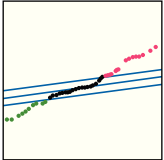


El hueso bovino anorgánico (Bio-Oss) regula el miARN de las células osteoblastoides



Annalisa Palmieri, PhD¹/Furio Pezzetti, PhD²/
Giorgio Brunelli, MD³ Marcella Martinelli, PhD⁴/Lorenzo
Lo Muzio, MD⁵/Antonio Scarano, DDS⁶/Luca Scapoli,
PhD⁴/Marzia Arlotti, PhD¹/Laura Guerzoni, PhD⁷/
Francesco Carinci, MD⁸

*Bio-Oss (Geistlich) es un material de hueso bovino anorgánico que se ha utilizado ampliamente en intervenciones de regeneración ósea durante la cirugía oral. No obstante, no se conoce por completo la forma en que este biomaterial incrementa la actividad de los osteoblastos para favorecer la formación ósea. El microARN (miARN) representa un tipo de ARN pequeño, funcional y no codificante de 19 a 23 nucleótidos que regula la transcripción del ARN mensajero (ARNm) en proteínas. En este estudio se utilizó la técnica de micromatriz de miARN para investigar la regulación de la traducción en una línea celular osteoblastoide (MG63) expuesta a Bio-Oss. Se identificaron 9 miARN regulados al alza (mir-423, mir-492, mir-191, mir-23a, mir-377, mir-494, mir-214, mir-139b, mir-320) y 4 miARN regulados a la baja (mir-27a, mir-24, mir-188 y let-7c). Puesto que cada miARN regula 100 ARNm, solamente se analizaron los ARN relacionados con la formación ósea. La amplia mayoría de los ARNm detectados están regulados a la baja, y destacan algunos genes homeobox (genes que regulan la morfogénesis de todo un segmento del organismo), como *noggin* y *EN1*. Se demostró un efecto indirecto positivo en la proteína morfogenética ósea 4. Según la información de que disponen los autores, los resultados descritos en este artículo son los primeros sobre regulación de la traducción en osteoblastos expuestos a Bio-Oss. Este estudio puede ser relevante para conocer mejor el mecanismo molecular de la regeneración ósea y puede utilizarse como herramienta potencial para analizar el uso combinado de citocinas. (Rev Int Odontol Restaur Period 2010;14:80-85.)*

¹Postdoc Fellow, Institute of Histology, University of Bologna and Center of Molecular Genetics, CARISBO Foundation, Bologna, Italy.

²Associate Professor, Institute of Histology, University of Bologna and Center of Molecular Genetics, CARISBO Foundation, Bologna, Italy.

³Senior Lecturer, Dipartimento di Discipline Medico Chirurgiche della Comunicazione e del Comportamento (DMCCC), Section of Maxillofacial Surgery, University of Ferrara, Ferrara, Italy.

⁴Assistant Professor, Institute of Histology, University of Bologna and Center of Molecular Genetics, CARISBO Foundation, Bologna, Italy.

⁵Professor, Dental Clinic, University of Foggia, Foggia, Italy.

⁶Assistant Professor, Dental Clinic, University of Chieti, Chieti, Italy.

⁷Postdoc Fellow, Department of DMCCC, Section of Maxillofacial Surgery, University of Ferrara, Ferrara, Italy.

⁸Associate Professor, Department of DMCCC, Section of Maxillofacial Surgery, University of Ferrara, Ferrara, Italy

Correspondencia: Dr Francesco Carinci, Department of DMCCC, Section of Maxillofacial Surgery, University of Ferrara, Corso Giovecca, 203, 44100 Ferrara, Italy; fax: +39 0532 291582; e-mail: crc@unife.it.

Bio-Oss (Geistlich) está formado por hueso bovino esterilizado y desproteinizado compuesto por carbonato de apatita deficiente en calcio y es idéntico al hueso humano desde el punto de vista fisicoquímico¹⁻⁸. Bio-Oss tiene una fuerza de compresión de 35 MPa y su naturaleza porosa (75 al 80 % del volumen total) permite incrementar en gran medida la superficie del material. Este aumento de la superficie proporciona un substrato para incrementar la angiogénesis y constituye un almacén para la formación de hueso¹⁻⁸. Se ha descrito que Bio-Oss favorece la osteogénesis y tiene una tasa de reabsorción muy baja. Se ha utilizado con frecuencia en casos de elevación del suelo del seno maxilar⁹⁻¹⁶. En algunos casos puede ser ventajoso utilizar un material que presenta muy poca degradación, como Bio-Oss. Cuando se utiliza, el hueso crece en dirección ascendente desde el hueso preexistente en el suelo sinusal hacia la zona injertada, manteniendo el espacio, ayudando a prevenir la indeseada reabsorción ósea y sin muestras de

reacción inflamatoria. El éxito de Bio-Oss en el aumento de seno maxilar también se confirmó en un estudio a largo plazo¹⁷.

