos positivos en el hueso cortical y trabecular³. Recientemente, nuestro grupo también ha

demostrado que la PTHrP (107-139) revierte la osteopenia y aumenta la regeneración ósea en ratones tratados con 3-metilprednisolona o diabéticos^{18,19}.

La comprensión de los mecanismos de regeneración es fundamental para entender el comportamiento del tejido óseo tras el implante de una prótesis o durante la recuperación de una fractura. Se sabe que los procesos de reparación ósea en adultos reproducen el desarrollo normal del esqueleto durante la embriogénesis²⁰. La formación ósea en el feto comienza con la condensación de células mesenquimales seguida de su diferenciación a condrocitos (osificación endocondral) o directamente a osteoblastos (formación ósea intramembranosa). En la mayoría de las fracturas, la formación del callo implica una combinación de ambas osificaciones. Aunque no se conocen completamente las vías de señalización ni las interacciones celulares implicadas en la reparación ósea, existen diferentes estrategias para mejorar este proceso²⁰. Una de ellas implica la administración sistémica o local de factores osteogénicos que aumenten la formación ósea de *novo*. Se ha demostrado que inyecciones diarias de PTH mejoran la reparación ósea de fracturas en ratas normales y ovariectomizadas^{21,22}. Además, la administración sistémica de un análogo de la PTHrP (1-34) contrarrestó los efectos deletéreos en un defecto en ulna de conejos tratados con prednisolona²³. Un enfoque más directo para aumentar la reparación ósea consistiría en la liberación local de factores osteogénicos con biomateriales en la zona afectada.

Los biomateriales se pueden definir como “materiales implantables que desarrollan su función en contacto con tejidos vivos”²⁴. Recientemente, se han diseñado cerámicas mesoporosas bioactivas que permiten la adsorción y liberación de distintas moléculas con buenas expectativas en la aplicación clínica²⁵. El SBA (*Santa Barbara Amorphous*)-15 posee una estructura hexagonal de poros cilíndricos con un diámetro de 5-10 nm. Una ventaja de este tipo de cerámica es su mayor volumen de poro y la elevada concentración de grupos Si-OH²⁶⁻²⁸. Además, este material presenta una serie de microporos interconectados que promueven una mayor difusión iónica desencadenando una mayor respuesta bioactiva. De hecho, se ha estudiado la captación y la liberación del L-triptófano cargado en el material SBA-15 y en una versión funcionalizada (C8-SBA-15)²⁹. La superficie hidrofóbica del material C8-SBA-15 es capaz de interaccionar con el anillo indol del triptófano de diferentes péptidos y dejar un espacio disponible menor, ocupado por cadenas alquílicas. Nuestro grupo ha caracterizado la captación/liberación de la osteostatina cargada en dichos materiales, demostrando que el péptido les confiere actividad osteogénica en osteoblastos de ratón¹⁴.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad del material cerámico SBA-15, funcionalizado o no con grupos C8 (C8-SBA-15), cargado con la PTHrP (107-111) para inducir osteogénesis en un modelo de defecto cavitario en el fémur del conejo.

Materiales y Métodos

Preparación de los materiales

El material mesoporoso SBA-15 fue sintetizado utilizando un método basado en el uso de un surfactante, como agente director de estructura, y tetraetilortosilicato (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) como fuente de sílice³⁵. Esta estructura fue confirmada por difracción de rayos X (DRX) y análisis de adsorción de N₂. La funcionalización de sílice se llevó a cabo con el método post-sintético o *grafting* del anclaje de un alcóxido silano, N-octiltrietoxisilano (C8, Sigma-Aldrich), como se describe³⁰. Se confirmó por espectroscopia infrarroja utilizando transformadas de Fourier y por análisis elemental. El material funcionalizado resultante contiene un 11% en peso (0,97 mmol/g) de fracciones orgánicas, lo que permite calcular el grado de funcionalización.

Para los experimentos, ambos tipos de material SBA-15 fueron conformados en discos de 50 mg (6x2 mm) por presión uniaxial (1MPa) e isostática (1MPa). Los materiales fueron expuestos a radiación ultravioleta en una cámara de cultivos celulares (FLV120, Tecnología para Diagnóstico e Investigación, Madrid) durante toda la noche para su esterilización. La unión de la PTHrP (107-111) (Bachem, Bubendorf, Suiza) al material se efectuó por inmersión en una solución del péptido (100 nM) en 1 ml de tampón salino fosfato (TSF), pH 7,4, a 4 °C con agitación durante 24 horas^{31,32}.

Producción del defecto cavitario en conejo

Se utilizaron conejos blancos Nueva Zelanda hembras (Granja San Bernardo, Valencia, España)

con una edad de 24-30 semanas [n=2 para microtomografía computerizada (μ CT) y 5 para estudios histológicos]. Estos animales fueron estabilizados individualmente en jaulas en las instalaciones del Animalario de la Fundación Jiménez Díaz durante dos semanas. Los animales tuvieron acceso libre a agua y a una dieta estándar (Panlab, Reus, España) en una habitación mantenida a temperatura ambiente con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Todos los estudios fueron desarrollados con la aprobación del Comité de Experimentación Animal de la Fundación Jiménez Díaz. El dolor y el sufrimiento de los animales se disminuyeron de acuerdo a la normativa europea.

La intervención quirúrgica se realizó bajo anestesia general. Los conejos fueron rasurados en ambas rodillas para crear los defectos cavitarios lateral y medial con una fresa de media velocidad (5 mm de diámetro y 4-5 mm de profundidad)³³. A continuación, se implantaron los materiales a ensayar y las heridas fueron suturadas. El defecto lateral femoral derecho recibió el material SBA-15 sin el péptido; y el defecto medial derecho el biomaterial SBA15 cargado con PTHrP (107-111). El defecto femoral lateral izquierdo recibió el material SBA-15 funcionalizado con C8, mientras que el biomaterial C8-SBA-15 cargado con PTHrP (107-111) fue implantado en el defecto femoral medial izquierdo. Los animales fueron sacrificados a las 4 y 8 semanas de estas intervenciones. Los fémures se distribuyeron para exámenes histológicos e inmunohistoquímicos y análisis de μ CT.

