



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

**TÍTULO: Mecanotransducción basada en
nanomateriales magnéticos: Medicina regenerativa**

Autor: Sara García Meneses

Fecha: Junio 2019

Tutor: Isabel Izquierdo Barba

ÍNDICE:

Lista de abreviaturas.....	1
Resumen y Abstract.....	1
1. Introducción.....	2
1.1 Mecanotransducción.....	2
1.2 Regeneración ósea.....	4
1.3 Nanopartículas magnéticas y sus aplicaciones biomédicas.....	5
2. Objetivos.....	6
3. Material y métodos.....	6
4. Resultados y discusión.....	6
5. Conclusión.....	13
6. Referencias bibliográficas.....	14

Lista de abreviaturas:

BMP2: proteína morfogenética recombinante humana 2

MNPs: nanopartículas magnéticas

➤ RESUMEN

La mecanotransducción es un proceso molecular dinámico basado en la conversión de los estímulos mecánicos procedentes del medio extracelular en señales bioquímicas intracelulares. En los organismos vivos, estos estímulos mecánicos son “*transducidos*” a través de los tejidos a fin de dar información a las células sobre las características o el estado del ambiente en el que se encuentran, lo cual puede resultar por ejemplo, en una respuesta de adaptación de éstas al medio intracelular. En concreto, estas fuerzas mecánicas tienen efecto sobre la homeostasis tisular, ya que regulan el comportamiento de las células en muchos aspectos, incluyendo la proliferación y diferenciación celular. En la actualidad la comunidad científica está estudiando la posibilidad de emplear esta propiedad con fines de regeneración tisular lo cual supondría un gran avance en la mejora de la integración y reparación de los tejidos. En este sentido, los avances más recientes en este tipo de terapia consisten fundamentalmente en una activación selectiva de mecanosensores de diversos tipos celulares que activen de manera adecuada diferentes cascadas de señalización y activen el mecanismo de regeneración tisular. Una alternativa para lograrlo consiste en la utilización de nanopartículas magnéticas, las cuales han mostrado unas propiedades únicas para desarrollar este tipo de terapias. El objetivo de este trabajo fin de grado ha sido llevar a cabo un análisis bibliográfico de una serie de artículos científicos basados en la investigación de la aplicación o uso de esta estrategia con el fin de valorar si puede o no ser utilizada como terapia en el ámbito de la medicina regenerativa, más concretamente, en regeneración de tejido óseo.

Palabras clave: Mecanotransducción, regeneración tisular, nanopartículas, terapia celular.

➤ ABSTRACT

Mechanotransduction is a dynamic molecular process based on the conversion of mechanical stimuli from the extracellular medium into intracellular biochemical signals. These mechanical stimuli are "transduced" through tissues in order to give information to the cells about the characteristics of the environment in where they are, that may result, for example, in an adaptation response to the intracellular environment. In particular, these mechanical forces have an effect on tissue homeostasis, they regulate the behaviour of cells in many aspects, including cell proliferation and differentiation. The scientific community is recently studying the possibility of using this property for tissue regeneration, which would represent a great advance in improving the integration and repair of tissues. In this sense, the most recent advances in this type of therapy consist fundamentally of a selective activation of mechanosensors of different cell types that adequately activate different signalling cascades and activate the mechanism of tissue regeneration. An alternative to achieve this is the use of magnetic nanoparticles, which have shown unique properties to develop this type of therapy. The objective of this end-of-degree work has been to carry out a bibliographic analysis of a series of scientific articles based on research into the application or use of this strategy in order to assess whether or not it can be used as therapy in regenerative medicine.

➤ INTRODUCCIÓN

La mecanotransducción es un proceso de conversión de fuerzas mecánicas externas en señales bioquímicas intracelulares que cuenta con un papel de gran importancia en el metabolismo tisular, ya que interviene en la regulación de comportamientos celulares tales como la proliferación y diferenciación celular [1].

A nivel de tejido óseo, podríamos decir que su reparación y regeneración están indudablemente influenciadas por las interacciones íntimas entre los ambientes fisiológico, bioquímico y mecanobiológico y, en particular, se ha estudiado ampliamente el efecto de la fuerza mecánica sobre estos dos procesos, lo que ha llevado a una mayor concienciación sobre la importancia de estudiar la mecanotransducción.

Por lo tanto, cuando nos encontramos en una situación de daño o pérdida ósea, controlar el ambiente mecánico situado alrededor de la zona fracturada puede resultar una novedosa terapia de reparación de tejido óseo.

1.1 Mecanotransducción

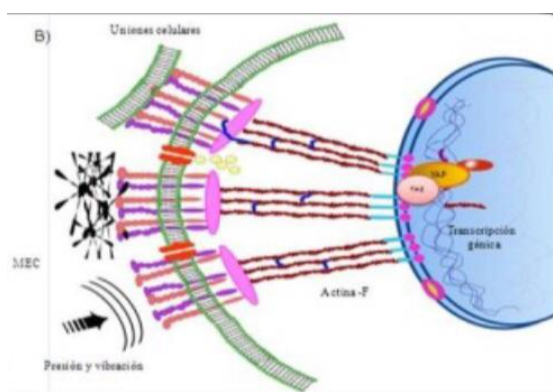


Figura 1. La célula percibe estímulos a través de: Interacción célula-célula, entorno celular y MEC. La respuesta se presenta desde arreglos en el citoesqueleto, hasta cambios morfológicos, que pueden incluso producir expresión diferencial de proteínas.

La mecanotransducción puede ser definida como la conversión de fuerzas externas que actúan sobre los mecanosensores situados en la superficie de las células, en señales bioquímicas intracelulares [2]. Estos mecanosensores son estructuras o moléculas cuya interacción con otras se ve constantemente afectada por fuerzas mecánicas. De entre todos los existentes, cabe destacar los de tipo canal iónico, cuya sensibilidad reside en la membrana plasmática de todas las células, mientras que su función depende del tipo y la fuerza de los estímulos que reciben.