Puesto que se no se conoce por completo el mecanismo por el cual Bio-Oss estimula la actividad de los osteoblastos para favorecer la formación ósea, los autores trataron de obtener más información mediante el análisis de los microARN (miARN).

La transcripción es la síntesis de ARN mensajero (ARNm) a partir del ADN, mientras que la traducción es la síntesis de proteína a partir del ARNm. Los miARN constituyen una clase de ARN pequeños, funcionales y no codificantes de 19 a 23 nucleótidos que regulan la traducción de los ARNm en proteínas^{18,19}. Así pues, los miARN regulan la cantidad de ARNm específicos en las vías metabólicas de silenciamiento del ARN postranscripcional al inducir la degradación de los ARNm diana²⁰⁻²⁶.

Para investigar el efecto de Bio-Oss en los miARN se utilizó un microchip conteniendo cientos de secuencias de miARN (Invitrogen). Esta técnica se denomina *micromatriz miARN* o *perfil de expresión génica*, porque permite que el técnico analice de forma simultánea los cambios en cientos de miARN. Al analizar 329 secuencias de miARN humano repartidas por la matriz (portaobjetos), los autores compararon las expresiones de los miARN en las células osteoblastoides humanas (MG63) tratadas con Bio-Oss frente a las células (MG63) no tratadas.

Materiales y métodos

Cultivos celulares

Las células osteoblastoides (MG63) se cultivaron en pocillos Falcon para cultivos celulares estériles (Becton Dickinson) que contenían un medio mínimo esencial de Eagle suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (Sigma Chemical) y antibióticos (100 mg/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomomicina, Sigma Chemical). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada de dióxido de carbono al 5 %. Se obtuvieron las células MG63 y se sembraron con una densidad de 1×10^5 cél/ml en pocillos de 9 cm² (3 ml) utilizando tripsina al 0,1 % y ácido etilendiaminotetraacético al 0,02 % en tampón de Eagle sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ para liberar las células. Se añadió Bio-Oss en un grupo de pocillos a una concentración de 100 mg/10 ml. Transcurridas 24 h, cuando los cultivos alcanzaron la subconfluencia, se procesaron las células para extraer el ARN.

Micromatrices de miARN

El miARN se extrajo de las células utilizando el PureLink miRNA Isolation Kit (Invitrogen). Se tomaron 400 ng de miARN de cada muestra (tratada y control) y se utilizaron para hibridar el NCode Multi-Species miRNA Microarray, un portaobjetos conteniendo 329 secuencias humanas de miARN por duplicado. Se utilizó un NCode miRNA

Labeling System (Invitrogen) para marcar e hibridar el miARN de la micromatriz, según las instrucciones del fabricante. En pocas palabras, se añadió una cola de poli(A) a cada miARN utilizando una poli(A) polimerasa y un tampón reactivo optimizado. Posteriormente, la secuencia de captura se ligó al miARN utilizando un oligo(dT) intermediario. Tras la purificación, los miARN marcados se hibridaron con las micromatrices y se incubaron durante toda la noche.

Tras un período de incubación de 18 a 20 h, la matriz se lavó y se hibridó con el reactivo de captura Alexa Fluor 3 (para las células control) y Alexa Fluor 5 (para las células tratadas). La matriz se lavó de nuevo y luego se exploró utilizando un escáner de micromatrices estándar (Axon Instruments).

Tras el escaneado, se identificaron todos los puntos gracias a un archivo GenePixR Array List descargado de www.invitrogen.com/ncode que enumera la identidad y la localización de todas las sondas impresas en la matriz. Las imágenes se cuantificaron utilizando el programa GenePix 6.0 (Axon Instruments). La intensidad de la señal de cada punto se calculó restando el fondo local de la intensidad total. Los datos se normalizaron utilizando los paquetes DNMD y Preprocessing^{27,28}, que generaron un valor promedio de las dos réplicas de cada miARN. Para seleccionar los miARN expresados de forma diferencial se analizaron los datos obtenidos utilizando el paquete Significance Analysis of Microarray²⁹.