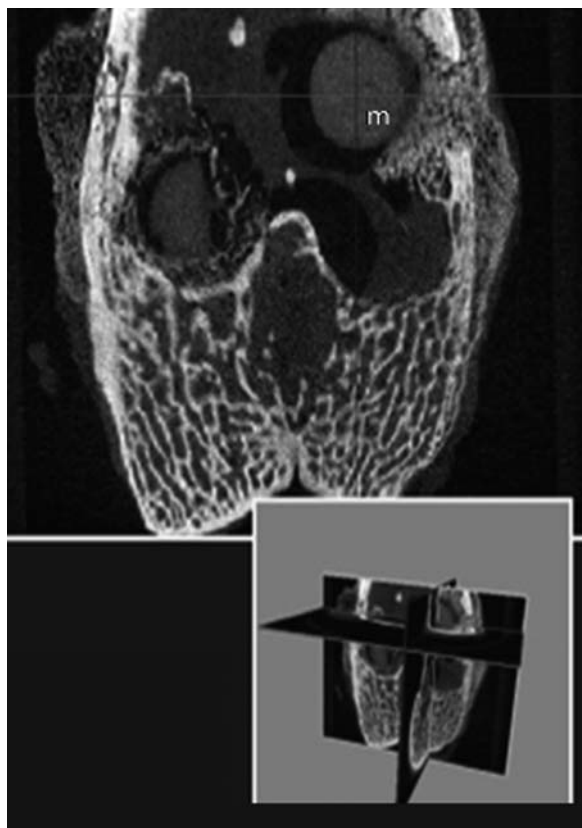
Histología

Los fémures de conejo se fijaron en p-formaldehído al 4% en TSF a 4°C. Las muestras fueron descalcificadas (24 h) en Osteosoft (48/72 h) (Merk, Whitehouse Station, N.J.), deshidratadas e incluidas en parafina. Los análisis histológicos se llevaron a cabo en secciones de 8 μ m sobre el plano sagital, depositadas sobre portaobjetos pretratados con L-lisina (Polylysine, Thermo, Waltham, MA), y tinción con hematoxilina/eosina. Antes de la tinción, las muestras se mantuvieron a 60°C durante 6-24 horas para fijar los tejidos al portaobjetos. Se desparafinaron incubándolas secuencialmente en xilol, etanol 100%, 70% y agua destilada. Tras la tinción, las muestras se deshidrataron y montaron con resina DPX (una mezcla de distireno, plastificante y xilol). Se utilizaron dos secciones histológicas de cada conejo de un total de 2-4 conejos por grupo experimental. Todas las evaluaciones de las muestras fueron analizadas por 3 observadores independientes.

Inmunohistoquímica

Los cortes histológicos obtenidos de las muestras óseas fueron desparafinados y rehidratados. Se realizó el bloqueo y la permeabilización en albúmina bovina de suero en (4% en TSF con 0,1% de Tritón X-100) durante 30 minutos a T/A. Se utilizaron anticuerpos frente a osteocalcina (OC) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), VEGF (Abcam, Cambridge, MA), RAM11 (Dako) y TRAP

Figura 1. Imagen por microtomografía computarizada (μ CT) del fémur distal del conejo con el biomaterial (m) incorporado



(Santa Cruz Biotechnology), y un anticuerpo policlonal frente a esclerostina (R&D, Minneapolis, MN). Los anticuerpos primarios se incubaron en una cámara húmeda durante toda la noche a 4°C, salvo en el caso de la esclerostina que fue incubada dos horas a temperatura ambiente (T/A). En todos los anticuerpos, menos en la esclerostina, se utilizó un anticuerpo secundario biotilado. Se incubó con el complejo extravidina-fosfatasa alcalina (dilución 1:200), durante 60 minutos a T/A y se lavó con TSF, tres veces, durante 5 minutos. En el caso de la esclerostina el anticuerpo secundario estaba unido a peroxidasa, que fue incubado durante 1 hora a T/A. Se realizó el revelado mediante incubación con el sustrato cromogénico DAB durante 10 minutos. Se incluyó siempre una muestra sin anticuerpo primario como control negativo. Las muestras fueron contrastadas con hematoxilina. Las células con positividad para los diferentes anticuerpos se determinaron en 10 campos próximos al material. En el caso de los osteocitos positivos para esclerostina, éstos se cuantificaron en 5 campos aleatorios en el hueso cortical.

Análisis de μ CT

Las muestras de fémur de conejo se cortaron con un disco hiperflexible de granulometría fina (15 μ m) y abrasión suave conectado a un motor quirúrgico (KaVo. Dental GmbH, Biberach,

Alemania) a una velocidad de 15.000 rpm. Durante el proceso de corte, la muestra se irrigó constantemente con suero salino para prevenir el sobrecalentamiento y su deshidratación. Las muestras fueron escaneadas con un sistema de microtomografía de alta resolución (SkyScan 1172, Skyscan N.V., Aartselaar, Bélgica), con un tubo de rayos X con un voltaje de 100 kV y una corriente de 100 μ A sin filtro. Una vez escaneadas, se generaron las imágenes con la aplicación *DataViewer* (SkyScan), que fueron reconstruidas en función del algoritmo de Feldkamp³⁴. El ángulo de rotación del escaneado fue de 360°. Para el análisis cuantitativo y cualitativo del crecimiento óseo alrededor del implante se utilizó la aplicación *CTAn* (SkyScan). De cada muestra se analizaron un total de 70 imágenes. Los parámetros trabeculares fueron calculados en regiones seleccionadas (Figura 1) entre 0 y 5 pixels y 10 y 15 pixels, siendo 1 pixel equivalente a 21,8 μ m. Mediante la aplicación *CTVol* (SkyScan), se crearon los modelos tridimensionales tanto del biomaterial (que se ha considerado como un cilindro para mayor claridad de la representación) como del hueso formado a diferentes distancias de la superficie del implante. El sistema de análisis proporcionó el cálculo de los siguientes parámetros trabeculares:

- Porcentaje de volumen óseo (BV/TV): Relaciona el volumen de tejido óseo calcificado respecto del volumen total del área analizada (%).
- Factor de patrón de hueso trabecular (Tb.Pf): Índice de conectividad del hueso trabecular. Está basado en el principio de que una mayor concavidad trabecular indica una mayor conectividad, al aumentar la probabilidad de nodos de conexión entre las trabéculas. De esta forma, un Tb.Pf menor indica una mayor conectividad trabecular (mm^{-1}).