Todos los canales iónicos resultan sensibles a la estimulación mecánica [3], de hecho, fue demostrado en diversos tipos celulares que ésta resulta en un aumento del calcio intracelular, con el cual se activan numerosas moléculas que participan en la

mecanotransducción y, de este modo, se contribuye por ejemplo a la diferenciación de células madre mesenquimales humanas en células óseas, favoreciendo así la reparación del tejido óseo [4]. Para que esta mecanotransducción de fuerzas mecánicas en corrientes iónicas se pueda llevar a cabo, existe como único requerimiento el cambio de probabilidades entre los dos estados que tiene un canal iónico, que son abierto y cerrado, es decir, debe aumentar la probabilidad de que ese canal se encuentre en su estado abierto y disminuir la probabilidad de que éste se encuentre en su estado cerrado [5].

La mecanotransducción, como ya se ha citado anteriormente, es un proceso que tiene un papel muy importante a nivel de diferenciación celular, crecimiento de los tejidos y homeostasis tisular y, cuando se lleva a cabo, las señales generadas son transmitidas al exterior celular, como ocurre por ejemplo en situaciones de daño óseo, donde los osteocitos producen señales que suponen el primer paso para inducir su reparación y lograr la homeostasis de los huesos [6].

1.2 Regeneración ósea.

El tratamiento de la pérdida ósea o su curación deficiente es un problema clínico complejo y, por lo tanto, requiere soluciones innovadoras. Existen varias opciones para llevar a cabo esta terapia, como por ejemplo, el empleo de autoinjertos (técnica más utilizada, conlleva la toma de un fragmento de hueso del paciente y su posterior trasplante a otra zona del mismo), aloinjertos (toma y procesamiento del hueso de un cadáver y su posterior trasplante al paciente) o xenoinjertos (utilizan fragmentos de hueso obtenidos de animales de diferentes especies). Sin embargo, existe una desventaja en la utilización de estas técnicas, dado que podemos encontrarnos con problemas tales como la escasez de donantes, problemas de rechazo, etc. [7]

Como consecuencia de esto, la comunidad científica ha llevado a cabo una serie de investigaciones a fin de mejorar los tratamientos existentes y se han implantado una serie de técnicas que buscan solucionar los problemas anteriormente comentados. El conjunto de estas técnicas se denomina "Ingeniería de tejido óseo" y, en su mayoría, se basan en el cultivo celular en matrices tridimensionales, en medios de cultivo suplementados con factores de crecimiento. En la regeneración ósea que utiliza la ingeniería de tejidos, son fundamentales tres elementos tales como: matrices tridimensionales, diferentes tipos celulares y factores de crecimiento.

- **Matrices tridimensionales:** Son dispositivos que proporcionan a las células el apoyo necesario para su proliferación y para el mantenimiento de sus funciones. Además van a aportar las señales biológicas requeridas para la conservación de la expresión génica específica. Estas señales serán fundamentales para la arquitectura del tejido. Las células interactúan con estos dispositivos de manera activa en el proceso de regeneración del tejido, lo cual induce la liberación de factores de diferenciación y crecimiento. Las matrices tridimensionales utilizadas en ingeniería de tejidos deben ser biocompatibles (no deben causar respuesta inmune ni ser tóxicas), porosas (para la correcta difusión de gases y nutrientes), biodegradables, osteoinductivas (las células madre deben ser agrupadas en los sitios de regeneración y estimuladas para diferenciarse hacia la línea osteogénica), deben tener propiedades mecánicas y, por último, deben ser osteoconductoras.
- **Células:** Las células más usadas para la regeneración ósea son las células madres mesenquimales (MSC). Estas células cumplen una serie de requisitos que las hacen ideales para su cultivo. Básicamente estas características son: fácil obtención, conservación y expansión; mantenimiento de su función y multipotencialidad necesaria para diferenciarse a una amplia variedad de células especializadas. Se obtienen del tejido adiposo o de la médula ósea.
- **Factores de crecimiento:** La morfogénesis del hueso precisa de una serie de moléculas de señalización, que son los conocidos factores de crecimiento de entre los cuales destacaremos la proteína morfogénica ósea (BMP2). Estos factores son los que se añadirán a los medios de cultivo de células osteoprogenitoras para llevar a cabo la regeneración ósea.

Todos estos elementos deben encontrarse bajo unas condiciones físico-químicas adecuadas que permitan la regeneración del tejido que queremos reemplazar .

Además de todo lo anterior, estudios preclínicos en diferentes modelos experimentales confirman que, poco después de la formación de un defecto óseo, hay una ventana de

oportunidades para mejorar su curación mediante la modulación del entorno mecánico situado alrededor del sitio fracturado, y, debido a esto, se generan numerosas preguntas de investigación con respecto a los posibles mecanismos de reparación, como el control de la mecanotransducción y la optimización de las fuerzas mecánicas.

Las nanopartículas magnéticas, suponen la única manera de dirigir la mecanotransducción en las células, y, por lo tanto, su empleo podría ser considerado una terapia innovadora en este ámbito.

1.3 Nanopartículas magnéticas y aplicaciones biomédicas

Se define como nanopartículas a aquellos materiales cuyo tamaño oscila entre los 1 y 100 nanómetros, tanto en tres como en dos dimensiones y cuyas propiedades fisicoquímicas dependen de la longitud de su superficie específica por lo que las reglas fisicoquímicas habituales no pueden ser completamente aplicables en ellas.

Pueden ser fabricadas a través de numerosos materiales, incluyendo polímeros y materiales inorgánicos, de entre los cuales destacan los metales u óxidos metálicos [8], por ejemplo el óxido de hierro. Aquellas fabricadas por este material, son utilizadas entre otras cosas en resonancias magnéticas [9] y como vehículo de medicamentos contra células tumorales [10].

