



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA EN MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
BIOLOGÍA BUCAL

**CONSTRUCCIÓN DE UN ANDAMIO DE GELATINA-ÁCIDO HIALURÓNICO Y
MICROESFERAS DE BMP-2 y VEGF**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
M. en C. KATIA JARQUÍN YÁÑEZ

TUTOR: DR. ANDRÉS E. CASTELL RODRÍGUEZ
FACULTAD DE MEDICINA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ARGELIA ALMAGER FLORES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DR. JESÚS ARENAS ALATORRE
INSTITUTO DE FÍSICA

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Noviembre de 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Mi mayor agradecimiento a Dios, por permitirme concluir este trabajo de investigación, brindarme la oportunidad de crecer tanto académicamente como espiritualmente y sobretodo por regalarme una familia tan maravillosa.

Mami gracias por tu compañía, por ser mi motor de vida y por apoyarme siempre.

A mis hermanos Lizet, Marisela, Juan y Carolina, no sólo por compartir mis sueños sino también por formar parte de ellos.

A mis sobrinos: Naomi, Nazareth, Axel y César por contagiarme con su energía y ser la alegría de vida.

A Narda por ser mi mejor amiga en esta etapa de mi vida.

A mi familia en general, por brindarme su apoyo y comprensión, por escucharme y darme un buen consejo.

A la Dra. Esther por ser el ángel que me alienta en todo momento.

A la Dra. María Luisa por ser mi consejera, amiga y cómplice.

A mis mejores amigas desde la licenciatura: Gris, Marce, Mary, Dolores, Ericka, Nancy y Jessy por compartir estos momentos conmigo.

Al laboratorio de Inmunoterapia Experimental e Ingeniería de Tejidos, donde se encuentran mis amigos y compañeros: Judith, Nadia, Betty, Gaby (Gat), Miguel, Rosa, Cass, Dinoh, Alda, Laurita, Maggy, Jenny Fer, Ili, Chucho, Gabita, Alita, Wendy, Aarón, Rodrigo, Karlita, Mitzy y el Dr. Castell; a los cuales les agradezco sus enseñanzas, sus consejos, su compañía y sobre todo su critica constructiva, porque gracias a ello, he podido concluir y mejorar este proyecto.

Erick y Dulce, gracias por todo su apoyo incondicional, los quiero mucho.

Betty, Gat, Jess y Dany en especial les quiero decir que son el mejor regalo que he tenido, con ustedes he pasado grandes momentos de felicidad, también me han reconfortado cuando he estado triste, siempre encuentran las palabras adecuadas para hacerme sonreír; GRACIAS por su AMOR, COMPRENSIÓN Y CARÍÑO.

Miguel gracias por brindarme tu amistad y hacerme ver que la vida es más sencilla de lo que creo.

Dr. Castell, no existen palabras que puedan expresar lo que siento, simplemente le diré que gran parte de lo que soy, se lo debo a usted y siempre tendrá mi más grande admiración y agradecimiento.

AGRADECIMIENTOS

Al comité revisor de esta tesis:

- Dra. Elba Rosa Leyva Huerta
- Dra. Ana María Fernández Presa
- Dr. Andrés Eliu Castell Rodríguez
- Dr. Carlos Andrés Álvarez Gayosso
- Dr. Jesús Angel Arenas Alatorre

A los siguientes miembros del laboratorio de Inmunoterapia Experimental e Ingeniería de Tejidos del Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM. Por su tutoría y asesoría técnica en la realización de este trabajo:

- Dr. Andrés Castell Rodríguez
- Dra. Gabriela Piñón Zárate
- M. en C. Miguel Herrera Enríquez
- Biól. Beatriz Hernández Téllez
- Méd. Erick Francisco Ortega Sánchez
- Estud. Dulce María López Pérez
- Méd. Sara Judith Álvarez Pérez
- M. en C. Christian Adrián Cárdenas Monroy

Por su apoyo en la realización de cortes histológicos y tinciones a la técnica académica Raquel Guerrero Alquicira del laboratorio de Técnicas Histológicas y al Biól. Armando Zepeda Rodríguez por su apoyo técnico en microscopía electrónica de barrido del Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM.

Por su apoyo técnico en la obtención de las imágenes de microscopía electrónica de barrido, análisis de EDS, análisis de RAMAN e interpretación de los resultados; les agradezco a los siguientes miembros del Instituto de Física, UNAM:

- Dr. Jesús Arenas Alatorre
- Fís. Roberto Hernández Reyes
- Dr. Samuel Tehuacanero Cuapa
- M.C. Manuel Aguilar Franco
- Ing. María Cristina Zorrilla Cangas
- M.C. Jaqueline Cañetas Ortega
- Diego Quiterio Vargas

Al proyecto DGAPA PAPIIT IN218315, al Posgrado en Ciencias Médicas Odontológicas y de la Salud así como también a CONACyT.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ab	Antibiótico
BMPs	Proteínas morfogénicas de hueso
BMSC	Células estromales de médula ósea (por sus siglas en inglés)
BSP	Sialoproteína ósea
CD	Grupos de diferenciación (cluster of differentiation)
DMEM	Medio mínimo esencial modificado por Dubelco
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carboimida hidrócloro
EDS	Microanálisis por rayos X
Ge	Gelatina
HA	Ácido hialurónico
IGF	Factor de crecimiento de insulina
IL	Interleucina
IR	Espectroscopía de infrarrojo
LDH	Deshidrogenasa láctica
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
MSC	Células madre mesenquimales
OCN	Osteocalcina
ODF	Factor diferenciador de osteoclastos
OPG	Osteoprotegerina
OPN	Osteopontina
PLGA	Ácido poliláctico glicólico
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
R1,2,3 y 4	Restilene marca de ácido hialurónico
RANK	Receptor activador de NFκB
RANKL	Receptor activador del ligando NFκB
RGD	Arginina, Glicina y Aspartato.
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFB	Suero fetal bovino
TGF	Factor de crecimiento transformante
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAP	Fosfatasa ácida tartrato resistente

CONSTRUCCIÓN DE UN ANDAMIO DE GELATINA-ÁCIDO HIALURÓNICO Y MICROESFERAS DE BMP-2 Y VEGF-1

INTRODUCCIÓN: La reparación de fracturas y de rellenos de defecto óseo hace necesario la fabricación de matrices poliméricas biomiméticas entrecruzadas con la finalidad de semejar al tejido a sustituir. Por otro lado, es importante sintetizar microesferas con factores de crecimiento como la proteína morfogenética de hueso 2 (BMP-2) que induce la diferenciación de células estromales de médula ósea hacia osteoblastos, y el factor de crecimiento endotelial vascular 1 (VEGF-1) para lograr posteriormente incorporarlos en un solo constructo.

OBJETIVOS:

1. Construir un andamio de gelatina-ácido hialurónico con distintas concentraciones de 1 etil-3-(3-dimetilaminopropil) carboimida hidrocloreto (EDC).
2. Elaborar las microesferas de BMP-2 y VEGF-1.

METODOLOGÍA: Se utilizaron ratas Wistar Albinas de 250g para la obtención de células estromales de médula ósea para las pruebas de citotoxicidad. Se construyó por el método de liofilizado los andamios de Ge-HA en una proporción de 80:20. Después se entrecruzaron por 12h en una solución de alcohol con distintas concentraciones de EDC 6, 30, 50 y 60mM. Se sintetizaron las microesferas con quitosán-albúmina a través de emulsión simple y reticulación. La caracterización se realizó con Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) para evaluar su morfología; Espectroscopía infraroja para evaluar su composición, con citometría de flujo se evaluó el tamaño de partícula y finalmente con ELISA se verificó la presencia de los factores de crecimiento en las microesferas de quitosán-albúmina.

RESULTADOS: la concentración de 50 mM de EDC fue la concentración óptima para entrecruzar los andamios de Ge-HA, debido a que mostró un tamaño de poro en promedio de 30.48µm y no mostraron citotoxicidad. Las microesferas de quitosán obtenidas por el método de emulsión simple y reticulación, alcanzaron tamaños que van de 100nm a 5µm, además adsorbieron exitosamente los factores de crecimiento.

CONSTRUCTION OF THE SCAFFOLD OF GELATIN-HYALURONIC ACID AND MICROSPHERES OF BMP-2 AND VEGF-1

INTRODUCTION: In order to effectively repair fractures and bone defects it is necessary to construct scaffolds that may be used as support for bone cells and simulate three-dimensional conditions of bone tissue. Scaffolds are made of polymers, which may be crosslinked to improve their biological and physical characteristics. Moreover, to improve bone repair it is necessary to create slow release systems of growth factors, thus, the constructing of Chitosan microspheres that release bone morphogenetic protein 2(BMP-2) and vascular growth factor 1 (VEGF-1) may induce differentiation of stromal bone marrow cells to osteoblasts and endothelial cells, respectively.

OBJECTIVES:

1. To develop a scaffold of gelatin-hyaluronic acid with different concentrations of (1-ethyl-(3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) (EDC).
2. To develop microsphere of chitosan with BMP-2 and VEGF.

METHODOLOGY: Albino Wistar rats of 250g were sacrificed and bone marrow stromal cells were obtained from femurs and tibias. The cells were used to cytotoxicity test. Scaffolds of gelatin-hyaluronic acid (Ge-HA) (80:20), were constructed by the method of freeze-drying. Then, they were crosslinked with different concentrations of EDC (6, 30, 50 and 60 mM for 12h) in an alcohol solution. Chitosan microspheres with albumin were synthesized through a simple emulsion and crosslinking. The characterization of both, the and microspheres, was made using Scanning Electron Microscopy (SEM) to evaluate morphology; Infrared spectroscopy to analyze its composition; flow cytometry to measure particle size and finally the presence of growth factors was evaluated with ELISA.

RESULTS: The best concentration of EDC to crosslink the scaffolds Ge-HA was 50mM and the porous size average was 30.48 μ m. It is noteworthy that no cytotoxicity was observed. The size of the Chitosan microspheres was 100nm to 5 μ m. The microspheres successfully adsorbed the growth factors.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	8
II. MARCO TEÓRICO	9
2.1 Tejido óseo	9
Células de tejido óseo	9
Matriz extracelular ósea	12
Osificación	15
Proceso de Mineralización	17
2.2 Ingeniería de Tejidos para Regeneración Ósea	19
Biomateriales	20
Metales y Aleaciones	21
Cerámicos y Vidrios	21
Polímeros	22
Compuestos	23
Biomateriales en tejido óseo	23
Hidrogeles	24
Entrecruzamiento de hidrogeles	25
Matriz Extracelular	28
Gelatina (Ge)	28
Ácido Hialurónico (HA)	29
2.3 Procesos de Encapsulación	30
Métodos de encapsulación	31
Quitosán	33
Factores de Crecimiento	34
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
IV. JUSTIFICACIÓN	36
V. OBJETIVOS	37
5.1 General	37
5.2 Específico	37
VI. HIPÓTESIS	38
VII. METODOLOGÍA	39
7.1 Tipo de estudio	39
7.2 Definición de variables	40
7.3 Procedimiento	41
VIII. ANALISIS ESTADISTICO	46
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
X. CONCLUSIONES	70
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN	74

I. INTRODUCCIÓN

La pérdida de tejidos y el mal funcionamiento orgánico, constituyen uno de los problemas más frecuentes y costosos para el sistema de salud. El tratamiento actual para este tipo de alteraciones se basa en el trasplante de órganos y/o tejidos o bien el empleo de sistemas bioartificiales.

Uno de los tejidos que frecuentemente se ve afectado por algún accidente o una enfermedad es el tejido óseo. En la actualidad, el injerto óseo es la técnica más utilizada para contrarrestar enfermedades en los huesos, especialmente en enfermedades periodontales; sin embargo, la disponibilidad de los huesos para los injertos, así como la necesidad de varias intervenciones quirúrgicas y la posibilidad de transmisión de enfermedades ha llevado a buscar nuevas alternativas de tratamiento.

La medicina regenerativa es la disciplina que se encarga de la reparación de tejidos, reproduciendo los mecanismos que intervienen en la renovación celular del organismo; la estrategia a seguir, es cultivar células del propio paciente o células madre sobre andamios en un reactor y luego implantarlo en el paciente junto con factores de crecimiento. Por lo anterior, el presente trabajo de investigación hace uso de los fundamentos de medicina regenerativa e ingeniería de tejidos para la construcción de andamios de origen natural, que puedan ser empleados en la regeneración de tejido óseo y que además formen parte de la matriz extracelular del tejido, la gelatina y el ácido hialurónico son los polímeros que se emplearon en la construcción del andamio, los cuales fueron entrecruzados con una carboimida para aumentar su tiempo de degradación; además como elementos inductores, se elaboraron microesferas de quitosán para la adsorción de factores de crecimiento.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 TEJIDO ÓSEO

El hueso es un tejido conjuntivo especializado que se distingue de otros tejidos conjuntivos, por la mineralización de su matriz orgánica. Desde el punto de vista histológico, el tejido óseo se compone de células y matriz extracelular. El hueso es un tejido altamente vascularizado e innervado, que está estructurado en laminillas de matriz ósea calcificada, las cuales determina que el hueso sea clasificado como cortical o esponjoso. El hueso cortical, también llamado compacto, está formado por unidades estructurales denominadas osteonas, en ellas se pueden localizar a las células osteoprogenitoras alrededor de vasos sanguíneos. Estas células proliferan y se diferencian a osteoblastos, al mismo tiempo que comienzan a alejarse unas de otras por la síntesis y secreción de proteínas de matriz extracelular que se estructura en forma de láminas concéntricas que una vez calcificadas forman la osteona cortical. Así, los vasos sanguíneos, alrededor de los cuales se formaron las osteonas, quedan finalmente incluidos en un conducto llamado Havers. Una vez que los osteoblastos dejan de sintetizar matriz orgánica ósea y esta se calcifica, se les llaman osteocitos. Los osteocitos se comunican unos con otros a través de prolongaciones incluidas en la matriz calcificada. El conductillo en el que están incluidas las prolongaciones de los osteocitos se denomina canalículos óseos. Por otro lado, el hueso esponjoso, también llamado trabecular, lo constituyen laminillas óseas en forma de red que delimitan cavidades areolares en cuyo interior se encuentra médula ósea, también encontramos células osteoprogenitoras alrededor de los vasos sanguíneos pero no forman las osteonas (Welsch, 2008; Wojciech, 2015; Fernández-Tresguerres Hernández-Gil et al 2016).

CÉLULAS DE TEJIDO ÓSEO

Células osteoprogenitoras:

Las células osteoprogenitoras o células troncales óseas son células indiferenciadas alargadas con citoplasma poco prominente, proceden de células mesenquimales primitivas y forman una población de células capaces de autorrenovarse y dar origen a osteoblastos (Tresguerres Hernández-Gil et al 2016).

Estas células se encuentran en las superficies externas (células perioósticas) e internas de los huesos (células endósticas) y como células de revestimiento de los conductos de Havers y de Volkmann. En los huesos en crecimiento, estas células aparecen aplanadas y contienen un núcleo alargado u ovoide pálido y un citoplasma acidófilo. Si las células osteoprogenitoras son estimuladas, se diferencian en células secretoras más activas: los osteoblastos, que tienen la

función de sintetizar a la matriz ósea orgánica, por ello se les conoce también como células formadoras de hueso.

En el adulto, en condiciones de baja exigencia metabólica ósea, estas células se encuentran en una fase de relativo reposo o latencia (Welsch, 2008; Fortoul 2010; Ross, 2015).

Osteoblasto

Los osteoblastos son células de 20-30 μm que se encargan de sintetizar la matriz ósea, en una manera similar a como lo hacen los fibroblastos y los condroblastos. Proceden de las células mesenquimales pluripotentes de la médula ósea, del endostio, del periostio y de la región perivascular. Se caracterizan por secretar colágena tipo I y la sustancia fundamental que constituyen el hueso inicial no mineralizado u osteoide, a un ritmo de 2 a 3mm por día, además de expresar una gran actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP), que permite la mineralización y calcificación de hueso inicial a un ritmo de 1-2mm por día (Tresguerres Hernández-Gil *et al* 2016).

Los osteoblastos tienen forma cuboidal o poliédrica debido a su distribución monoestratificada en la superficie donde se está formando el tejido óseo. Su citoplasma es marcadamente basófilo y el aparato de Golgi, debido a su tamaño, a veces se observa como un área clara alrededor del núcleo. Con el microscopio electrónico se identifican prolongaciones citoplasmáticas muy delgadas que atraviesan el osteoide producido y que se unen a prolongaciones de otros osteoblastos por medio de uniones comunicantes o tipo nexo (*maculae communicans*) que les permiten acoplar sus citoplasmas iónica y eléctricamente lo que permite el paso de iones como calcio y otras moléculas como citocinas o prostaglandinas. Estas uniones están formadas por conexones que a su vez están formados por proteínas llamadas conexinas, siendo la principal de ellas la conexina 43. Además los osteoblastos poseen moléculas de adhesión intercelular conocidas como integrinas mediante las cuales se unen entre sí y con proteínas de la matriz extracelular (Welsch, 2008; Fortoul 2010; Ross, 2015).

Los osteoblastos sintetizan, entre otras proteínas no colágenas, macromoléculas de proteoglucanos, glucoproteínas multiadhesivas, proteínas dependientes de vitamina K osteoespecíficas, factores de crecimiento y citocinas. Más aún, tienen la capacidad de dirigir la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular y mediar la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citocinas específicas como TNF α .

La vida media de los osteoblastos humanos es de 1 a 10 semanas, al término de las cuales pueden morir por mecanismos de apoptosis o bien madurar a células de revestimiento u osteocitos (Welsch, 2008; Fortoul 2010; Ross, 2015).

Osteocito

Los osteocitos son las células óseas encargadas del mantenimiento de la matriz. Los osteocitos constituyen el estadio final desde la línea osteoblástica, puesto que una vez mineralizada la matriz sintetizada por los osteoblastos, algunos de ellos quedan atrapados dentro de ella, transformándose en osteocitos, por lo que se localizan inmersos en la matriz ósea en regiones conocidas como lagunas u osteoplasmas. Los osteocitos tienen una tasa de renovación muy baja, poseen los mismos marcadores que los osteoblastos, pero al contrario de los anteriores, expresan el marcador específico CD44. Los osteocitos se comunican a través de procesos citoplasmáticos mediante uniones tipo nexo o gap, estas prolongaciones citoplásmicas están localizadas en los canalículos que están llenas de fluido óseo extracelular (Tresguerres Hernández-Gil *et al* 2016). De esta forma, los osteocitos se organizan formando un sincicio celular interconectado que representa una única estructura, con la ventaja de que exista una gran superficie de contacto en el interior y hacia la superficie ósea, para asegurar oxígeno y nutrientes. Por otro lado, los osteocitos también poseen la capacidad de sintetizar, así como de reabsorber, matriz ósea, contribuyendo a la homeostasis del calcio sérico, no obstante, se cree que su función principal es la de controlar el remodelado óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas, fenómeno denominado mecanotransducción (Ross, 2015; Tresguerres Hernández-Gil *et al* 2016).

Los osteocitos tienen una vida media de 10 a 20 años y su muerte podría ser por apoptosis, por degeneración/necrosis, por senescencia o debido a la actividad de remodelado llevado a cabo por los osteoclastos, lo cual tiene como consecuencia la reabsorción de la matriz, seguida por reparación o remodelación del tejido óseo debido a la actividad de los osteoblastos (Welsch, 2008; Fortoul 2010; Ross, 2015).

Osteoclasto

Los osteoclastos son células eosinófilas multinucleadas grandes de 100µm, con abundantes mitocondrias y vacuolas. Su función principal es la reabsorción de tejido óseo. Se originan a partir de células progenitoras de granulocitos/macrófagos (GMP, CFU-GM) localizadas en la médula ósea y adquieren sus múltiples núcleos por varias repeticiones nucleares sin que se lleve a cabo la división del citoplasma, o bien por la fusión de múltiples monocitos (Fortoul 2010).

Las células antecesoras de los osteoclastos se caracterizan por expresar c-fos y factor nuclear kappa-beta (NF-kB), además del receptor activador del NF-kB (RANK), el cual interactúa con la molécula ligando de RANK (RANKL) que se produce y se expresa en preosteoblastos y

osteoblastos. La interacción entre RANKL y su receptor RANK produce la diferenciación y activación de osteoclastos aumentando la reabsorción ósea. Así, para regular la resorción ósea, los efectos del RANKL tanto *in vivo*, como *in vitro* son inhibidos por la osteoprotegerina (OPG), proteína circulante producida por los osteoblastos y pre-osteoblastos perteneciente a la superfamilia de los receptores de TNF. Otra molécula relevante que indicada la activación de los osteoclastos es la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), la cual permite la desfosforilación de las proteínas. Esta actividad enzimática es aprovechada para identificarlos tanto *in vivo* como *in vitro* (Ross, 2015; Tresguerres Hernández-Gil *et al* 2016).

En relación con su estructura, los osteoclastos tienen 3 especializaciones en la membrana: *la región basolateral, un borde en cepillo y una zona clara*. La región basolateral está involucrada en la exocitosis del material digerido. En contraste, en el borde en cepillo tiene lugar la reabsorción ósea. En este sitio, el pH es ácido debido a la liberación de iones (H⁺) generados por la anhidrasa carbónica II y enzimas proteolíticas como colagenasas, metaloproteasas, catepsina K, glucuronidasas etc., implicadas en la solubilización de la matriz orgánica primero y de la mineral después proceso que resulta en la resorción ósea. En relación a la zona clara, ésta se caracteriza por poseer una alta expresión de microfilamentos e integrinas que sirven de anclaje a la matriz. Es de notar que las integrinas de los osteoclastos, particularmente la $\alpha\text{V}\beta\text{3}$, reconoce la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) existente en la colágena de la matriz extracelular uniéndose de manera estrecha a ella. Esta unión contribuye, entre otros mecanismos, a la formación de un sellado hermético en la región del borde en cepillo formando una depresión poco profunda llamada laguna de Howship o laguna de reabsorción (Welsch, 2008; Fortoul 2010; Ross, 2015).

MATRIZ DEL TEJIDO ÓSEO

Matriz orgánica

La matriz orgánica constituye el 35% del hueso, está formada por colágena, principalmente del tipo I, con pequeñas cantidades del tipo III, V, XI, XII y XIII, constituyendo el 90% de la matriz orgánica (Welsch, 2008).

La formación de la colágena que se da en el interior de las células comprende la traducción de dos tipos de cadenas de péptidos que se sintetizan en los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso (RER), las llamadas cadenas alfa-1 y alfa-2 llamadas procadenas α o moléculas de preprocolágena que contienen propéptidos globulares grandes en los extremos aminoterminal y carboxilo terminal. Los polipéptidos recién sintetizados, como todas las proteínas de exportación, se localizan en el retículo endoplasmático rugoso (RER) donde se llevan

a cabo las siguientes modificaciones:

- Escisión del péptido señal amino terminal.
- La hidroxilación de los aminoácidos lisina y prolina, proceso dependiente de ácido ascórbico (vitamina C) como cofactor.
- Adición de grupos sacáridos O-ligados a algún residuo de hidroxilisina (glucosilación) y sacáridos N-ligados a las dos posiciones terminales.
- Formación de la estructura globular en el extremo carboxiterminal, la cual se estabiliza gracias a los enlaces disulfuro, de manera que asegura la alineación correcta de las 3 cadenas.
- Formación de la triple estructura helicoidal con dos cadenas de alfa-1 y una cadena de alfa-2 a través de enlaces de hidrógeno y disulfuro intracatenarios e intercatenarios.
- Estabilización de la molécula helicoidal triple mediante la unión de la proteína chaperona hsp47, dando como resultado a la procolágena. La procolágena es transportada al aparato de Golgi, donde se empaqueta y es secretada por exocitosis a la matriz extracelular.

Una vez fuera de la célula, la procolágena peptidasa asociada con la membrana celular, escinde los extremos no helicoidales de la procolágena para formar una molécula de colágeno maduro. Posteriormente, las moléculas de colágena se alinean para formar las fibrillas de colágena, a través de reticulación covalente por la lisil oxidasa que une residuos hidroxilisina y lisina. Finalmente, las múltiples fibrillas de colágeno se asocian entre sí para formar las fibras de colágeno (Ross, 2015; Tresguerres Hernández-Gil *et al* 2016).

