



TÍTULO

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL PARCIAL DE UN PÉPTIDO BIOMIMÉTICO RGD CON DOMINIO DE AFINIDAD POR EL COLÁGENO I PARA FINES DE REGENERACIÓN ÓSEA

AUTOR

Raúl Fernández Barranco

Tutores	Esta edición electrónica ha sido realizada en 2013
Curso	Rick Visser y Pilar M ^a Arrabal García
ISBN	Máster en Biotecnología Avanzada
©	978-84-7993-889-5
©	Raúl Fernández Barranco
Fecha documento	De esta edición: Universidad Internacional de Andalucía
	Enero de 2013



Reconocimiento-No comercial-Sin obras derivadas

Usted es libre de:

- Copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra.

Bajo las condiciones siguientes:

- **Reconocimiento.** Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciador (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o apoyan el uso que hace de su obra).
 - **No comercial.** No puede utilizar esta obra para fines comerciales.
 - **Sin obras derivadas.** No se puede alterar, transformar o generar una obra derivada a partir de esta obra.
-
- *Al reutilizar o distribuir la obra, tiene que dejar bien claro los términos de la licencia de esta obra.*
 - *Alguna de estas condiciones puede no aplicarse si se obtiene el permiso del titular de los derechos de autor.*
 - *Nada en esta licencia menoscaba o restringe los derechos morales del autor.*



**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL PARCIAL DE UN PÉPTIDO
BIOMIMÉTICO RGD CON DOMINIO DE AFINIDAD POR EL
COLÁGENO I PARA FINES DE REGENERACIÓN ÓSEA**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER
MÁSTER DE BIOTECNOLOGÍA AVANZADA
*CURSO 2011-12***

RAÚL FERNÁNDEZ BARRANCO

ENERO 2013

Proyecto desarrollado en el Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga, en colaboración con el Centro Andaluz de Biotecnología y Nanomedicina – BIONAND.

Parte de este trabajo ha sido incluido en el siguiente artículo: Visser R, Arrabal PM, Santos-Ruiz L, Becerra J, Fernández-Barranco R, Cifuentes M. A collagen-targeted RGD biomimetic peptide to promote osteogenesis. Tiss Eng (en evaluación).

El péptido CBD-RGD descrito en este trabajo es objeto de protección por la solicitud de patente P201230017.

Tutores:

Dr. Rick Visser

Dra. Pilar M^a Arrabal García

Fdo: Rick Visser

Fdo: Pilar M^a Arrabal García

HISTOLOGÍA DEL TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo es un tipo especializado de tejido conectivo de gran dureza y consistencia, que se caracteriza por estar formado por células rodeadas de una sustancia denominada matriz ósea o matriz extracelular (ECM), donde abunda gran cantidad de fibras proteicas y sales minerales. La parte orgánica de la ECM está formada por una arquitectura ordenada de fibras de colágeno tipo I principalmente, aunque también podemos encontrar colágeno tipo V y, en menor medida, colágeno tipo II, XI y XIII. Solo el 10% de las proteínas son no-colagénicas, siendo éstas proteoglicanos, osteocalcina, osteonectina, osteopontina, sialoproteína, fibronectina, etc. La parte mineral de la matriz está compuesta por fosfato de calcio en forma de hidroxapatita (HA), que se deposita sobre los componentes orgánicos de la matriz.

Las células osteoprogenitoras derivan de las células madre mesenquimales (MSC), las cuales poseen su reservorio principalmente en la médula ósea. Estas células osteoprogenitoras pueden diferenciarse en osteoblastos en respuesta a los estímulos adecuados. Los osteoblastos mantienen la capacidad de dividirse y son los encargados de sintetizar activamente los componentes orgánicos de la ECM y enzimas encargadas de la mineralización de la misma. Una vez quedan envueltos por dicha matriz madura mineralizada, pasan a denominarse osteocitos, disminuyendo su actividad sintetizadora y pasando a ejercer el control metabólico de la matriz. El tercer tipo celular es el osteoclasto, cuya génesis deriva de la línea hematopoyética. Su función es la reabsorción de la matriz del hueso, dando lugar a una desmineralización por bajada de pH y una posterior degradación de los componentes orgánicos mediante enzimas digestivas (Ross MH y Pawlina W, 2007). Estas células están finamente reguladas para mantener el equilibrio dinámico (también llamado remodelado óseo), y que permite la renovación de un 5-15% del hueso al año en condiciones normales (Fernandez-Tresguerres *et al.* 2006).

REGENERACIÓN ÓSEA

La regeneración ósea u osteogénesis es el proceso de formación de tejido óseo nuevo, y con ello se consigue la *restitutio ad integrum* (restauración de condiciones originales) del tejido tras un trauma, a diferencia de la reparación, donde el tejido que se forma es un tejido cicatricial, con características diferentes al original. En este sentido, y a día de hoy, el tejido óseo es el único tejido del organismo, a excepción del embrionario, que se restituye totalmente tras una lesión (Fernandez-Tresguerres *et al.*, 2006).

La osteogénesis implica una respuesta en la que están involucrados los vasos sanguíneos, las células y la matriz extracelular. Tras un trauma o fractura, se produce una respuesta inflamatoria y un hematoma inicial. Las células del coágulo liberan interleuquinas, factores de crecimiento y productos de genes homeóticos, originando la migración de linfocitos, macrófagos, precursores de osteoclastos y células madre mesenquimales (MSC). Estas señales moleculares perfectamente coordinadas, promueven la diferenciación de las MSC hacia células endoteliales, fibroblastos, condroblastos y osteoblastos, que darán origen a un nuevo tejido estructuralmente en forma y tamaño similar al tejido pretrauma (Einhorn, 1998). Normalmente, en personas sanas, el proceso completo puede variar entre seis y doce semanas de duración, dependiendo del grado del trauma y del hueso a regenerar.

Actualmente existen numerosos estudios que ponen de manifiesto el enorme coste económico y social que conllevan los defectos óseos para las diferentes administraciones médicas (Polinder S *et al.*, 2005; Finner HW *et al.*, 2003). Las lesiones o defectos en el tejido óseo se han tratado tradicionalmente usando métodos de fijación que ayudan a estabilizar la fractura, aunque en ocasiones resultan en la formación de hueso inestable con una alta posibilidad de refractura. Sin embargo, fracturas graves, amplias resecciones de hueso o casos de no unión de fractura (muy comunes en fracturas de cadera en personas mayores) requieren tratamientos más sofisticados. En estos casos el autoinjerto ha sido la técnica más utilizada. No obstante esta técnica conlleva procesos de curación muy largos que pueden derivar en complicaciones que afecten negativamente al proceso de regeneración. Alternativamente, aloinjertos, huesos procedentes de bancos de huesos y/o el uso de biomateriales que sustituyan al tejido dañado, han sido usados como fuente para la realización de este tipo de técnicas.