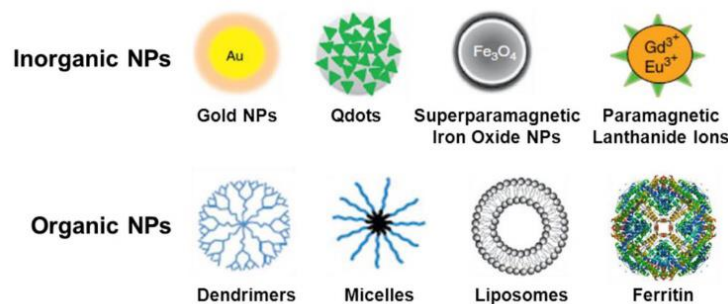


Figura 2. Nanopartículas con gran potencial terapéutico y de diagnóstico

Aplicaciones biomédicas

Existen diversos tipos de nanopartículas, entre ellas destacamos las magnéticas (MNPs), ya que actualmente han recibido gran importancia en el ámbito de la medicina, tanto a nivel de diagnóstico (resonancias magnéticas) como a nivel terapéutico (hipertermia, regulación de señalización celular) y, a día de hoy, están siendo ampliamente estudiadas con el fin de demostrar su efectividad y el gran avance que suponen en métodos de cultivo celular 2D e incluso en hidrogeles 3D y microinyección [11].

Com se ha citado anteriormente, las MNPs suponen la única forma de dirigir la mecanotransducción en las células, y cuentan con una serie de características que las convierten en idóneas para determinadas situaciones clínicas, como por ejemplo para el tratamiento de daño o pérdida ósea.

Una de sus principales ventajas en este ámbito, es que no producen alteraciones de las propiedades mecánicas del material utilizado como base, lo que anteriormente suponía un grave problema ya que este desajuste de propiedades tenía como resultado importantes fracasos en implantes médicos [12].

Su uso, por lo tanto, resulta una técnica prometedora para futuros avances en aplicaciones biomédicas, idea que está respaldada por la disponibilidad de MNPs que pueden apuntar a

componentes celulares específicos, la variedad de formas existentes y la posibilidad de controlar finamente las fuerzas magnéticas aplicadas [13].

Además de sus efectos terapéuticos, mediante estimulación celular mecánica, las MNPs pueden ser empleadas como vehículos de distribución de medicamentos, como mecanismo de inducción de apoptosis de células cancerígenas y, por último, como método de control de canales iónicos o receptores de superficie de las células mediante la transformación de energía en fuerzas mecánicas o calor.

En el siguiente apartado nos vamos a centrar en la regeneración ósea mediada por el proceso de la mecanotransducción estimulada por MNPs con el fin de controlar el ambiente mecánico de alrededor de la zona de hueso afectada, y vamos a estudiar las ventajas de su empleo en combinación con BMP2.

➤ **OBJETIVOS:**

El objetivo de este trabajo fin de grado consiste en estudiar la diferenciación osteogénica de las células madre humanas y la consecuente formación de tejido óseo en modelos de cultivo tridimensionales (hidrogeles de colágeno y fémur fetal de ave) en respuesta a la activación de manera remota de la mecanotransducción inducida tanto por estímulos osteogénicos primarios como por la combinación de estos con efectos producidos por el factor de crecimiento BMP2.

➤ **MATERIAL Y MÉTODOS:**

Se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica usando como base principal ScienDirect y SciFinder, además de otras fuentes tales como revistas de divulgación científica digitalizadas. Como palabras clave se han introducido: mecanotransducción y regeneración ósea. Se han consultado un total de 7 artículos, los más novedosos referentes al tema, cuyos principales autores son James R. Henstock y Alicia J. El Haj.

➤ **RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

La mecanotransducción es un factor muy importante en el metabolismo de los huesos y, en algunas ocasiones, se han llevado a cabo estudios que han demostrado que los estímulos mecánicos afectan de manera directa a la diferenciación de las células madre en células osteoblásticas, interaccionando y amplificando las señales de activación de cascadas procedentes de factores de crecimiento tales como la BMP2 [14]. Como resultado de esto, podríamos determinar que la presencia o ausencia de estimulación mecánica durante la diferenciación de las células y la síntesis de los tejidos, puede tener un impacto notable tanto en la cantidad como en la calidad de hueso formado.

Como la aplicación de estos estímulos de manera directa a las zonas defectuosas de los huesos sin causar daño a los tejidos de alrededor resulta bastante difícil, se han desarrollado una serie de métodos indirectos que consiguen estimular la mecanotransducción de manera in situ [15]. Por medio de ellos, los mecanorreceptores que se encuentran en la superficie de las células, como aquellos que están asociados a canales iónicos TREK1 de potasio, o al sitio de unión RGD de integrinas que conecta la matriz extracelular con el citoesqueleto [16], pueden ser marcados directamente mediante el uso de nanopartículas magnéticas, y a continuación, serán estimulados mediante el uso de campos magnéticos externos [17].

Como consecuencia de esto, se propagarán estímulos mecánicos por todo el interior celular y así, lo que vamos a conseguir, es un control externo de la activación de las rutas que intervienen en la diferenciación celular.

Este tipo de mecanotransducción es estimulada sin que se produzca una situación de estrés mecánico, ni en el tejido sobre el que se lleva a cabo, ni en los alrededores de este, de tal modo que es posible aplicar fuerzas de un amplio rango sobre el receptor elegido [18].

Teniendo en cuenta todo esto, lo que podríamos determinar es que la mecanotransducción basada en nanomateriales magnéticos se convierte en una técnica novedosa de gran importancia para controlar de forma precisa y no invasiva las fuerzas aplicadas sobre las células [19].

En este trabajo, lo que vamos a estudiar es la efectividad de la mecanotransducción activada remotamente en terapias basadas en células inyectables marcadas con nanopartículas magnéticas utilizando dos modelos diferentes de formación ósea: en primer lugar, fémures de ave fetal desarrollados in vivo, y, en segundo lugar, un hidrogel de colágeno.