Por otro lado, el 10% restante de la matriz orgánica del hueso contiene otras proteínas (no colágenas) formadas por:

- *Proteoglicanos*: están formados por una proteína central con cantidades diversas de cadenas laterales de glucosaminoglicanos como: el ácido hialurónico, condroitín sulfato y queratán sulfato. Son responsables de la fijación de factores de crecimiento, además de inhibir la mineralización y contribuir a la resistencia de compresión.
- *Glucoproteínas*: intervienen en la adhesión de las células óseas y las fibras colágenas a la sustancia fundamental mineralizada. Son varios los ejemplos de este tipo de glucoproteínas, no obstante algunas de las más importantes son:
 - ❖ La *osteonectina* es una glucoproteína con gran afinidad por la colágena tipo I, por el calcio y por la hidroxiapatita. Representa el 25% de las proteínas no colágenas e interviene en la regulación de la adhesión celular entre la matriz y las células, por lo que es necesaria para la mineralización ósea.

- ❖ La *fosfatasa alcalina* es una enzima que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos, necesario para la mineralización. Existen varias isoenzimas y, entre ellas la ósea, que se han considerado un buen marcador de la actividad osteoblástica.
- ❖ *Proteínas con el tripéptido RGD*, también llamadas SIBLINGS (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein) son fundamentalmente cinco: osteopontina, sialoproteínas óseas, fibronectina, trombospondina y vitronectina. Son glucoproteínas fundamentales en los procesos de remodelado y regeneración óseos, poseen una secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) que es reconocida por las integrinas de los osteoblastos y los osteoclastos ($\alpha V\beta 3$, entre otras). También actúan como receptores de superficie de las células óseas permitiendo la adhesión de las células a la matriz extracelular y activando señales de proliferación o diferenciación celular.
- ❖ Otras proteínas procedentes del plasma se encuentran en la matriz orgánica ósea. Son la *albúmina* y la *$\alpha 2$ -SH-glicoproteína*, probablemente relacionadas con la incorporación del calcio a la matriz osteoide.
- *Proteínas dependientes de vitamina K osteoespecíficas*: incluida la osteocalcina, que captura el calcio de la circulación estimulando a los osteoclastos para el remodelado óseo; la proteína S, que contribuye a la eliminación de las células que sufren apoptosis y la proteína Gla de matriz (MGP), que participa en el desarrollo de las calcificaciones vasculares.
- *Factores de crecimiento y citocinas* como: el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor de necrosis tumoral α ($TNF\alpha$), el factor transformante β ($TGF-\beta$), los factores de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), las proteínas morfogénicas óseas (BMP), la esclerostina (antagonista de BMP) e interleucinas (IL-1 e IL-6).

La matriz orgánica ósea juega un papel importante en el tejido óseo, ya que la ausencia de cualquiera de las proteínas que la constituyen lleva a la aparición de enfermedades (Welsch, 2008; Fortoul 2010; Ross, 2015).

Matriz Inorgánica

El componente mineral del hueso representa el 65% del peso óseo y realiza dos funciones esenciales: sirve de reserva de iones y confiere al hueso la mayor parte de su rigidez. Aproximadamente, el 90% del calcio del cuerpo, el 85% del fósforo y entre un 40 y un 60% del total del sodio y magnesio del cuerpo se encuentra en los cristales minerales óseos.

Esta fracción mineral está formada por calcio, fosfato y carbonato, el cual es considerado químicamente como fosfato cálcico e hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Es de notar que la hidroxiapatita no se encuentra en forma pura, sino en combinación con carbonato, citrato, magnesio, sodio, flúor y estroncio. Entre los cristales de hidroxiapatita, existen espacios ocupados por mucopolisacáridos, iones y líquido intersticial, además de una capa iónica cuya función es la de hidratar la superficie, constituida por carbonato, magnesio, sodio, citrato, etc., donde se lleva a cabo el intercambio iónico entre los minerales y el agua. En relación con la regulación de la mineralización, las proteínas adhesivas la inducen, mientras que los proteoglicanos, magnesio, ATP y pirofosfato la inhiben (Welsch, 2008; Fortoul 2010; Ross, 2015).

OSIFICACIÓN

Es el proceso mediante el cual se lleva a cabo la síntesis de hueso a nivel embrionario. Existen dos tipos de osificación: intramembranosa y endocondral como a continuación se resume.

Osificación intramembranosa

En la osificación intramembranosa, característica de la bóveda del cráneo, el mesénquima vascular condensado forma una membrana donde se depositan bandas de matriz orgánica no mineralizada, las cuales se unen formando regiones de matriz ramificadas, mientras que las células que originaron la matriz se encuentran en lagunas rodeadas de matriz y se comunican con el exterior por medio de canaliculos. Posteriormente, células mesenquimatosas migran hacia la zona de osificación, donde se acumulan en la superficie de las espículas y trabéculas formadas anteriormente, se diferencian directamente en osteoblastos, depositan matriz osteoide no mineralizada, y depositan fosfato cálcico. Los osteoblastos atrapados en su laguna se convierten en osteocitos, y se organizan en láminas concéntricas para formar osteonas. Grupos de osteoblastos forman los centros de osificación y la matriz producida en estos se calcifica con rapidez, mientras que las espículas se van engrosando y crecen en todas las direcciones (Welsch, 2008).

El primer hueso formado es el esponjoso (trabeculado) y sus espacios se rellenan con mesénquima y vasos sanguíneos, que más tarde se modifican para formar a la médula ósea. El depósito continuo de hueso dentro de los espacios produce un hueso (denso) compacto, que da lugar a las láminas de hueso compacto de las láminas, externa e interna de los huesos del cráneo; el hueso interpuesto entre las láminas externa e interna forma el diploe.

Algunos ejemplos de osificación membranosa son: los huesos planos del cráneo, parte de la mandíbula y la mayor parte de la clavícula (Ross, 2015).

Osificación endocondral

En la osificación endocondral, la cual es característica de los huesos largos de las extremidades, el mesénquima forma inicialmente un molde de cartílago hialino que posteriormente será reemplazado por hueso. El molde cartilaginoso está cubierto por pericondrio y crece tanto de forma intersticial (crecimiento desde el interior de la matriz ósea), como por aposición (crecimiento desde el pericondrio). En un hueso largo, el molde de cartílago asemeja la forma del futuro hueso, presenta una porción central cilíndrica y larga llamada la diáfisis, y contiene dos extremos voluminosos, las epífisis. Los centros de osificación primarios se localizan en las diáfisis en donde los condrocitos se hipertrofian y producen fosfatasa alcalina, lo cual promueve el depósito de calcio en la matriz extracelular; a continuación los condrocitos mueren y la matriz se calcifica dando lugar a la formación de periostio. El cartílago hipertrofiado es penetrado por vasos, células sanguíneas y tejido con capacidad osteogénica (invasión vascular). De estos brotes se diferencian osteoblastos, que se adhieren a la superficie de la matriz cartilaginosa muerta, formando al tejido óseo y dando origen a los centros primarios de osificación. A partir del centro de la diáfisis, el collar óseo subperióstico se engrosa y se extiende hacia los extremos (epífisis) del molde cartilaginoso. Al mismo tiempo, la resorción del cartílago y la formación de hueso también avanzan hacia los extremos del molde. Este hueso central es transitorio y pronto es removido dando lugar al canal medular (Welsch, 2008; Fortoul 2010; Ross, 2015).

Después, en las epífisis del molde de cartílago aparecen los centros secundarios de osificación (disco epifisiario), mientras que las masas cartilaginosas epifisarias comienzan a sustituirse por hueso, excepto en la zona de la futura superficie articular, donde persiste una capa de cartílago y el disco epifisiario localizado entre la diáfisis y cada epífisis, que permite el crecimiento del hueso en longitud. Entre estos dos extremos se encuentran varias zonas intermedias desde el lado epifisiario del disco y hacia el diafisiario, distinguiéndose las siguientes zonas:

- *Reposo o reserva*: formada por cartílago hialino.
- *Proliferación*: caracterizada por numerosas mitosis. Las células se disponen en hileras paralelas al eje longitudinal del modelo cartilaginoso.
- *Hipertrofia*: las células aumentan de volumen y adoptan forma cuboidal.
- *Calcificación*: en esta zona la matriz cartilaginosa se calcifica.

- *Resorción*: las células cartilaginosas mueren, al igual que las placas más finas de matriz calcificada. Las placas de matriz más gruesas persisten y dan aspecto de panal.
- *Osificación*: los osteoblastos se disponen en la superficie de las láminas de matriz cartilaginosa calcificada muerta y comienzan a depositar matriz ósea sobre estas.

Existe un equilibrio entre la formación y la reabsorción del hueso durante toda su remodelación ulterior y como consecuencia de este proceso el canal medular se alarga. En relación con el crecimiento longitudinal, el hueso depende de la proliferación celular de los condrocitos de la unión diáfisis-epífisis. Cuando el crecimiento longitudinal del hueso cesa, el disco epifisario es reemplazado por tejido óseo, la diáfisis y la epífisis se mantienen unidas y se forma la metáfisis. El fémur, húmero, esternón, peroné, y costillas, son ejemplos de este tipo de osificación. En el caso de las extremidades la osificación comienza al final del periodo embrionario y al nacer la mayoría de las diáfisis ya han sido calcificadas (Welsch, 2008; Fortoul 2010; Ross, 2015).

PROCESO DE MINERALIZACIÓN

La mineralización fisiológica de los tejidos duros, como el hueso, es un proceso altamente regulado por las células y la matriz orgánica, en donde intervienen hormonas y factores de crecimiento como:

Hormonas tiroideas: Son producidas por la glándula tiroides, estimulan la síntesis de la matriz osteoide por los osteoblastos y su mineralización, favoreciendo la síntesis del factor de crecimiento parecido a insulina (IGF-I). No solo esta hormona estimula la síntesis de matriz, también produce un efecto contrario, estimulando la reabsorción ósea al aumentar el número y función de los osteoclastos.

Parathormona u Hormona Paratiroidea (PTH): Producida en las glándulas paratiroideas, es conocida como la hormona hipercalcemiente. dado que induce el aumento de la actividad de los osteoclastos favoreciendo la reabsorción ósea. La secreción de la PTH está controlada por las concentraciones de Ca^{++} en sangre.

Calcitonina: Producida en las células C o parafoliculares de la tiroides, inhibe la reabsorción ósea, al reducir el número y la actividad de los osteoclastos; disminuye el movimiento de calcio desde la matriz ósea al líquido extracelular reduciendo con ello la reabsorción ósea; además incrementa el movimiento de fósforo del líquido extracelular al hueso para el depósito de matriz.

1,25(OH)₂ vitamina D3 o calcitriol: Hormona esteroidea que favorece la absorción intestinal de calcio y fosfato; estimula la síntesis de la fosfatasa alcalina (ALP) y ATPasa Ca-dependiente, por tanto está relacionada de manera indirecta con la mineralización ósea.

Andrógenos: Tienen efecto sobre los osteoblastos, además de promover su diferenciación, estimulan la producción de colágeno e incrementan la expresión del ARNm del pro-colágeno tipo I. El efecto de los andrógenos sobre la proliferación y diferenciación de los osteoblastos parece ser debido a la producción local del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) o por aumento de la sensibilidad a la acción mitogénica del factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) y de la IGF11. El TGF- β estimula la actividad de la fosfatasa alcalina y la producción de colágeno (Osuna 2016).

Estrógenos: La disminución de la reabsorción ósea es la acción más importante de los estrógenos sobre el remodelado óseo en el humano. Se ha postulado que la unión de los estrógenos a sus receptores en los osteoblastos aumentan los niveles de osteoprotegerina (OPG), proteína producida por los osteoblastos que inhibe la reabsorción, por lo que podrían jugar un papel importante en la regulación de la osteoclastogénesis. Por otro lado, los estrógenos favorecen la formación ósea al aumentar el número y función de los osteoblastos (Osuna 2016).

Progesterona: Aumenta la actividad de los osteoblastos.

Glucocorticoides: Inhiben la síntesis de IGF-I por los osteoblastos, y suprimen directamente a la proteína morfogénica de hueso tipo 2 (BMP-2) y el Cbfa1, factores que intervienen en la osteoblastogénesis cuando son suministrados en dosis altas.

Hormona de Crecimiento (GH): Es una proteína secretada por la adenohipófisis y actúa directamente sobre los osteoblastos estimulando su actividad, lo que produce un aumento en la síntesis de colágena, osteocalcina y ALP.

El proceso de mineralización de la matriz ósea orgánica parece ser iniciado por los osteoblastos mediante la formación de vesículas que están limitadas por una membrana, dentro de ellas se forman cristales de hidroxapatita que posteriormente son secretados hacia la matriz extracelular en forma de pequeñas vesículas matriciales (50-250 nm). Estas vesículas son ricas en ALP, que se secreta sólo durante el periodo en el que la célula produce matriz ósea.

Para que la mineralización normal continúe es necesario el equilibrio entre los niveles de fosfato inorgánico (Pi) y de pirofosfato inorgánico (PPi) extracelular. El PPi antagoniza la habilidad del Pi para inducir la formación de cristales de calcio y formar hidroxapatita, por lo tanto suprime la producción de cristales (Welsch, 2008; Fortoul 2010; Ross, 2015).

2.2 INGENIERÍA DE TEJIDOS PARA REGENERACIÓN ÓSEA

El término Medicina Regenerativa es un campo emergente interdisciplinario de investigación y de aplicaciones clínicas enfocadas a la reparación, reposición o regeneración de células, tejidos u órganos para restaurar su función después de alteraciones variadas como los defectos congénitos, enfermedad o incluso trauma. La Medicina Regenerativa utiliza una combinación de abordajes tecnológicos que van más allá del tradicional trasplante y terapias de reemplazo. Estos abordajes pueden incluir, el uso de células troncales, moléculas solubles, ingeniería genética y terapia celular avanzada. El término Medicina Regenerativa fue acuñado en 1998 para describir el objetivo unificador de: *Trasplante de Células, Ingeniería de Tejidos y la Transferencia Nuclear*; no obstante, es frecuentemente confundido y nombrado como Ingeniería de Tejidos. Es importante hacer notar que no son sinónimos, la Ingeniería de Tejidos es un proceso previo que requiere de células, las cuales son sembradas y cultivadas en un andamio biocompatible y biodegradable, que contiene los factores de crecimiento necesarios para estimular el desarrollo de tejidos y órganos, pretendiendo que sean lo más semejante al tejido a sustituir. El término Ingeniería de Tejidos ha sido usado desde 1985, debido a que los investigadores combinaron los campos científicos de la ciencia de dispositivos y materiales con la biología celular (Kim KH, 2011; Fang YL *et al.*, 2014). Por lo tanto, la ingeniería de tejidos es un área reciente que se sustenta en conocimientos de bioingeniería, biología celular y tisular, biomateriales e inmunología con el objetivo de inducir procesos de regeneración de tejidos que puedan sustituir a aquellos tejidos u órganos que han sido dañados o que están lesionados (Sastre *et al.*, 2000; Jha *et al.*, 2011; Kavya KC *et al.*, 2013).

Con relación al tejido óseo, los defectos causados por trauma, resección de tumores, degeneraciones patológicas o congénitas, además de fracturas no consolidadas; han llevado a que éste tejido sea el segundo más trasplantado en humanos, por lo que los esfuerzos en ingeniería de tejidos se han centrado en el desarrollo de constructos óseos que pueden ser empleados para su implantación (Ben-David *et al.*, 2011; Jarquín *et al.*, 2016).

En medicina regenerativa e ingeniería de tejidos hay tres elementos indispensables para poder fabricar un tejido: moléculas como citocinas y factores de crecimiento, células troncales y o progenitoras y andamios o soportes construidos con diferentes materiales.

BIOMATERIALES

Uno de los puntos clave en la regeneración de órganos es desarrollar estructuras tridimensionales que sustituyan parte del órgano dañado o actúen como vehículo para transportar células y moléculas a lugares concretos del organismo. Estos soportes se construyen con materiales distintos en función de la estructura del órgano o tejido donde se vayan a implantar. Se fabrican implantes metálicos, de cerámica, de polímeros naturales o sintéticos y compuestos (Ben-David *et al.*, 2011; Jarquín *et al.*, 2016). En la actualidad, los soportes que más se utilizan son de naturaleza polimérica y en todos los casos tienen que cumplir una serie de requisitos:

1. Tienen que ser **compatibles** con el organismo donde se van a introducir, es decir, no generar rechazo ni daños.
2. Tienen que tener una determinada **vida media** para desarrollar su tarea. En el caso de las prótesis que reemplazan parte de un órgano, el soporte debe ser permanente, mientras que en otros casos puede tener una duración limitada al tiempo necesario para realizar su función, el cual puede ser de minutos o máximo en horas. En este último caso, es común construir materiales biodegradables que poco a poco se van degradando o disolviendo, por lo que en un tiempo determinado desaparecen del organismo. Tienen que aportar las condiciones necesarias para realizar bien la función a la que van destinados.

Los materiales deben ser aplicados específicamente y producir una adecuada respuesta al huésped, es decir, el material debe ser biocompatible, término acuñado en 1987, por la Sociedad Europea de Biomateriales. A los materiales que son biocompatibles se les conoce como biomateriales los cuales son usados en el servicio de la medicina para interactuar con los sistemas biológicos induciendo una actividad biológica específica, con el objetivo de poseer un uso terapéutico: en el tratamiento de una lesión o una enfermedad. En algunas ocasiones, se utilizan biomateriales para el diagnóstico de alguna patología o bien para identificar los niveles de algunas moléculas en sangre, i.e. el nivel de glucosa en sangre. Por lo que, ya sea un uso terapéutico o diagnóstico, el biomaterial siempre estará en contacto con fluidos biológicos y debe poseer propiedades que satisfagan las exigencias de esa aplicación (Barroso e Ibáñez 2014).

Es importante mencionar que de acuerdo a su naturaleza química y textura, los biomateriales pueden poseer mayor biocompatibilidad que otros, dado que se integran más fácilmente al cuerpo y no inducen inflamación (Anitua *et al.*, 2010). Lo anterior es relevante, dado que los materiales deben ser inocuos durante toda la vida del paciente en donde fue

aplicado. Algunas veces, se forman productos a partir de reacciones de los biomateriales con los fluidos corporales, no obstante estos productos deben ser bien tolerados, es decir, no tóxicos, por los tejidos circundantes de tal manera que la función del órgano o tejido no sea afectada (Ben-David *et al.*, 2011; Jarquín *et al.*, 2016).

Como ya se había mencionado, podemos encontrar diferentes tipos de biomateriales, por lo que se clasifican en:

- Metales y aleaciones

Los metales tienen una estructura cristalina, donde los elementos constituyentes están enlazados a través de enlaces metálicos. En general son rígidos, dúctiles o maleables, poseen una buena conductividad térmica y eléctrica, sus átomos tienen poca energía cinética, son deformables con la temperatura o al aplicar una fuerza externa, además de tener una resistencia mecánica relativamente alta.

Por otro lado, las aleaciones son materiales obtenidos de diferentes metales con características metálicas, en general superan o mejoran las propiedades de los metales que las forman de manera individual.

La mayoría de los biometales o biomateriales metálicos son considerados como casi inertes, ya que su actividad biológica referente a formar una interfase hueso-implante es menor a otros biomateriales. Los biometales son utilizados en implantes o soportes en donde se necesita soportar cargas, debido a su alta resistencia mecánica. Por otro lado, también se utilizan en aplicaciones cardiovasculares (stents). La biocompatibilidad de los biometales, relacionada sólo con el material, está determinada por la toxicidad, o generación de iones de los metales individuales o en aleación; reacciones químicas como corrosión y características estructurales como rugosidad, tamaño de grano y porosidad (Callister 1996; Barroso e Ibáñez 2014).

- Cerámicos y vidrios

La palabra cerámico viene del griego “*keramicos*” que significa “*material cocido*”. De manera general estos materiales están compuestos por cristales inorgánicos de naturaleza arenácea o rocosa y están formados por metales y no metales mediante enlaces iónicos. Entre sus diversas características, destacan que son duros pero frágiles, tienen baja tenacidad y ductilidad, son buenos aislantes eléctricos y térmicos, poseen resistencia estructural y baja densidad. En general tienen altas temperaturas de fusión y son estables termodinámicamente, es decir, a altas temperaturas no modifican su estructura y conservan sus propiedades. Además, poseen alta resistencia a los ataques químicos, por ello son resistentes a la corrosión. Por otro lado, tienen la característica de ser materiales porosos.

El vidrio es un material amorfo cerámico, es decir, no tiene arreglos regulares. Los vidrios tienen un elevado punto de fusión, por lo tanto sus cambios dimensionales durante calentamiento y enfriamiento son pequeños. Ejemplos de biovidrios o biocerámicos empleados en aplicaciones biológicas son la: hidroxiapatita, la zirconia, la alúmina 1 y 2, biovidrios etc (Callister 1996; Barroso e Ibáñez 2014).

▪ Polímeros

Los polímeros son estructuras formadas por varias unidades repetidas llamadas “meros”, unidas mediante enlaces químicos y se producen por un proceso denominado polimerización. Los polímeros son macromoléculas orgánicas estructuradas en cadenas con diferentes pesos moleculares frecuentemente constituidos por moléculas derivadas del carbono. Algunas de las características de los polímeros son proporcionar buen aislamiento térmico y una buena resistividad eléctrica, no obstante, cada polímero posee propiedades únicas (Callister 1996; Barroso e Ibáñez 2014). Los polímeros pueden clasificarse de acuerdo a varias variables como a continuación se menciona:

- *Tipo de cadena*
 - *Lineal*
 - *Ramificados*
 - *Entrecruzados*
 - *Estrella*
 - *Dendrímero*
- *Estructura*
 - *Cristalinos*
 - *Amorfos*
- *Origen*
 - *Natural*
 - *Sintético*
- *Composición o tipo de mero*
 - *Homopolímero*
 - *Monómero*
 - *Copolímero*
 - * *Copolímero aleatorio*
 - * *Copolímero en bloques*
 - * *Copolímero de injerto*
- *Estereoregulación (tipo de unión en el espacio)*
 - *Isotáctico*
 - *Sindistáctico*
 - *Atáctico*
- *Peso molecular*
 - *Hemicoloides*
 - *Mesocoloides*
 - *Eucoloides*

- *Materiales compuestos*

Los materiales compuestos se forman cuando dos o más materiales se mezclan para obtener un biomaterial con más propiedades que las encontradas en los componentes de la mezcla por separado, por lo que las características de los materiales compuestos dependen de las propiedades de los materiales que lo constituyen así como de su distribución e interacción entre ellos. Generalmente se tiene por resultado materiales de características excepcionales, utilizados con gran auge en las diferentes industrias (Callister 1996; Barroso e Ibáñez 2014).

BIOMATERIALES EN TEJIDO ÓSEO

Los avances experimentados en los últimos años sobre la manipulación, tratamiento y conservación de tejidos óseo permiten ampliar las posibilidades de disponibilidad de injertos de tejidos a partir de donantes humanos, ya sea vivos o cadavéricos, conocidos como homoinjertos; sin embargo el éxito obtenido es limitado, debido, entre otros factores, a las escasas donaciones de tejido y a las múltiples disputas éticas. Por otro lado, a pesar de que los injertos de tejido autólogo o autoinjerto no induce el desarrollo de rechazo inmunológico, sí poseen importantes limitaciones en relación con su disponibilidad, la morbilidad en la zona de donde se obtiene el injerto, inducción de infecciones y en ocasiones resorción ósea, además del compromiso biomecánico en el sitio donante. Así, se ha optado por otra alternativa que ha proporcionado buenos resultados en algunas aplicaciones, la cual es la utilización de heteroinjertos o xenoinjertos, constituidos por tejidos u órganos procedentes de especies animales, por ejemplo los de origen bovino, los cuales han sido empleados como material de relleno y reemplazo de hueso humano (Sastre *et al.*, 2000).

Por lo anterior, la evolución de los biomateriales en tejido óseo en los últimos 60 años se ha dado a través de 3 diferentes generaciones, con el objetivo de buscar nuevas alternativas de tratamiento (Navarro M *et al.*, 2008; Pérez RA *et al.*, 2012).

Biomateriales de la primera generación: Son materiales bioinertes con bajo desarrollo en una respuesta inmunológica de rechazo. Fueron diseñados para aplicaciones específicas en tejido óseo como implantes para cadera, clavos para procesos de ferulización etc, esto debido a sus propiedades físicas. El titanio es uno de estos materiales, fue empleado por primera vez en 1940 como sustituto óseo. Otros ejemplos son las aleaciones de Níquel-Titanio (NiTi), las cuales aparecieron desde los 60s; las biocerámicas de primera generación como la alumina, la zirconia y algunas cerámicas porosas; las siliconas de goma, resinas acrílicas, poliuretano, polipropileno y el polimetilacrilato. Una característica común a todos los biomateriales de

primera generación, fue que después de su implantación en el organismo, una capa de proteínas inespecíficas se acumulaba sobre su superficie, induciendo en algunas ocasiones fibrosis y en otras rechazo inmunológico (Pérez RA *et al.*, 2012).