Sin embargo, existe una clara desventaja en la utilización de estos medios debido a la escasez de donantes, dificultades para la extracción, problemas de rechazo de trasplantes o la incapacidad de los materiales para remodelarse y ejercer funciones fisiológicas (da Paz *et al.*, 2007). Así, la necesidad de encontrar alternativas más efectivas es hoy en día, una de las principales vías de investigación a nivel científico-médico.

INGENIERÍA TISULAR

En las últimas dos décadas la ingeniería de tejidos es una tecnología que persigue mediante la combinación de células, biomateriales, y factores estimuladores apropiados bajo unas condiciones fisicoquímicas adecuadas, la reparación o regeneración ósea.

Biomateriales: colágeno

Hasta hoy, numerosos materiales inorgánicos (titanio), orgánicos (matriz de hueso desmineralizada) y sintéticos (polímeros de ácido láctico) han sido usados y estudiados en diferentes aproximaciones en la ingeniería de tejidos. Sin embargo, y aunque ninguno de ellos se ha considerado el ideal, sí requieren unas características básicas comunes: ser biocompatibles, biodegradables, porosos, poseer unas propiedades mecánicas apropiadas y ser osteoconductores y, a ser posible, osteoinductores.

El colágeno tipo I es la proteína mayoritaria de la matriz ósea en mamíferos, lo que confiere a este biomaterial una alta biocompatibilidad y biodegradabilidad y muy poca inmunogenicidad. A pesar de su falta de propiedades biomecánicas, es el biomaterial más ampliamente usado en clínica (Lee, Singla *et al.*, 2001). Las fibras de colágeno, gracias a su osteoconductividad, proveen un microambiente que favorece la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular (Heino, 2007; Kleinman, *et al.*, 1981; Liotta *et al.*, 1978). Además, esponjas de colágeno tipo I (ACS) han sido usadas en combinación con factores de crecimiento como las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs) con resultados satisfactorios (Valentin-Opran A *et al.*, 2002).

Factores de crecimiento

Aunque existen numerosos factores implicados en los procesos de regeneración ósea, destacan sobremanera las proteínas morfogenéticas de hueso cuya capacidad osteoinductora es muy potente y ha sido bien descrita (Huang, Ren et al. 2010) (son capaces de inducir la formación de hueso ectópico). Así, algunos factores de esta familia (BMP-2 y BMP-7) ya han sido aprobados para su uso en clínica por la FDA y la EMA (Govender *et al.*, 2002). Sin embargo, su uso aún reporta posibles complicaciones, como la producción endógena de anticuerpos anti-BMP del propio paciente (Granjeiro *et al.*, 2005), la pérdida de eficacia a lo largo del tiempo y las elevadas dosis que se necesita suministrar, lo que conlleva un alto coste económico (Garrison *et al.*, 2007). Esto determina que la comunidad científica esté tratando de desarrollar mejoras de la combinación ACS-BMP, con el fin de implementar su seguridad y eficiencia, a la par que reducir el coste económico de estos tratamientos.

Biomimetización

La interacción célula-biomaterial es uno de los procesos más importantes, pero no por ello mejor conocido, durante la regeneración ósea (Zouani *et al.*, 2010). Las posibilidades de exponer motivos moleculares que faciliten la adhesión/diferenciación/proliferación celular en los diferentes biomateriales es un campo que está dando muy buenos resultados. La funcionalización de biomateriales o *biomimetización* es una de las herramientas más usadas para potenciar y controlar las interacciones célula-biomaterial (Burg *et al.*, 2000; Ma, 2008). Inicialmente, estos materiales eran recubiertos con proteínas de adhesión celular como la fibronectina o la laminina (Hersel *et al.*, 2003). El uso de proteínas, sin embargo, supone algunos inconvenientes en aplicaciones médicas, como la respuesta inmune por la presencia de proteínas aisladas de otros organismos y la degradación a largo tiempo de la proteína. Además la inespecificidad de anclaje de la proteína a la superficie y la diversidad de posibles orientaciones de los diferentes motivos también conlleva numerosos problemas (Elbert *et al.*, 2001).

Estos problemas pueden ser sobrellevados con el uso de pequeños péptidos inmovilizados. Ello permite un mayor control de las condiciones pues son menos

sensibles a temperatura, pH, etc. y permiten un fácil manejo, amén de reducir los costes de producción. Debido a su pequeño tamaño también puede aumentarse la densidad de los péptidos en la superficie, lo que contrarresta la menor eficacia de éstos con respecto a las proteínas nativas (Hersel *et al.*, 2003). La matriz extracelular presenta numerosos motivos de reconocimiento celular mientras que los péptidos, al presentar generalmente solo uno, permiten un mejor direccionamiento hacia el receptor de interés.

La adhesión celular a los componentes de la matriz extracelular se da principalmente a través de receptores de adhesión, entre los cuales se encuentran las integrinas, una familia ampliamente expresada de receptores transmembrana. Heterodímeros formados por la unión no covalente de la subunidad α y la subunidad β se unen a secuencias específicas de aminoácidos, como la secuencia arginina-glicina-aspartico (RGD) (Pierschbacher *et al.*, 1984). Los osteoblastos y las células progenitoras expresan un gran número de integrinas que unen numerosos componentes de la matriz extracelular. Las interacciones con las proteínas de la membrana mediadas por integrinas son un factor clave en la actividad osteoblástica (García *et al.*, 2005). De hecho, Damsky y colaboradores demostraron mediante el bloqueo con anticuerpos en cultivos primarios de osteoblastos, que las interacciones mediadas por integrinas, y en concreto el heterodímero $\alpha 5\beta 1$ en su unión a fibronectina, es esencial para la supervivencia, proliferación, específica expresión de genes y mineralización de la matriz de los osteoblastos (Damsky *et al.*, 1996). El bloqueo de la adhesión del colágeno tipo I a la integrina $\alpha 2\beta 1$, interfiere en la actividad de factores transcripcionales como Runx2/Cbfa1, genes específicos de expresión osteoblástica y mineralización de la matriz (Harris *et al.* 1999; Fujisawa *et al.*, 2000).

La secuencia RGD derivada de fibronectina es, de lejos, la más efectiva y más ampliamente utilizada para estimular la adhesión celular en superficies sintéticas, aunque no la única. Esta secuencia está presente en numerosas proteínas de la ECM como la vitronectina, laminina, osteopontina, colágeno tipo I, etc. Aunque diversos autores aún recelan de las posibilidades de este tripéptido en los procesos osteogénicos (Bellis, 2011), algunos grupos han reportado que potencia la osteointegración de implantes de titanio funcionalizados con este péptido (Germanier *et al.*, 2006; Petrie *et al.*, 2008). Además, el uso combinado de factores como BMP-2 o derivados del mismo, en conjunto con superficies mimetizadas con RGD, han demostrado una potenciación

de la proliferación y de la expresión de marcadores osteogénicos en células mesenquimales de humanos (Moore, Lin et al. 2011); así como la adición de RGD lineal promueve la diferenciación osteogénica y compromete a líneas celulares preosteoblásticas. Una unión fuerte y estable del RGD a la superficie es esencial para que pueda desarrollar su actividad biológica.