El fémur de ave fetal, supone un método muy útil para estudiar la formación ósea in vitro [20-21] puesto que al aislarlo a mitad de la gestación (semana 11, en este caso) cuenta con un rudimento cartilaginoso con un único sitio de mineralización y ausencia de mineralización epifisaria [22]. Este modelo, por lo tanto, permite monitorizar el progreso de mineralización que tiene lugar en respuesta a la aplicación de tratamientos experimentales y, por otro lado, los efectos osteogénicos que surgen como resultado de la mecanotransducción mediada por nanopartículas magnéticas, pueden ser determinados mediante el uso de rayos X [23].

La siembra de células en los hidrogeles de colágeno supone también un método para estudiar la acción de las nanopartículas en unas condiciones mucho más controladas y para demostrar además cómo este mecanismo puede suponer un avance en las estrategias biomateriales empleadas en medicina regenerativa.

En el estudio llevado a cabo se emplearon dos grupos de experimentos:

1. Fémur fetal de ave e hidrogeles de colágeno.

En este modelo experimental, se contó con **fémures fetales de ave**, en algunos de los cuales fueron inyectadas células madre no marcadas, en otros células madre marcadas por nanopartículas magnéticas de unión a TREK1 o de unión a RGD, y por último, se contaba con fémures control, que fueron inyectados en simulacro con PBS (tampón fosfato salino)

Nanopartículas magnéticas funcionalizadas fueron dirigidas a los canales de potasio de TREK1 o a los dominios de unión de integrinas (RGD) de las células madre mesenquimales humanas.

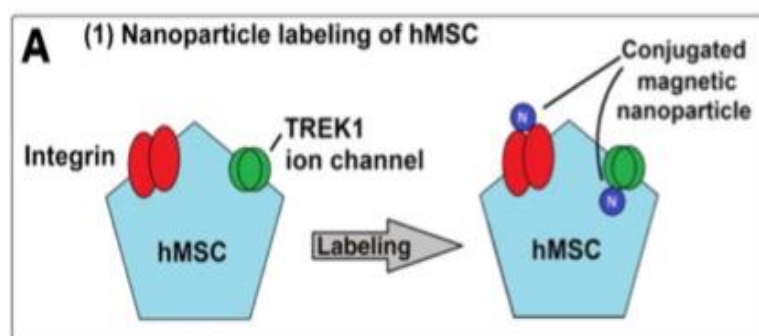


Figura 3. Las células madre mesenquimales humanas fueron marcadas con nanopartículas magnéticas dirigidas al sitio de unión de integrinas RGD o al canal mecanosensible de iones TREK1

Posteriormente, estas fueron microinyectadas insertando un capilar de vidrio en el rudimento cartilaginoso del fémur, que después, se retiraba con el fin de crear una pequeña cavidad sin dañar excesivamente el tejido de alrededor.

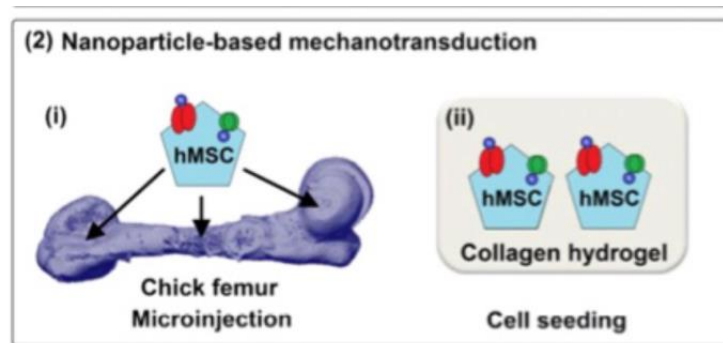


Figura 4. microinyección de células madre marcadas por nanopartículas magnéticas en fémur de ave fetal (4.i) y en hidrogel de colágeno (4.ii)

Finalmente, los fémures fueron devueltos al cultivo organotípico y fueron sometidos a un campo magnético oscilatorio.

Una vez hubieron pasado 14 días en cultivo in vitro, tanto los grupos control como aquellos inyectados con células madre marcadas y no marcadas, fueron teñidos histológicamente con el fin de determinar la presencia de glucosaminoglicanos y de calcio.

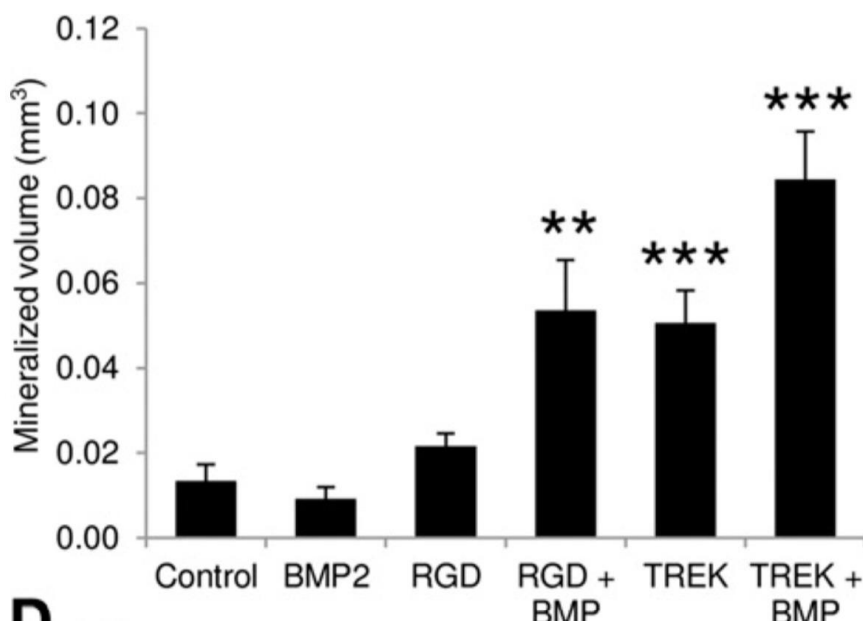


Figura 5. El aumento del umbral de análisis para la microtomografía a fin de cuantificar sólo la porción mineralizada del hidrogel reveló que el volumen del material mineralizado de alta densidad era similar para el control y el BMP2 solo, mientras que las células tratadas con cualquiera de las nanopartículas en combinación con el BMP2 estaban significativamente más mineralizadas. Las combinaciones de nanopartículas y nanopartículas + BMP resultaron en la formación de regiones mineralizadas más numerosas y gruesas dentro del hidrogel que los controles o el BMP2

Evaluando los resultados se observó que, en el caso de los fémures inyectados con células madre no etiquetadas, es decir, que no estaban marcadas con nanopartículas, la mineralización era similar a la de los grupos control que, como ya se ha dicho anteriormente, estaban inyectados en simulacro con tampón fosfato PBS.