Biomateriales de segunda generación: aparecieron entre 1980 y 2000 y fueron definidos como materiales bioactivos y biodegradables, con la habilidad de interactuar con el ambiente biológico para incrementar la respuesta celular. Los más comunes han sido los cerámicos como hidroxiapatita y beta-fosfato tricálcico, caracterizados por ser biocompatibles y osteoconductivos. Es de notar que ningún metal empleado en ortopedia es bioactivo por sí mismo, sin embargo hay 2 formas de inducir esta bioactividad: la primera consiste en cubrirlo con una superficie cerámica bioactiva y la segunda consiste en modificar químicamente su superficie con otro material bioactivo. Así, algunos cerámicos han sido empleados con el propósito de inducir bioactividad en el titanio.

Existen otros polímeros biodegradables de origen natural o sintético como el poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), polidioxano (PDS), poli-E-caprolactona (PCL), quitosán, ácido hialurónico, entre otros, que han sido utilizados en aplicaciones ortopédicas, para la fabricación de suturas, barras, tornillos, sujetadores, etc. (Navarro M *et al.*, 2008; Pérez RA *et al.*, 2012).

Biomateriales de tercera generación: son todos aquellos materiales capaces de estimular una respuesta celular específica y tienen la capacidad de modificar el comportamiento celular, estimulando la adhesión celular y la proliferación. Estos biomateriales se han funcionalizado de diferentes maneras, por ejemplo: se han añadido secuencias de péptidos miméticos de la matriz extracelular que se unen a ligandos específicos de las células, liberan factores de crecimiento o medicamentos que controlen el comportamiento celular a través de la mecanotransducción (Navarro M *et al.*, 2008; Pérez RA *et al.*, 2012).

HIDROGELES

Los hidrogeles son compuestos inteligentes porque pueden modular sus propiedades superficiales y asemejarse al tejido a sustituir ya sea químicamente a través de moléculas de la matriz extracelular o gracias a sus propiedades físicas como la rigidez; asimismo pueden ser usadas para la liberación de moléculas terapéuticas externas como medicamentos, proteínas o genes (Pérez RA *et al.*, 2012).

Los hidrogeles han sido ampliamente estudiados como una alternativa para el relleno de defectos óseos, fracturas de huesos largos y artroplastías entre otras, permitiendo la formación de nuevo tejido debido a que pueden promover la síntesis de proteínas de matriz extracelular.

Los hidrogeles pueden ser de origen natural como colágena, gelatina, alginato, quitosán, ácido hialurónico o heparina; de origen sintético como poliéster, polietilenimina (PEI) o polietilenglicólico (PEG); semisintéticos como PEG combinado con colesterol o polímeros con material inorgánico como PEG con hidroxiapatita (Nguyen and Alsberg 2014; Gibbs *et al.*, 2016; Poveda-Reyes *et al.*, 2016).

Los hidrogeles elaborados con componentes naturales de la matriz extracelular presentan algunas ventajas tal como la buena biocompatibilidad con el tejido, propiedades viscoelásticas y estructurales semejantes a la matriz extracelular, además de fácil degradación por enzimas presentes en el organismo. Otra ventaja es la mejora de la consistencia y habilidad para modificar sus propiedades como la degradación, además de facilitar la unión celular (Gibbs *et al.* 2016). Sin embargo, suelen ser inconsistentes en la hidratación y en sus propiedades elásticas, su tiempo de degradación es muy corto y poca afinidad para encapsular factores de crecimiento (Tsaryk *et al.*, 2015, Gibbs *et al.*, 2016).

En general, los hidrogeles son capaces de mimetizar la matriz extracelular facilitando la adhesión, proliferación, diferenciación y síntesis de nueva matriz. Las proteínas transmembranales como las integrinas son esenciales para el anclaje de las células a los hidrogeles, lo cual da como resultado que las proteínas estructurales y de señalización sean reclutadas en el espacio intracelular formando un complejo de adhesión focal, implicado en un cambio estructural y molecular en las células. En el caso de hidrogeles no adhesivos, éstos suelen combinarse con péptidos como Arg-Gly-Asp (RGD), Asp-Gly-Glu-Ala (DGEA) o Pro-His-Ser-Arg-Asn (PHSRN) que promuevan la unión celular mediante integrinas, colágena, gelatina, ácido hialurónico, etc. Los hidrogeles también permiten la difusión de macromoléculas a través de todo su espesor debido a que tienen alta afinidad al agua, asimismo poseen una estructura porosa que se expande cuando se hincha, por lo tanto pueden ser utilizados como liberadores de agentes activos (Pérez RA *et al.*, 2012).

ENTRECRUZAMIENTO DE HIDROGELES

La mayoría de los hidrogeles necesitan ser entrecruzados para aumentar su rigidez y para evitar su pronta degradación en el cuerpo por hidrólisis o digestión enzimática. Cabe señalar que si los hidrogeles no son lo suficientemente rígidos para balancear las fuerzas, tienen pocas posibilidades de formar fibras de estrés dentro de las células, en contraste con aquellos hidrogeles rígidos donde se da formación de abundantes fibras de estrés, las cuáles, son características de las células de tejido óseo. Es importante enfatizar que la diferencia en el arreglo del citoesqueleto (distribución de las fibras de estrés o relacionados con la formación

de fibras de estrés) está directamente relacionados con la rigidez del material y el comportamiento celular, incluyendo movilidad, crecimiento y viabilidad (Pérez RA *et al.*, 2012; Nava MM *et al.*, 2015; Poveda-Reyes *et al.*, 2016).

Los diversos métodos para la construcción de andamios de hidrogeles se dividen en: el entrecruzamiento físico que controla la liberación de sustancias activas y el entrecruzamiento químico que relaciona 2 o más polímeros entre sí con factores de crecimiento o adhesión.

Entrecruzamiento físico

1. *Autoensamblaje de polímeros en respuesta a la temperatura*: Es uno de los métodos más usados. El Pluronic es un ejemplo característico. Se trata de un polímero que en solución acuosa a temperatura ambiente se autoensambla en forma de micelas y posteriormente se gelifica como resultado de la asociación de las micelas dentro del cuerpo; éste polímero no tiene la capacidad de degradarse.
2. *Autoensamblaje de polímeros en respuesta a pH y temperatura* : Son los denominados polímeros iónicos sensibles a pH y a temperatura. Pueden interactuar iónicamente con factores bioactivos iónicos lo cual induce el cambio de fase acuoso a gel. La temperatura y el pH también pueden inducir la formación de geles. Oligómeros aniónicos de sulfametazina (OSM) son ejemplo de este tipo de geles.
3. *Autoensamblaje de polímeros basados en complejos de inclusiones*: Este tipo de hidrogeles se forma mediante la mezcla de polímeros y ciclodextrinas, las cuales son oligosacáridos cíclicos compuestos de unidades de glucosa.
4. *Autoensamblaje de péptidos*: Péptidos o proteínas se colocan dentro de la solución que formará al hidrogel, logrando con ello emplearlos en áreas biomédicas como hidrogeles de liberación controlada.

Entrecruzamiento químico

1. *Fotoentrecruzamiento*: Se induce a través de la exposición del polímero a la luz visible o ultravioleta (UV) en presencia de compuestos fotosensibles llamados fotoiniciadores. La luz UV descompone a los fotoiniciadores, como el metacrilato o el acrilato, lo cual induce la generación de radicales libres dando lugar a un hidrogel fotoentrecruzado con baja toxicidad. Ejemplo de ello es el hidrogel sintético de poli(alfa-ácido hidrox)-PEG-poli(alfa-ácido hidrox) copolímero tribloque con terminaciones de grupos acrilato.
2. *Adición Michael*: La reacción de Michael se forma entre los grupos tiol y metacrilato/acrilatos o grupos vinil, ocurre rápidamente en condiciones fisiológicas sin reaccionar con grupos aminos de proteínas. Ejemplo de lo anterior es el hidrogel

formado por la mezcla de PEG-acrilato con PEG-ditiol a una proporción estequiométrica de 1:1 y a pH fisiológico, lo cual ocurre en contacto con tejido vivo, moléculas biológicas y células, permitiendo la liberación de factores de crecimiento.

3. *Formación de Disulfuros*: Son los polímeros con grupos tiol o tiomeros que pueden formar uniones disulfuro inter y/o intramolecular a pH 5. Las uniones se forman a través de la oxidación de grupos tiol en aire o agentes oxidantes, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peryodato de sodio ($NaIO_4$), persulfato de amonio ($(NH_4)_2S_2O_8$), hipoclorito de sodio ($NaOCl$) o borohidrato de sodio ($NaBH_4$).
4. *Reacción con la base de Schiff*: Es una reacción de condensación de aldehído con grupos amina sin utilizar un catalizador. Los polisacáridos son frecuentemente oxidados por reaccionar con $NaIO_4$ para crear un grupo aldehído dentro de su misma cadena.
5. *Entrecruzamiento de enzimas*: Es una excelente estrategia para el entrecruzamiento químico, porque es muy específica y se puede inducir en medio acuoso en condiciones fisiológicas. Entre los agentes entrecruzantes están: el formaldehído, glutaraldehído, carbodiimida soluble en agua, compuestos diepoxi, diisuccinatos y dextrán dialdehído. Sin embargo, en vista de la toxicidad de los agentes entrecruzantes, la carbodiimida soluble en agua se usa preferentemente debido a que no se incorpora en la estructura entrecruzada, simplemente cambia a un derivado de urea soluble en agua que tiene muy baja citotoxicidad. El 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) es un entrecruzante carbodiimida que a diferencia de otros, como el glutaraldehído, no forma parte del producto final después de la reacción, por lo tanto, es menos citotóxico. El EDC reacciona con los grupos hidroxilo de los biopolímeros para formar una O-urea activa, la que reacciona con grupos amino para formar un enlace amida y liberar isourea. Este último es un subproducto de la reacción, soluble en agua que puede ser retirado fácilmente.
6. *Otros métodos químicos de entrecruzamiento*: La genipina es un producto natural aislado de la gardenia puede entrecruzar a través de grupos amino funcionales de macromoléculas para formar hidrogeles biocompatibles.

El proceso de entrecruzamiento enzimático para los polímeros de origen natural es fácil de realizar, debido a que poseen grupos funcionales de manera natural que permiten la unión entre ellos o con proteínas adhesivas a través de la formación de enlaces covalentes (Nguyen and Alsberg 2014; Poveda-Reyes *et al.*, 2016; Jarquín *et al.*, 2016).

MATRIZ EXTRACELULAR

Los tejidos conjuntivos están formados principalmente por células y una matriz extracelular (MEC). Esta última, entre otras características, posee la capacidad de proporcionar soporte a las células a través de motivos que se unen a receptores de integrinas, además es insoluble y no tiene la capacidad de difundir. De manera típica, la MEC está constituida por redes macromoleculares altamente hidratadas compuestas por glucoproteínas como colágena, elastina, fibronectina y laminina; glucosaminoglucanos como ácido hialurónico, condroitin 6-sulfato, dermatán sulfato y heparán sulfato, además de agua; su composición y topografía depende del tejido específico y de su población celular. Estas macromoléculas han sido empleadas para construir diferentes andamios tridimensionales buscando que sean lo más parecido a la MEC de distintos tejidos conjuntivos (Poveda-Reyes *et al.*, 2016; Jarquín *et al.*, 2016).

Gelatina

La gelatina (Ge) es un producto proteico obtenido por hidrólisis parcial de colágena de piel, hueso, cartílago o ligamento de todos los animales, sin embargo comercialmente se prefiere que sea de ganado vacuno o porcino. La Ge puede ser utilizada en ingeniería de tejidos por varias razones: es fácil de extraer, es soluble en agua, es completamente reabsorbible *en vivo*, sus propiedades fisicoquímicas pueden ser adecuadamente moduladas debido a la presencia de varios grupos funcionales (glicina, prolina, hidroxiprolina, ácido glutámico, arginina, alanina, ácido aspártico y otros aminoácidos), y no se ha demostrado que posea antigenicidad (Hong SR *et al.*, 2004; Grover CN *et al.*, 2012). Por otro lado, las propiedades de adhesión de la Ge son reguladas por secuencias de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), las cuales son reconocidas por muchas de las integrinas de adhesión celular presentes en las células del tejido conjuntivo (Ruoslahti E 1996). Además, se ha demostrado que la incorporación de proteínas naturales a matrices tridimensionales mantienen mejor las funciones celulares que cuando se agregan secuencias de aminoácidos cortas (Jia X *et al.*, 2009). Más aún, a temperaturas por debajo de 35 °C, la Ge tiene una estructura de triple hélice equivalente a la de la colágena en condiciones similares de temperatura, situación que puede inducir la formación de los enlaces necesarios para construir una red tridimensional (Gil ES *et al.*, 2005)

Cuando se añade agua, los gránulos de Ge se hinchan y forman partículas que absorben de 5-10 veces su peso en agua. Cuando alcanzan temperaturas alrededor de los 40°C, las

partículas hinchadas se disuelven formando una solución, que se transforma en gel después de enfriarse. El porcentaje de solubilidad de la Ge es afectado por factores como la temperatura, la concentración y el tamaño de las partículas. Entre sus características físicas, la Ge es insoluble en alcohol y en la mayoría de solventes orgánicos (Ben-David *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Heris *et al.*, 2012).

Así, las propiedades de la Ge hacen de ella un candidato excelente e ideal para la liberación de fármacos y ser utilizada en ingeniería de tejidos (Zhang *et al.*, 2011; Jarquín *et al.*, 2016).

Ácido hialurónico

Los glucosaminoglucanos (GAG) han mostrado que influyen el comportamiento de células del tejido conjuntivo y juegan un importante papel en el desarrollo y reparación de tejidos. Son fácilmente esterilizables, son biodegradables y pueden ser sintetizados en amplio rango de consistencias y formas (Liu *et al.*, 1999).

Los glucosaminoglucanos (GAGs) son polisacáridos largos no ramificados, compuestos por cadenas repetidas de disacáridos, que se integran por un azúcar amino (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina) y un derivado de ácido urónico. Los GAGs se clasifican en dos tipos: sulfatados y no sulfatados. Los GAGs sulfatados incluyen al queratán sulfato, dermatán sulfato, heparán sulfato y condroitin 4 y 6 sulfato. El ácido hialurónico (HA) es el único GAG no sulfatado, puede tener hasta 10,000 unidades de disacáridos repetidos y se sintetiza en la cara citoplasmática de la membrana celular por las sintetasas de hialuronano, las cuales además facilitan su salida hacia la matriz extracelular (Welsch, 2008; Fortoul, 2010).

El HA polisacárido de cadena larga es biocompatible y biodegradable, compuesto por unidades de disacáridos repetitivas de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina que se encuentra ampliamente distribuido en la MEC. Se ha demostrado que el HA estabiliza y organiza a la MEC debido a las interacciones que tiene con otras proteínas y, asimismo, regula la adhesión y proliferación de células del tejido conjuntivo mediante interacciones con la proteína CD44. Por otro lado, posee un papel importante en la organización y estructura de la matriz extracelular, el transporte de iones y nutrientes y permite la difusión de líquido tisular en el intersticio de los tejidos y órganos, además tiene una gran capacidad de retener agua en un medio biológico. Aplicaciones biomédicas del HA incluyen la construcción de andamios para la cicatrización de heridas y la ingeniería de tejidos, así como el tratamiento de la artritis, como componente de materiales de implante y promueve la diferenciación de células madre a

condroblastos y osteoblastos (Hu X *et al.*, 2010; Jha *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Heris *et al.*, 2012; Jarquín *et al.*, 2016).

Distintos hidrogeles fabricados con colágena/glucosaminoglucanos en forma de esponjas, membranas o cubiertas, han sido desarrollados y usados en estudios en humanos y animales como sustratos temporales para promover la regeneración de distintos tejidos, incluyendo al óseo (Liu *et al.*, 1999; Grover *et al.*, 2012; Jarquín *et al.*, 2016).

2.3 PROCESOS DE ENCAPSULACIÓN

La microencapsulación es una propuesta novedosa en la que están inmersos una gran variedad de compuestos bioactivos (fármacos, vitaminas, ácidos nucleicos, péptidos, genes, saborizantes, colorantes, aceites esenciales, nutrientes y pesticidas) en una matriz o un sistema de membranas, permitiendo la obtención de sistemas de liberación controlada. La sustancia encapsulada es generalmente un líquido, pero también puede presentarse en forma sólida. El producto obtenido mediante este proceso se define como micropartícula (Sáez *et al.*, 2004; Saez *et al.*, 2007) .

Las micropartículas son pequeños cuerpos menores a 1,000 micras, elaboradas con polímeros u otros materiales de naturaleza biodegradable o no, que se emplean para transportar distintos tipos de compuestos bioactivos. Con respecto a su morfología y estructura interna, las micropartículas se dividen en dos tipos: las microesferas y microcápsulas.

Las microesferas son sistemas que tienen una estructura de tipo matricial, donde las sustancias encapsuladas pueden ser adsorbidas en la superficie de la partícula o encapsuladas en su interior. Por su parte, las microcápsulas son sistemas reservorio que poseen una estructura morfológica relativamente simple, constituidas por dos elementos: el núcleo interno, que contiene el compuesto bioactivo, y la membrana de revestimiento, por lo general de naturaleza polimérica (Pakulsa *et al.*, 2016; Jóhannesson *et al.*, 2016).

Los principales factores que pueden controlar la velocidad de liberación de los compuestos bioactivos en las microesferas o microcápsulas son:

- La cantidad de sustancia activa existente en la matriz.
- La porosidad de la unidad de liberación.
- La longitud y sinuosidad de los poros de la matriz polimérica.
- La solubilidad de la sustancia activa

Las razones que justifican el proceso de microencapsulación son variadas; sin embargo, se pueden destacar las siguientes: asegurar la protección del principio activo, por ejemplo aquellas sustancias sensibles a la luz; modificar la solubilidad del compuesto al encapsularlo, proteger los principios activos incompatibles entre sí y conseguir la liberación sostenida o

controlada de moléculas, la cual es la aplicación más frecuente (Andhariya and Burgess *et al.*, 2016).

MÉTODOS DE ENCAPSULACIÓN

Las técnicas de microencapsulación para liberación controlada en ingeniería de tejidos están determinadas por las propiedades físicoquímicas de la sustancia activa y del biomaterial seleccionado, además de su aplicación y funcionalidad. Se pueden clasificar en tres tipos, encapsulación por extrusión, emulsión y secado por atomización (Saez *et al.*, 2007; Pakulsca *et al.*, 2016).

▪ Encapsulación por extrusión

Esta técnica requiere de un dispositivo que forme gotas a partir de la solución polimérica y el principio activo, las cuales son depositadas sobre una solución que contiene el agente gelificante, quien induce polimerización mediante el mecanismo de gelificación externa. La principal limitación que presenta esta técnica es el gran tamaño de las micropartículas, que dependen del diámetro de la boquilla del dispositivo extrusor. Existen otros factores que influyen en el tamaño y morfología de las partículas, como por ejemplo: la distancia de separación de la boquilla a la solución, el efecto de la gravedad y la tensión superficial de la solución que induce la gelificación. A pesar de todos estos factores, la técnica de microencapsulación por extrusión ha sido empleada tradicionalmente para la obtención de microcápsulas con tamaños uniformes (Pakulsca *et al.*, 2016; Jóhannesson *et al.*, 2016).

Recientes estudios demuestran que la aplicación de esta técnica mejora notablemente al incorporar dispositivos extrusores como boquillas múltiples y discos aspersores, inyectores con impulsos vibratorios e incluso con flujo de aire incorporado para la producción masiva de micropartículas (Saez *et al.*, 2007; Pakulsca *et al.*, 2016).

▪ Encapsulación en emulsión

La técnica de encapsulación en emulsión se ha definido como el proceso de dispersión de un líquido en otro líquido inmiscible donde la fase dispersa consta de la matriz que incluye el componente a encapsular. La adición de un tensioactivo mejora la formación y estabilidad de la emulsión, así como la distribución de tamaño de las gotas. En este sentido, la preparación de micropartículas por emulsificación puede llevarse a cabo empleando el mecanismo de gelificación externa o interna. Para el primer caso, la gelificación externa en emulsión, consta en la dispersión de una mezcla solución de polímero y un componente en una fase continua no acuosa, seguido de la adición de una fuente de calcio que al difundirse a la fase dispersa inicie la gelificación permitiendo la encapsulación, y a su vez, la desestabilización de la emulsión para la separación de las cápsulas formadas. Mientras que, la técnica en emulsión por gelificación

interna se fundamenta en la liberación del ión calcio desde un complejo insoluble o parcialmente soluble en cuyo caso se adiciona un agente secuestrante, contenido en una solución de polímero-componente el cual es dispersado en una fase continua no acuosa generando una emulsión agua en aceite (W/O). La liberación del ion calcio ocurre con la adición de un ácido orgánico soluble en la fase continua que al difundirse disminuye el pH del medio solubilizando la sal y produciendo la gelificación (Sáez *et al.*, 2004; Saez *et al.*, 2007; Pakulsca *et al.*, 2016; Jóhannesson *et al.*, 2016).

Para aumentar la estabilidad de las microesferas obtenidas por este proceso algunos autores han incluido la reticulación, la que además incrementa sus propiedades físicas y químicas. La densidad de reticulación del polímero es inversamente proporcional al grado de hinchamiento, es decir, una densidad de reticulación baja ocasionará una alta tasa de flexibilidad e hidratación, que se asocia a una mayor área superficial de éste y en consecuencia existirá una mayor fuerza mucoadhesiva. Para mejorar la mucoadhesión de los polímeros reticulados se puede incluir durante la formulación promotores de adhesión, tal es el caso de cadenas de polímero libre y otros polímeros injertados en la red preformada (Saez *et al.*, 2007; Jóhannesson *et al.*, 2016).

- Encapsulación mediante secado por atomización

El secado por atomización ha sido una tecnología ampliamente usada por la industria debido a su reproducibilidad y economía. Ha sido usado para enmascarar sabores, aromas y la encapsulación de vitaminas. El procedimiento consiste en la preparación de una emulsión o suspensión que contenga al compuesto a encapsular y el material polimérico, el cual es pulverizado sobre un gas caliente que generalmente es aire, promoviendo así la evaporación instantánea del agua y permitiendo que el principio activo presente quede atrapado dentro de una película de material encapsulante. Las micropartículas en polvo obtenidas son separadas del gas a bajas temperaturas. Una de las grandes ventajas de este proceso es, además de su simplicidad, que es apropiado para materiales sensibles a altas temperaturas debido a que los tiempos de exposición son muy cortos (5 a 30 segundos). A pesar, que la suspensión o emulsión a pulverizar con la técnica de secado por atomización se ha limitado a formulaciones acuosas (Pakulsca *et al.*, 2016).

El uso de polímeros naturales de origen animal y vegetal como el alginato, el dextrano, la goma acacia, el quitosán, albumina, caseína o gelatina se han utilizado ampliamente en el proceso de encapsulación, su elección se debe a su baja toxicidad, su solubilidad según la vía de administración y lugar de absorción del principio activo (Sáez *et al.*, 2004; Saez *et al.*, 2007; Pakulsca *et al.*, 2016; Jóhannesson *et al.*, 2016).

QUITOSÁN

El quitosán es un polímero natural que se obtiene a partir de la quitina, la cual forma parte de la estructura de numerosos organismos vivos como artrópodos, moluscos y hongos. Está constituida por unidades de 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucosa unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4). La obtención de quitosán a partir de quitina se realiza por desacetilación, así se conoce como grado de desacetilación al porcentaje de grupos amino libres en la molécula de quitosán. Es de notar que la solubilidad y la bioactividad dependen del grado de desacetilación. El quitosán es definido como la quitina que ha sido desacetilada en un 60-75% o más, dejando libre el grupo amino del carbono 2, en la mayoría de veces este proceso no llega al 100%, es por ello que al quitosán se le considera un copolímero de 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucosa y 2-amino-2-deoxy- β -D-glucosa, punto en el cual se vuelve soluble únicamente en soluciones ácidos orgánicos (Campos E. *et al.*, 2013; Shu-Hua Teng 2015).

El quitosán, considerado un polímero catiónico, es biocompatible y biodegradable en el organismo ya que es metabolizado por varias enzimas, especialmente la lisozima. En este sentido, la industria farmacéutica lo ha empleado para la liberación de fármacos, por ejemplo, en regiones específicas del tracto gastrointestinal, gracias a sus propiedades mucoadhesivas que se originan al interactuar las zonas iónicas de los grupos aminos cargados positivamente y la capa de moco cargado negativamente en la superficie intestinal. Los sistemas mucoadhesivos constituyen una gran solución, pues al utilizar polímeros con capacidad de adhesión a membranas biológicas, crean un contacto íntimo entre la formulación farmacéutica y el lugar de absorción, favoreciendo la interacción del fármaco con el organismo y aumentando de esta forma la biodisponibilidad y por tanto la efectividad terapéutica. Del mismo modo, estos sistemas presentan numerosas ventajas, representadas por la disminución de efectos adversos y toxicidad asociada a la administración de medicamentos.