Muchos de los problemas asociados a este tipo de aproximaciones vienen dados por la falta de especificidad del péptido y/o proteína a la superficie del biomaterial, lo que obliga a llevar a cabo el proceso de funcionalización mediante simple adsorción (poco controlable y poco eficiente) o empleando una a varias reacciones químicas para unir los péptidos de forma covalente al biomaterial.

Muchas proteínas poseen dominios que confieren una afinidad específica al colágeno. En organismos superiores casi todos estos dominios están asociados a proteínas del plasma sanguíneo como la fibronectina, la trombospondina o el factor de von Willebrand (vWF). Numerosas citoquinas han sido producidas como proteínas de fusión con algunas de estas secuencias, aumentando su afinidad por el colágeno sin perder actividad biológica. El dominio de unión a colágeno (CBD) derivado del vWF, es un decapeptido (WREPSFMALS) que ha sido usado con éxito en la fusión de diferentes proteínas como los factores de crecimiento TGF- β , FGF-2 o BMP-2 (Tuan *et al.*, 1996; Andrades *et al.*, 2001; Visser *et al.*, 2009). Así se consigue una funcionalización simple donde la proteína mantiene sus propiedades biológicas y presenta un aumento de su afinidad al colágeno tipo I.

Aunque el colágeno no es el único autorizado para su uso en clínica, su biocompatibilidad y osteoconductividad, además de la posibilidad de poder funcionalizarlo con péptidos que favorezcan la adhesión y diferenciación celular, hacen de este biomaterial un punto de especial interés. Así, en este proyecto se pretende caracterizar *in vitro* un péptido sintético, formado por el dominio de unión a colágeno del vWF y la secuencia RGD derivada de la fibronectina (CBD-RGD; figura 1). Este péptido pretende permitir la funcionalización de manera sencilla y eficiente de esponjas absorbibles de colágeno tipo I bovino (ACSs), frecuentemente empleadas como material osteoconductor en cirugía ortopédica, con señales RGD para favorecer la adhesión y/o diferenciación de células osteoprogenitoras.

Este proyecto se basa en estudios anteriores que demuestran que este péptido posee la capacidad de incrementar la diferenciación osteogénica de MSC de rata *in vitro* y de inducir la formación de hueso ectópico en ratas cuando se coadministra con una dosis subfuncional de BMP-2 en ACSs implantadas intramuscularmente (resultados no publicados).

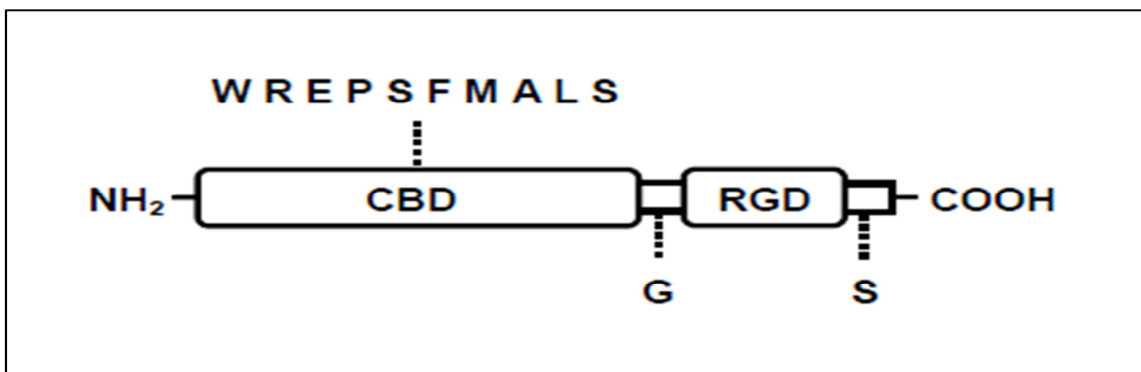


Figura 1. Péptido sintético (CBD-RGD), formado por el dominio de unión a colágeno del vWF y la secuencia RGD derivada de la fibronectina.

OBJETIVOS

El proyecto que aquí se presenta propone la caracterización parcial del péptido CBD-RGD a través de dos subobjetivos :

- Determinación de la capacidad de unión del péptido a ACSs mediante técnicas de espectrofotometría, marcaje con biotina y detección por dot-blot.

- Determinación de la actividad biológica *in vitro* sobre cultivos de células mesenquimales de rata (MSC), que juegan un papel fundamental en la regeneración ósea, mediante marcaje fluorescente para la detección de beta1-integrina por microscopia confocal.

RESULTADOS

1.1 Biotinilación, purificación y cuantificación de CBD-RGD-biotina.

El péptido CBD-RGD fue biotinilado covalentemente y purificado en columna de desalado. La concentración de péptido y la relación biotina:CBD-RGD fueron calculados para cada una de las 15 fracciones de elución (tabla 1, datos de las fracciones 1 a 7 no mostrados).

Las fracciones de elución mostraron un primer pico de concentración de péptido entre las muestras 9 y 11, bajando un poco en la muestra 12 y volviendo a subir hasta la muestra 15. En cuanto a las ratios biotina:CBD-RGD, se observaron que se mantenían por debajo de la unidad entre las muestras 9-11, mientras que la superaban en las muestras más tardías. La alta concentración de péptido y los altos niveles de ratio son debidos a la liberación de moléculas de péptido y biotina libres que no han reaccionado.

Las fracciones de elución 9,10 y 11 presentaban valores adecuados, pero solo se escogieron la 9 y la 10, descartando la 11 por seguridad al no ser las fracciones constantes en su totalidad. Las fracciones de elución 9 y 10 fueron unificadas (1:1) presentando una concentración de péptido adecuada (180µg/ml) y una relación aceptable biotina:CBD-RGD, en torno al 70%.

Fracción de elución	Ratio biotina:CDB-RGD	Concentración µg/ml
8	0	34,92358
9	0,81	186,65386
10	0,66	260,57374
11	0,96	240,14851
12	1,12	234,31273
13	1,33	316,98628
14	1,22	359,782
15	1,08	417,16717

Tabla 1. Datos de purificación, y determinación de la cantidad de CBD-RGD-biotina. La secuencia CBD-RGD sólo posee una diana para ser biotinilada (la amina primaria N-terminal), por lo que se generaría un CBD-RGD-biotina. El hecho de que la ratio este por debajo de uno es significativo de que la reacción y la purificación han sido satisfactorias.

1.2 Saturación de ACSs con CBD-RGD

El lavado de las ACSs cargadas con 1 µg de CBD-RGD, resultó en una liberación secuencial de moléculas no retenidas en la esponja en los primeros 30 µl de volumen de lavado (figura 2A). La cantidad total de péptido que se pierde tras los lavados es de 0.224 µg, por lo tanto una media de 0.776 µg (458 pmol) fueron retenidos en la esponja. Referido al volumen de la esponja, la cantidad de péptido es equivalente a ~23 µM.