En los grupos control de inyección simulada, se observó que la mineralización había sido estimulada en el sitio de inyección como tal (sitio donde se había generado el daño), al contrario

que en los fémures inyectados con células madre marcadas, donde se estimuló una mineralización significativamente mayor como consecuencia de la aplicación del campo magnético oscilatorio directamente sobre los mecanorreceptores, lo que indujo mecanotransducción y, por consiguiente, un aumento significativo de la densidad ósea en el lugar de inyección y alrededores.

Por otro lado y como he citado anteriormente, también se llevaron a cabo experimentos en **hidrogeles de colágeno**, los cuales permitieron un mayor control sobre las condiciones de cultivo celular y, además, se pudo observar el proceso de formación del hueso de una manera más lograda y detallada.

En este caso, se empleó el mismo procedimiento: Se contaba con hidrogeles control, hidrogeles en los que se habían sembrado células madre no marcadas, e hidrogeles con células madre marcadas con MNPs. Sobre todos fue aplicado un campo magnético oscilatorio, y fueron sometidos a cultivo in vitro.

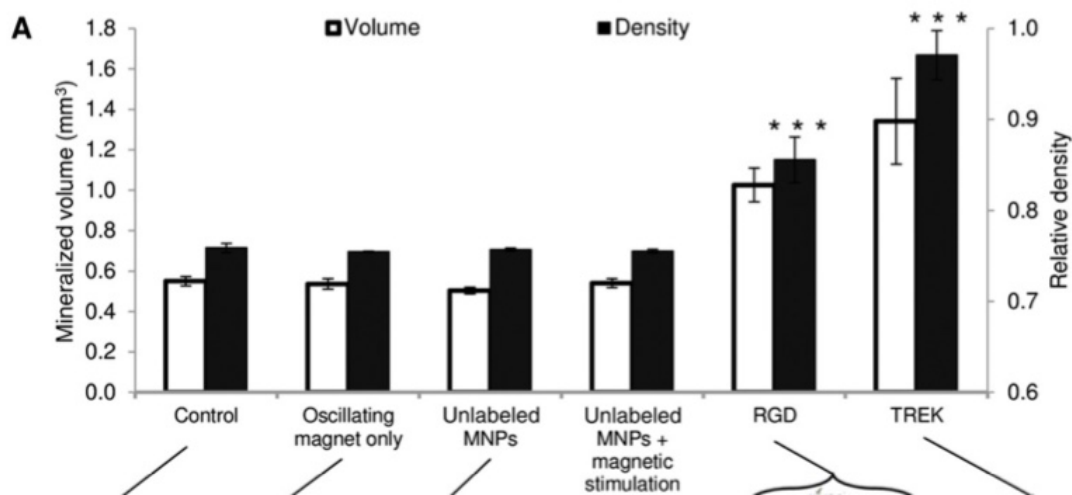


Figura 6. La microtomografía de rayos X reveló que la mineralización en los geles es similar bajo todas las condiciones de control. Tanto las nanopartículas magnéticas conjugadas con RGD como las TREK-Ab tuvieron efectos significativos sobre el volumen y la densidad del material mineralizado en el gel cuando se etiquetaron las células madre mesenquimales antes de la siembra en el hidrogel.

Tras 28 días en estas condiciones, se llevo a cabo un estudio por microtomografía de rayos X que mostró que se había producido un aumento similar de volumen del gel en todos los grupos control y que la presencia de un campo magnético oscilatorio no tenía ningún tipo de efecto ni sobre las células madre no etiquetadas ni sobre los controles.

Posteriormente, en los hidrogeles de colágeno que contenían células madre no etiquetadas, se añadieron nanopartículas directamente en el gel, es decir, sin marcar células, y lo que se observó fue que no había aumento ni en la densidad ni en el volumen del gel en comparación con los grupos control.

Lo que se confirmó con esto fue que no solo son necesarias las nanopartículas magnéticas para alcanzar la mecanotransducción, si no que además es necesario que se encuentren unidas a las células madre.

Por otro lado, en los hidrogeles de colágeno que contenían células madre previamente etiquetadas con nanopartículas magnéticas, ya fueran de unión a RGD o de unión a TREK1, se podían observar grandes áreas de mineralización que se hacían visibles mediante métodos de

microtomografía como regiones teñidas intensamente (tanto por la presencia de calcio como de colágeno) y altamente pobladas.

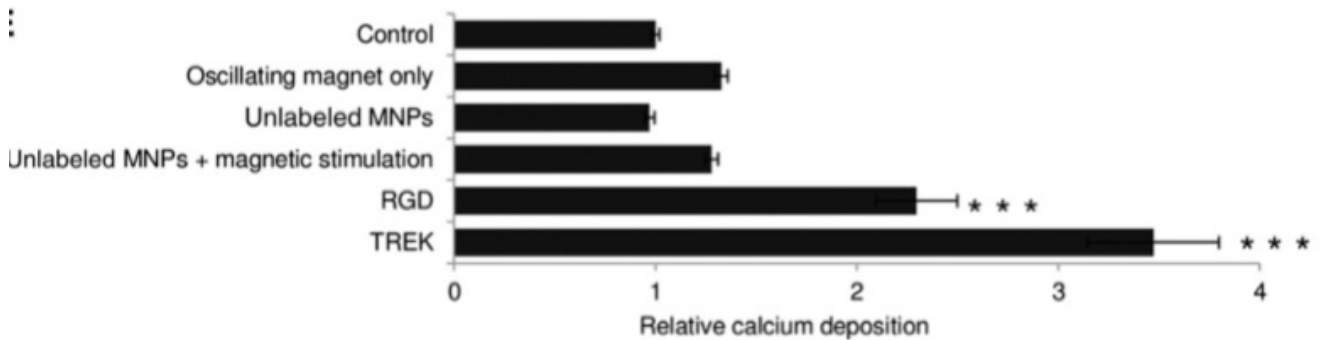


Figura 7. La retención permitió la cuantificación de la deposición de calcio, que fue equivalente para todos los controles y significativamente mayor en hidrogeles sembrados con células marcadas con RGD y TREK-Ab

Además, para llevar a cabo la cuantificación de calcio y ser más precisos en los detalles, se empleó una solución de tinción de aliz-arín rojo, y se pudo confirmar que los grupos marcados por nanopartículas estaban muchísimo más mineralizados que los controles.