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM). La comparación no paramétrica entre dos muestras se realizó por la prueba de Mann Whitney. Se utilizó ANOVA no paramétrica para comparar varias muestras (Kruskal-Wallis), seguido de una prueba *post-hoc* (Dunn). Todos los valores con $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

Resultados

Se utilizaron técnicas de histología y μ CT para comprobar la respuesta del tejido al biomaterial y el efecto de la PTHrP (107-111) tras el defecto cavitario en el fémur del conejo, a las 4 y 8 semanas.

Del análisis histopatológico de las muestras óseas se obtuvieron los siguientes resultados:

SBA-15

A las 4 semanas de implantar el material SBA-15, éste se hallaba intacto rellenando el defecto cavitario producido en el fémur. La zona de entrada del biomaterial estaba ocupada por abundante tejido conectivo denso. Alrededor del biomaterial se observó una gran presencia de osteoide (Figura 2A) en zonas corticales, y una cápsula fibrosa que

aísla y envuelve al material, sin interferir aparentemente con el área medular. No se observó reacción inflamatoria. A las 8 semanas, el biomaterial en contacto con la médula ósea no presentaba modificaciones significativas, permaneciendo aislado por la cápsula fibrosa. Además, en la zona en contacto con el hueso cortical se observó la formación de trabéculas en las proximidades del implante (Figura 4A).

C8-SBA-15

En los animales implantados con este material se observó un comportamiento similar al descrito para el implante de SBA-15 sin funcionalizar a las 4 semanas. Sin embargo, el C8-SBA-15 se encontraba aislado por una cápsula fibrosa de mayor espesor (Figura 2C). La reparación ósea observada a las 8 semanas, abarcaba todo el defecto cavitario, observándose una cápsula fibrosa externa bien definida rodeada por osteoide que ocupaba la luz de la cavidad de entrada del biomaterial y trabéculas óseas de hueso neoformado rodeando la cara cortical del biomaterial (Figura 4C).

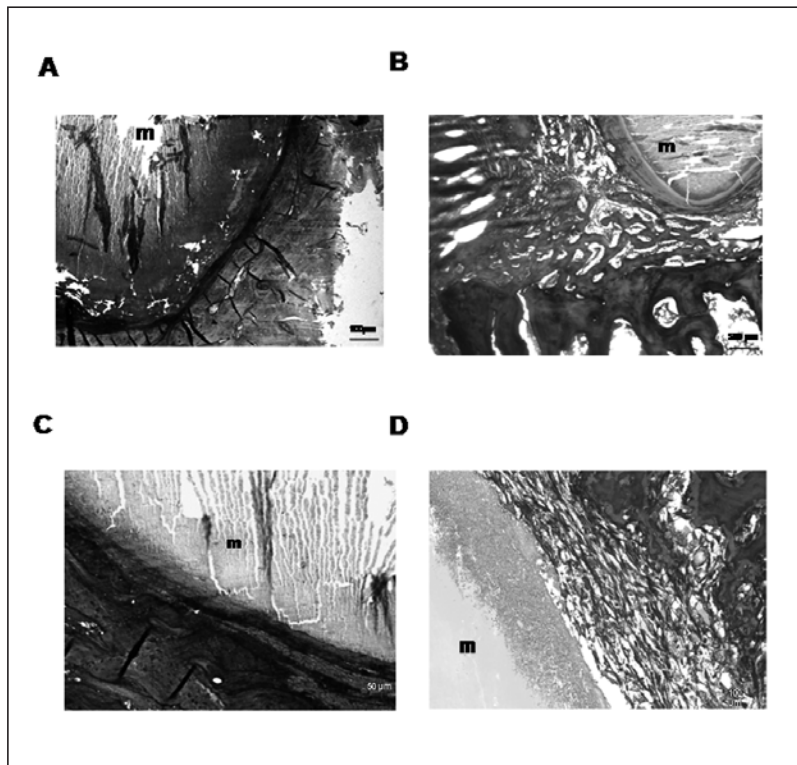
SBA-15 + PTHrP (107-111)

A las 4 semanas de implantar el SBA-15 cargado con PTHrP (107-111), se observó una intensa cicatrización que abarcaba desde la cavidad de entrada del biomaterial (ahora ocupada por una gruesa capa de tejido conjuntivo fibroso y cartilago articular) y gran cantidad de osteoide rodeando al mismo. El biomaterial en contacto con el área medular se hallaba rodeado por hueso trabecular situado en la periferia de la superficie de osteoide (Figura 2B). Por otra parte, el osteoide descrito aumentó significativamente alrededor de la cara cortical del biomaterial en dirección a la superficie externa a las 8 semanas; siendo, por el contrario, más limitada hacia la zona medular donde se observaban áreas trabeculares rodeando el biomaterial implantado (Figura 4B).