Varios estudios han demostrado que la fuerza de adhesión aumenta con el grado de desacetilación, que no es más que el porcentaje de grupos amino libres que posee el quitosán, por lo que mientras mayor sea la presencia de estos grupos mayor será su fuerza adhesiva (Campos E. *et al.*, 2013; Shu-Hua Teng 2015; Pandolfi *et al.*, 2016).

La presencia de grupos aminos en la molécula de quitosán, lo convierte en un polieléctrolito catiónico con un pKa de 6.5. Por otro lado, la presencia de grupos hidroxilos, permite la fácil modificación química de este polímero. Las variaciones en el peso molecular, el grado de desacetilación, pH, tipo de solvente, temperatura, pK, fuerza iónica y concentración

del ácido afectan las propiedades fisicoquímicas del quitosán, como su viscosidad y solubilidad; además esto se relaciona con las diferentes funciones que puede realizar como agente espesante, regulador de la viscosidad, agente ligante de color y vehículo para liberación, entre otras aplicaciones.

Las propiedades biológicas del quitosán han permitido usarlo como un biomaterial en forma de fibras, películas y membranas, se han diseñado andamios de quitosán-gelatina que controla la liberación de pequeñas moléculas con la finalidad de aplicarlo en ingeniería de tejidos (Paldolfi *et al.*, 2016) además la industria biomédica y farmacéutica ha empleado el quitosán en forma de microesferas y microcápsulas para la liberación de principios activos o factores de crecimiento (Shu-HuaTeng 2015; Campos E. *et al.*, 2013).

FACTORES DE CRECIMIENTO: BMP y VEGF

Los factores de crecimiento son proteínas capaces de desencadenar señales bioquímicas en las células y tejidos como la regeneración de tejidos, la inducción de crecimiento, proliferación celular etc. Por lo que estos factores son usados como terapia para curar y/o controlar diversas enfermedades.

La entrega de moléculas de señalización para la regeneración ósea se ha centrado principalmente en los factores que afectan directamente las vías de formación ósea como son las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP).

Las BMPs comenzaron a utilizarse en 1889 con las investigaciones del cirujano americano Senn, que utilizaba implantes óseos desmineralizados en la cirugía ósea restauradora, pero fue hasta 1960 cuando el investigador Marshall Urist descubrió que los huesos alógenos desmineralizados implantados entre el músculo formaban hueso nuevo. Posteriormente se logró extraer a las BMPs y caracterizarlas, de tal manera que ahora se sabe que estos factores de crecimiento pertenecen a la superfamilia del Factor de Crecimiento Tumoral Beta (TGF β) y que poseen un peso molecular de 30KDa. Hasta la fecha se han aislado y clonado más de 40 BMPs de diferentes tejidos, sin embargo, las proteínas que se han demostrado poseer actividad osteoinductivas son la BMP2, la BMP4 y la BMP7. Las BMPs en general pueden inducir la diferenciación a hueso y cartílago, son capaces de incrementar la formación de hueso tanto por osificación intramembranosa como endocondral (Hankenson KD, 2015) (Murray SS, 2016), coordinando además muchos procesos de desarrollo durante la embriogénesis como la formación de las capas germinales, la morfogénesis de tejidos y la diferenciación celular (Salazar VS, 2016)

Las BMP son un grupo importante de factores de crecimiento óseo, altamente conservado entre especies. Pueden inducir la diferenciación ósea en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, en especial, la BMP-2 ha usado ampliamente, de manera individual o en sinergismo con el VEGF, incrementando el crecimiento del tejido óseo (Nisarg J. Shaha *et al.*, 2011; Li P *et al.*, 2014).

Por otro lado, el VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular) es una glucoproteína con un peso molecular de 34-46 KDa producida por varios tipos celulares en respuesta a diversos estímulos. Actúa sobre las células endoteliales a través de receptores de membrana tirosina-quinasa específicos que funcionan por dimerización u oligomerización, regulando de esta manera funciones celulares como: proliferación, diferenciación, migración y supervivencia celular.

La familia de VEGF consiste en 7 proteínas diferentes: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-D, VEGF-E y Factores de Crecimiento Placentario (PlGF) 1 y 2. La VEGF-A es el factor más estudiado e induce la angiogénesis en una gran variedad de modelos *in vivo*. De esta proteína se conocen al menos 6 isoformas diferentes: 121, 154, 165, 183, 189 y 206. Es una molécula clave para la inducción de la angiogénesis y vasculogénesis provocando proliferación, brotación, migración y formación de vasos sanguíneos (Giovannini M, 2010) (LB, 2006) (Zachary, 2005).

El VEGF además de promover la angiogénesis, está indirectamente relacionado con la formación de hueso a través de la estimulación de las células osteoprogenitoras, dado que se ha observado la expresión de VEGF desde el día 0 al día 5 después de una fractura (Hankenson KD, 2015). Asimismo, el VEGF se ha empleado para aumentar el número de vasos sanguíneos durante la formación de tejido óseo. La angiogénesis es requerida para el desarrollo de la mayoría de los tejidos y es un componente importante a considerar para la medicina regenerativa (Nisarg J. Shaha *et al.*, 2011; Subbiah *et al.*, 2015). Se han fabricado microesferas de polietilenglicol con calmodulina a través de la técnica de suspensión acuosa de dos fases, a las cuales se les agregó VEGF y BMP-2 durante el proceso de fotopolimerización, los autores lograron una alta eficiencia de encapsulación de $65,8 \pm 4,8\%$ y $79,5 \pm 3,0\%$ para VEGF y BMP-2, respectivamente. (William King *et al.*, 2011).

En la actualidad se han empleado polímeros biomiméticos de la matriz extracelular del hueso como el quitosán que tiene una estructura química similar al ácido hialurónico para evitar el desarrollo de una respuesta inmunológica en el huésped (Shu-Hua Teng 2015, Nyberg E *et al.*, 2016); Además, Mantripragada y cols. 2016, lograron la nueva formación de hueso en defectos femorales de ratas a través de una solución de microesferas de quitosano con BMP-7, reduciendo con ello el tiempo de cicatrización ósea a 12 semanas.

Así, es claro que un desarrollo y regeneración efectivas del tejido óseo en ingeniería de tejidos, requiere el empleo de factores de crecimiento que estén involucrados en la diferenciación celular y la formación de redes microvasculares.

III. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

Los andamios contruidos de polímeros naturales como la Ge y el HA requieren de agentes entrecruzantes como el EDC para estabilizar sus cadenas y evitar su pronta degradación, sin embargo, no se tiene bien establecida la dosis del entrecruzante EDC, por lo que se hace necesario conocer las concentración ideales del EDC como entrecruzante de andamios de Ge-HA.

Por otro lado, además de las concentraciones de trabajo ideales del EDC para la elaboración de andamios de Ge-HA, también es importante considerar el tipo de ácido hialurónico, estabilizados y no estabilizados, utilizados para fabricar andamios de Ge-HA con el objeto de verificar si se inducen cambios estructurales en los andamios.

Aunado a lo anterior, los andamios realizados con biopolímeros empleados en regeneración ósea necesitan ser osteoinductivos, por lo que, la adición de factores de crecimiento es importante para eficientar esta característica, sin embargo, la liberación de los factores de crecimiento debe ser controlada por lo que es necesario integrarlos junto con el polímero, como el quitosán en forma de microesferas, para evaluar cuáles son las condiciones del polímero para adsorber los factores de crecimiento.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Cuál es el efecto de diferentes concentraciones de EDC sobre los andamio de Ge-HA?
2. ¿Diferentes HA estabilizados previamente, modificarán la composición de los andamos Ge-HA entrecruzados con EDC?
3. ¿Cuáles son las condiciones que influyen en la síntesis de microesferas de quitosán para que tengan la capacidad de adsorber factores de crecimiento?

IV. JUSTIFICACIÓN

La reparación de fracturas y el relleno de defectos óseos hace necesario la fabricación de matrices de origen natural o sintético entrecruzados que posean las características funcionales necesarias que favorezcan la adhesión y la proliferación de las células óseas. Asimismo, se requiere de la liberación controlada de factores de crecimiento que promuevan la diferenciación de células mesenquimales hacia osteoblastos y, que al mismo tiempo, induzcan

la generación de vasos sanguíneos para permitir una mejor reparación de las fracturas o de los defectos óseos.

V. OBJETIVOS

5.1 GENERALES

- Construir un andamio de gelatina-ácido hialurónico con distintas concentraciones de EDC y con diferentes tipos de HA.
- Elaborar microesferas de quitosán que liberen BMP-2 y VEGF-1.

5.2 PARTICULARES

- Caracterizar a los andamios de gelatina-ácido hialurónico con diferentes concentraciones de EDC con relación a su porosidad, composición química, capacidad de absorción de agua y citotoxicidad en células estomales de médula ósea (BMSC).
- Obtener BMSC de médula ósea de rata y caracterizar la población de células madre mediante la expresión de los marcadores CD44, CD73, CD90, CD105, SSEA4 y STRO I.
- Fabricación de microesferas de quitosán mediante la técnica de emulsión y reticulación.
- Caracterizar a las microesferas de quitosán con relación a su forma y tamaño.
- Verificar la presencia de VEGF y BMP2 en las microesferas de quitosán.

VI. HIPÓTESIS

Hipótesis de trabajo 1:

Las concentraciones de 6, 30, 50 y 60mM de EDC incrementarán el entrecruzamiento entre Ge y HA, provocando cambios en el tamaño de poro, la capacidad de absorción y la biocompatibilidad de los andamios construidos.

Hipótesis nula 1:

Las concentraciones de 6, 30, 50 y 60mM de EDC no incrementarán el grado de entrecruzamiento entre Ge y HA, y por lo tanto no provocarán cambios en el tamaño de poro, la capacidad de absorción y la biocompatibilidad de los andamios construidos.

Hipótesis de trabajo 2:

La composición química de los andamios de Ge-HA dependerá de la fuente de HA empleada.

Hipótesis nula 2:

La composición química de los andamios de Ge-HA no dependerá de la fuente de HA empleada.

Hipótesis de trabajo 3:

La concentración de quitosán, tensoactivo y glutaraldehído influirán en la síntesis de microesferas a través el método de emulsión y reticulación.

Hipótesis nula 3:

La concentración de quitosán, tensoactivo y glutaraldehído no influirán en la síntesis de microesferas a través del método de emulsión y reticulación.

VII. METODOLOGÍA

7.1 TIPO DE ESTUDIO

El trabajo de investigación es Experimental, Longitudinal y Prospectivo.

Obtención de células estromales de médula ósea (BMSC), cultivadas en medio DMEM, F12 y DMEM/F12. Caracterización de células madre con STRO I, CD44, SSEA4, CD73, CD105 y CD90 mediante citometría de flujo

Construcción de andamios de Ge-HA con diferentes concentraciones de EDC sembrados con BMSC, análisis de citotoxicidad con LDH, capacidad de absorción, cuantificación de número y tamaño de poro con MEB y programa Image Pro Plus

Construcción de andamios de Ge- con diferentes HA, caracterización con IR, MEB, EDS, cuantificación de número y tamaño de poro con Image Pro Plus. Sembrado de BMSC.

Síntesis de microesferas de Quitosán a través del método de emulsión y reticulación; caracterización con RAMAN, tamaño y forma de partícula MEB, encapsulación de factores de crecimiento BMP-2 y VEGF y análisis de su presencia a través de ELISA.

DEFINICIÓN DE VARIABLES

VARIABLE DEPENDIENTE			VARIABLE INDEPENDIENTE		
	Definición Conceptual	Definición Operacional		Definición Conceptual	Definición Operacional
Ge	Del lat. gelātus 'helado'. f. Sustancia sólida, incolora y transparente cuando está pura, e inodora, insípida y notable por su mucha coherencia. Procede de la transformación del colágeno del tejido conjuntivo y de los huesos y cartílagos por efecto de la cocción.	Es un polímero natural obtenido de la piel de bovino, marca Sigma Aldrich.	HA	Es un polisacárido del tipo de glucosaminoglucanos con enlaces β.	Obtenido de 2 marcas comerciales <ul style="list-style-type: none"> ▪ R1: Restylane Vital para la hidratación de la cara ▪ R2: Restylane sofá para relleno de arrugas finas ▪ R3: Restylane Perlane para relleno de labios y surcos ▪ R4: Restylane Sub- Q para relleno de pómulos ▪ Nativo de Sigma Aldrich
Liofilización	Del gr. λύειν λύειν 'soltar', 'disolver', 'filo e - izar'. 1. tr. Separar el agua de una sustancia, o de una disolución, mediante congelación y posterior sublimación a presión reducida del hielo formado, para dar lugar a un material esponjoso que se disuelve posteriormente con facilidad.	Extracción del solvente de la solución Ge-HA entrecruzada con EDC, a través del proceso de sublimación a temperatura de -110°C a una presión de 0.03HPa. Con la finalidad de obtener andamios porosos.	EDC	Es una carbodiimida, obtenida generalmente como su clorhidrato. Se le emplea a un rango de pH de 4.0-6.0. Agente activante de grupos carboxilos para el acople de aminas primarias que conduzcan a enlaces amida.	Agente entrecruzante disuelto a: 6, 30, 50 y 60mM en alcohol al 96%.
Microesferas	<u>Microesferas</u> : Cualquier esfera cuyo tamaño se mide en micrómetros.	Partículas regularmente esféricas de tamaño mayor a 100nm hasta 10µm.	Quitosán	Un oligosacárido de hidratos de carbono derivado de la quitina.	Polisacárido de origen natural obtenido de cangrejo de la marca Sigma Aldrich. Concentración de trabajo a 1 y 2%.
Concentración de BMP-2 y VEGF 1.	<u>Concentración</u> : Magnitud que expresa la cantidad de una sustancia por unidad de volumen, y cuya unidad en el sistema internacional es el mol por metro cúbico (mol/m ³). <u>BMP-2</u> : La proteína morfogénica ósea 2, es un miembro de la superfamilia de proteínas TGF-beta. <u>VEGF 1</u> : El factor de crecimiento endotelial vascular es una proteína señalizadora implicada en la vasculogénesis y en la angiogénesis.	10µg de BMP-2 y 10µg de VEGF en un mililitro de solución salina.	Glutaraldehído	Líquido dialdéhido alifático, de bajo peso molecular, incoloro y de olor picante.	Agente usado al 25% para reticular las microesferas. Volumen 5 y 10ml.

7.3 PROCEDIMIENTO

Animales.

Se utilizaron las células estromales de médula ósea (BMSC) de 2 ratas macho Wistar de 250g de peso por cada experimento de citotoxicidad, las ratas fueron mantenidas bajo condiciones libres de pirógenos, con disponibilidad de agua y alimento *ad libitum* con nutricubos “purina Chow” y ciclos de luz oscuridad controlados, en las instalaciones del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. El sacrificio de los animales se realizó de acuerdo a los lineamientos de los Comités de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM de acuerdo a la Norma Mexicana NOM 062-ZOO-1999.

Reactivos.

Gelatina, tipo B obtenida de piel de bovinos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), con un peso molecular (PM) de 20,000-25,000, con una fuerza de gel en la escala de Bloom de ~225 g y un punto isoeléctrico (pI) de 4.7-5.2. Ácido hialurónico (HA) obtenido de *Streptococo Equi* con un peso molecular de 403.3 g/mol, soluble en agua (5mg/mL) y con $\leq 1\%$ de impurezas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); ácido hialurónico gentilmente donado por Restylane, Medicis, USA. Estos HA tienen 4 diferentes densidades de HA de menor a mayor densidad o cohesividad; su procedencia es de origen bacteriano y están químicamente entrecruzados con butanediol-diglicidil-éter (BDDE), estabilizados y suspendidos en buffer de fosfatos a pH 7, a una concentración de 20mg/mL. EDC (N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) con un peso molecular de 191.7 g/mol y soluble en agua ($\leq 100\text{mg/mL}$). Kit para detección de citotoxicidad (LDH) obtenido de Roche, Alemania. Quitosán de cangrejo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) de alta viscosidad. Glutaraldehído 25% para Microscopia Electronica de Barrido. Aceite Mineral PM varía entre aproximadamente 205 y 500 g/mol; es un líquido aceitoso incoloro; prácticamente inodoro. Su punto de fusión es igual a 360 °C y su punto de ebullición varía entre 260 y 360 °C. Su densidad específica varía de 0.845 a 0.905 para el aceite pesado y de 0.818 a 0.880 para el aceite ligero obtenido de Farmacia Paris México, alcohol polivinílico y Span 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); Proteína recombinante humana BMP2, proteína recombinante de rata VEGF ambas derivadas de E. Coli, Kit Human BMP-2 Standard ABTS ELISA y Kit VEGF Standard ABTS ELISA (Peprotech, México).

Obtención y purificación de células

Para cada ensayo se utilizaron 2 ratas, de las cuáles se obtuvieron las tibias y fémures. Una vez retirado el tejido muscular, los huesos fueron transferidos a una solución de alcohol al 70% para eliminar la contaminación de la manipulación, posteriormente fueron lavados en PBS estéril, y

después colocados en medio de cultivo mínimo esencial modificado por Dubelcco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% y antibióticos (Ab) 1% donde se obtuvo mediante perfusión las células de la médula ósea. Finalmente, la suspensión celular obtenida fue lavada, filtrada para retirar restos de tejido óseo y sembrada en cajas Petri de acuerdo a los siguientes grupos experimentales:

1. *DMEM bajo en glucosa/SFB/Ab*
2. *DMEM bajo en glucosa/SFB/Ab + F12/SFB/Ab*
3. *F12/SFB/Ab*

La caracterización de las células madre de médula ósea fue demostrada por medio de la expresión de las proteínas STRO I, CD44, CD105, CD90, SSEA4 y CD73 en la membrana celular, estas proteínas son marcadores de superficie, por lo que mediante su expresión se determina el porcentaje de células troncales mesenquimales. Tras despegar las células de la placa de cada uno de los experimentos, la suspensión celular fue colocada en 7 tubos de 1.5mL y fueron lavadas 3 veces con amortiguador de tinción; después se hicieron 2 lavados con BD Perm/Wash TM y fueron incubadas por 15 min con el Anti- STRO I, CD44, CD105, CD90, SSEA4 y CD73 en cada uno de los tubos, en el séptimo tubo se repitió STRO I; después fueron lavadas 3 veces con amortiguador de tinción. Las muestras fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-conejo (MP Biomédical kit) por 15 min y lavadas 3 veces con amortiguador de tinción. Finalmente fueron incubadas con Estreptoavidina acoplada a PE a una concentración de 1:300 por 15 min, lavadas con el amortiguador de tinción y resuspendidas en amortiguador de fijación, a excepción del 7^{mo} tubo al que después de los lavados del anticuerpo Estreptoavidina/FITC, se incubó con anti CD44 por 15 min; después fue lavado 3 veces con amortiguador de tinción y se incubó con el anticuerpo Estreptoavidina/APC 1:300 por 15 min; para finalmente incubarla con el anticuerpo CD90 PE y poder tener de esta manera triple marca en la misma muestra. En todos los experimentos se adquirieron 1×10^4 células en un citómetro BD FACSCalibur del Laboratorio Nacional de Citometría del Instituto de Investigaciones Biomédicas y los datos fueron analizados con el software FlowJo 8.7.

Fabricación de andamios de Ge-HA con diferentes concentraciones de EDC.

La Ge y el HA se disolvieron en agua destilada a una proporción de 4:1, respectivamente, en agitación constante durante 30 min a una temperatura de 50°C. Un mL de la solución de Ge-HA se colocó en varios tubos Ependorf, que posteriormente fueron congelados con nitrógeno líquido previo a su liofilización durante 12h a -50°C a una presión atmosférica de 0.036mBar. A continuación, los andamios fueron sumergidos durante 24 h a 4 °C en concentraciones de 6, 30, 50 ó 60 mM de EDC disuelto en etanol al 96%. A continuación, los andamios fueron lavados 3 veces con

agua destilada y liofilizados nuevamente bajo las condiciones ya mencionadas. Finalmente, los andamios obtenidos fueron seccionados con objeto de obtener discos de aproximadamente 9mm de diámetro por 3mm de grosor, en ellos se realizaron las pruebas biológicas y fisicoquímicas.

Fabricación de andamios de Ge-HA con diferentes ácido hialurónicos estabilizado y no estabilizado

Se disolvió la Ge con diferentes HA, los de Restylane que tienen diferentes aplicaciones como rellenos cutáneos y que están estabilizados y HA de origen no animal no estabilizado estabilizado (Sigma Aldrich).

- R1: Restylane Vital para la hidratación de la cara
- R2: Restylane sofá para relleno de arrugas finas
- R3: Restylane Perlane para relleno de labios y surcos
- R4: Restylane Sub- Q para relleno de pómulos
- Nativo de Sigma Aldrich

La proporción Ge-HA fue de 4:1, respectivamente, se mantuvieron en agitación constante durante 30 min a temperatura de 50°C. Se colocó un mL de la solución de Ge-HA en tubos Eppendorf y posteriormente se congelaron con nitrógeno líquido para ser liofilizado durante 12h a -50 °C a 0.036mBar de presión atmosférica. A continuación, los andamios se sumergieron durante 12h a 4 °C en una concentración de 50mM de EDC disuelto en etanol al 96%. Posteriormente, los andamios se lavaron 3 veces con agua destilada y se liofilizaron nuevamente bajo las condiciones ya mencionadas. Los andamios se seccionaron con objeto de obtener discos de aproximadamente 9mm de diámetro por 3mm de grosor y en ellos se realizaron las pruebas biológicas y fisicoquímicas.

Cuantificación del número de poros

Los andamios Ge-HA 6, 30, 50 y 60mM de EDC y Ge-HA 1R, 2R, 3R, 4R y Nativo; se procesaron para obtener cortes en parafina de 5 µm, los cuales se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se seleccionaron 10 campos al azar de cada muestra y se cuantificó el número de poros en cada caso, con un microscopio Nikon E81i. Los promedios se expresaron en número de poros por mm².

Microscopia electrónica de barrido

Las muestras de los diferentes andamios de Ge-HA se fijaron con glutaraldehído al 2.5% durante una hora, se lavaron, se secaron y se recubrieron con oro por 1 minuto, colocándolas en el ionizador Polaron Modelo: 11HD, posteriormente se examinaron en un microscopio electrónico de barrido ZEISS Modelo: DSM950. Se tomaron fotografías de 4 campos al azar a un aumento de 1,500X. Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa Image-Pro Plus 7.0 (Media

Cybernetics, Inc. San Diego CA) con el propósito de medir el tamaño de los poros en su diámetro menor.

Microanálisis de dispersión de energía de rayos X en todas las muestras (EDS).

Con el propósito de identificar la composición química elemental de los andamios, se analizaron a través de la técnica EDS, con ayuda de una sonda marca Noran, modelo Voyager 4.2.3., la cual se encuentra acoplada a un Microscopio Electrónico de Barrido de Bajo Vacío marca JEOL modelo JSM5600LV. Para llevar a cabo el análisis por esta técnica las muestras no se recubrieron con oro coloidal o carbón. De cada muestra se seleccionaron 10 campos al azar y las concentraciones de los distintos elementos analizadas.

Capacidad de absorción en andamios con diferentes concentraciones de EDC

Los andamios entrecruzados de 9mm de diámetro por 3mm de grosor se pesaron y se sumergieron en amortiguador salino de fosfatos 1M durante 1 h a temperatura ambiente. Se retiró el exceso de agua del andamio con papel absorbente por 2 segundos y a continuación se volvieron a pesar. El peso en gramos, que corresponde a la capacidad de absorción, se obtuvo mediante la siguiente fórmula: $CA = P_H - P_S$, donde CA es la capacidad de absorción, P_H es el peso del andamio húmedo y P_S es el peso seco del andamio (Deng *et al.*, 2007). Este experimento se realizó por triplicado.

Espectroscopía de Infrarrojo en andamios Ge con distintos HA

La técnica de espectroscopía de infrarrojo (IF) es una de las herramientas para observar espectros vibracionales, esto debido al proceso de absorción y emisión sobre las moléculas que se encuentran en el material analizado. Para caracterizar, con esta técnica, los andamios de Ge con distintos HA se tomaron 3 muestras de cada una de ellos.

Citotoxicidad y cultivo celular in vitro

Para esterilizar los andamios de Ge-HA se sumergieron en alcohol al 70% y se trataron con luz UV durante toda la noche, posteriormente fueron lavados 3 veces en PBS estéril y antibióticos al 1% (penicilina, anfotericina-B y gentamicina) durante 30 min ambiente.