2. Microesferas de factor de crecimiento BMP2

En el segundo grupo de experimentos, se emplearon **microesferas de PLGA** de liberación controlada del factor de crecimiento BMP2, que en algunos casos fueron inyectadas en los fémures en combinación con células madre marcadas con nanopartículas de unión a TREK1 o RGD, y en otros casos, fueron inyectadas solas.

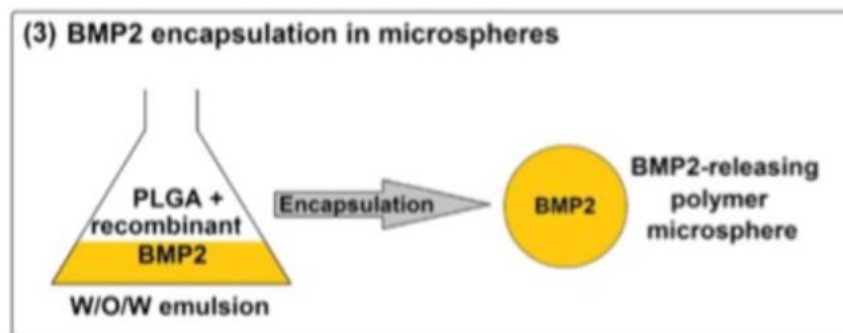


Figura 8. En experimentos posteriores, se estudiaron los efectos combinados de la mecanotransducción dirigida y la administración de BMP2 utilizando microesferas de PLGA liberadoras de BMP2 formadas por un proceso de emulsión.

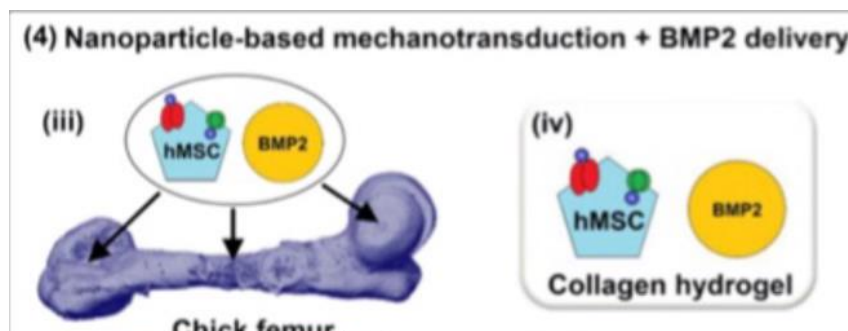


Figura 9. Las células etiquetadas y las microesferas liberadoras de BMP2 se colocaron en el fémur de los pollitos (9.i) o en hidrogeles de colágeno (9.ii)

Posteriormente, se llevó a cabo la tinción de estos fémures con alizarina roja para determinar la cantidad de calcio existente y, de este modo, ser capaces de observar la extensión de la mineralización.

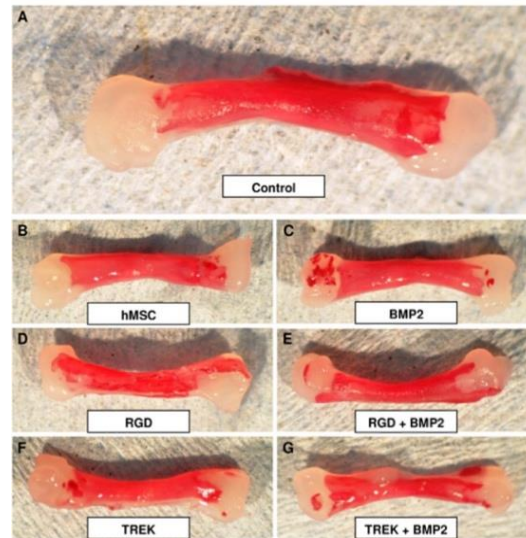


Figura 10. Mineralización en el fémur del feto en respuesta a la mecanotransducción dirigida por nanopartículas y a la liberación de BMP2. (A): La deposición de calcio (tinción con alizarina roja) de fémures enteros después de 2 semanas de cultivo organotípico in vitro muestra que el collarín óseo es el único sitio de mineralización en fémures de control (control). (B, C): Cuando se inyectaron células madre mesenquimales humanas (B) o micropartículas liberadoras de BMP2 (C), se produjo mineralización en los puntos de inyección. (D, E): La inyección de células preetiquetadas con nanopartículas magnéticas recubiertas de RGD (D) o TREK-Ab (E) mostró un aumento en la formación ósea, generalmente a través de la extensión del collarín óseo dentro de la epífisis. (F, G): Las inyecciones combinadas de micropartículas liberadoras de BMP2 con células madre marcadas con RGD (F) o TREK-Ab (G) mostraron tanto la extensión del cuello óseo como áreas de mineralización de novo en el sitio de la inyección.

Los resultados manifestaron que en los fémures en los que se habían inyectado las microesferas de BMP2 solas, se produjo un aumento del volumen del hueso formado pero no significativo, mientras que en el caso de los fémures inyectados con una combinación de células madre marcadas y microesferas, se observó un aumento muy destacable de la densidad de hueso. Este experimento se llevó a cabo de igual modo en hidrogeles de colágeno, observándose los mismos resultados, y por lo tanto corroborando que con la combinación de células madre marcadas con MNPs y microesferas de BMP2, se logra un efecto sinérgico que resulta en un aumento significativo de la densidad ósea con respecto a los controles, hasta cuatro veces mayor.