C8-SBA-15 + PTHrP (107-111)

El comportamiento del C8-SBA-15 cargado con la PTHrP (107-111) fue similar al descrito en el grupo anterior, manteniéndose un mayor espesor de la cápsula fibrosa en comparación con los grupos que no estaban funcionalizados con C8 (Figura 2D). A las 8 semanas, durante el proceso de reparación, se observó una hiperplasia conjuntiva externa y del cartilago hialino y una hiperplasia ósea que conformaban el estrato tisular de las

Figura 2. Imágenes representativas de la tinción de Masson en los fémures de conejos con los implantes de los biomateriales SBA-15 (A) o C8-SBA15 (C) sin cargar o cargados (B y D, respectivamente) con la PTHrP (107-111) a las 4 semanas del defecto cavitario. m= material correspondiente



neoformaciones de osteoide que rodean al implante. Lo más destacado de este grupo fue la reacción interna observada en la cápsula fibrosa, la cual aparecía desdoblada permitiendo la aparición de un espacio ocupado por osteoide no calcificado que perfila la superficie intacta del biomaterial (Figura 4D).

Las observaciones realizadas en el estudio histológico a 4 y 8 semanas para cada uno de los biomateriales fueron confirmadas por estudios de μ CT. En las imágenes representativas de cada grupo experimental se puede observar la formación ósea de *novo*, con presencia de trabéculas, a diferentes distancias del material implantado (Figuras 3 y 5). El aumento de formación ósea observado en las imágenes correspondientes a los materiales cargados con PTHrP (107-111) se evidenció por el aumento del % de BV/TV y la disminución del Tb.Pf. en el fémur del conejo (Tabla 1).

Los cambios observados en la histología y en la estructura ósea del fémur del conejo se correlacionaron con un aumento significativo de la tinción de OC en las muestras con materiales cargados con PTHrP (107-111) (Figura 6A). Se observó un aumento significativo de la tinción en los fémures que contenían los biomateriales cargados con PTHrP (107-111) en comparación con aquellos que no contenían el péptido. De especial interés es señalar que la presencia del péptido en el biomaterial C8-SBA-15 indujo un mayor efecto en

Tabla 1. Parámetros estructurales óseos a diferentes distancias de cada uno de los biomateriales implantados, con o sin PTHrP (107-111) a las dos y cuatro semanas del defecto cavitario producido en el fémur de conejo

4 semanas	SBA-15		SBA-15+ PTHrP (107-111)		C8-SBA-15		C8-SBA-15+ PTHrP (107-111)	
Distancia (µm)	BV/TV (%)	Tb.Pf (mm ⁻¹)	BV/TV (%)	Tb.Pf (mm ⁻¹)	BV/TV (%)	Tb.Pf (mm ⁻¹)	BV/TV (%)	Tb.Pf (mm ⁻¹)
109	0,50±0,09	60,82±1,14	27,74±1,04*	28,01±0,35*	2,01±0,98	35,62±1,46	26,75±1,10*	0,59±0,10*
327	3,82±0,35	28,27±2,22	14,48±0,90*	14,35±1,45	4,03±1,20	28,37±0,23	17,60±0,53*	8,01±0,42*
8 semanas	SBA-15		SBA-15+ PTHrP (107-111)		C8-SBA-15		C8-SBA-15+ PTHrP (107-111)	
Distancia (µm)	BV/TV (%)	Tb.Pf (mm ⁻¹)	BV/TV (%)	Tb.Pf (mm ⁻¹)	BV/TV (%)	Tb.Pf (mm ⁻¹)	BV/TV (%)	Tb.Pf (mm ⁻¹)
109	13,65±0,22	17,42±0,89	24,24±0,95*	19,92±0,72	1,95±0,59	35,24±0,92	2,86±0,44	8,75±0,21*
327	25,75±0,58	14,68±0,11	44,08±1,22*	6,25±0,15*	1,13±0,12	44,96±1,41	23,29±0,82*	4,11±0,33*

BV/TV (%) porcentaje de volumen óseo; Tb.Pf. factor de patrón de hueso trabecular. Los datos corresponden a un conejo representativo de cada grupo. *p<0,05 vs. material sin cargar correspondiente.

este marcador que en el SBA-15 (Figura 6A). En ninguno de los fémures estudiados se observó un aumento del componente inflamatorio en presencia de los diferentes materiales estudiados.

Además, la presencia de células positivas para la inmunotinción de TRAP o de RAM11 (Figura 6B y C) (marcaje de macrófagos) fue muy baja en todos los grupos de estudio (por debajo del 3%), siendo prácticamente nula en el caso de los materiales con PTHrP (107-111). No se pudieron cuantificar las diferencias en la inmunotinción positiva para VEGF (Figura 6D), ya que el marcaje fue muy débil para este marcador en la mayoría de los grupos de estudio.

Discusión

Los resultados expuestos anteriormente demuestran la capacidad osteogénica de la osteostatina, cargada en los materiales cerámicos SBA-15 y C8-SBA-15, en un modelo de regeneración ósea. Estos hallazgos abren nuevas perspectivas en el contexto de la reparación ósea, ya que sugieren que la exposición local a este pentapéptido en el entorno óseo promovería la regeneración ósea. Recientemente, nuestro grupo ha demostrado la capacidad de los materiales SBA-15 y C8-SBA-15 con la PTHrP (107-111) para liberar al medio el péptido y se observó que el primero liberaba aproximadamente un 4% más que el segundo a lo largo del tiempo. Esta diferencia en el perfil de liberación con ambos biomateriales es similar a la obtenida con los mismos materiales cerámicos cargados con L-triptófano, el aminoácido C-terminal de la PTHrP (107-111)²⁹. Hay que tener en cuenta que las cargas negativas del SBA-15 al pH fisiológico

utilizado en el proceso de captura del péptido promueven las interacciones electrostáticas con las cargas ligeramente positivas de los grupos amino en la PTHrP (107-111) a este pH. Sin embargo, la superficie hidrofóbica del C8-SBA-15 es capaz de interactuar con el anillo indol del triptófano en este péptido; aunque esta funcionalización deja un espacio disponible menor (ocupado por cadenas alquílicas) para la adsorción del péptido en el interior de los poros en comparación con el SBA-15²⁹. Esto justifica que este material retenga menos PTHrP (107-111) que el C8-SBA-15.