Los ensayos se realizaron con BMSC de rata de la cepa Wistar. Las cuales se expandieron en cajas de cultivo con medio DMEM/SFB/Ab y se mantuvieron en cultivo con condiciones de temperatura de 37 °C y CO₂ al 5%.

Los andamios de Ge-HA con diferentes concentraciones de EDC, fueron sembrados con 1×10^4 BMSC en cajas de 24 pozos con solución salina balanceada de Hank's (HBSS), se incubaron por 4h a 37°C con CO₂ al 5%; con la finalidad de determinar la concentración óptima de entrecruzante sin que sea toxico para las células. El control positivo para la prueba de citotoxicidad fueron células

expuestas a la luz UV en una solución de PBS. Como control negativo se colocó sólo PBS y el sobrenadante de células no expuestas a UV ni sembradas en los andamios se consideró como control de muerte basal. Después de las 4 h de incubación se tomaron 100 µl de sobrenadante de cada muestra y se colocaron en una placa de 96 pozos, se les adicionó 100 µl de la solución del kit de citotoxicidad de lactato deshidrogenasa (LDH) (Citotoxicity Detection Kit LDH, Roche) y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente en cámara oscura, transcurriendo el tiempo de incubación, se leyó la placa en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm. El experimento se realizó por triplicado para cada andamio.

A los andamios con las diferentes condiciones experimentales, se les inoculó una suspensión con 2.04×10^4 BMSC con una aguja de 0.3mm X 13 mm y se les adicionó DMEM suplementado que se reemplazó diariamente por 7 días. Se fijó con formol al 10% por 2 h los andamios con las células y se incluyeron en parafina para realizar cortes de 5µm y teñirlos con H&E. Finalmente se tomaron fotografías con un microscopio Nikon Eclipse 80i.

Síntesis de Microesferas de Quitosán

Para la elaboración de microesferas se siguió el método de emulsión simple (w/o), incorporando glutaraldehído para la reticulación de las moléculas de quitosán, formando así una red tridimensional con objeto de que las microesferas adquieran una mayor rigidez.

El proceso para la fabricación y reticulación de las microesferas de quitosán fue de la siguiente manera: se agregó SPAN 80 a 100ml de aceite mineral a las concentraciones de 0.5, 1 y 2%. Por otro lado, se utilizó quitosán al 1 ó 2% con albúmina al 1% diluido en agua destilada. La solución de aceite mineral/SPAN 80 se agitó con un Ultraturrax T25 a 12,200 rpm a temperatura ambiente y el quitosán se vertió gota a gota y después de que el quitosán fue incorporado en su totalidad, se agitó la solución por otro 1 minuto más.

La solución quitosán/albúmina–aceite mineral/SPAN80 se colocó en el agitador magnético por 30 minutos a 3,000 rpm a temperatura ambiente y se le adicionó glutaraldehído al 25% a un volumen de 5 ó 10 ml y se colocó en agitación por 3 horas a temperatura ambiente. La solución se centrifugó a 4,000 rpm por 10 minutos, con objeto de obtener un botón de microesferas y finalmente fueron lavadas con hexano dos veces y tres veces con agua destilada. En estas condiciones, las microesferas se pueden almacenar a 4 °C hasta su uso.

Posteriormente, se suspendieron 10 mg de microesferas toda la noche en 150 µl de BMP2 o 150 µl de VEGF-1, ambos a una concentración de 10 µg/ml a temperatura ambiente y con agitación constante; después se lavaron con agua destilada tres veces y se le adicionó 200 µl de EDC a una concentración de 50mM en agitación constante por 3 horas a temperatura ambiente. Finalmente,

las microesferas se lavaron con agua destilada 6 veces, se resuspendieron en 300 μ l de agua destilada y se colocaron en una incubadora por 30 minutos y una hora a 37 °C. Con objeto de evaluar si las microesferas adsorbieron los factores de crecimiento, se tomaron 100 μ l de agua destilada, a los tiempos ya mencionados, y se analizó mediante ELISA la presencia de los factores de crecimiento.

Caracterización de las microesferas

Morfología: se analizó con microscopía electrónica de barrido. La forma y tamaño, de la partícula, se midió con el programa Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics, Inc. San Diego CA).

Composición: La espectrometría Raman se utiliza comúnmente en química, ya que la información vibracional es muy específica para los enlaces químicos de las moléculas. Por lo tanto, proporciona una huella dactilar de la molécula que puede ser identificada. La región de huella digital de las moléculas orgánicas está en el rango de 500-2000 cm^{-1} . Se usó esta técnica para identificar el quitosán en las microesferas.

Tamaño: A través de citometría de flujo se analizó el tamaño de la microesferas comparándolas con microesferas de poliestireno de 3 μ m como grupo control. Se tomaron 200 μ l de la solución de microesferas quitosán 2%/albumina 1%, reticuladas con 10ml de glutaraldehído al 25% y se adquirieron 10,000 eventos y se analizaron en un citómetro BD FACSCalibur del Laboratorio Nacional de Citometría del Instituto de Investigaciones Biomédicas y los datos fueron analizados con el software FlowJo 8.7.

VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se les aplicó una prueba de Kruskal-Wallis con el programa Graph Pad Prim 6, tomando un valor de $p < 0.05$ como significativo.

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cultivo de BMSC sobre cajas Petri

Las BMSC se obtuvieron mediante el cultivo de células totales de médula ósea durante 24 horas en cajas Petri con tres diferentes medios F12 (fig. 1A), F12+DMEM bajo en glucosa (fig. 1B) y DMEM bajo en glucosa (fig. 1C) suplementados con 10% SFB y 1% Ab. Al finalizar el tiempo de incubación, se observó una población celular que se adhirió a la caja de Petri y se consideraron como células estromales de médula ósea, mientras que las células no adheridas se desecharon. Las células estromales de médula ósea; son una población heterogénea de células que incluyen células madre mesenquimales, adipocitos, reticulocitos, células endoteliales, células óseas diferenciadas y fibroblastos que están en contacto directo con elementos hematopoyéticos. El porcentaje de células madre de médula ósea es bajo y deben expresar las siguientes moléculas de superficie: CD73, CD90, CD105, STRO I, CD44 y SSEA4 (Seok-Jung K *et al*, 2008; Lindner U *et al* 2010).

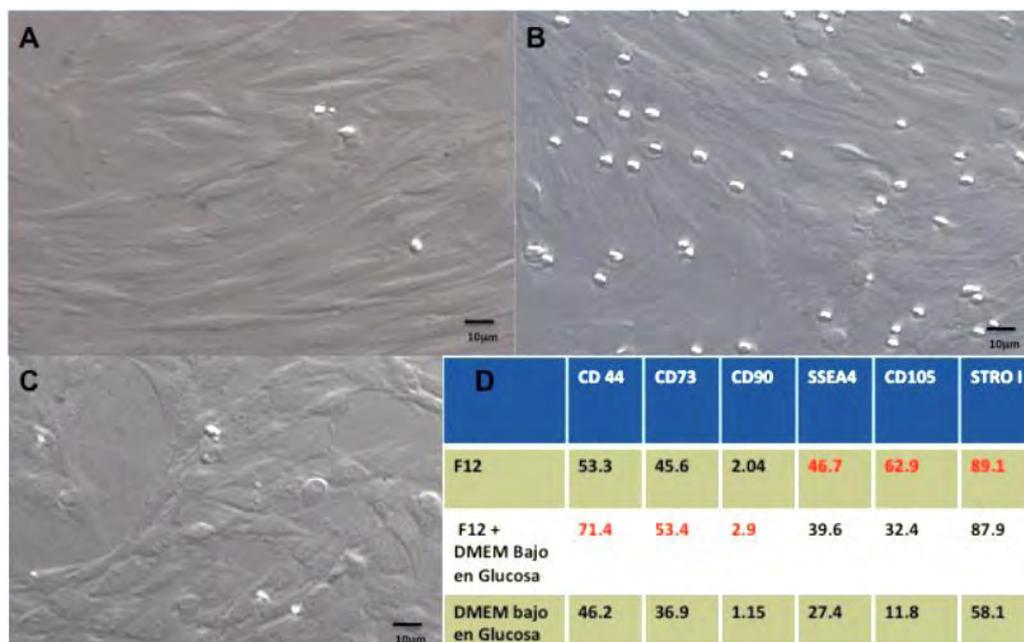


Figura 1. BMSC de rata cultivadas con diferentes medios de cultivo: (A) F12; (B) F12+DMEM bajo en glucosa y (C) DMEM bajo en glucosa por 2 semanas. (D) tabla del porcentaje celular de la expresión de marcadores CD44, CD73, CD90, SSEA4, CD105 Y STRO I obtenidos por citometría de flujo donde se resalta con rojo el porcentaje más alto de los marcadores.

Se incubaron las células con diferentes condiciones experimentales hasta su confluencia, posteriormente se tripsinizaron y se incubaron con los siguientes anticuerpos: CD44, CD73, CD90, SSEA4, CD105 y STRO I (fig. 2). A continuación se adquirieron 10,000 eventos y se analizaron en el citómetro de flujo FACScalibur (BD).

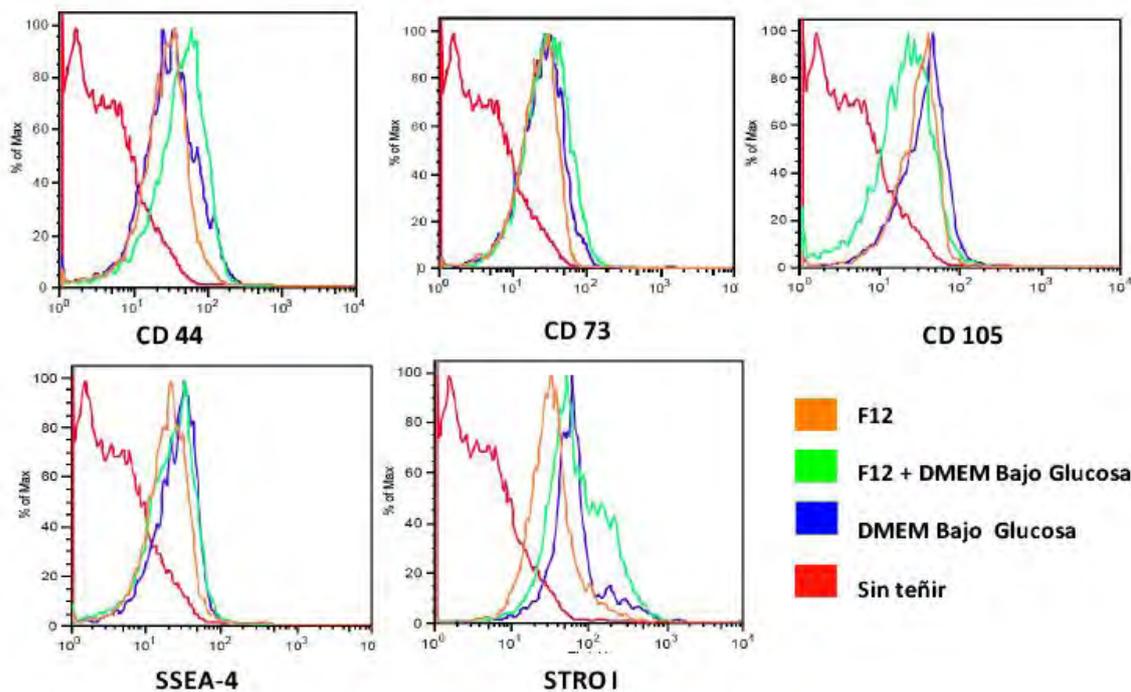


Figura 2. Histogramas de la expresión de CD44, CD73, CD105, SSEA4 y STRO en BMSC de rata cultivadas en diferentes medios de cultivo

El resultado se expresó en porcentaje celular, el 71.4% de las células cultivadas en medio *F12+DMEM bajo en glucosa* expresó CD44, el 53.4% fue positivo a CD73 y el 2.9% a CD90 (fig. 1D y fig. 2).

El papel que juega CD73 en células madre mesenquimales está relacionado con mecanismos de adhesión celular, ya que se ha encontrado co-expresada con moléculas tipo $\alpha 2$ integrinas, el cual se caracteriza por ser un mediador de adhesión celular. Mientras que CD90, es un marcador de precursores mesenquimales tempranos que tienen la capacidad de diferenciarse a osteoblastos. CD44 es una molécula de adhesión que actúa mediante la interacción con el ácido hialurónico, osteopontina, colágeno, anquirina, fibronectina y metaloproteinasas, contribuyendo en procesos de adhesión, migración y proliferación de las células madre (Arévalo *et al* 2007; Seok-Jung K *et al*, 2008; Lindner U *et al* 2010).

SSEA4 se expresó en un 46.7% en las células cultivadas con el medio F12, las mismas células expresaron CD105 en un 62.9% y STRO I en un 89.1% (fig. 1D y fig. 2). CD105 interviene en la

regulación de distintos componentes de la matriz extracelular como fibronectina y colágena, razón por la cual se cree que está relacionada con procesos de angiogénesis y reparación vascular. STRO-1 es un marcador que se expresa en el desarrollo temprano de células madre de médula ósea, declinando su expresión con genes asociados a la diferenciación y expansión osteogénica. Por lo tanto, la expresión de estos marcadores en los cultivos celulares indica que las células obtenidas pueden ser diferenciadas a osteoblastos y a células endoteliales, siempre y cuando sean enriquecidos con factores de crecimiento adecuados (Arévalo *et al.*, 2007; Seok-Jung K *et al.*, 2008; Lindner U *et al.*, 2010).

Estudios realizados por Niehage *et al* 2011 sobre la proteómica de la superficie celular de las células estromales mesenquimales humanas y encontraron que el marcador CD44 se expresa en un 13.61%, CD73 en un 29.44%, CD90 en 24.84% y CD105 en 34.65%. Los resultados de este trabajo, se acercan más a la expresión de CD73 con un 36.9%, mientras que en el presente trabajo la expresión de CD90 fue muy baja con 1.5% en contraste con el 24.84% del estudio de Niehege, sin embargo lo anterior puede ser a que las células empleadas en este estudio fueron de BMSC de rata y la de ellos fueron humanas.

La figura 3 indica la presencia de triple marcaje (STRO I, CD44 y CD90) en las BMSC cultivadas con *F/2*: 6.1×10^3 son positivas a STRO I de 1×10^5 células adquiridas, y de éstas en promedio 1×10^3 son STRO I, CD90 y CD44 positivas al mismo tiempo, los experimentos fueron realizados por triplicado.

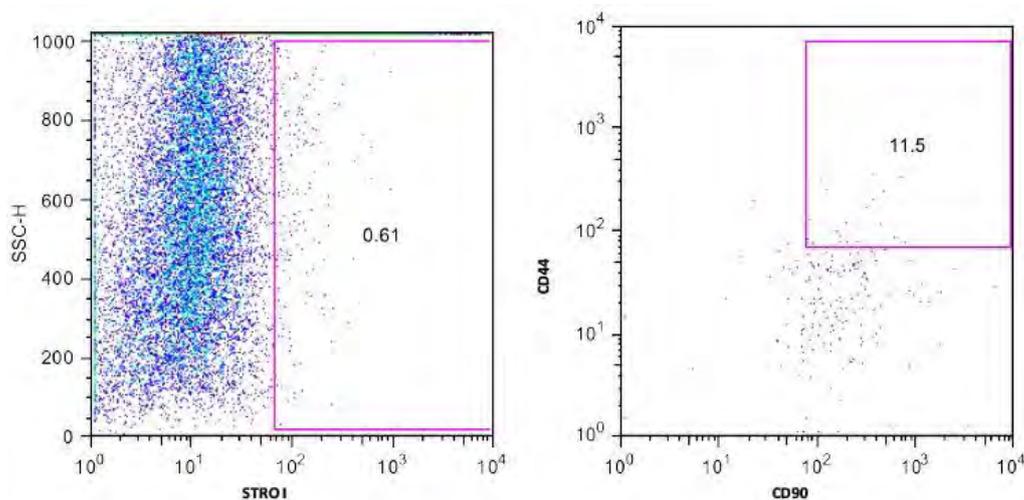


Figura 3. Citometría de flujo representativa de BMSC de rata expresando STRO I, CD44 y CD90.

Formación de andamios de Ge-HA con diferentes concentraciones de EDC.

Al combinar EDC a concentraciones de 6, 30, 50 y 60 mM con una mezcla de Ge al 4% y HA al 1% se obtuvieron andamios porosos con aspecto de esponja (fig. 4).

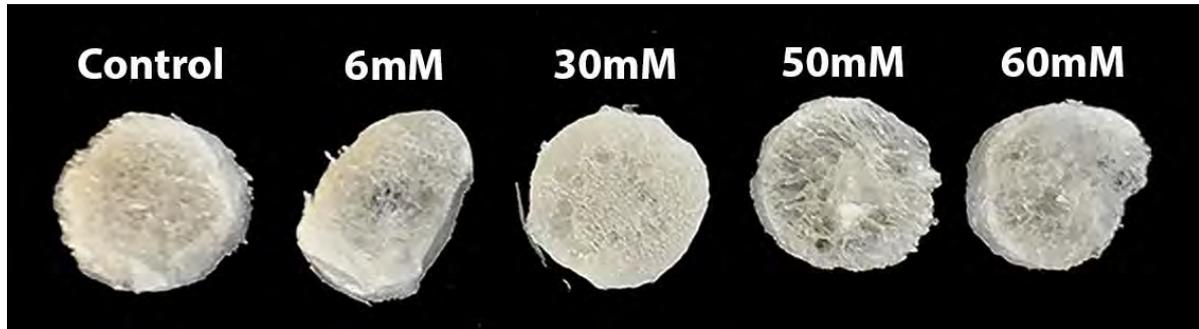


Figura 4. Esponjas de Gelatina(Ge)/ácido hialurónico (HA) con distintas concentraciones de EDC, (N-(3-Dimetil amino propil)-N- etilcarboimida hidrocloreto).

El mecanismo de entrelazado del EDC (Tomihata *et al*, 1994; Lee *et al*, 1996) se debe a que este reacciona con los grupos carboxilo de la Ge y/o del HA formando O-urea activada, la cual a su vez puede reaccionar con los grupos amino de la Ge resultando en la formación de enlaces amida con la liberación de urea soluble (fig. 5).

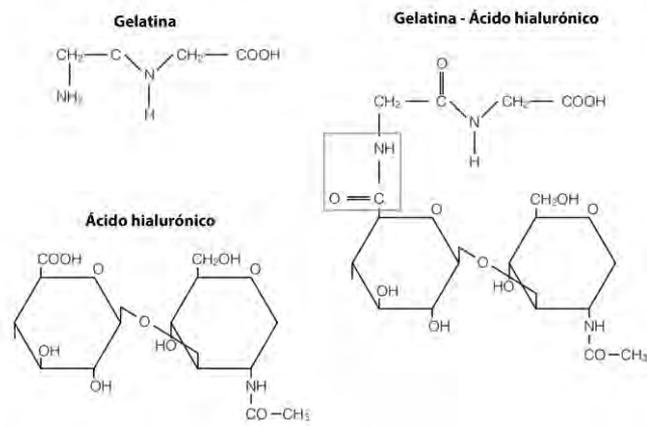


Figura 5. Imagen tomada del artículo de Chia-Ling Ko *et al*. 2012 donde se puede observar en el recuadro azul, la formación de enlaces amida.

Por otro lado, ya que el EDC puede ser fácilmente desactivado en solución acuosa (Choi *et al*. 1999), se utilizó un método de reacción heterogéneo donde el EDC diluido en etanol/agua (96:4) se añadió a la mezcla de Ge-HA liofilizada. De esta manera, con las diferentes concentraciones de EDC se obtuvieron andamios con distintos grados de degradación. La mezcla de etanol/agua fue utilizada

para prevenir la disolución de la esponja de Ge-HA liofilizada. Por otro lado, existen diferentes métodos para fabricar matrices tridimensionales porosas como electrohilado, separación de fases y en espuma con gas (Salerno *et al.* 2006; He *et al.* 2006, Van Vlierberghe *et al.* 2009); sin embargo, el método empleado por nosotros, la liofilización, es un método no tóxico y simple que utiliza a los cristales de hielo como porógenos (Zhang *et al.* 2007). En este sentido, se aprovechó la gran capacidad hidrofílica de la gelatina y del ácido hialurónico para llevar a cabo el proceso de formación de poros mediante liofilización, el cual, se da a través del proceso de sublimación del solvente congelado de la muestra dejando, los espacios que eran ocupados por el agua.

Morfología de las esponjas de Ge-HA con diferentes concentraciones de EDC

La figura 6 muestra los diferentes tipos de morfología de las esponjas de Ge-HA entrelazadas con diferentes concentraciones de EDC y se puede observar que el método realizado por nosotros dio como resultado la construcción de andamios porosos denominados esponjas. Se puede apreciar que el tamaño de los poros fue diferente cuando las esponjas de Ge-HA fueron entrelazadas a distintas concentraciones de EDC (fig. 6e)

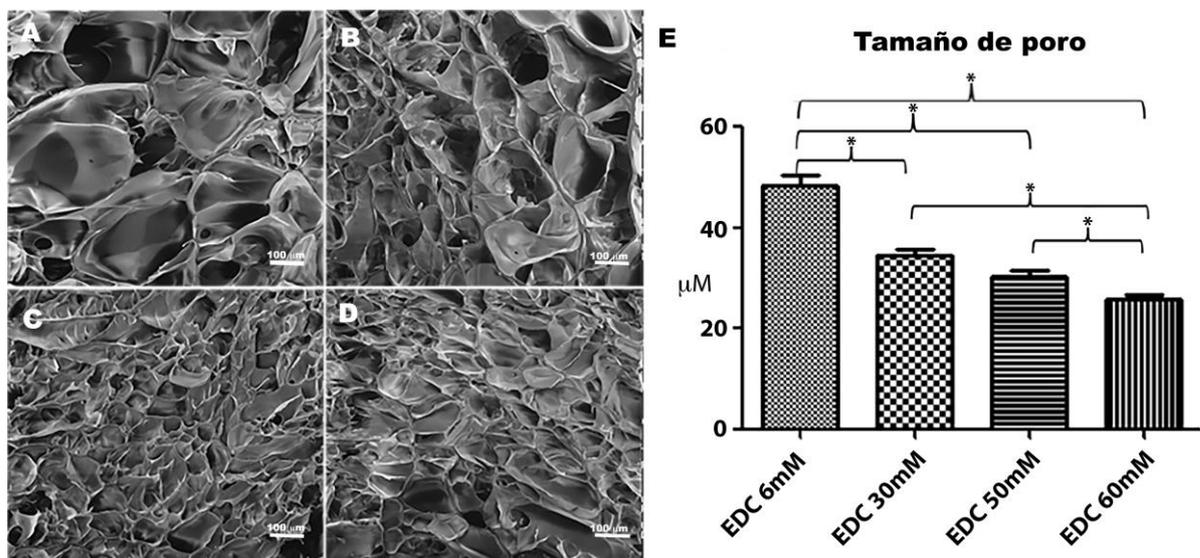


Figura 6. Andamios de gelatina (Ge)-ácido hialurónico (HA) con diferentes concentraciones de 1-etil-3- [3-dimetilaminopropil] carbodiimida clorohidrato (EDC) : 6mM (A), 30mM (B), 50mM (C) y 60mM (D). Gráfico del tamaño de poro (E) *P < 0.05

Los andamios entrelazados a una concentración de 6 mM de EDC tuvieron los poros más grandes con una media de 48.2 μm ; las esponjas entrelazadas con EDC a una concentración de 30 mM tuvieron una media de tamaño de poro de 34.69 μm ; los poros de las esponjas entrelazadas con EDC a una concentración de 50 mM tuvieron una media de 30.48 μm ; finalmente las esponjas entrelazadas a una concentración de EDC de 60 mM tuvieron poros con una media de 25.9 μm . Es de notar que los andamios mostraron diferencias significativas entre todos los grupos a excepción de los grupos de andamios entrecruzados con 30 y 50 mM, esto se correlaciona con la concentración del EDC siendo el tamaño de poro menor en el grupo de mayor concentración y el promedio mayor en la menor concentración (Fig. 6e). Por otro lado, el número de poros en las esponjas fue inversamente proporcional a la concentración de EDC empleada como entrelazante (Fig. 7)

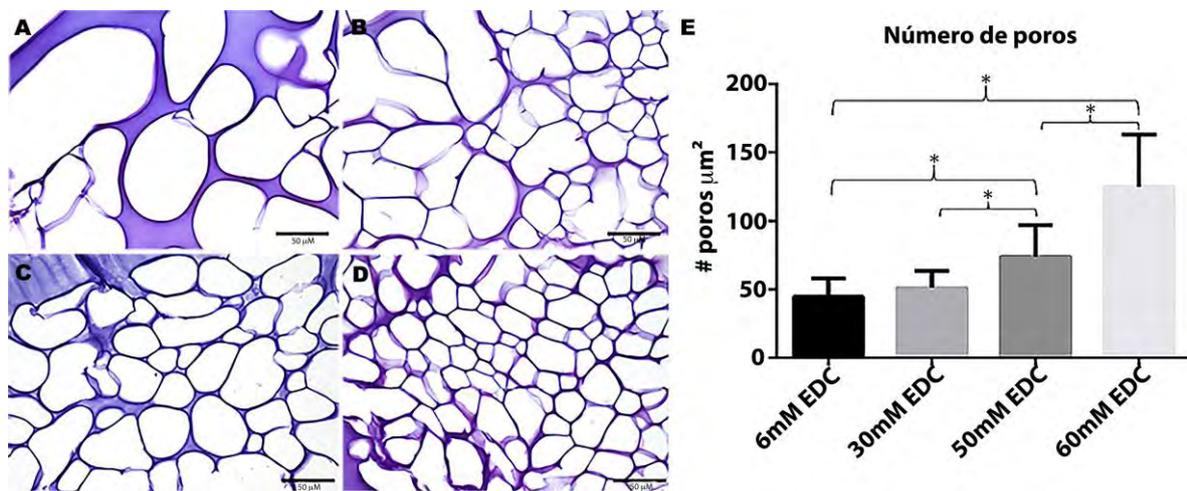


Figura 7. Andamios de gelatina (Ge)-ácido hialurónico (HA) con diferentes concentraciones de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida clorhidrato (EDC). Cortes histológicos tinción H&E : 6mM (A), 30mM (B), 50mM (C) y 60mM (D). Gráfico del número de poros por micra cuadrada (E). *P < 0.05

El EDC reduce el número y tamaño de poros debido a que forma uniones nuevas entre los grupos activados de ácido carboxílico con los residuos de glutamato, del aspartato o de los grupos amina de la gelatina logrando con ello una mejor estabilidad entre las cadenas poliméricas (Staroszczyk *et al.*, 2014).