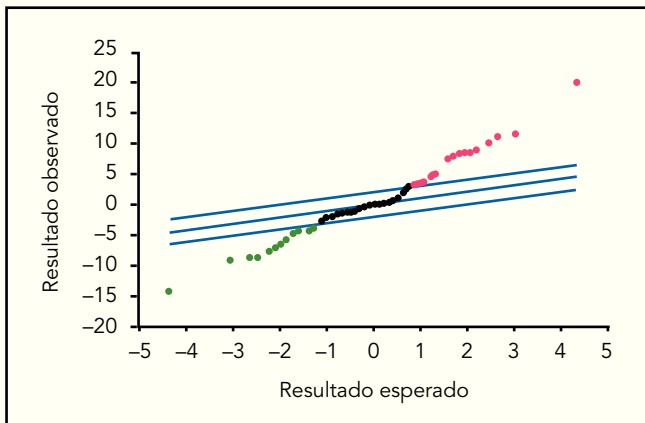


Figura 1 Análisis estadístico del gráfico de la micromatriz de células MG63 tratadas durante 24 h con Bio-Oss a una concentración de 100 mg/10 ml. Los miARN regulados a la baja se localizan en la zona inferior izquierda; los miARN regulados al alza se sitúan en la zona superior derecha. Las líneas paralelas trazadas desde la parte inferior izquierda a la parte superior derecha son los valores de corte.

Para las predicciones y validaciones diana, los miARN se procesaron utilizando miRBase Target³⁰, un recurso de la red desarrollado por Enright Lab en el Wellcome Trust Sanger Institute. Esta fuente utiliza un algoritmo denominado miRanda para identificar los posibles lugares de unión de un determinado miARN en la secuencia genómica.

La lista de genes diana se procesó mediante FatiGO³¹, una interfaz de la red que realiza la extracción de datos sencillos utilizando Gene Ontology³². La extracción de datos consiste en asignar el término Gene Ontology más característico a cada grupo de genes regulados.

Resultados

La hibridación del miARN (obtenido de las células MG63 cultivadas con Bio-Oss a una concentración de 100 mg/10 ml) con las secuencias

seleccionadas en el portaobjetos permitieron que los autores realizaran un análisis sistemático de los miARN y proporcionaron información primordial sobre la regulación del proceso de traducción inducido por Bio-Oss. Existieron nueve miARN regulados al alza (mir-423, mir-492, mir-191, mir-23a, mir-377, mir-494, mir-214, mir-139b, mir-320) y cuatro miARN regulados a la baja (mir-27a, mir-24, mir-188 y let-7c), para una tasa de descubrimientos falsos igual a 0 y una puntuación > 7. La figura 1 presenta el gráfico del análisis estadístico de la micromatriz y muestra la expresión diferencial de los miARN. Puesto que el miARN tiene potencia para regular miles de genes, los autores seleccionaron solamente los genes relacionados con la osteogénesis y la remodelación ósea regulados de la misma forma por dos miARN casi independientes (tabla 1). Se excluyeron los genes con regulaciones opuestas.

Tabla 1 Genes regulados al alza y a la baja

miARN	Función biológica	Genes diana
Regulados al alza	Desarrollo esquelético	SUFU, IGF2, IGFβ4, N1, PAPSS1, NOG
	Desarrollo cartilaginoso	NOG
Regulados a la baja	Desarrollo esquelético	DLX5

Discusión

Los informes histológicos muestran que la mayoría de las partículas de Bio-Oss estaban rodeadas por hueso maduro, compacto, de reciente formación, con osteonas bien organizadas^{2,5,7,8}. En algunos campos se observaron osteoblastos en proceso de aposición ósea directamente en la superficie de la partícula. No existieron vacíos en la interfaz partícula-hueso y éste se mantuvo en contacto estrecho con las partículas en todo momento⁹⁻¹³. No se observó ningún infiltrado de células inflamatorias alrededor de las partículas o en la interfaz con el hueso. Sin embargo, apenas se conoce la manera en que este biomaterial altera la actividad de los osteoblastos a nivel genético para favorecer la formación ósea. Por tanto, los autores trataron de obtener más información analizando los miARN de los osteoblastos expuestos a Bio-Oss frente a los osteoblastos no expuestos.

Los miARN son un tipo de moléculas de ARN no codificante, de pequeño tamaño (19 a 23 nucleótidos) recién descubiertas. Desempeñan un papel importante en el proceso de la regulación postranscripcional. Los miARN no se traducen en proteínas, en lugar de ello

regulan la expresión de otros genes al segmentar o reprimir la traducción de sus ARNm diana.