Considerando estos hallazgos *in vitro*, nos propusimos determinar la capacidad osteogénica de la osteostatina cargada en estos materiales mesoporosos *in vivo*. Con tal finalidad, se desarrolló un modelo de regeneración ósea tras provocar un defecto cavitario en el fémur de conejo. A las 4 semanas del defecto, tanto el SBA-15 como el C8-SBA-15 promovieron la osteointegración, con presencia de tejido conectivo y osteoide, de acuerdo con estudios anteriores con otros materiales cerámicos³⁵. Este efecto fue mayor en el caso de ambos materiales con la osteostatina adsorbida, como indica la presencia de trabéculas neoformadas en las inmediaciones del biomaterial y un menor grosor de la cápsula fibrosa, sobre todo a 8 semanas. La falta de respuesta inflamatoria con estos biomateriales, como indica la ausencia significativa de células con tinción de RAM11 (macrófagos) y TRAP, como consecuencia de su estabilidad (sin degradación aparente), constituye una ventaja de este tipo de biomateriales³⁶. Sin embargo, una inflamación sostenida asociada a la degradación de materiales

como el β -TCP (fosfato tricálcico ultraporoso) o el DCaS (sulfato de calcio denso) puede comprometer la regeneración ósea en defectos óseos, como consecuencia del desacoplamiento entre regeneración y resorción ósea³⁶. Además, aunque la inmunotinción para VEGF fue débil, se pudo observar una revascularización de la zona del defecto. En este sentido, dos estudios recientes de nuestro grupo demostraron que la administración sistémica de la PTHrP (107-139) estimula la angiogénesis y el sistema VEGF en la tibia en regeneración de ratones osteopélicos diabéticos o tratados con glucocorticoides^{18,19}.

Las propiedades de la PTH y del fragmento N-terminal de la PTHrP como agentes anabólicos cuando se administran de forma sistémica en humanos y en modelos animales de osteoporosis y/o fractura ósea son conocidas³⁷. En concreto, estudios en los que se utiliza la PTHrP (1-36) o un análogo sintético de la PTHrP (RS-66271) han demostrado un aumento de la densidad mineral ósea (DMO) de la columna vertebral en mujeres postmenopáusicas³⁸, así como del hueso cortical y trabecular en ratas osteopélicas³⁹. Además, el RS-66271 administrado de modo sistémico ha demostrado ser eficaz para aumentar la reparación ósea en conejos tratados con glucocorticoides (osteopélicos), aumentando la DMO y los parámetros biomecánicos y normalizando los cambios histológicos asociados a la pérdida de hueso²³. Por otro lado, diferentes factores locales óseos, como la IL-1/6, IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1), TGF- β (factor transformante del crecimiento) o las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), han sido propuestos como posibles agentes para promover la reparación ósea⁴⁰, aunque existen pocos estudios del efecto de dichos factores incorporados a un material en este contexto.

La liberación local de factores de crecimiento en defectos óseos, como representa el modelo usado en este trabajo, se ha demostrado como eficaz y ventajosa frente a su administración exógena. Así, un estudio en ratas con un defecto segmentario en el fémur e implantadas con matrices degradables que contenían ADN plasmídico de BMP4 y/o del fragmento 1-34 de la PTH aumentaron (en mayor medida cuando la matriz poseía ambos factores) la neo-formación ósea en dicho defecto⁴¹. Algunos autores han estudiado la interacción entre la PTHrP y el IGF-1 endógenos como reguladores de la reparación ósea tras la fractura en ratas⁴². En este modelo, al inicio de la formación del callo cartilaginoso,

Figura 3. Imágenes representativas (analizadas por μ CT) de la neoformación ósea a diferentes distancias de cada uno de los biomateriales estudiados, con o sin PTHrP (107-111) a las 4 semanas de realizar el defecto cavitario en el fémur del conejo

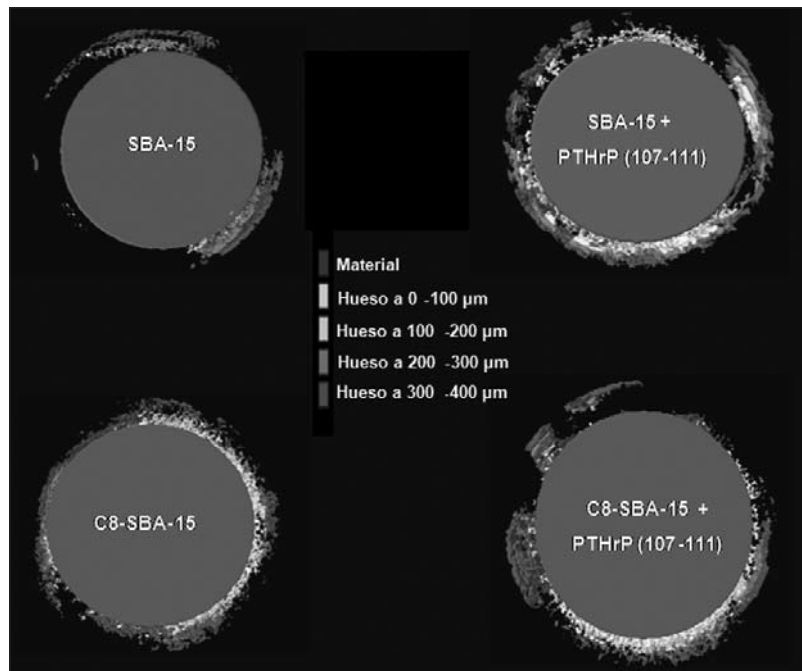


Figura 4. Imágenes representativas de la tinción de Masson en los fémures de conejos con implantes de los biomateriales SBA-15 (A) o C8-SBA15 (C) sin cargar o cargados (B y D, respectivamente) con la PTHrP (107-111) a las 8 semanas del defecto cavitario. m= material correspondiente