El número de poros fue mayor en las esponjas entrelazadas con una concentración de 6 mM de EDC y fue disminuyendo paulatinamente hasta que el menor número de poros se observó en la concentración de 60 mM de EDC. De hecho, se observaron diferencias significativas entre el número de poros de las esponjas entrelazadas con una concentración de 6 mM y el número de poros de las esponjas entrelazadas con 50 y 60 mM, pero no hubo diferencias significativas con las esponjas

entrelazadas a 30 mM. En todos los casos, la morfología de las esponjas de Ge-HA fue altamente dependiente de la concentración del entrelazante EDC.

Es importante resaltar que se observaron 2 capas en las esponjas. Se constató que la región superior de la esponja, la cual estuvo expuesta directamente al vacío, fue diferente con respecto a la estructura a la parte inferior que estuvo en contacto con el molde. La gran capacidad formadora de películas de gelatina puede contribuir a la orientación de los canales de los poros en la parte superior. Por otro lado, la parte inferior del andamio tuvo una forma diferente debido al hecho de que el vacío no alcanzó la fuerza suficiente en comparación con la parte superior.

Es importante señalar que las características arquitectónicas del poro como la porosidad y el tamaño tienen un papel significativo en las características necesarias para que las células se adhieran, crezcan y proliferen, induciendo la formación de tejidos y puedan dar lugar a la regeneración tisular (Vasilescu *et al.*, 2011). Así, se ha considerado que un tamaño de poro que va desde 40 y hasta 200 micras es adecuado para crear un ambiente favorable para que las células se desarrollen.

Capacidad de absorción de los andamios de Ge-HA con diferentes concentraciones de EDC

Para que un andamio sea adecuado para la proliferación celular debe tener cierta capacidad hidrofílica lo cual puede inducir un apropiado aporte de nutrimentos disueltos en líquidos y una buena capacidad de oxigenación, además de prevenir la pérdida de fluidos corporales durante el tratamiento (Shabafrooz *et al.*, 2013), por esta razón, exploramos la capacidad de absorción de agua de las esponjas obtenidas con diferentes concentraciones de EDC. La capacidad de absorción en peso de cada esponja a diferentes concentraciones de EDC se obtuvo al restar el peso inicial del peso final de los andamios después de haberlos sumergido en agua destilada durante una hora. Los resultados de este experimento demostraron que la máxima absorción se presentó cuando las esponjas no fueron entrecruzadas con EDC, por lo que la capacidad de absorción de las esponjas fue disminuyendo conforme disminuyó la concentración de EDC (fig. 8a y b). Con anterioridad se había reportado (Kabiri *et al.* 2013) que cuando se aumenta la concentración de entrelazantes disminuye la capacidad de absorber agua debido a que el agente entrelazante forma redes entre las cadenas de polímeros. Así, si se coloca menos concentración de entrelazante se formarán menos redes del polímero y habrá una mayor cantidad de cadenas libres. No obstante lo anterior, la capacidad hidrofílica del ácido hialurónico se conserva aun cuando sea entrelazado con EDC.

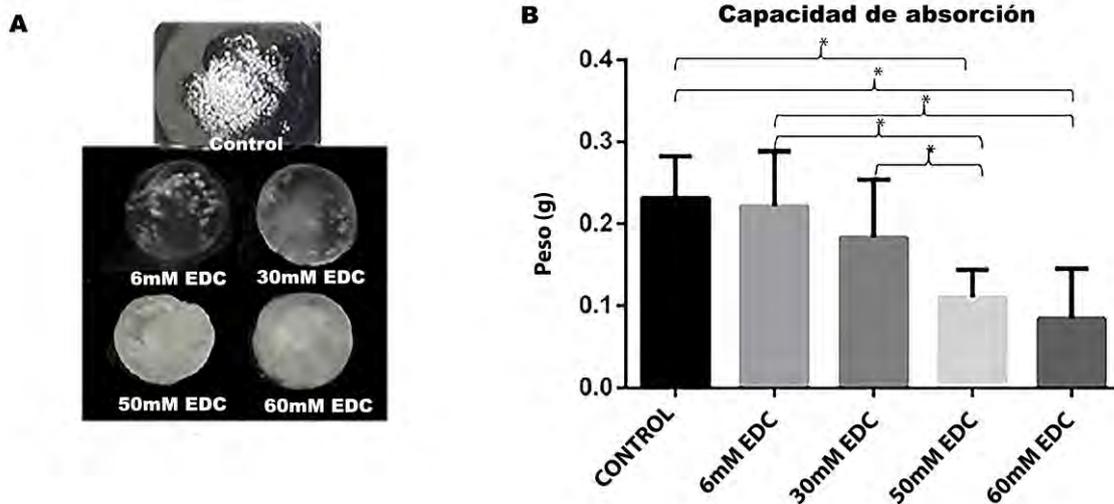


Figura 8. A. Andamios de Ge-HA con diferentes concentraciones de EDC, hidratados con PBS por una hora; B. Gráfico de la cantidad de PBS absorbido por el andamio por una hora. Comparación múltiple de Tukey * $P < 0.05$

Microanálisis por Rayos X de andamios de Ge-HA con diferentes concentraciones de EDC.

Con el objeto de conocer la composición química de los andamios de Ge-HA entrelazados con diferentes concentraciones de EDC se analizaron los elementos presentes en cada muestra mediante análisis de dispersión de energía de rayos X (EDS). En la figura 9 se puede observar el análisis de EDS, en escala logarítmica, realizado a los diferentes andamios de Ge-HA. Todos los andamios mostraron la presencia de varios elementos como carbono, oxígeno, sodio, cloro, azufre y calcio, como se muestra en la figura 9G, expresados en porcentaje en peso (wt%). La concentración de algunos de los elementos en las esponjas no mostró cambios significativos, sin embargo, es de destacar que en el sodio y el azufre sí se encontró una diferencia, que aunque no fue significativa, sí marca una tendencia de disminuir su porcentaje en peso conforme se aumenta la concentración de EDC como entrelazante. Es conocido que el ácido hialurónico no posee grupos azufre y por lo tanto, aunque es hidrofílico no posee la misma hidrofiliidad que los otros glucosaminoglucanos. Sin embargo, cuando el ácido hialurónico se combinó con gelatina estos grupos azufre aparecieron, indicando que provienen de la estructura de la gelatina, en un porcentaje de 0.80 en las esponjas entrelazadas con EDC a 6mM; en contraste las esponjas entrelazadas a una concentración de 60mM tuvieron un porcentaje de 0.06. El hecho de que las esponjas de Ge-HA entrelazadas con 60mM de EDC contengan menos azufre concuerda con su menor capacidad para atraer agua como ya fue mostrado anteriormente. La capacidad de los glucosaminoglucanos en atraer agua radica en la presencia de

moléculas de azufre que poseen una carga negativa, esto hace que iones de sodio sean atraídos junto con moléculas de agua hacia los tejidos conjuntivos ricos en proteoglicanos. El hecho de que las esponjas de Ge-HA contengan grupos azufre sugiere que pueden ser adecuadas para funcionar como andamios donde las células colocadas en ellas puedan proliferar y crecer formando tejidos.

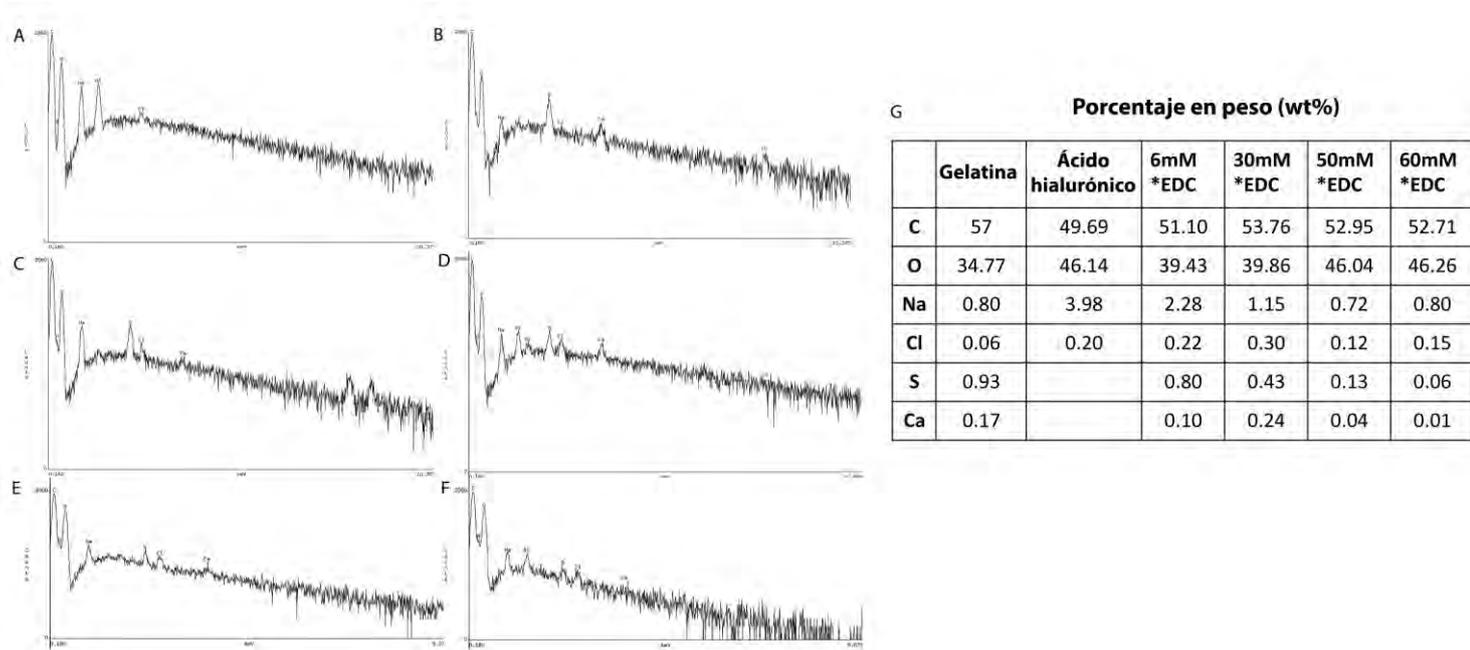


Figura 9. Espectro de EDS: A) Gelatina (Ge), B) ácido hialurónico (HA), C) 6mM, D) 30mM, E) 50mM y F) 60mM. Tabla con los resultados en porcentaje de los EDS (G).

Citotoxicidad en los andamios de Ge-HA con diferentes concentraciones de EDC

Con objeto de analizar si el proceso de entrecruzamiento de la Ge-Ha es adecuado para el crecimiento celular, realizamos una prueba de citotoxicidad mediante la cuantificación de liberación de la enzima LDH por colorimetría. El método de detección de la enzima LDH en el medio de cultivo como indicador de citotoxicidad es un método confiable y fácil de realizar utilizado con frecuencia en ingeniería de tejidos (Tengvall *et al.*, 2003).

El sobrenadante de los cultivos en todos los casos se obtuvo 4 horas después que las células fueron sembradas en los andamios entrelazados con diferentes concentraciones de EDC. Los resultados de citotoxicidad obtenidos mostraron que la intensidad del color disminuyó conforme hubo menos cantidad de células muertas en cada grupo experimental y en los controles. Así, se observó que la máxima absorbancia, 0.68, la mostró el control positivo de células muertas que no estuvieron sembradas en andamios, mientras la menor absorbancia se observaron cuando en

muestras de células vivas no sembradas en andamios y fue de 0.2. Cuando se analizó el medio de cultivo sin células no se observó absorbancia alguna. Mientras que cuando las células fueron sembradas en los andamios a diferentes concentraciones de entrecruzamiento se obtuvieron las siguientes absorbancias: 6mM de EDC = 0.32, 30mM = 0.5, 50mM = 0.26 y 60mM = 0.63 (fig. 10).

En todos los casos de células sembradas en los andamios a diferentes concentraciones, con excepción del de 60mM de EDC, se observó un cambio importante y significativo con respecto al control de células muertas. En el caso de las células sembradas en el andamio de 60mM no se encontraron cambios significativos con respecto al grupo control de células muertas. El hecho de que los andamios de Ge-HA entrelazados con EDC a 60mM induzcan citotoxicidad puede deberse a que el proceso de retirar los residuos del mismo haya sido ineficiente, como otros han observado (Park *et al*, 2002), y quizás se requiera más tiempo en el proceso de liofilización para retirar el entrelazante.

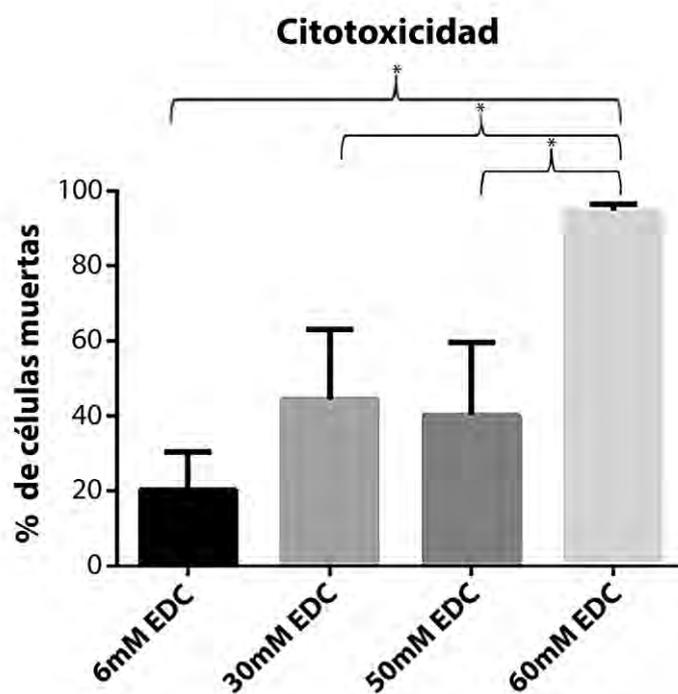


Figura 10. La gráfica representa el porcentaje de células muertas al colocarlas sobre los andamios de GE-HA con diferentes concentraciones de EDC. Comparación múltiple de Tukey * $P < 0.05$

Cultivo *in vitro* en andamios de Ge-HA con diferentes concentraciones de EDC

Los andamios de Ge-HA entrelazados con diferentes concentraciones de EDC se sembraron con 50×10^3 BMSC durante 7 días y se obtuvieron cortes histológicos teñidos con HE. En los andamios entrelazados a concentraciones de EDC de 6mM, 30mM, 50mM y 60mM; se observaron cúmulos de células con citoplasma eosinófilo, núcleo redondeado con cromatina finamente granular y con prolongaciones extendiéndose hacia las fibras del andamio (Fig. 11). Por otro lado, es importante resaltar que en los andamios entrelazados con EDC a 60mM mostraron muy pocas células con sus membranas notoriamente dañadas y con núcleos pequeños y picnóticos (Fig. 11), lo cual indicó claramente que estaban en proceso de muerte celular. Este hallazgo concuerda con los resultados de citotoxicidad, en donde se observó que los andamios entrecruzados a concentraciones de 60 mM de EDC mostraron un incremento en la citotoxicidad.

Además de la concentración de EDC, la muerte de las células se puede deber al tamaño de los poros y a la baja capacidad de difusión de agua y oxígeno en el interior del andamio como resultado de la menor capacidad de absorción de agua de los andamios entrelazados con EDC a 60 mM, como ya se mostró con anterioridad.

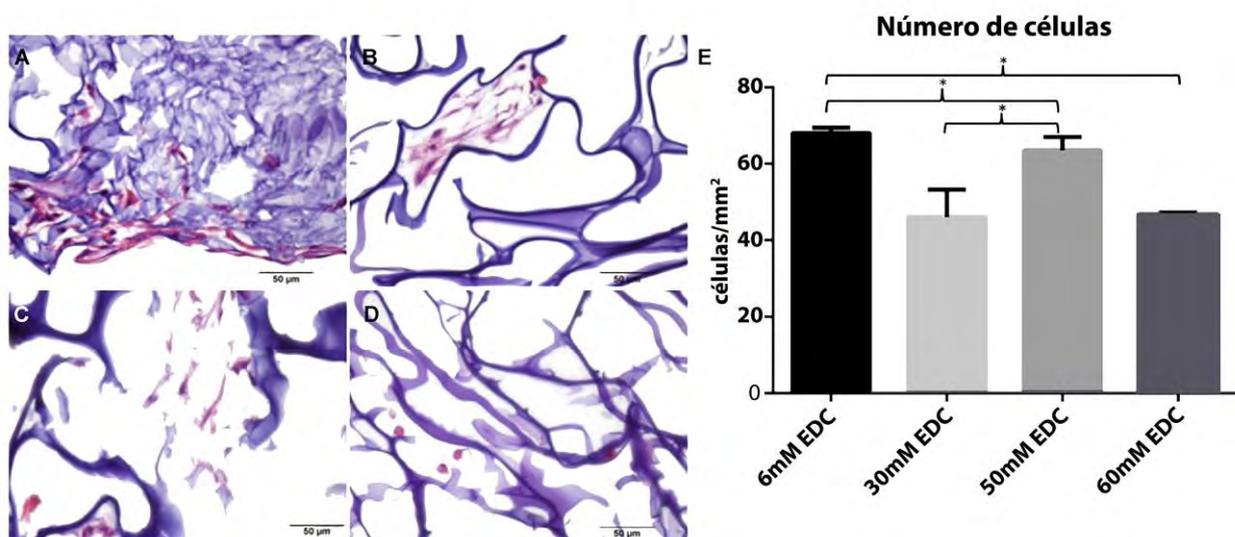


Figura 11. El gráfico muestra el número de células por mm^2 contadas en distintos campos de andamios de Ge/HA entrecruzados con diferentes concentraciones de EDC: A. 6mM, B. 30mM, C. 50mM y D. 60mM. Comparación múltiple de Tukey * $P < 0.05$

Fabricación de andamios de Ge-con diferentes HA.

En los resultados previos, se determinó la dosis óptima del entrecruzante, la cual fue de 50mM de EDC. Así, esta dosis de EDC fue empleada para entrecruzar los andamios de Ge-con

diferentes HA, independientemente del grado de entrecruzamiento del HA Restylane, siguiendo la metodología ya mencionada.

Cabe señalar, que los HA Restylane poseen distintos tipo de densidad y tamaño de partícula, dependiente del grado de entrecruzamiento. A continuación se enumeran los HA Restylane de menor a mayor densidad y tamaño de partícula: R1) *Restylane Vital* (para la hidratación de la cara); R2) *Restylane sofá* (para el relleno de las arrugas finas); R3) *Restylane Perlane* (para el relleno de labios y surcos) y R4) *Restylane Sub-Q* (para el relleno de pómulos) y el HA nativo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) el cual no contiene entrecruzante (Sánchez *et al.*, 2010). Restylane fue elegido debido a su amplia utilización en cirugía estética y dermatología gracias a su baja morbilidad al momento de la aplicación y la reversibilidad potencial con hialuronidasa (British Journal of Dermatology, 2015).

IR de andamios Ge con diferentes concentraciones de HA

Se elaboró una biblioteca de espectros de los compuestos que se ocuparon en la construcción del andamio de Ge con los diferentes HA. El espectro de la Ge muestra las bandas que corresponde a los enlaces C=O a 1,650; N-H a 1,545; C-C a 1,455 y C-H a 1,080, mientras que el espectro del HA mostró la banda del COOH a 1,614 y no mostró las bandas de C-C, C=O y N-H (fig. 12). Es de notar que en ambos espectros se observan los puentes de hidrógeno del agua entre los 3,000 y 3,500.

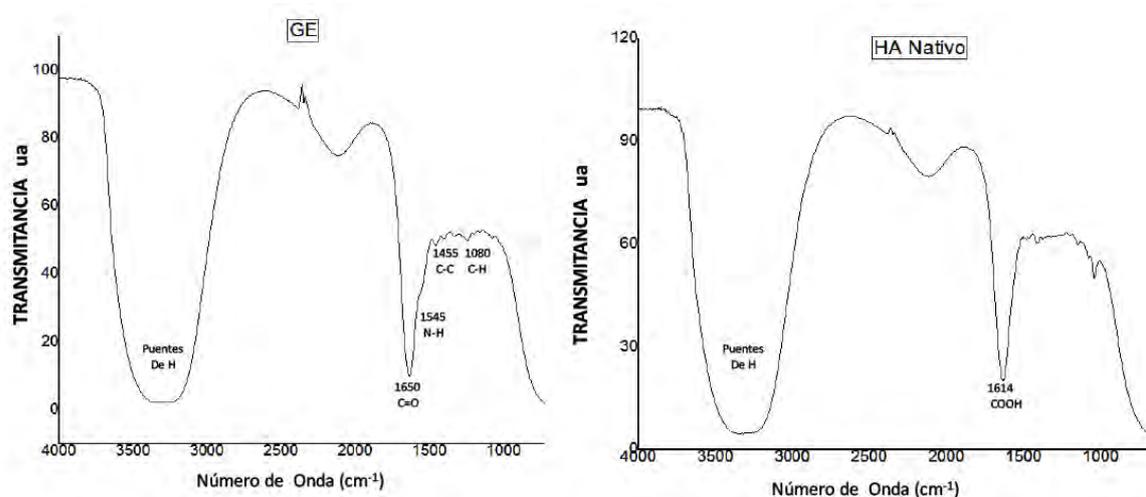


Figura 12. Espectros de IF de Ge y HA donde se observa las bandas que corresponden al material orgánico que va de los 1700 a los 900.

Con respecto a los espectros de IF de las muestras Ge-HA R1 al R4 y nativo se observó que sus bandas fueron similares mostrando enlaces C=O a 1,650, N-H a 1,545, C-C a 1,455, C-H a 1,080 y de COOH a 1,614. La diferencia más notable se observó en la concentración de agua dentro de cada uno de los andamios. Lo anterior se debió a que el HA R1 posee un menor grado de entrecruzamiento y absorbe más agua mientras el HA R4 se encuentra más entrecruzado, por lo que absorbe menos agua al igual que el HA nativo (fig. 13). En general se encontró agua en todos los grupos por lo tanto, la formación de puentes de hidrógenos intermoleculares fuertes debilitaron el enlace OH en el dímero, lo cual indujo el descenso y el ensanchamiento en la banda de absorción ubicada entre el rango de 3,000 a 3,500nm.