La hibridación del miARN obtenido de las células MG63 cultivadas con 100 mg/10 ml de Bio-Oss con las secuencias seleccionadas en el portaobjetos permitió a los autores realizar un análisis sistemático de los miARN y proporcionó información primordial con respecto a la regulación de la traducción inducida por Bio-Oss (tabla 1).

La amplia mayoría de los genes detectados se regula a la baja, y entre ellos existieron varios genes homeobox (genes que regulan la morfogénesis de todo un segmento del organismo). Los nogging (NOG) inactivan a los miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante b de proteínas de señalización, como la proteína morfogenética ósea 4. Al difundirse por las matrices extracelulares de forma más eficiente que los miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante b, los NOG tienen un papel importante en la creación de gradientes morfogenéticos³³. El homólogo humano engrailed 1 (EN1) interviene en el control de la formación de patrones durante el desarrollo de las extremidades³⁴. El gen homeobox distal-less 5 (DLX5) se regula al alza; es un miembro de la familia homeobox que regula el factor de transcripción e interviene en el desarrollo óseo y la consolidación de las fracturas. La mutación de este gen está asociada con la malformación ectrodactilia de manos y pies³⁵. Otro grupo de genes regulados a la baja son las hormonas, como el factor de crecimiento insulinoide

tipo 2 (IGF2), que es miembro de la familia insulínica de los factores de crecimiento polipeptídicos implicados en el desarrollo y el crecimiento³⁶.

Los genes estudiados en este artículo son solamente unos cuantos de los descritos en la tabla 1 que están regulados de forma diferencial por el miARN. Los autores analizaron brevemente aquellos cuyo funcionamiento se conoce mejor y que estuvieron relacionados directamente con la formación ósea, el desarrollo esquelético, la remodelación del cartílago y la producción ósea. Además, el hecho de que varios genes relacionados con la formación ósea tengan un control negativo de la traducción puede estar relacionado con una fase temprana del análisis (es decir, las células MG63 cultivadas durante 24 h hasta la subconfluencia). Esta fase se caracteriza por una cinética celular elevada y una baja diferenciación y producción de matriz extracelular.

Vale la pena destacar que MG63 es una línea celular y no un cultivo celular primario de osteoblastos. No obstante, las ventajas de utilizar una línea celular están relacionadas con el hecho de que la reproducibilidad de los datos es más elevada, ya que no existe variabilidad en el paciente estudiado. Los cultivos celulares primarios constituyen una fuente de células normales, pero también contienen diferentes tipos de células contaminantes y células en diferentes estadios de diferenciación. Es más, los autores eligieron realizar el experimento después de 24 h para obtener información sobre los estadios iniciales de la estimulación, un

momento crítico en cualquier procedimiento de injerto. Son necesarios más investigadores, con otras líneas celulares osteoblastoides, cultivos primarios y diferentes momentos puntuales para obtener una comprensión global de los sucesos moleculares relacionados con Bio-Oss. No obstante, se detectó un efecto global en la formación de hueso y el modelo de estudio puede ser útil para investigar el uso combinado de citocinas como la proteína morfogenética ósea 4.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por becas de la Universidad de Ferrara, Italia (FC), PRIN 2005 prot. 2005067555-002 (FC). Fondazione CARIFE (F) y la Fondazioni CARISBO (FP).

Bibliografía

1. Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 1997;8: 117-124.
2. Piattelli M, Favero GF, Scarano A, Orsini G, Piattelli A. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus lifting augmentation procedure: A histologic long-term report of 20 cases in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14: 835-840.
3. Valentini P, Abensur D. Maxillary sinus floor elevation for implant placement with demineralized freeze-dried bone and bovine bone (Bio-Oss): A clinical study of 20 patients. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1997;17:232-241.
4. Rodriguez A, Anastassov GE, Lee H, Buchbinder D, Wettan H. Maxillary sinus augmentation with deproteinized bovine bone and platelet rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implants. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:157-163.