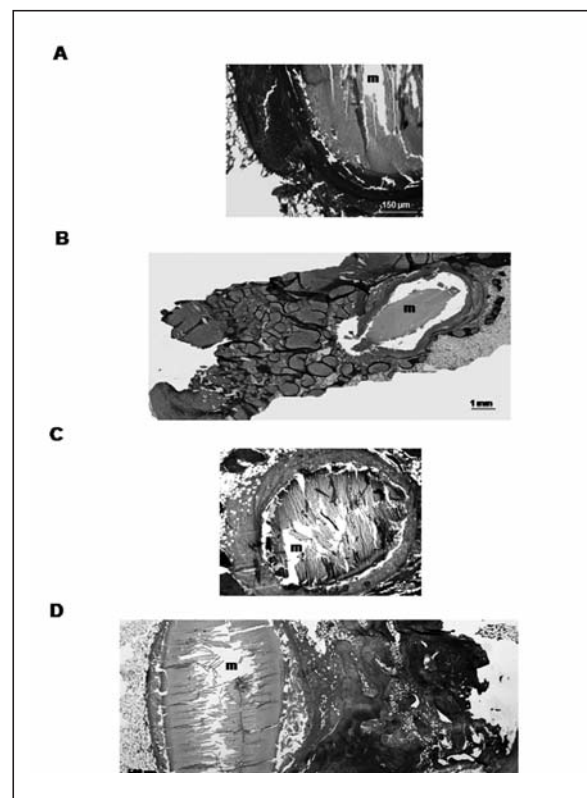


Figura 5. Imágenes representativas (analizadas por μ CT) de la neoformación ósea a diferentes distancias de cada uno de los biomateriales estudiados, con o sin PTHrP (107-111) a las 8 semanas de realizar el defecto cavitario en el fémur del conejo

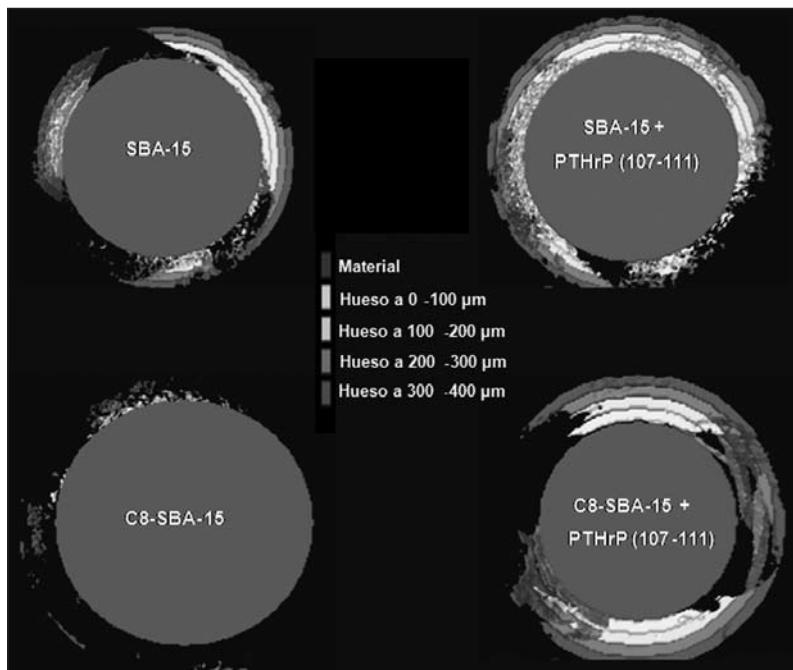
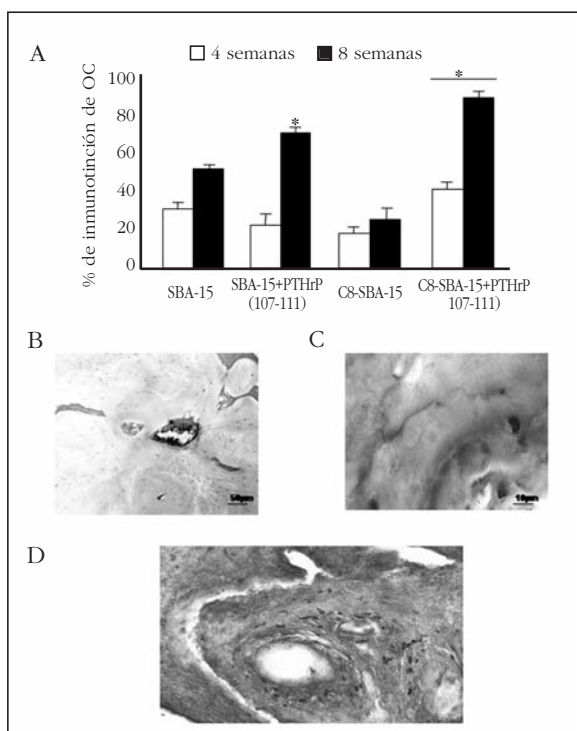


Figura 6. (A) Inmunotinción de osteocalcina (OC) en las proximidades de los biomateriales estudiados cargados o no con PTHrP (107-111), a las 4 y 8 semanas del defecto cavitario producido en el fémur del conejo. Los resultados son medias \pm EEM de 3 conejos por cada grupo experimental. * $p < 0,05$ vs material sin cargar correspondiente. Imágenes representativas de la inmunotinción de TRAP (B), de RAM11 (C) y de VEGF (D) en las proximidades del material



el IGF-1 parece aumentar la condrogénesis, mientras que la PTHrP regularía la tasa de diferenciación de condrocitos y, tras la osificación endocondral, ambos factores parecen actuar coordinadamente para aumentar la osteogénesis a través de acciones autocrinas/paracrinas. La PTHrP, cuya expresión aumenta en las células preosteoblásticas a través de su fragmento N-terminal, podría estimular la diferenciación y síntesis de colágeno en estas células a través del IGF-1⁴². Los resultados obtenidos en este modelo de defecto cavitario apoyan la hipótesis de que el fragmento C-terminal de la PTHrP ejerce efectos anabólicos locales para promover la reparación ósea, posiblemente independientes del IGF-1, basándonos en datos previos *in vitro*¹³. Los datos expuestos resaltan la importancia de la osteostatina como factor anabólico liberado de forma local en las inmediaciones de mate-

riales implantados; como demuestra la histología y el análisis de μ CT.