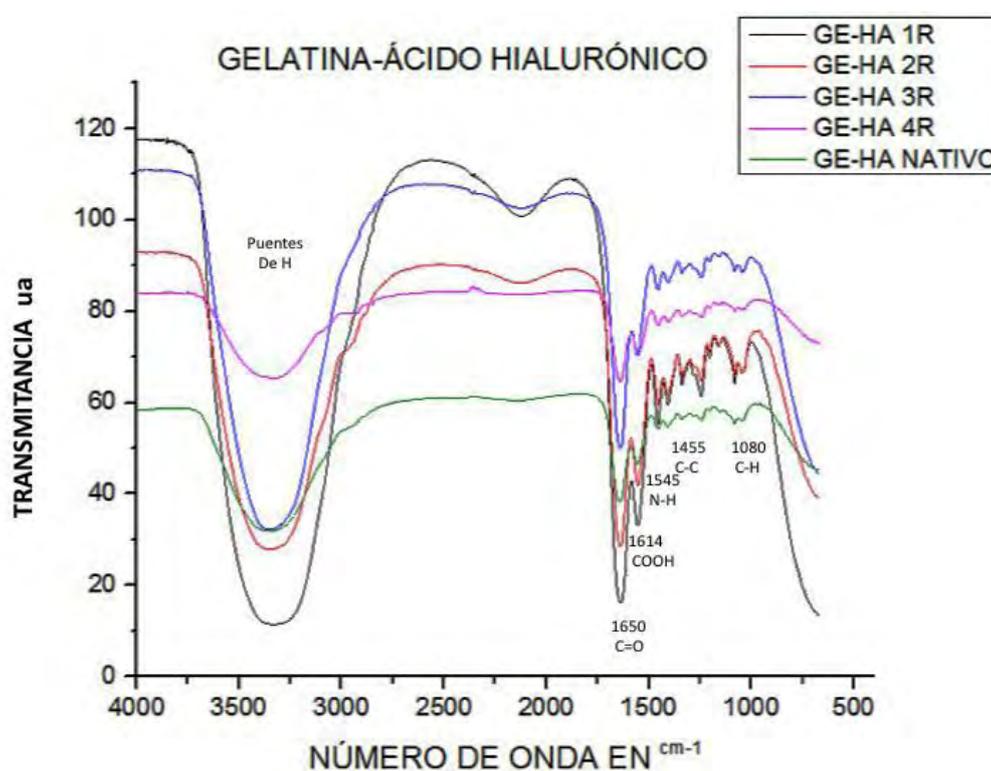


Figura 13.- Espectros de IF de la mezcla de Ge y HA donde se observa las bandas que corresponden al material orgánico que va de los 1700 a los 900.

Finalmente, es importante destacar que la presencia de las bandas de COOH, NH y dobles enlaces en los andamios permitieron el proceso de entrecruzamiento de la Ge con los diferentes HA (Wiley y Sons, 2004; Kabiri *et al.*, 2013) formando enlaces amida.

Estos resultados coinciden con lo publicado por Pasqui cols. en 2007 donde mostró en polímeros de ácido hialurónico una banda a los 1,650 que correspondió al estiramiento del doble enlace CO y a los 1,605 localizaron el estiramiento simétrico del doble enlace de CO. Mientras que Ibrahim cols. en 2011 y Staroszczyk cols. en 2014 observaron las principales bandas de la gelatina:

amida A en la posición 3,280, amida B en la banda 3,075 y entre los 2,970-2,940, amida I a los 1,633, amida II entre los 1,400 a 1,538 y finalmente la amida III en la posición de los 1,238.

MEB de los andamios Ge con diferentes HA

Es bien sabido que las características de superficie tales como bordes, ranuras y rugosidad de los biomateriales afectan el comportamiento de las células (Enrione *et al.*, 2013). Con el propósito de observar las características de la superficie de cada una de las muestras de los andamios de Ge con diferentes concentraciones de HA, los andamios se liofilizaron y procesaron para MEB y, de manera similar a la técnica de IR, se construyó una biblioteca de imágenes de cada grupo.

La figura 14 micrografía de barrido muestra en: A) Ge una estructura porosa mientras que B) es HA nativo, el cuál es menos poroso que la Ge, los HA-R1 al R4 (C,D,F y G) mostrarán estructura continua.

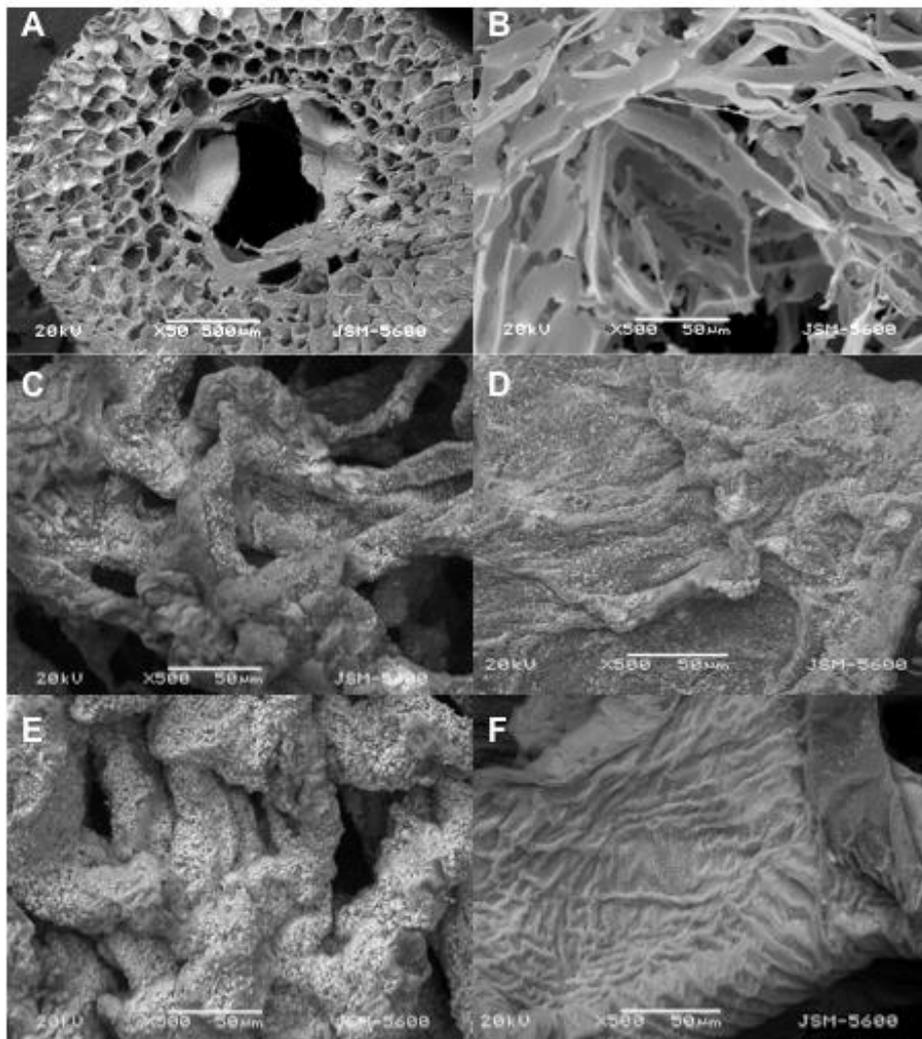
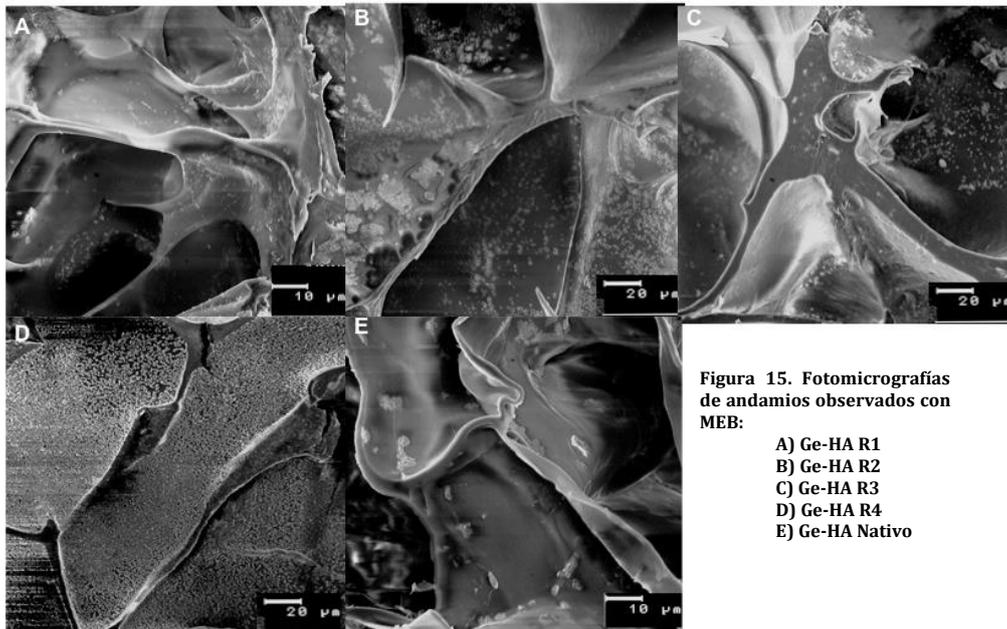


Figura 14. MEB de: A) Ge; B) HA nativo; C) HA R1; D) HA R2; E) HA R3 y F) HA R4. Se observan andamios sintetizados con Ge y diferentes HA con distintos grados de entrecruzamiento. Es de notar que en la Ge y el HA nativo se observan poros a distintos tamaños, mientras que en los HA R1, R2, R3 y R4 no se observan.

Una de las características más relevantes, fue la presencia de precipitados sobre la superficie de los andamios Ge-con los diferentes HA después de liofilizarlos (fig. 15).



Con la finalidad de conocer la composición química de los andamios de Ge con diferentes HA e identificar los precipitados observados, se analizaron los elementos presentes en cada muestra mediante análisis de dispersión de energía de rayos X (EDS). En la figura 16 se puede observar el análisis de EDS, en escala logarítmica, realizado a los diferentes andamios de Ge-con diferentes HA. Todos los andamios mostraron la presencia de varios elementos como carbón, oxígeno, sodio y cloro. En la figura 16F se muestran las concentraciones de los elementos presentes en cada andamio, expresadas en porcentaje en peso (wt%). La concentración de algunos de los elementos como el Na y el Cl, varió de manera significativa en los andamios Ge-HA R1 al R4 teniendo la mayor presencia de esos elementos R4, esto se debe a que los HA Restylane están suspendidos en buffer de fosfatos y el HA nativo está en polvo y se resuspendió en agua destilada, razón por la cual HA nativo fue el que menos concentración mostró de Na y Cl; sin embargo, el HA nativo fue el que demostró una mayor concentración de C debido a su proceso de obtención (Sánchez *et al.* 2010). Estos resultados confirman que la composición del andamio es dependiente del tipo de HA. Diferentes estudios que utilizaron andamios similares de Ge-HA observaron una disminución en la concentración de Na y Cl (Enrione *et al.*, 2013). En nuestra investigación, hemos obtenido una arquitectura diferente en los andamios Ge-R1 al Ge-R4 con concentraciones altas de Na y Cl, debido

al amortiguador que contiene el HA Restylane, siendo el HA nativo (Sigma Aldrich) el único que coincide con los datos reportados por Enrione y cols. en 2013.

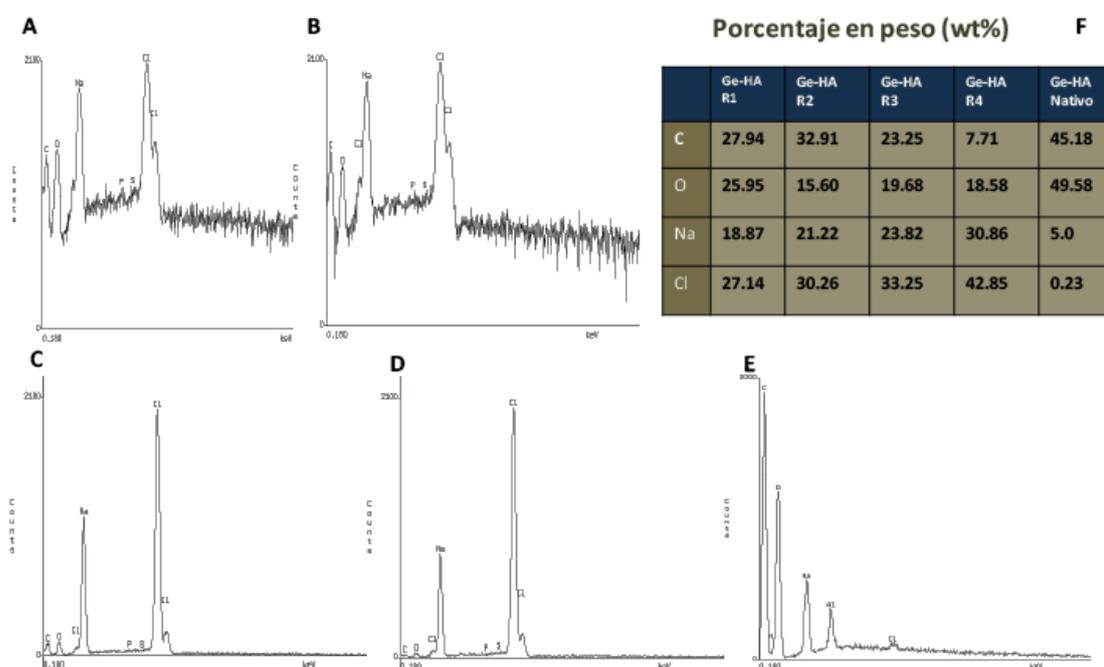


Figura 16. Espectro de EDS de cada uno de los andamios analizados de Ge-HA: A) Ge-HA R1; B) Ge-HA R2; C) Ge-HA R3; D) Ge-HA R4; E) Ge-HA Nativo y F) Tabla con los resultados en porcentaje de los EDS.

La figura 17 muestra los diferentes tipos de morfología de los andamios Ge-con distintos HA entrecruzados con 50mM de EDC, se puede observar un material poroso donde el tamaño de estos varió en cada una de las muestras (fig. 17 f). El promedio de tamaño del poro para Ge-HA R1 fue de $65\mu\text{m}$ y tuvo diferencia significativa con Ge-HA R2 ($20\mu\text{m}$), Ge-HA R4 ($78\mu\text{m}$) y Ge-HA Nativo ($50\mu\text{m}$); mientras que Ge-HA R3 ($63\mu\text{m}$) mostró cambios significativos con Ge-HA R4 y Ge-HA Nativo. Con respecto a los resultados obtenidos del tamaño de poro con diferentes concentraciones de EDC, 6 mM tuvo una media de $48.2\mu\text{m}$, 30 mM tuvo una media de tamaño de poro de $34.69\mu\text{m}$ y 50 mM tuvieron una media de $30.48\mu\text{m}$. Los andamios diseñados para la ingeniería de tejidos deben cumplir con ciertos parámetros, tales como tamaño de poro, distribución de poros y porosidad de la matriz, que están directamente relacionados con la fijación, la migración, proliferación celular además de permitir la difusión de nutrientes (Nguyen *et al.*, 2013). De acuerdo a esto, los andamios reportados en este trabajo, el tamaño de poro varió de 20 a $80\mu\text{m}$, en general, por lo que tienen un tamaño adecuado para ser usados en ingeniería de tejidos. Sawatjui y cols., en el año 2015, encontraron un tamaño de poro de $211.2 \pm 30\mu\text{m}$, en un andamio elaborado de fibroína de seda con gelatina, ácido hialurónico y condroitin sulfato. Singh y cols., en 2014, demostraron que un

tamaño de poro de entre 30 a 250 μm es apropiado para sembrar osteoblastos, debido a que facilitan la absorción de matriz y permiten la adhesión, proliferación y migración de las células.

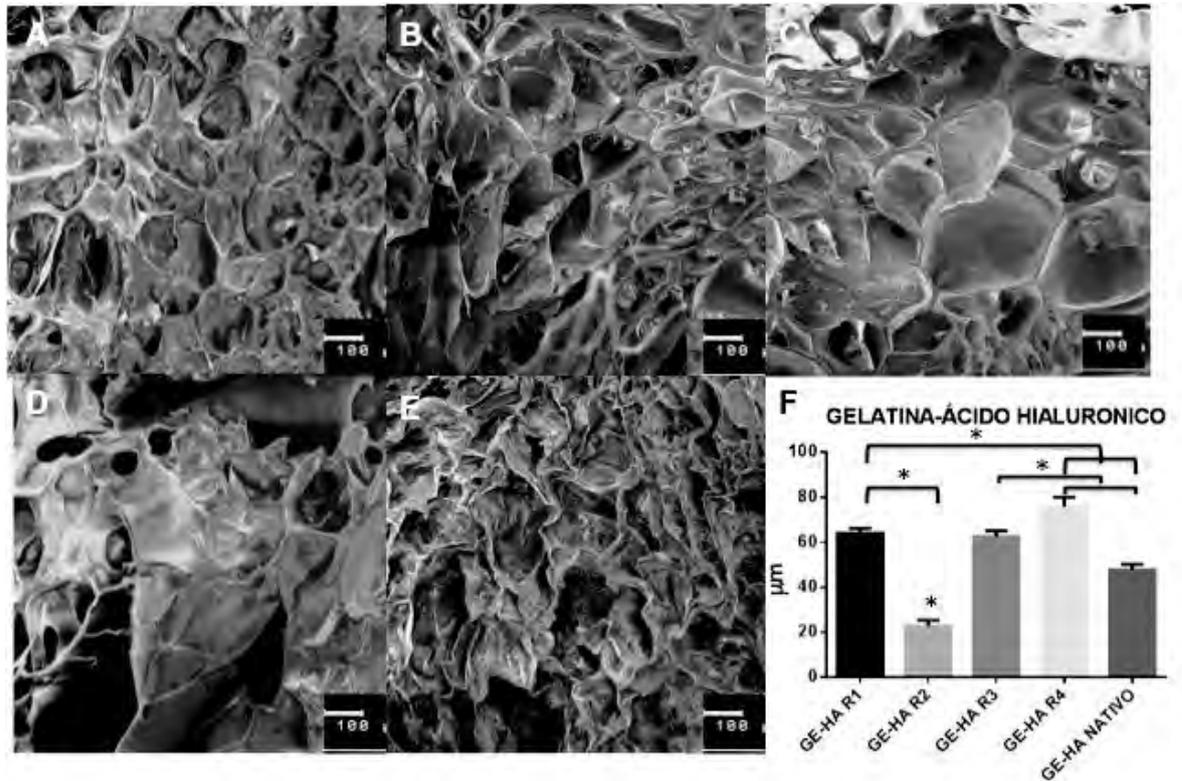


Figura 17. MEB donde se muestra la porosidad de los diferentes grupos experimentales: A) Ge-HA R1; B) Ge-HA R2; C) Ge-HA R3; D) Ge-HA R4; E) Ge-HA Nativo y F) Tabla tamaño de poro de los diferentes experimentos.

Cultivo *in vitro* en andamios de Ge-con diferentes HA

Los andamios de Ge-con diferentes HA se sembraron con 50×10^3 BMSC durante 7 días, se fijaron con formol 10% toda la noche y se procesaron para obtener cortes histológicos teñidos con HE. En los andamios se observaron cúmulos de células con citoplasma eosinófilo, núcleo redondeado con cromatina finamente granular y con prolongaciones extendiéndose hacia las fibras del andamio (fig. 18), de manera similar a lo encontrado en los andamios de Ge-HA con 6, 30 y 50mM de EDC (fig. 11).

El número de células varió de 40 a 70 células por mm^2 , pero únicamente los andamios Ge-HA R3 tuvieron diferencia significativa en comparación con el Ge-HA Nativo (fig. 18).

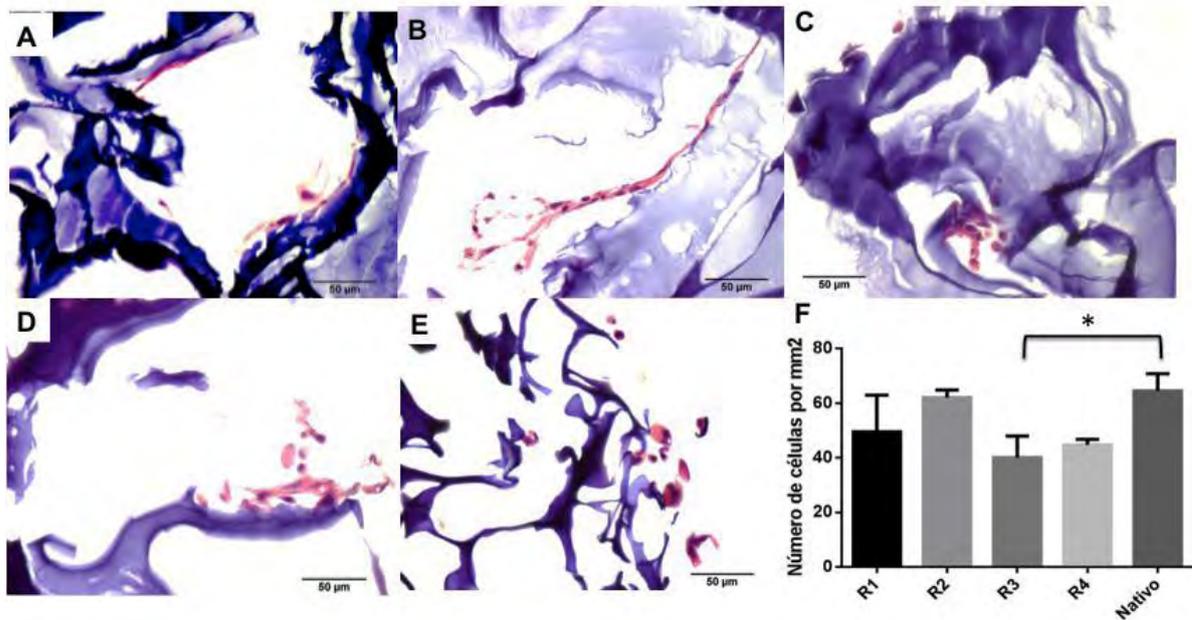


Figura 18. Se observan BMSC sembradas sobre los andamios y la estructura porosa de cada uno de ellos: A) Ge-HA R1; B) Ge-HA R2; C) Ge-HA R3; D) Ge-HA R4; E) Ge-HA Nativo y F) Tabla de número células por mm². Técnica de HE P < 0.005

Otros investigadores han empleado polímeros naturales como la Ge y HA para regeneración ósea y cartílago como Sawatjui *et al.* (2015), que cultivó BMSC sobre andamios de fibroína de seda/Ge-HA-condroitín sulfato, encontrando que las células se adhieren y proliferan gracias a los motivos RGD que proporciona la Ge. En un estudio similar realizado por Heri *et al.* (2016), se entrecruzó a Ge y HA con Poli(etilen glicol) diacrilato (PEGDA) y se observó que éstos andamios promovieron la adhesión celular mediada por integrinas, además de inducir la migración celular. Por otro lado, Zhao *et al.*, en el año 2014, funcionalizaron con thiol a HA y Ge para cultivar células mesenquimales humanas, observando que el comportamiento de las BMSC en los andamios de Ge y HA es similar a los resultados que nosotros reportamos con Ge-HA nativo (fig. 19).

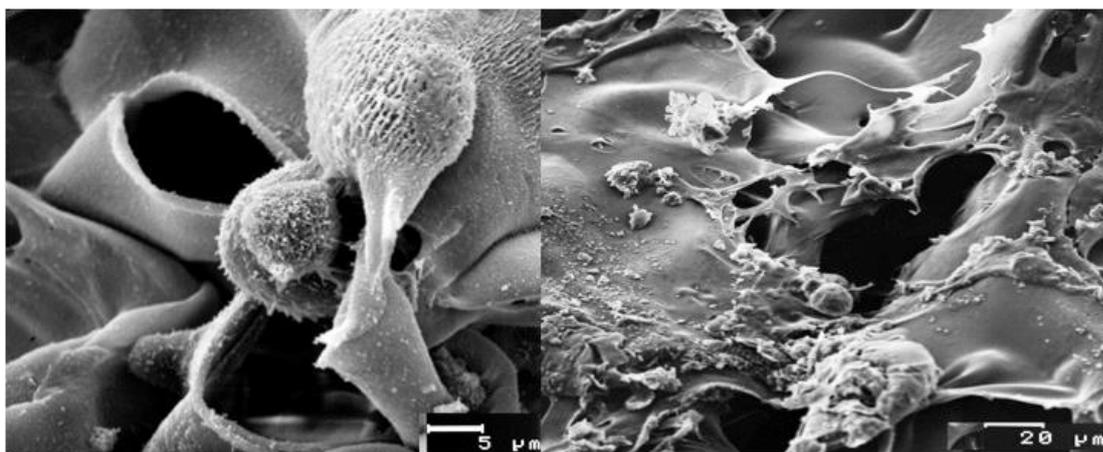


Figura 19. MEB de andamio de Ge-HA entrecruzado con 50mM de EDC sembrados con BMSC, donde se observa la presencia de células sobre la superficie del andamio y entre los poros.