Además, el lavado de las ACSs cargadas con 5 µg de CBD-RGD, resultó en una liberación secuencial de moléculas no retenidas en la esponja en los primeros 75 µl de volumen de lavado (figura 2B). En este caso la cantidad total de péptido perdido tras los sucesivos lavados fue de 4.044 µg, indicando que la esponja puede retener aproximadamente 0.956 µg de CBD-RGD (564 pmol). Referido al volumen de la esponja, la cantidad de péptido es equivalente a ~29 µM.

Alternativamente, las ACSs fueron cargadas con 1 µg y 5 µg de CBD-RGD biotinilado (figura 3). De esta manera, y en concordancia con los resultados arriba descritos, tanto el péptido lavado en cada fracción, como el retenido en la esponja muestran un comportamiento similar al CBD-RGD sin biotinar. En las ACSs cargadas con 1 µg de péptido biotinilado se observó una liberación en el primer lavado, siendo casi inexistentes a partir del segundo lavado, coincidiendo con la curva de liberación antes mostrada para el CBD-RGD. Así mismo las ACSs cargadas con 5 µg de CBD-RGD biotinilado mostraron el mismo patrón de liberación que el péptido sin biotinar.

ACSs cargadas con ambas cantidades de CBD-RGD biotinilado mostraron abundante señal de bioluminiscencia (figura 3), siendo más evidente en las ACSs cargadas con 5 µg, corroborando los datos obtenidos anteriormente.

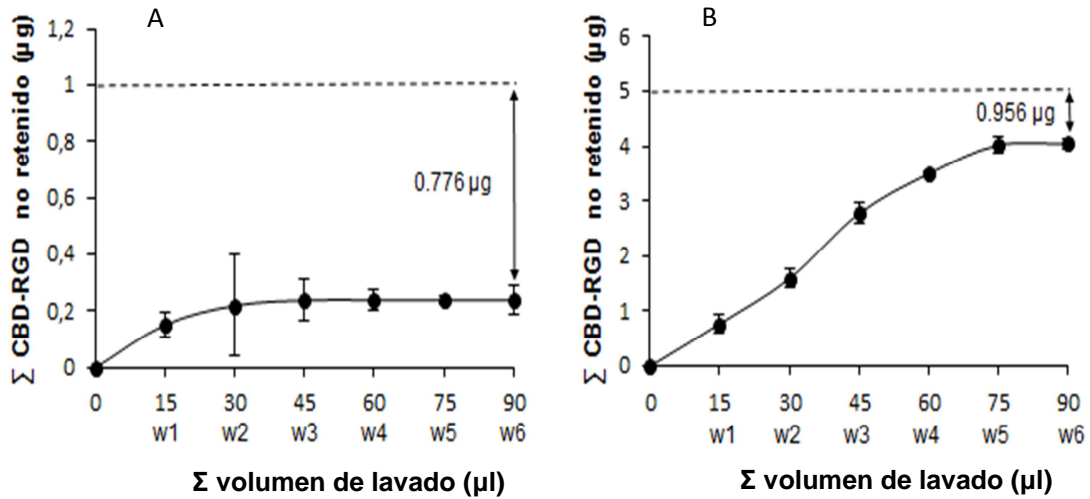


Figura 2. Unión de péptido CBD-RGD a esponjas de colágeno. 1μg (A) y 5μg (B). La grafica representa el total de péptido (media ± desviación estándar) cuantificados espectrofotométricamente a 205nm, recuperados de las esponjas en cada lavado. N=4 para cada condición.

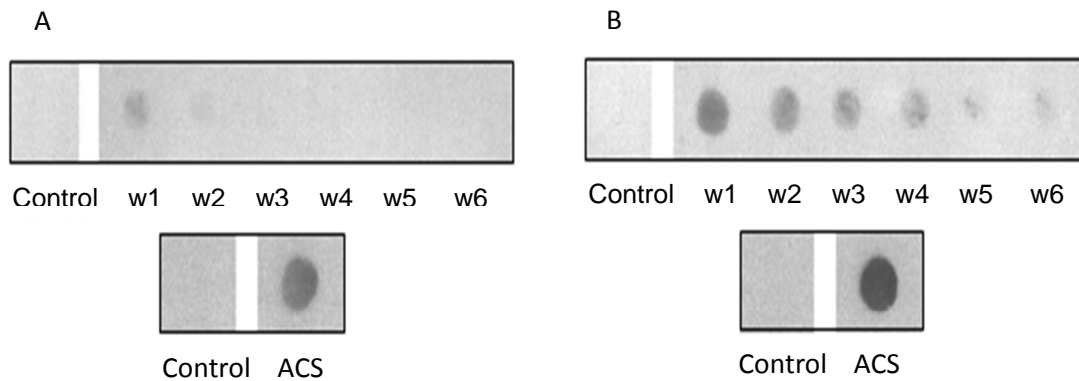


Figura 3. Unión de péptido CBD-RGD biotilado a esponjas de colágeno 1 μg (A) y 5 μg (B). Fracciones de lavado de 15 μl cada una. Controles negativos cargados con CBD-RGD no biotilado. N=3 para cada condición.

1.3 Inmunocitoquímica anti- β 1 integrina sobre MSC de rata

El cultivo de células MSC de rata en presencia del péptido CBD-RGD en forma soluble no favoreció ningún cambio drástico en la expresión de β 1 integrina en ninguno de los casos a estudio (figura 4). Sin embargo, se observaron sutiles diferencias en cuanto a la expresión de β 1 integrina a lo largo del tiempo, presentando una menor intensidad de señal a tiempos cortos que a tiempos largos. En cuanto a las diferentes concentraciones de péptido a ensayo, no se han observado cambios apreciables. No obstante es preciso apuntar que parece existir un aumento de la expresión de β 1 integrina a concentraciones de $1\mu\text{M}$ en tiempos cortos y largos con respecto a las demás concentraciones usadas, pero no así a tiempos intermedios donde parece producirse cierta inhibición (figura 4H).

Las MSC fueron monitorizadas *in vivo* durante todo el proceso, no reportando ningún cambio apreciable de morfología a reseñar (datos no mostrados).