La existencia de cierta variabilidad en los resultados obtenidos se puede deber a las siguientes razones: se intentó reducir el número de conejos utilizados de acuerdo con las guías éticas de Protección Animal realizando multi-intervenciones en ambos fémures. Además, la reproducibilidad del defecto cavitario así como el análisis histológico (dificultad del corte en parafina con un material) y de μ CT tiene sus limitaciones debido a lo expuesto anteriormente.

A la vista de los resultados expuestos, la PTHrP (107-111) cargada en el material C8-SBA-15 ejerce un mayor efecto osteogénico en comparación con el material sin funcionalizar. Es posible que este mayor efecto se deba al péptido remanente adsorbido en la cerámica, cuyas concentraciones residuales demostraron ser suficientes para estimular la proliferación de células osteoblásticas *in vitro*, en comparación con el SBA-15 en el que el péptido es liberado de forma más rápida¹⁴.

Conclusiones

Como conclusión, queda probada la capacidad de los biomateriales cerámicos SBA-15 y C8-SBA-15 como soportes de liberación local de la PTHrP (107-111) para favorecer la regeneración ósea tras un defecto cavitario en el fémur del conejo. Además, la funcionalización del SBA-15 con grupos C8 y su posterior carga con PTHrP (107-111) permite obtener un biomaterial idóneo para promover la regeneración ósea en este sentido. Los hallazgos aquí presentados apoyan la posible uti-

lización de dichos materiales cargados con la osteostatina como alternativa terapéutica en la reparación y la regeneración ósea.

Agradecimientos: Este estudio fue realizado gracias a las ayudas procedentes del Instituto de Salud Carlos III (PI050117, PI080922, and RETICEF RD06/0013/1002), Ministerio de Educación y Ciencia de España (SAF2005-05254), Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña, Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT, España) (MAT2008-736) y Comunidad Autónoma de Madrid (S2009/MAT-1472). DL es un investigador posdoctoral asociado al proyecto de la Comunidad de Madrid (S2009/MAT-1472).