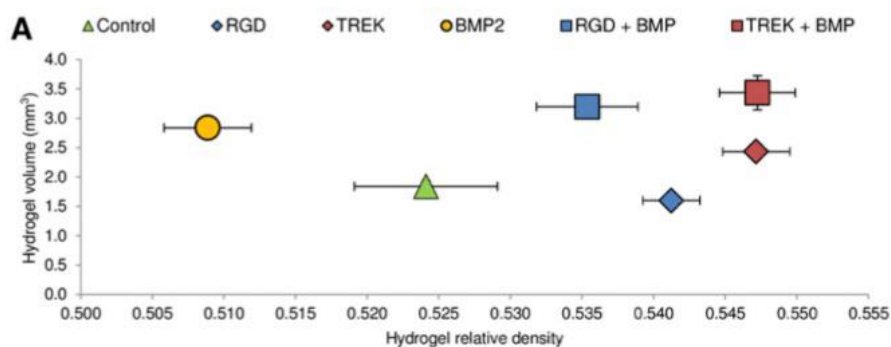


Figura 11. La cuantificación de los datos de la microtomografía de rayos X revela que la inyección de micropartículas liberadoras de BMP2 en el fémur de los pollitos causó un aumento en el volumen de hueso formado (eje y) en comparación con el control de inyección simulada, pero no afectó la densidad ósea (eje x). Las inyecciones de células madre no etiquetadas causaron un ligero aumento en la densidad ósea (eje x). Al apuntar a TREK1 con nanopartículas magnéticas y micropartículas liberadoras de BMP2, se produjo un aumento significativo de la densidad ósea.

Como en el caso de muchos tejidos, los huesos utilizan señales mecánicas durante su desarrollo y su reparación, al igual que señales bioquímicas [24].

Siempre se ha considerado que las señales más osteogénicas para llevar a cabo la remodelación del esqueleto son el ejercicio intenso y los estímulos intensos de tipo mecánico, pero actualmente, ha sido demostrado que incluso una estimulación de baja intensidad pero de elevada frecuencia puede proporcionar una señal anabólica en el hueso tal que puede resultar en la diferenciación de células madre en células osteogénicas [25].

En esta investigación, se utilizaron nanopartículas magnéticas funcionalizadas que fueron dirigidas directamente a los dominios de unión de RGD asociados a la matriz y a los canales iónicos de potasio TREK1, de tal modo que estas vías de mecanotransducción se pudieran activar remotamente. El canal iónico TREK1 puede ser activado de manera remota mediante la unión de nanopartículas magnéticas en su región intracelular y la aplicación de un campo magnético a su alrededor, mientras que el complejo RGD- integrina- nanopartículas, puede llevar a cabo una transducción directa de la fuerza [26].

La activación mediante nanopartículas de TREK1 en particular, fue significativa para aumentar la formación ósea en ambos modelos, pero lo que más podríamos destacar es que se demostró su actividad de carácter sinérgica con los efectos anabólicos del factor de crecimiento BMP2, obteniéndose como resultado fémures e hidrogeles de colágeno mineralizados en mayor medida. Esto demostraría la importancia de la actuación de estímulos mecánicos en combinación con la señalización llevada a cabo por los factores de crecimiento para obtener una formación óptima de una matriz extracelular totalmente funcional [27,28,29].

Teniendo en cuenta esto, podríamos considerar que una mecanotransducción controlada en las células madre empleadas en terapia ósea, sería un método novedoso y no invasivo, libre de fármacos, que podría ser empleado en las estrategias regenerativas para la reparación de los huesos [30,31].

En general, con los resultados obtenidos se pudo observar que las células madre como tal, es decir, sin marcaje, no influían significativamente en la mineralización en ninguno de los dos grupos experimentales, gracias a lo que se determinó que podría considerarse necesario un estímulo adicional, como es el caso de la mecanotransducción o de los factores de crecimiento, a fin de lograr el efecto o resultado deseado, es decir, una señalización y diferenciación de células madre en células osteocíticas.

Se puede establecer entonces que la mecanotransducción es un proceso que actúa como estímulo de diferenciación y, además, amplifica las señales de los factores de crecimiento relevantes del entorno circundante. Por ello, comprender las interacciones entre las vías de mecanotransducción y de señalización de los factores de crecimiento puede ser clave para determinar y optimizar la efectividad clínica de los tratamientos en el ámbito de regeneración ósea [32,33]. De este modo, al dirigir la mecanotransducción mediante nanopartículas magnéticas, es posible optimizar las dosis efectivas de los factores de crecimiento exógenos, amplificando sus cascadas intracelulares y mejorando potencialmente los usos clínicos de los tratamientos terapéuticos con BMP2 para diversas patologías óseas.

➤ CONCLUSIÓN

Los estímulos mecánicos son importantes para la remodelación y homeostasis de los huesos, que adaptan su forma a las diferentes cargas mecánicas a través de la actividad mecanosensora de los osteocitos.

Las nanopartículas magnéticas suponen un novedoso método para conducir estos estímulos marcando directamente los mecanosensores que se encuentran en las superficies celulares y transduciendo las fuerzas procedentes de un campo magnético externo, resultando en una mecanotransducción que puede ser controlada remotamente y que, como hemos dicho anteriormente, influye de una manera significativa en el proceso de diferenciación celular, en nuestro caso particular, en la diferenciación de células madre en células osteocíticas, y, como consecuencia, en un aumento de mineralización del tejido óseo.

El empleo sinérgico de factor de crecimiento BMP2 y el proceso de mecanotransducción mediado por nanopartículas, supone una novedosa estrategia cuyo papel es contribuyente en el tratamiento de defectos óseos clínicos y, por lo tanto, nos presenta una oportunidad para poder plantearnos nuevos enfoques optimizados para la rápida restauración del hueso funcional.