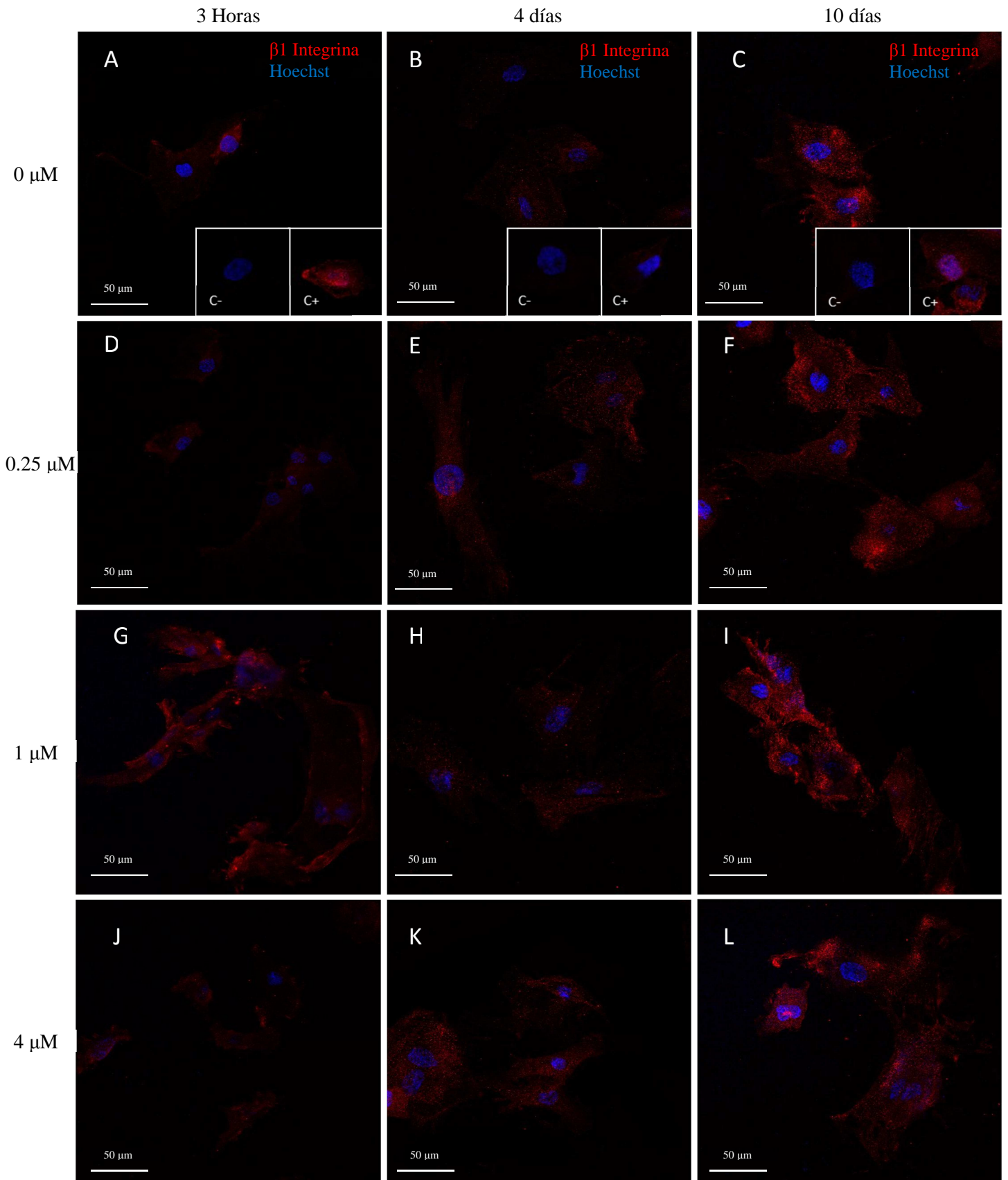


Figura 4. Inmunocitoquímica anti $\beta 1$ integrina de células MSCs cultivadas en presencia de diferentes concentraciones del péptido CBD-RGD.

DISCUSIÓN

Desde su descubrimiento en 1965 (Urist MR. *et al.*, 1965), las BMPs han constituido un prometedor futuro en el campo de la ingeniería tisular como uno de los componentes principales en los productos biomédicos de aplicación en clínica, muy especialmente en la regeneración ósea y cartilaginosa. Por otra parte el colágeno es la proteína más abundante de la ECM en animales, y es el único transportador aprobado para ser usado en combinación con BMP-2 y BMP-7 para la reparación de hueso en clínica. La literatura muestra numerosos estudios tratando de funcionalizar biomateriales directamente con la proteína completa (Bessa PC. *et al.*, 2008), lo cual conlleva en muchos casos a la pérdida de actividad biológica o la necesidad de usar dosis muy superiores a las fisiológicas.

Las BMPs poseen efectos pleiotrópicos en muchos otros tejidos además del hueso y, debido a su poca afinidad natural al colágeno, debe ser usado a altas concentraciones, lo cual puede causar efectos adversos en el paciente (Itoh K. *et al.*, 2001; Sciadini *et al.*, 200). Con el objetivo de reducir la cantidad de BMP-2 usada para promover la ontogénesis *in vivo*, se diseñó una proteína BMP-2 recombinante con un dominio de unión a colágeno (Visser *et al.*, 2009). Así se permitía una fácil funcionalización de esponjas de colágeno tipo I (ACSs) frecuentemente usadas en clínica como material osteoconductor. A pesar de todo, la producción de proteína recombinante rhBMP2-CBD sigue siendo a día de hoy un proceso caro y costoso.

En los últimos años, han emergido superficies biomiméticas incorporando motivos de naturaleza peptídica de la matriz extracelular como una estrategia prometedora en el campo de los biomateriales de aplicación en la ingeniería de tejidos, siendo el péptido de unión a integrina RGD el más estudiado (Garcia AJ. *et al.*, 2005).

Tratando de superar los posibles obstáculos e inconvenientes antes mencionados, en este proyecto se ha diseñado un péptido sintético biomimético de unión a colágeno CBD-RGD. Aunque los biopéptidos pueden presentar limitaciones a la hora de comparar su actividad biológica con respecto a la proteína nativa, el CBD-RGD supone una alternativa al uso de BMPs y/o biomateriales mimetizados con proteínas de la ECM

como la fibronectina. Además del consiguiente ahorro en costes, ya que estas proteínas son muy caras y costosas de producir, podría reducirse la cantidad de una proteína grande y potencialmente inmunogénica, como es la BMP-2, por un péptido pequeño y con poca inmunogenicidad, lo que podría incrementar la bioseguridad en futuras aproximaciones clínicas. La propiedad de alta afinidad del péptido por el colágeno, supone la fácil funcionalización de ACSs, superando la necesidad de usar agentes químicos durante el proceso de unión del RGD al colágeno, evitando la manipulación de las ACSs previas a su implantación en el paciente, en los casos de un futuro uso clínico.

El RGD por sí solo no es capaz de activar a los receptores de las integrinas celulares, sino que requiere de moléculas espaciadoras adyacentes que realicen la función de brazo entre la superficie y la secuencia RGD (Shin H. *et al.*, 2003). De ahí, que el dominio CBD del péptido confiere una doble característica al RGD, ya que no solo permite la unión a fibras de colágeno, sino que también hace de brazo espaciador que permite hacer accesible el RGD al sitio de unión de la integrina.