5. Tadjoein ES, de Lange GL, Bronckers AL, Lyaruu DM, Burger EH. Deproteinized cancellous bovine bone (Bio-Oss) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases. *J Clin Periodontol* 2003;30:261–270.
6. Merckx MAW, Maltha JC, Stoelinga PJW. Assessment of the value of anorganic bone additives in sinus floor augmentation: A review of clinical reports. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003;32:1–6.
7. Maiorana C, Sommariva L, Brivio P, Sigurtà D, Santoro F. Maxillary sinus augmentation with anorganic bovine bone (Bio-Oss) and autologous platelet-rich plasma: Preliminary clinical and histologic evaluations. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003;23:227–235.
8. Hallman M, Cederlund A, Lindskog S, Lundgren S, Sennerby L. A clinical histologic study of bovine hydroxyapatite in combination with autogenous bone and fibrin glue for maxillary sinus floor augmentation. Results after 6 to 8 months of healing. *Clin Oral Implants Res* 2001;12:135–143.
9. Haas R, Baron M, Donath K, Zechner W, Watzek G. Porous hydroxyapatite for grafting the maxillary sinus: A comparative histomorphometric study in sheep. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17:337–346.
10. Artzi Z, Nemcovsky CE, Dayan D. Bovine-HA spongiosa blocks and immediate implant placement in sinus augmentation procedures. Histopathological and histomorphometric observations on different histological stainings in 10 consecutive patients. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:420–427.
11. Sennerby L, Lundgren S. Histologic aspects of simultaneous implant and graft placement. In: Jensen OT (ed). *The Sinus Bone Graft*. Chicago: Quintessence, 1999:95–105.
12. Landi L, Pretel RW Jr, Hakimi NM, Setayesh R. Maxillary sinus floor elevation using a combination of DFDBA and bovine-derived porous hydroxyapatite: A preliminary histologic and histomorphometric report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000;20:574–583.
13. Froum SJ, Tarnow DP, Wallace SS, Rohrer MD, Cho SC. Sinus floor elevation using anorganic bovine bone matrix (OsteoGraf/N) with and without autogenous bone: A clinical, histologic, radiographic, and histomorphometric analysis—Part 2 of an ongoing prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1998;18:528–543.
14. Wheeler SL. Sinus augmentation for dental implants: The use of alloplastic materials. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:1287–1293.
15. Wallace SS, Froum SJ, Tarnow DP. Histologic evaluation of a sinus elevation procedure: A clinical report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1996;16:46–51.
16. Wallace SS, Froum SJ. Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003;8:328–343.
17. Sartori S, Silvestri M, Forni F, Icaro Cornaglia A, Tepei P, Cattaneo V. Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. *Clin Oral Implants Res* 2003;14:369–372.
18. Moss EG. MicroRNAs in noncoding RNAs. In: Barciszewski J, Erdmann V (eds). *Molecular Biology and Molecular Medicine*. Georgetown: Landes Bioscience, 2003:98–114.
19. Schmitter D, Filkowski J, Sewer A, et al. Effects of Dicer and Argonaute down-regulation on mRNA levels in human HEK293 cells. *Nucleic Acids Res* 2006;34:4801–4815.
20. Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: Growth, death, fat, stress, and timing. *Cell* 2003;113:673–676 [erratum 2003;114:269].
21. Sontheimer EJ, Carthew RW. Silence from within: Endogenous siRNAs and miRNAs. *Cell* 2005;122:9–12.
22. Zamore PD, Haley B. Ribo-gnome: The big world of small RNAs. *Science* 2005;309:1519–1524.
23. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 2001;106:23–34.
24. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001;293:834–838.
25. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 2001;15:2654–2659.
26. Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 2004;118:57–68.
27. Vaquerizas JM, Dopazo J, Díaz-Uriarte R. DNMAID: Web-based diagnosis and normalization for microarray data. *Bioinformatics* 2004;20:3656–3658.
28. Herrero J, Diaz-Uriarte R, Dopazo J. Gene expression data preprocessing. *Bioinformatics* 2003;19:655–656.
29. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:5116–5121 [erratum 2001;98:10515].
30. MicroCosm Targets Version 5. <http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5>. Accessed November 24, 2009.
31. Babelomics. FatiGO. <http://www.fatigo.org>. Accessed November 24, 2009.
32. The Gene Ontology website. <http://www.geneontology.org>. Accessed September 22, 2009.
33. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A:1544–1552 [erratum 2004;86-A:141].
34. Johnson RL, Tabin CJ. Molecular models for vertebrate limb development. *Cell* 1997;90:979–990.
35. Depew MJ, Lufkin T, Rubenstein JL. Specification of jaw subdivisions by Dlx genes. *Science* 2002;298:381–385.
36. Constancia M, Hemberger M, Hughes J, et al. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature* 2002;417:945–948.