➤ REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Huang, H., Kamm, R. D., and Lee, R. T. (2004) Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287, C1–C11
2. Ingber, D. E. Cellular basis of mechanotransduction. *Biol. Bull.* 194:323–325, 1998.
3. Markin, V. S., and B. Martinac. Mechanosensitive ion channels as reporters of bilayer expansion: a theoretical- model. *Biophys. J.* 60:1120–1127, 1991.
4. Shen, J., F. W. Lusinskas, A. Connolly, C. F. Dewey, and M. A. Gimbrone. Fluid shear-stress modulates cytosolic free calcium in vascular endothelial-cells. *Am. J. Physiol.* 262:C384–C390, 1992.
5. Coste, B., J. Mathur, M. Schmidt, T. J. Earley, S. Ranade, M. J. Petrus, A. E. Dubin, and A. Patapoutian. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 330:55–60, 2010.6.
6. Huiskes, R., R. Ruimerman, G. H. van Lenthe, and J. D. Janssen. Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. *Nature* 405:704–706, 2000.
7. Cf., C. Estrada, A. C. Paz, L. E. López, “Ingeniería de tejido óseo: consideraciones básicas”, *Revista EIA*, 5 (2006) 93-100.
8. Chakraborty, M., S. Jain, and V. Rani. Nanotechnology: emerging tool for diagnostics and therapeutics. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165:1178–1187, 2011.
9. Ahamed, M., M. S. AlSalhi, and M. K. J. Siddiqui. Silver nanoparticle applications and human health. *Clin. Chim. Acta* 411:1841–1848, 2010.
10. Choi, W. I., J. Kim, S. U. Heo, Y. Y. Jeong, Y. H. Kim, and G. Tae. The effect of mechanical properties of iron oxide nanoparticle-loaded functional nano-carrier on tumor targeting and imaging. *J. Controlled Release* 162:267–275, 2012.
11. Cartmell SH, Keramane A, Kirkham GR, Verschueren SB, Magnay JL, El Haj AJ. Use of magnetic particles to apply mechanical forces for bone tissue engineering purposes. *J. Phys.* 17, 77–80 (2005).
12. Kopf J, Petersen A, Duda GN, Knaus P. BMP2 and mechanical loading cooperatively regulate immediate early signalling events in the BMP pathway. *BMC Biol.* 10, 37 (2012)
13. Kanczler JM, Sura HS, Magnay J et al. Controlled differentiation of human bone marrow stromal cells using magnetic nanoparticle technology. *Tissue Eng. Part A* 16, 3241–3250 (2010)
14. Kim IS, Song YM, Cho TH et al. Synergistic action of static stretching and BMP-2 stimulation in the osteoblast differentiation of C2C12 myoblasts. *J Biomech* 2009;42:2721–2727.
15. Griffin XL, Costello I, Costa ML. The role of low intensity pulsed ultrasound therapy in the management of acute fractures: A systematic review. *J Trauma* 2008;65:1446–1452
16. Wimpenny I, Markides H, El Haj AJ. Orthopaedic applications of nanoparticle- based stem cell therapies. *Stem Cell Res Ther* 2012;3:13.
17. Cartmell SH, Dobson J, Verschueren SB et al. Development of magnetic particle techniques for long-term culture of bone cells with intermittent mechanical activation. *IEEE Trans Nanobioscience* 2002;1:92–97.
18. Hughes S, McBain S, Dobson J et al. Selective activation of mechanosensitive ion channels using magnetic particles. *J R Soc Interface* 2008;5: 855–863
19. Kirby GTS, White LJ, Rahman CV et al. PLGA-based microparticles for the sustained release of BMP-2. *Polymers* 2011;3:571–586.
20. Henstock JR, Rotherham M, Rose JB et al. Cyclic hydrostatic pressure stimulates enhanced bone development in the foetal chick femur in vitro. *Bone* 2013;53:468–477.

21. Smith EL, Kanczler JM, Roberts CA et al. Developmental cues for bone formation from parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein in an ex vivo organotypic culture system of embryonic chick femora. *Tissue Eng Part C Methods* 2012;18:984–994.
22. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 1951;88:49–92.
23. Barbetta A, Bedini R, Pecci R et al. Role of x-ray microtomography in tissue engineering. *Ann Ist Super Sanita* 2012;48:10–18.
24. Nowlan NC, Sharpe J, Roddy KA et al. Mechanobiology of embryonic skeletal development: Insights from animal models. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2010;90:203–213.
25. Ozcivici E, Luu YK, Adler B et al. Mechanical signals as anabolic agents in bone. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:50–59.
26. Hughes S, McBain S, Dobson J et al. Selective activation of mechanosensitive ion channels using magnetic particles. *J R Soc Interface* 2008;5: 855–863.
27. Kopf J, Petersen A, Duda GN et al. BMP2 and mechanical loading cooperatively regulate immediate early signalling events in the BMP pathway. *BMC Biol* 2012;10:37.
28. McKay WF, Peckham SM, Badura JM. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphog
- 29 Kim IS, Song YM, Cho TH et al. Synergistic action of static stretching and BMP-2 stimulation in the osteoblast differentiation of C2C12 myoblasts. *J Biomech* 2009;42:2721–2727.
- etic protein-2 (INFUSE Bone Graft). *Int Orthop* 2007;31:729–734.
30. Gong C, Qi T, Wei X et al. Thermosensitive polymeric hydrogels as drug delivery systems. *Curr Med Chem* 2013;20:79–94.
- 31.. Johnson TD, Christman KL. Injectable hydrogel therapies and their delivery strategies for treating myocardial infarction. *Expert Opin Drug Deliv* 2013;10:59–72.
- 32.Kanczler JM, Ginty PJ, White L et al. The effect of the delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenic protein-2 to osteoprogenitor cell populations on bone formation. *Biomaterials* 2010;31: 1242–1250.
33. Johnson TD, Christman KL. Injectable hydrogel therapies and their delivery strategies for treating myocardial infarction. *Expert Opin Drug Deliv* 2013;10:59–72.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.