La afinidad del CBD-RGD a las ACSs, quedó demostrada mediante la saturación de las mismas con 1 y 5 μg de péptido. Tras los sucesivos lavados, las ACSs cargadas con 1 μg mostraron la capacidad de retener 776 ng de CBD-RGD; sin embargo, un aumento de la presión del péptido en las mismas, no resultó en un aumento sustancial de la cantidad de péptido retenido. Así, cuando las ACSs fueron cargadas con 5 μg de CBD-RGD y tras los sucesivos lavados, la cantidad de péptido que quedaba retenido en la esponja era de 956 ng de media. Por tanto se puede inferir que en torno a 950 ng es un valor cercano al límite de saturación de estas esponjas. Los ensayos de dot-blot en las ACSs confirmaron, por un lado la presencia de CBD-RGD biotinilado retenido en la esponja tras los sucesivos lavados, y por otra parte, que la cantidad de péptido liberada en cada lavado tanto para 1 μg como para 5 μg es muy similar al observado en las curvas de liberación del péptido sin biotinilar. Todo esto tomado en conjunto demuestra la fiabilidad y reproducibilidad del péptido a la hora de unirse a las ACSs, y la posibilidad de marcar el CBD-RGD con una molécula de biotina sin afectar a su afinidad por las esponjas de colágeno. Además, debido al pequeño peso molecular del péptido (1.69 KDa) la cantidad retenida en las ACSs suponen una densidad de

~2600 pmol/cm², lo cual supone entre uno y dos órdenes de magnitud superiores a la densidad necesaria para inducir la osteogénesis, descrito en la literatura (Paola B. *et al.*, 2012).

A pesar de que numerosos estudios han demostrado las bondades del motivo RGD en los procesos de osteogénesis (Zimmerman *et al.*, 2000; Takeuchi *et al.*, 1997), en este estudio no se han encontrado diferencias apreciables del efecto *in vitro* del péptido CBD-RGD en cultivo de células MSCs de rata, medido en términos de expresión de $\beta 1$ integrina. La cantidad y/o distribución de las moléculas de $\beta 1$ integrina parece no verse alterada en ninguno de los casos tratados durante el ensayo. Esto puede explicarse debido a que las MSCs no reaccionen frente a la presencia del péptido en solución (lo cual no se corresponde con resultados previos obtenidos en el seno del grupo, que ponen de manifiesto que el péptido soluble incrementa la expresión del marcador de osteogénesis fosfatasa alcalina y la mineralización de la ECM por parte de estas células), y/o bien, que la vía de señalización mediada por la interacción RGD-integrina no modifique los patrones de expresión de la subunidad $\beta 1$ de la integrina. En este último caso, futuros estudios de expresión de marcadores tempranos de diferenciación osteogénica como el factor de transcripción RUNX2, podrían confirmar si el CBD-RGD en solución es capaz de activar por sí solo la vía osteogénica en células MSCs.

A su vez, estudios de expresión diferencial de otras proteínas implicadas en los procesos de adhesión y/o diferenciación celular como la vinculina o la talina podrían arrojar más luz al entendimiento de los procesos de diferenciación osteogénica mediados por CBD-RGD.

CONCLUSIÓN

Este estudio describe el diseño y la caracterización parcial de un péptido biomimético de unión a colágeno, para una fácil funcionalización de esponjas absorbible de colágeno tipo I, como una alternativa de biomaterial osteoconductor y osteoinductor para su uso en aproximaciones ortopédicas.

APÉNDICE 1: MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Células, péptido de fusión, ACSs, anticuerpos y reactivos.

Las células MSC (provenientes de médula ósea de ratas Fisher 344) fueron descongeladas en pase 1 y sembradas en monocapa en frascos de cultivo T-75, en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% v/v penicilina/estreptomicina, 0.5% v/v anfotericina y 1.25% v/v L-glutamina. El medio se cambió tras 24 horas para eliminar posibles restos de DMSO y células no adheridas. Las células fueron usadas para los ensayos *in vitro* en pase 4.

Las células de osteosarcoma U2-Os, empleadas como control positivo, fueron descongeladas y sembradas en frascos de cultivo T-75, en medio McCoy's 5a (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (FBS), 1% v/v penicilina/estreptomicina, 0.5% v/v anfotericina y 0.75% v/v de L-glutamina. El medio se cambió tras 24 horas para eliminar posibles restos de DMSO y células no adheridas.

Ambos tipos celulares fueron incubados a 37°C en una atmósfera con humedad y al 5% de CO₂.

El péptido biomimético CBD-RGD (WREPSFMALSGRGDS) fue sintetizado por Peptide 2.0 (Chantilly, VA, USA) y suministrado liofilizado con una pureza del 98.5%. Fue reconstituido en tampón PB 25mM, pH 6.2 a una concentración de 1 mg/ml.

El anticuerpo anti-β1-Integrina EP1041Y monoclonal desarrollado en conejo fue suministrado por Abcam, El anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de conejo desarrollado en ratón unido al fluorocromo Alexa 594, fue suministrado por Invitrogen Molecular Probes.

Las esponjas de colágeno absorbible ACSs fueron cedidas amablemente por el Dr. Marcel E. Nimni; (US patent 5374539), y cortadas en discos de 5 mm de diámetro y 1 mm de altura.

El reactivo de biotilación (EZ-Link Sulfo-NHS-biotin, 21326), las columnas de purificación (Polyacrylamide Desalting Columns, 43426) y el kit de cuantificación de biotina (Pierce Biotin Quantitation Kit, 28005) fueron suministrados por Thermo scientific.

1.2 Biotilación del CBD-RGD

La adición de la biotina al extremo amino-terminal del péptido CBD-RGD se realizó empleando un kit comercial (EZ-Link Sulfo-NHS-biotin, Pierce), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, 190 µg de CBD-RGD fueron mezclados con el reactivo de biotilación y la reacción se dejó transcurrir durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Con el fin de separar las fracciones de péptidos no biotilados, péptidos biotilados y moléculas de biotina libres presentes en la mezcla de reacción, ésta se pasó por una columna de desalado de poliacrilamida. Una vez equilibrada la columna con tampón fosfato salino (PBS) se añadió todo el volumen de reacción sobre el lecho de la misma, recogándose una primera fracción de elución de volumen equivalente al de la mezcla de reacción. La cromatografía se realizó añadiendo volúmenes de 250 µl de PBS a la columna y recogiendo fracciones de elución del mismo volumen. Repitiendo esto secuencialmente, se obtuvieron 14 muestras de elución, de 250 µl cada una.

Para determinar en cuáles de las fracciones de elución se había recuperado el péptido y cuál era su concentración en estas fracciones, se monitorizó la lectura de la absorbancia a 205 nm de las muestras, empleando un espectrofotómetro de gota (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific). Para poder calcular la concentración de péptido en cada muestra, el valor de absorbancia de éstas fue interpolado en una recta patrón construida a partir de soluciones de concentraciones conocidas de CBD-RGD no biotilado.