Bibliografía

- Philbrick WM, Wysolmersky JJ, Galbraith S, Holt E, Orloff JJ, Yang KH, et al. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev* 1996;76:127-73.
- Martin TJ, Moseley JM, Williams DE. Parathyroid hormone-related protein: hormone and cytokine. *J Endocrinol* 1997;154:23-37.
- de Castro LF, Lozano D, Portal-Núñez S, Maycas M, De la Fuente M, Caeiro JR, Esbrit P. Comparison of the skeletal effects induced by daily administration of PTHrP (1-36) and PTHrP (107-139) to ovariectomized mice. *J Cell Physiol* 2012;227:1752-60.
- Horwitz MJ, Tedesco MB, Gundberg C, García-Ocana A, Stewart AF. Short-term, high-dose parathyroid hormone-related protein as a skeletal anabolic agent for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:569-75.
- Stewart AF, Cain RL, Burr DB, Jacob D, Turner CH, Hock JM. Six-month daily administration of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein peptides to adult ovariectomized rats markedly enhances bone mass and biomechanical properties: a comparison of human parathyroid hormone 1-34, parathyroid hormone-related protein 1-36, and SDZ-parathyroid hormone 893. *J Bone Miner Res* 2000;15:1517-25.
- Stewart AF. PTHrP (1-36) as a skeletal anabolic agent for the treatment of osteoporosis. *Bone* 1996;19:303-6.
- Fenton AJ, Kemp BE, Hammonds RG, Mitchelhill D, Moseley JM, Martin TJ, et al. A potent inhibitor of osteoclastic bone resorption within a highly conserved peptide region of PTHrP (107-111). *Endocrinology* 1991;129:3424-6.
- Fenton AJ, Kemp BE, Kent GN, Moseley JM, Zheng MH, Rowe DJ, et al. A carboxyl-terminal peptide from the parathyroid hormone-related protein inhibits bone resorption by osteoclasts. *Endocrinology* 1991;129:1762-8.
- Fenton AJ, Martin TJ, Nicholson GC. Long-term culture of disaggregated rat osteoclasts: inhibition of bone resorption and reduction of osteoclast-like cell number by calcitonin and PTHrP[107-139]. *J Cell Physiol* 1993;155:1-7.
- Cornish J, Callon KE, Nicholson GC, Reid IR. Parathyroid hormone-related protein-(107-139) inhibits bone resorption in vivo. *Endocrinology* 1997;138:1299-304.
- Boileau G, Tenenhouse HS, Desgrois L, Crine P. Characterization of PHEX endopeptidase catalytic activity: identification of parathyroid-hormone-related peptide 107-139 as a substrate and osteocalcin, PPI and phosphate as inhibitors. *Biochem J* 2001;355:707-13.
- Cornish J, Callon KE, Lin C, Xiao C, Moseley JM, Reid IR. Stimulation of osteoblast proliferation by C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein. *J Bone Miner Res* 1999;14:915-22.
- De Gortázar AR, Alonso V, Álvarez-Arroyo MV, Esbrit P. Transient exposure to PTHrP (107-139) exerts anabolic effects through vascular endothelial growth factor receptor 2 in human osteoblastic cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 2006;79:360-9.
- Lozano D, Manzano M, Doadrio JC, Salinas AJ, Vallet-Regí M, Gómez-Barrena E, et al. Osteostatin-loaded bioceramics stimulate osteoblastic growth and differentiation. *Acta Biomater* 2010;6:797-803.
- Valín A, Guillén C, Esbrit P. C-terminal parathyroid hormone-related protein (PTHrP) (107-139) stimulates intracellular Ca²⁺ through a receptor different from the type 1 PTH/PTHrP receptor in osteoblastic osteosarcoma UMR 106 cells. *Endocrinology* 2001;142:2752-9.
- Guillén C, Martínez P, de Gortázar AR, Martínez ME, Esbrit P. Both N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein increase interleukin-6 by NF-κB activation in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2002;277:28109-17.
- Alonso V, de Gortázar AR, Ardura JA, Andrade-Zapata I, Álvarez-Arroyo MV, Esbrit P. Parathyroid hormone-related protein (107-139) increases human osteoblastic cell survival by activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *J Cell Physiol* 2008;217:717-27.
- Fernández de Castro L, Lozano D, Dapía S, Portal-Núñez S, Caeiro JR, Gómez-Barrena E, et al. Role of the N- and C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein as putative therapies to improve bone regeneration under high glucocorticoid treatment. *Tissue Eng Part A* 2010;16:1157-68.
- Lozano D, Fernández-de-Castro L, Portal-Núñez S, López-Herradón A, Dapía S, Gómez-Barrena E, et al. The C-terminal fragment of parathyroid hormone-related peptide promotes bone formation in diabetic mice with low turnover osteopaenia. *Br J Pharmacol* 2011;162:1424-38.
- Deschaseaux F, Sensébé L, Heymann D. Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends Mol Med* 2009;15:417-29.
- Walsh WR, Sherman P, Howlett CR, Sonnabend DH, Ehrlich MG. Fracture healing in a rat osteopenia model. *Clin Orthop Relat Res* 1997;342:218-27.
- Andreassen TT, Ejersted C, Oxlund H. Intermittent parathyroid hormone (1-34) treatment increases callus formation and mechanical strength of healing rat fractures. *J Bone Miner Res* 1999;14:960-8.
- Bostrom MP, Gamradt SC, Asnis P, Vickery BH, Hill E, Avnur Z, et al. Parathyroid hormone-related protein analog RS-66271 is an effective therapy for impaired bone healing in rabbits on corticosteroid therapy. *Bone* 200;26:437-42.
- Vallet-Regí M, Balas F, Arcos D. Mesoporous materials for drug delivery. *Angew Chem Int Ed* 2007;46:7548-58.
- Vallet-Regí M. Evolution of bioceramics within the field of biomaterials. *Comptes Rendus Chimie* 2010;13:174-85.
- Manzano M, Colilla M, Vallet-Regí M. Drug delivery from ordered mesoporous matrices. *Expert Opin Drug Deliv* 2009;6:1383-400.
- Zhao D, Feng J, Huo Q, Melosh N, Fredrickson GH, Chmelka BF, et al. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. *Science* 1998;279:548-52.
- Vallet-Regí M. Revisiting ceramics for medical applications. *Dalton Trans* 2006;28:5211-20.
- Balas F, Manzano M, Colilla M, Vallet-Regí M. L-Trp adsorption into silica mesoporous materials to promote bone formation. *Acta Biomater* 2008;4:514-22.
- Zhao D, Huo Q, Fena J, Chmelka BF, Stucky GD. Non ionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant synthesis of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures. *J Am Chem Soc* 1998;120:6024-36.
- Zambonin G, Camerino C, Greco G, Patella V, Moretti B, Grano M. Hydroxyapatite coated with hepatocyte growth factor (HGF) stimulates human osteoblasts in vitro. *J Bone Joint Surg* 2000;82:457-60.
- Zambonin G, Grano M, Greco G, Oreffo ROC, Triffitt JT. Hydroxyapatite coated with insulin-like growth fac-

- tor 1 (IGF1) stimulates human osteoblast activity in vitro. *Acta Orthop Scand* 1999;70:217-20.
33. Hoemann CD, Sun J, McKee MD, Chevrier A, Rossomacha E, Rivard GE, et al. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants elicit hyaline cartilage repair integrated with porous subchondral bone in microdrilled rabbit defects. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:78-89.
 34. Feldkamp LA, Davis LC, Kress JW. Practical cone-beam algorithm. *J Opt Soc Am A* 1984;1:612-9.
 35. Kosmulski M. PH-dependent surface charging and points of zero charge. II.Update. *J Colloid Interface Sci* 2004;275:214-24.
 36. Hing KA, Wilson LF, Buckland T. Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes. *Spine J* 2007;7:475-90.
 37. Lozano D, de Castro LF, Dapía S, Andrade-Zapata I, Manzarbeitia F, Álvarez-Arroyo MV, et al. Role of parathyroid hormone-related protein in the decreased osteoblast function in diabetes-related osteopenia. *Endocrinology* 2009;150:2027-35.
 38. Horwitz MJ, Tedesco MB, Gundberg C, García-Ocana A, Stewart AF. Short-term, high-dose parathyroid hormone-related protein as a skeletal anabolic agent for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:569-75.
 39. Vickery BH, Avnur Z, Cheng Y, Chiou SS, Leaffer D, Caulfield JP, et al. RS-66271, a C-terminally substituted analog of human parathyroid hormone-related protein (1-34), increases trabecular and cortical bone in ovariectomized, osteopenic rats. *J Bone Miner Res* 1996;11:1943-51.
 40. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone* 1996;19:1S-12S.
 41. Fang J, Zhu YY, Smiley E, Bonadio J, Rouleau JP, Goldstein SA, et al. Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:5753-8.
 42. Okazaki K, Jingushi S, Ikenoue T, Urabe K, Sakai H, Iwamoto Y. Expression of parathyroid hormone-related peptide and insulin-like growth factor I during rat fracture healing. *J Orthop Res* 2003;21:511-20.