Una vez identificadas las fracciones de elución que contenían el péptido, se determinó la relación biotina:CBD-RGD en ellas. Al poseer cada molécula de CBD-RGD una única diana para la unión de la biotina, una ratio biotina:CBD-RGD superior a 1 significaría la presencia de moléculas de biotina libres en las muestras, mientras que

una relación inferior a 1 nos indicaría la eficiencia de la reacción de biotilación. Esto se llevó a cabo usando un kit comercial (Pierce Biotin Quantitation Kit), basado en la competencia entre el cromóforo HABA y la biotina por unirse a avidina. El kit se empleó siguiendo las recomendaciones del fabricante para un ensayo en placas de 96 pocillos y la absorbancia a 492 nm en ellas se midió en un lector de microplacas. Una vez obtenidos los datos, la ratio biotina:CBD-RGD se calculó empleando la herramienta web que pone a disposición el fabricante (<http://www.piercenet.com/haba/index.cfm>).

1.3 Saturación de ACSs con CBD-RGD

Para determinar la cantidad de CBD-RGD que era retenida en las esponjas de colágeno (ACS), éstas fueron cargadas de la siguiente manera:

- 5 µg de CBD-RGD en 27.8µl de tampón PBS 0.1M pH 7.1 (n=4).
- 1 µg de CBD-RGD en 27.8µl de tampón PBS 0.1M pH 7.1 (n=4).
- 5 µg de CBD-RGD biotilado en 27.8µl de tampón PBS 0.1M pH 7.1 (n=4).
- 1 µg de CBD-RGD biotilado en 27.8µl de tampón PBS 0.1M pH 7.1 (n=4).
- 27.8 µl por esponja con una cantidad total de PBS 0.1M pH 7.1 (n=2) como control negativo.

Tras la carga, las ACSs se dejaron secar a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, se lavaron las esponjas 6 veces consecutivas con 15 µl de tampón PBS, recogiendo las distintas fracciones de lavado para su posterior análisis.

Las fracciones de lavado correspondientes a las ACSs cargadas con péptido no biotilado se emplearon para determinar la cantidad de CBD-RGD lavada en cada una de ellas mediante espectrofotometría a 205 nm, usando como blanco las fracciones de lavado de las esponjas control (cargadas con sólo PBS). Con estos datos se pudo construir una curva de liberación y determinar la cantidad de CBD-RGD que había quedado retenida en las ACSs.

Las fracciones de lavado correspondientes a ACSs cargadas con péptido biotilado y las propias ACSs lavadas se emplearon para poner de manifiesto la

presencia del CBD-RGD en ellas mediante la técnica del dot-blot. En el caso de las fracciones de lavado, se recortaron rectángulos de PVDF, que fueron activadas con metanol durante 10 segundos y equilibradas con PBS durante 10 minutos. Las membranas fueron colocadas sobre filtros de papel húmedos y posteriormente se colocaron las muestras (15 μ l cada una) sobre la membrana dejando que esta las absorbiese. Las membranas se lavaron con PBST (PBS + 0.05% Tween-20) durante 5 minutos y se bloquearon con PBST + 1% BSA durante una hora a temperatura ambiente. Tras dos lavados de 5 minutos con PBST, las membranas fueron incubadas con un polímero de estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano (Sigma 52438) en PBS-tween durante 1 hora, en oscuridad. Tras varios lavados con PBST y posteriormente con PBS, ambos en oscuridad, las membranas fueron incubadas con ECL Western blotting reagent (GE Healthcare) y expuestas durante 2 minutos a una película fotográfica.

En el caso de las ACSs lavadas, éstas fueron directamente incubadas en solución de bloqueo (PBST + 1% BSA) durante 1 hora y, posteriormente, tratadas de la misma manera que las membranas de PVDF para la detección quimioluminiscente de las moléculas de CBD-RGD biotiniladas.

1.4 Inmunocitoquímica anti- β 1 integrina sobre MSC de rata

Para determinar si la presencia del péptido CBD-RGD en el medio de cultivo era capaz de inducir la sobreexpresión de β 1 integrina en células mesenquimales de rata, se cultivaron éstas y células de osteosarcoma U-2 OS como control positivo del experimento. Las células fueron despegadas de los frascos T-75 con 1 ml de solución de tripsina y resuspendidas con 8 ml de medio completo. Se procedió al recuento de las células en una cámara de Neubauer, empleando el colorante de exclusión azul tripano para determinar también la viabilidad celular.

Se sembraron 25.000 células por pocillo (N=3 para cada condición) en placas de 24 pocillos (Nunc, Nunc), sobre cubreobjetos de plástico (ThermanoxTM, Termo Cientific) previamente colocados en el fondo de los pocillos. Las células se dejaron adherir a los cubreobjetos durante toda la noche y, al día siguiente, se les cambió el medio por DMEM + 2% FBS durante 1 hora. A continuación se volvió a cambiar el

medio por DMEM + 2% FBS y distintas concentraciones de CBD-RGD (4, 1, 0.25 y 0 μ M, respectivamente). La detección inmunocitoquímica de la β 1 integrina se realizó tras 3 horas, 4 días y 10 días de incubación en presencia del péptido.

Una vez alcanzados los tiempos de incubación deseados, se procedió a retirar el medio de cultivo y a lavar las células con PBS y PB a temperatura ambiente antes de fijarlos durante 10 minutos con paraformaldehído al 4% tamponado en PB pH 7.0. Una vez fijados se lavaron las células varias veces con PBS a 4°C y se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti- β 1-Integrina monoclonal desarrollado en conejo, diluido 1:200 en PBS-tween + 3% BSA, durante toda la noche en una cámara húmeda.

Tras retirar el anticuerpo primario al día siguiente, se lavaron abundantemente los cubreobjetos con PBS para, posteriormente, añadir el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con el fluorocromo Alexa 594.

Para la correcta visualización de los núcleos celulares, éstos fueron teñidos con Hoechst a una concentración final de 0.01 μ g/ml. Los cubreobjetos fueron montados con una gota de glicerol como medio de montaje, sobre otro cubreobjetos rectangular y sellados con laca de uñas. Su almacenamiento fue a 4°C en oscuridad hasta su observación en un microscopio confocal.

1.5 Soportes informáticos

Para el manejo y procesado de los datos obtenidos a lo largo del trabajo se utilizaron los siguientes programas y aplicaciones informáticas:

- Excel 2007 Paquete de Office. Se utilizó para la realización de rectas de calibrado y procesamiento estadístico.
- Image J. Se empleó para el procesado de imágenes de microscopía confocal.

APÉNDICE 2: BIBLIOGRAFÍA

Andrades, J. A., L. T. Wu, et al. (2001). "Engineering, expression, and renaturation of a collagen-targeted human bFGF fusion protein." *Growth Factors* 18(4): 261-275.

Becerra, J., J. A. Andrades, et al. (2001). "[Bone regeneration, cell therapy and tissue engineering]." *Med Clin (Barc)* 116(1): 23-34.

Bellis, S. L. (2011). "Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials." *Biomaterials* 32(18): 4205-4210.

Bessa, P. C., M. Casal, et al. (2008). "Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery)." *J Tissue Eng Regen Med* 2(2-3): 81-96.

Burg, K. J., S. Porter, et al. (2000). "Biomaterial developments for bone tissue engineering." *Biomaterials* 21(23): 2347-2359.

Caplan, A. I. (1991). "Mesenchymal stem cells." *J Orthop Res* 9(5): 641-650.

da Paz, A. C., F. J. Carod Artal, et al. (2007). "The function of proprioceptors in bone organization: a possible explanation for neurogenic heterotopic ossification in patients with neurological damage." *Med Hypotheses* 68(1): 67-73.

Einhorn, T. A. (1998). "The cell and molecular biology of fracture healing." *Clin Orthop Relat Res*(355 Suppl): S7-21.

Elbert, D. L. and J. A. Hubbell (2001). "Conjugate addition reactions combined with free-radical cross-linking for the design of materials for tissue engineering." *Biomacromolecules* 2(2): 430-441.

Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil, I., M. A. Alobera-Gracia, et al. (2006). "Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue." *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11(1): E47-51.

Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil, I., M. A. Alobera-Gracia, et al. (2006). "Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process." *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11(2): E151-157.

Garcia, A. J. and C. D. Reyes (2005). "Bio-adhesive surfaces to promote osteoblast differentiation and bone formation." *J Dent Res* 84(5): 407-413.

Garrison, K. R., S. Donell, et al. (2007). "Clinical effectiveness and cost-effectiveness of bone morphogenetic proteins in the non-healing of fractures and spinal fusion: a systematic review." *Health Technol Assess* 11(30): 1-150, iii-iv.

Germanier, Y., S. Tosatti, et al. (2006). "Enhanced bone apposition around biofunctionalized sandblasted and acid-etched titanium implant surfaces. A histomorphometric study in miniature pigs." *Clin Oral Implants Res* 17(3): 251-257.

Govender, S., C. Csimma, et al. (2002). "Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients." *J Bone Joint Surg Am* 84-A(12): 2123-2134.

Granjeiro, J. M., R. C. Oliveira, et al. (2005). "Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use." *Braz J Med Biol Res* 38(10): 1463-1473.

Heino, J. (2007). "The collagen family members as cell adhesion proteins." *Bioessays* 29(10): 1001-1010.

Hersel, U., C. Dahmen, et al. (2003). "RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond." *Biomaterials* 24(24): 4385-4415.

Huang, Z., P. G. Ren, et al. (2010). "Modulating osteogenesis of mesenchymal stem cells by modifying growth factor availability." *Cytokine* 51(3): 305-310.

Hulth, A. (1989). "Current concepts of fracture healing." *Clin Orthop Relat Res*(249): 265-284.

Itoh, K., N. Udagawa, et al. (2001). "Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteoclast differentiation and survival supported by receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand." *Endocrinology* 142(8): 3656-3662.

Jabbari, E. (2009). "Engineering bone formation with peptidomimetic hybrid biomaterials." *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2009: 1172-1175.

Jikko, A., S. E. Harris, et al. (1999). "Collagen integrin receptors regulate early osteoblast differentiation induced by BMP-2." *J Bone Miner Res* 14(7): 1075-1083.

Kleinman, H. K., R. J. Klebe, et al. (1981). "Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells." *J Cell Biol* 88(3): 473-485.

Komori, T., H. Yagi, et al. (1997). "Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts." *Cell* 89(5): 755-764.

Lee, C. H., A. Singla, et al. (2001). "Biomedical applications of collagen." *Int J Pharm* 221(1-2): 1-22.

Liotta, L. A., D. Vembu, et al. (1978). "Collagen required for proliferation of cultured connective tissue cells but not their transformed counterparts." *Nature* 272(5654): 622-624.

Ma, P. X. (2008). "Biomimetic materials for tissue engineering." *Adv Drug Deliv Rev* 60(2): 184-198.

Mizuno, M., R. Fujisawa, et al. (2000). "Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen- α 2 β 1 integrin interaction." *J Cell Physiol* 184(2): 207-213.

Moore, N. M., N. J. Lin, et al. (2011). "Synergistic enhancement of human bone marrow stromal cell proliferation and osteogenic differentiation on BMP-2-derived and RGD peptide concentration gradients." *Acta Biomater* 7(5): 2091-2100.

Moursi, A. M., C. H. Damsky, et al. (1996). "Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation." *J Cell Sci* 109 (Pt 6): 1369-1380.

Petrie, T. A., J. E. Raynor, et al. (2008). "The effect of integrin-specific bioactive coatings on tissue healing and implant osseointegration." *Biomaterials* 29(19): 2849-2857.

Pierschbacher, M. D. and E. Ruoslahti (1984). "Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule." *Nature* 309(5963): 30-33.

Ruchon, A. F., M. Marcinkiewicz, et al. (2000). "Cellular localization of neprilysin in mouse bone tissue and putative role in hydrolysis of osteogenic peptides." *J Bone Miner Res* 15(7): 1266-1274.

Sciadini, M. F. and K. D. Johnson (2000). "Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model." J Orthop Res 18(2): 289-302.

Shin, H., S. Jo, et al. (2003). "Biomimetic materials for tissue engineering." Biomaterials 24(24): 4353-4364.

Takeuchi, Y., M. Suzawa, et al. (1997). "Differentiation and transforming growth factor-beta receptor down-regulation by collagen-alpha2beta1 integrin interaction is mediated by focal adhesion kinase and its downstream signals in murine osteoblastic cells." J Biol Chem 272(46): 29309-29316.

Tuan, T. L., D. T. Cheung, et al. (1996). "Engineering, expression and renaturation of targeted TGF-beta fusion proteins." Connect Tissue Res 34(1): 1-9.

Verrier, S., S. Pallu, et al. (2002). "Function of linear and cyclic RGD-containing peptides in osteoprogenitor cells adhesion process." Biomaterials 23(2): 585-596.

Visser, R., P. M. Arrabal, et al. (2009). "The effect of an rhBMP-2 absorbable collagen sponge-targeted system on bone formation in vivo." Biomaterials 30(11): 2032-2037.

Urist, M. R. (1965). "Bone: formation by autoinduction." Science 150(3698): 893-899.

Wang, E. A., V. Rosen, et al. (1990). "Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation." Proc Natl Acad Sci U S A 87(6): 2220-2224.

Yamaguchi, A., T. Komori, et al. (2000). "Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1." Endocr Rev 21(4): 393-411.

Zimmerman, D., F. Jin, et al. (2000). "Impaired bone formation in transgenic mice resulting from altered integrin function in osteoblasts." Dev Biol 220(1): 2-15.

Zouani, O. F., C. Chollet, et al. (2010). "Differentiation of pre-osteoblast cells on poly(ethylene terephthalate) grafted with RGD and/or BMPs mimetic peptides." Biomaterials 31(32): 8245-8253.