Síntesis de microesferas

Con el método ya descrito, los resultados mostraron que la solución de 0.5% de SPAN 80, con 1% de quitosán y 10 mL de glutaraldehído no formaron microesferas, por el contrario se observaron precipitados irregulares de quitosán de tamaño micrométrico (fig. 20).

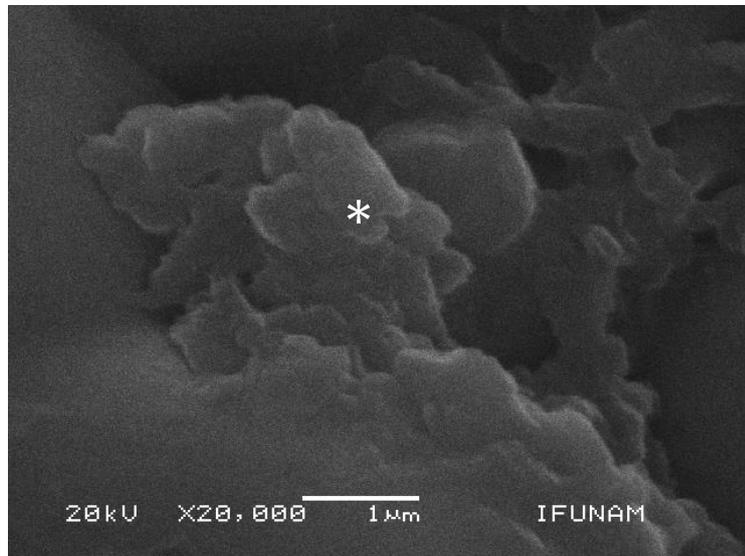


Figura 20. MEB del producto de la emulsión aceite mineral/SPAN 80 al 0.5%-quitosán al 1%-10ml de glutaraldehído al 25%; donde se observan precipitados amorfos (*).

Cuando se observaron las microesferas fabricadas con la solución de quitosán al 1% y SPAN 80 al 0.5% y 5 mL de glutaraldehído, se encontró que los precipitados del polímero fueron de mayor tamaño e irregulares (fig. 21)

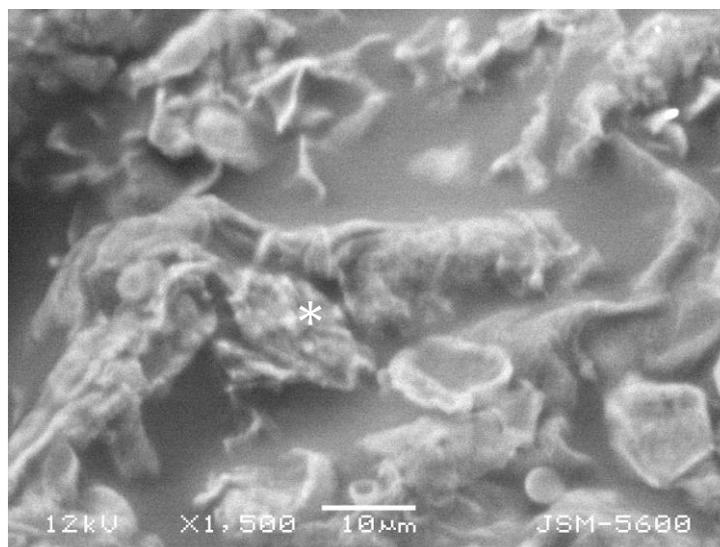


Figura 21. MEB del producto de la emulsión aceite mineral/SPAN 80 al 0.5%-quitosán al 1%-5ml de glutaraldehído al 25%; donde se observan precipitados amorfos menos reticulados (*).

Debido a que con las concentraciones anteriores no se formaron microesferas, se decidió aumentar la concentración del SPAN 80 del 0.5 al 2% y de quitosán del 1% al 2%. ¿Por qué se decidió esto? Debido a que la estructura química de los polisorbatos como el SPAN 80 influyen en la formación de micelas, por lo tanto, al aumentar la concentración, los excipientes formados por emulsión se estabilizan más rápidamente por la degradación de los enlaces éster de ácido polioxietileno y ácidos grasos presentes en el aceite mineral (Kerwin 2008). Por otro lado, al aumentar la concentración del polímero se incrementa la viscosidad de la solución dispersa así como el tamaño de la gota, de tal manera que se asegura la formación de esferas, logrando con ello evitar que se colapsen o se rompan (Kosegarten et al 2012).

Así, con las concentraciones ya comentadas, se obtuvieron microesferas de quitosán menores a $10\ \mu\text{m}$, sin embargo estuvieron cubiertas por un exceso de tensoactivo (fig. 22).

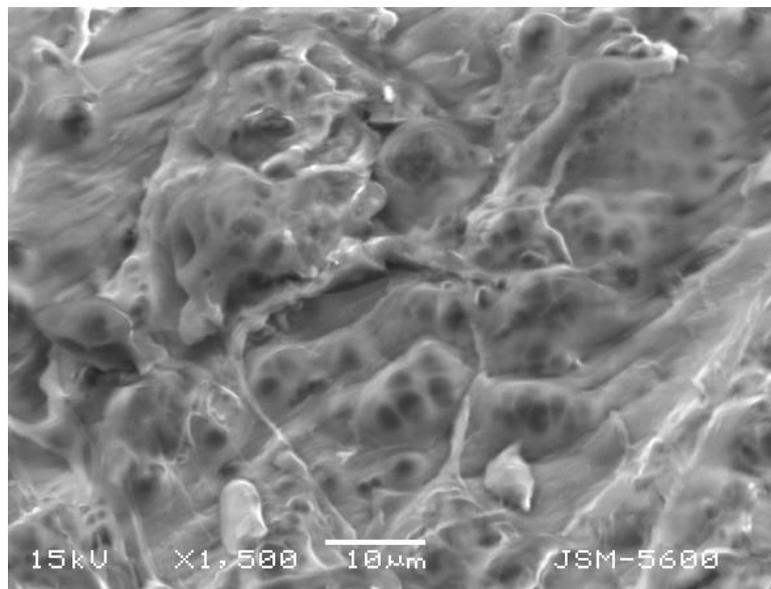


Figura 22. MEB del producto de la emulsión aceite mineral/SPAN 80 al 2%-quitosán al 2%-10ml de glutaraldehído al 25%. Se pueden observar formas esféricas cubiertas por una capa fina de material.

En otra serie de experimentos se modificó solamente la concentración de SPAN 80 de 2 a 1% y la concentración de quitosán fue de 2% y con 10 mL de glutaraldehído al 25%. Bajo estas condiciones se obtuvieron microesferas de aproximadamente 1 a $5\ \mu\text{m}$ de diámetro (Fig. 23). Estos resultados fueron similares a los de Teng y cols. (2016), que obtuvieron microesferas de 3 a $10\ \mu\text{m}$, empleando el glutaraldehído al 25% para la reticulación, con un tiempo de agitación de 5 horas. La diferencia con los resultados de la presente tesis fue que ellos mezclaron colágena con el HA en lugar de Ge. De manera similar, Faranesh y cols., en 2004, con la técnica de emulsión lograron sintetizar

microesferas de PLGA de 48 μ m después de agitar magnéticamente la solución por 3 horas y sonicarla.

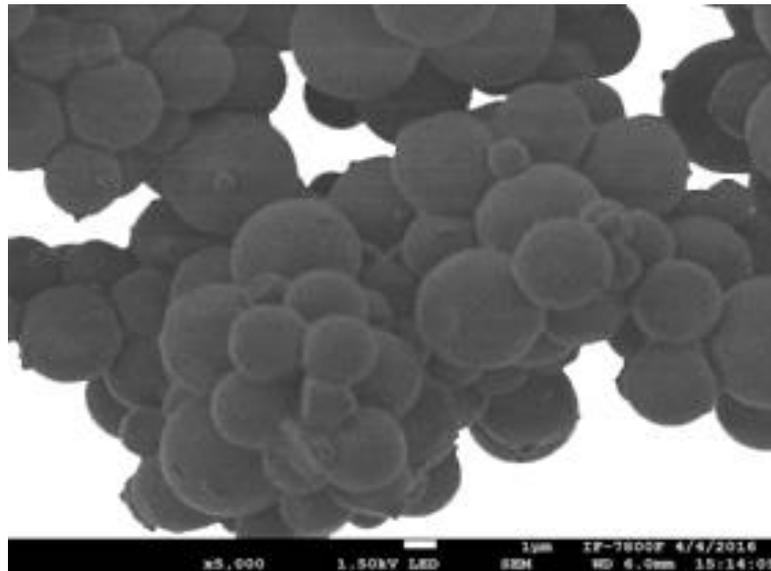


Figura 23. MEB del producto de la emulsión aceite mineral/SPAN 80 al 1%- quitosán al 2%-10ml de glutaraldehído al 25%. Se pueden observar las microesferas de quitosán.

Realizando un análisis cuantitativo de las microesferas, por citometría de flujo con el método ya descrito, el número de microesferas obtenido fue de 1,000x μ l. La forma de las microesferas fue consistentemente redondeada con un tamaño de 1 a 5 μ m (fig. 24).

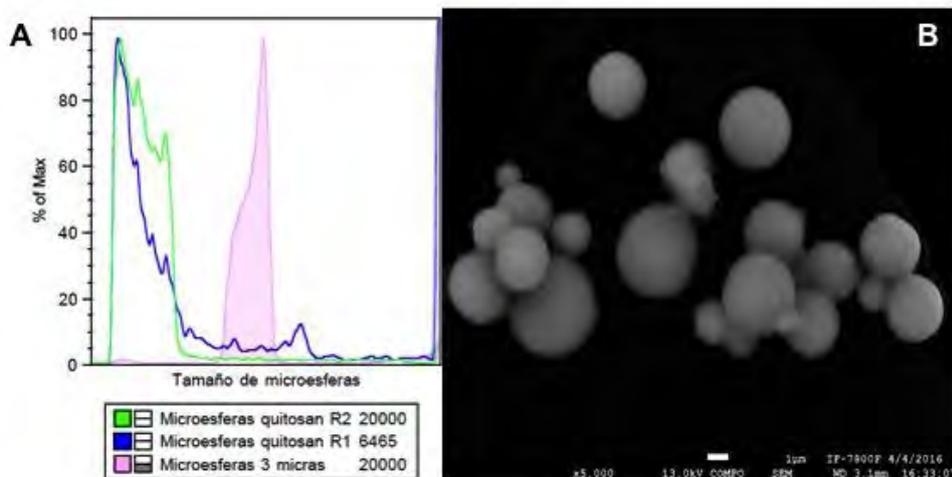


Figura 24. A. Histograma de microesferas de quitosán repetición 1 y 2 (R1 y R2) comparadas con microesferas de vidrio de 3 μ m. B. Microesferas de quitosán

Por otro lado, cuando se aumentó ligeramente la velocidad de agitación y el tiempo de goteo del quitosán a una concentración de 2%, se obtuvieron microesferas de un tamaño de 100 nm a 5 μm (fig. 25).

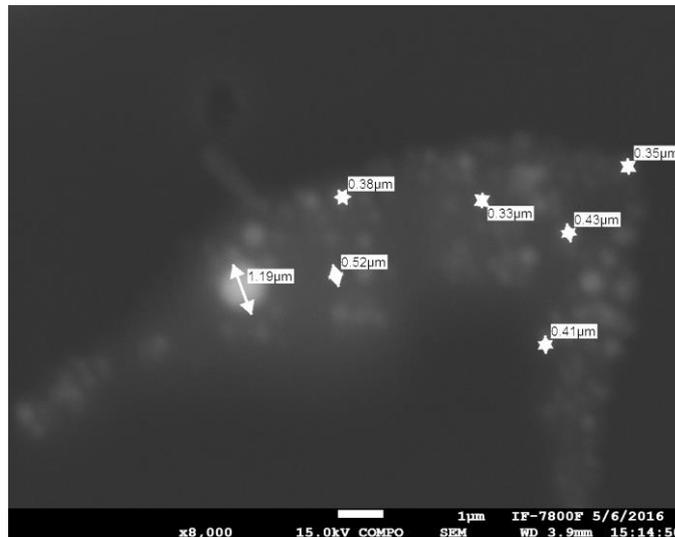


Figura 25. Microesferas de quitosán al 2% con 1% de albumina

La composición de las microesferas analizada por medio de espectroscopía RAMAN mostró una banda entre los 1,310 a 1,400 cm^{-1} que corresponde a los enlaces N-H y C-N de la amida terciaria que conforma a la albúmina, mientras que de los 1,600 a 1,700 cm^{-1} se observaron los enlaces C=O de la amida primaria así como lo demostró Tattini cols en 2006.

Las vibraciones del esqueleto de quitosán se observaron de los 300 a 400 cm^{-1} que corresponde a los enlaces C-C-C, mientras que en la banda de los 2,800 a 3,200 cm^{-1} se observó una fuerte vibración de los enlaces C-H. Por otro lado, en la banda de 2,100 a 2,300 cm^{-1} se observó una fuerte vibración de C-C, mientras que en la banda de entre 600 a 1,300 cm^{-1} se observó una vibración medianamente marcada de C-C (Fig. 26). Hernández y cols. (2009), y Escobar y cols. (2013), han corroborado la presencia de los espectros característicos del quitosán en diferentes estructuras como nanotubos o en láminas y corresponden a las mismas bandas que se observaron en las microesferas de quitosán.

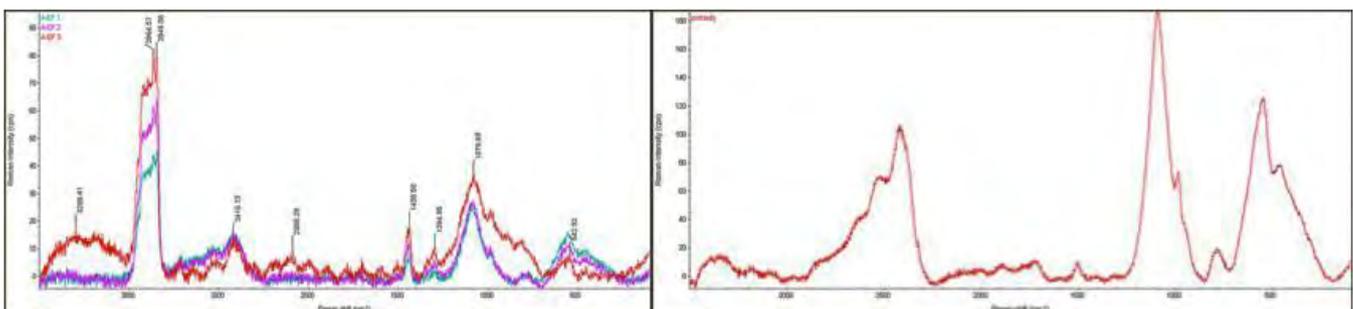


Figura 26. Espectroscopía RAMAN 3 repeticiones de la microesferas de quitosán y espectro del portaobjetos.

La figura 27 muestra la absorción de las proteínas recombinantes VEGF y BMP-2 liberadas a una hora, la cual indica la concentración de VEGF que fue de 0.5 ng/mL y 0.1 ng/mL para la BMP-2, con respecto a la curva de concentración. La manera de colocar los factores de crecimiento en las microsferas y el tipo de polímero usado, regulan su disponibilidad en cantidades precisas para llevar a cabo su función. En 2014, Suárez y cols., demostraron que la liberación de VEGF fue mayor que la liberación BMP-2 después de haber sumergido sus andamios durante 1 hora en una solución de 1mg/mL que contenía ambas proteínas. Se consideró que este resultado se debió a que el VEGF tiene mayor afinidad por la albumina, así, nuestros resultados coincidieron debido a que la BMP-2 tuvo una menor absorción que el VEGF-1, a pesar de que nosotros colocamos los factores de manera independiente. Por otro lado, Shah cols. (2011), observaron que la concentración del factor de crecimiento de 12µg/mL permitió una absorción de 0.7ng/mL; sin embargo, la concentración que nosotros obtuvimos es considerada dentro del rango para inducir diferenciación celular (Suárez et al. 2014).

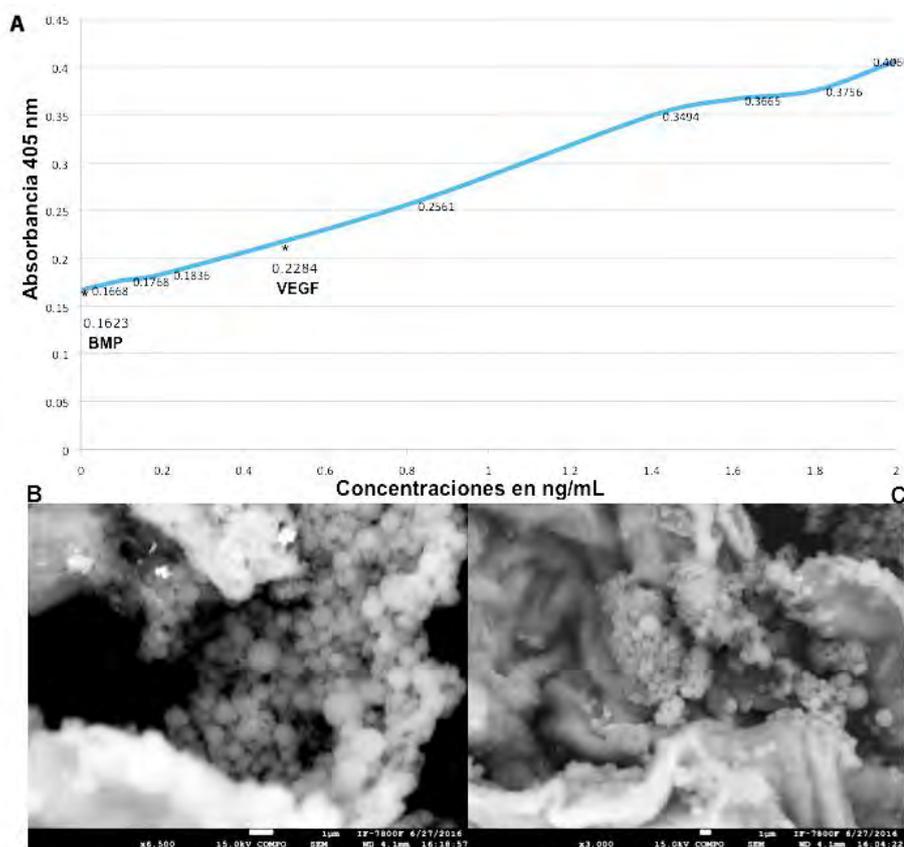


Figura 27. A. Curva de absorción y localización de la absorción de VEGF y BMP-2. B. MEB de microsferas con VEGF. C MEB de microsferas con BMP-2.

X. CONCLUSIONES

Los biomateriales de origen natural juegan un rol importante en la ingeniería ósea ya que tienen influencia sobre la matriz de las células adyacentes del tejido en formación, gracias a sus motivos de unión a integrinas como el RGD, DGEA o PHSRN presentes en la colágena y la Ge o bien por su comportamiento viscoelástico, mucoadherente e hidrofílico como el HA que es reconocido por la célula a través del receptor CD44. En este estudio se emplearon ambos polímeros entrecruzados con EDC, demostrando que el entrecruzante facilitó la formación de ésteres entre hidroxilos, grupos carboxilo y aminas, en los andamios de Ge-HA; con ello, se incrementó el número de poros y su resistencia a la degradación, por lo tanto, llegamos a la conclusión que 50 mM de EDC brindó las mejores condiciones para construir andamios de Ge-HA para emplearlos en reparación de tejido óseo.

Por otro lado, se demostró que la técnica de emulsión y reticulación fue efectiva para obtener microesferas de quitosán-albúmina menores a 5 μ m; siendo las siguientes condiciones de trabajo obtenidas: concentración de quitosán al 2%, el SPAN 80 al 1% y 10mL de glutaraldehído al 25%, con estas condiciones se logró la adsorción de los factores de crecimiento VEGF y BMP-2 en las microesferas quitosán-albúmina de manera exitosa.

XII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andhariya JV and Burgess DJ. Recent advances in testing of microsphere drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2016, 1742-5247
2. Anitua Eduardo –López Gabriel, “Nueva técnica de regeneración ósea con una sustancia autóloga”, *Diario Médico*.
3. Arévalo Romero JA, Páez Guerrero MD y Rodríguez Pardo VM. Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *Nova--*. Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. ISSN:1794-2470 Vol.5 No. 8 Julio-Diciembre de 2007:101-212.
4. Barroso Herrero S e Ibáñez Ulargui J. *Introducción al conocimiento de materiales*. Editorial: Universidad Nacional de Educación a distancia Madrid; Año:2014.
5. Ben-David Dror, Kizhner Tali A., Kohler Thomas, Müller Ralph, Livne Erella, Srouji Samer. Cell-scaffold transplant of hydrogel seeded with rat bone marrow progenitors for bone regeneration. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 39 (2011): 364-371.
6. Callister W. *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales (vol. II)*. Editorial: Reverte; Año: 1996. Nº de páginas: 404 págs.
7. Fang YL, Chen XG and Godbey WT. Gene delivery in tissue engineering and regenerative medicine. *J Biomed Mater Res Part B* 2014:00B:000–000.
8. Fortoul van der Goes Teresa. *Guía Biología celular e Histología médica*. 1ra Edición. Intersistemas S.A de C. V. Editorial. 2010.
9. Gibbs D, Black C, Dawson J and Oreffo R. A review of hydrogel use in fracture healing and bone regeneration. *J Tissue Eng Regen Med* 2016; 10: 187–198.
10. Gil ES, Spontak RJ, Hudson SM Effect of beta-sheet crystals on the thermal and rheological behavior of protein-based hydrogels derived from gelatin and silk fibroin. *Macromol Biosci*. 5(8)(2005): 702-709.
11. Grover CN, Cameron RE, Best SM Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater* (2012) 10: 62-74.
12. Heris Hossein K., Rahmat Meysam, Mongeau Luc. Characterization of a Hierarchical Network of Hyaluronic Acid/Gelatin Composite for use as a smart Injectable Biomaterial. *Macromol. Biosci*. 12 (2012): 202–210.
13. Hong SR, Chong MS, Lee SB, Lee YM, Song KW et al. Biocompatibility and biodegradation of cross-linked gelatin/hyaluronic acid sponge in rat subcutaneous tissue. *J Biomater Sci Polym Ed* 2004 15(2): 201-214.
14. Hu Xiaohong, Li Dan, Zhou Feng, Gao Changyou. Biological hydrogel synthesized from hyaluronic acid, gelatin and chondroitin sulfate by click chemistry. *Acta Biomaterialia* 7, (2011): 1618–1626
15. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications B*. Stuart John Wiley & Sons, (2004)

16. Jarquín-Yáñez, Arenas-Alatorre J, Piñón-Zárate G, Olivares RMA, Herrera-Enríquez M, et al. Structural Effect of Different EDC Crosslinker Concentration in Gelatin-Hyaluronic Acid Scaffolds. *J Bioengineer& Biomedical Sci* 6: 182. (2016) doi: 10.4172/2155-9538.1000182.
17. Jha Amit K., Xu Xian, Duncan Randall L. and Jia Xinqiao. Controlling the Adhesion and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Using Hyaluronic Acid-based, Doubly Crosslinked Networks. *Biomaterials*. 32(10): (2011): 2466–2478.
18. Jia X, Kiick KL Hybrid multicomponent hydrogels for tissue engineering. *Macromol Biosci*. 9(2)(2009): 140-156.
19. Jóhannesson G, Stefánsson E and Loftsson T. Microspheres and Nanotechnology for Drug Delivery. *Dev Ophthalmol*. Basel, Karger, 2016, vol 55, pp 93–103.
20. Kavva KC, Jayakumar R, Nair S and Prasad K, Fabrication and characterization of chitosan/gelatin/nSiO₂ composite scaffold for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 59 (2013) 255– 263
21. Kim KH. The evolution of urogenital tissue engineering. *Int Neurorol J*. 2011 Sep; 15 (3): 107-108.
22. Lindner U, Kramer J, Rohwedel J, and Schlenke P. Mesenchymal Stem or Stromal Cells: Howard a better understanding of their biology?. *Transfus Med Hemother* 2010; 37: 75-83.
23. Liu Lin-Shu, Thompson Andrea Y., Heidaran Mohammad A., Poser James W., Spiro Robert C. An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration. *Biomaterials* 20 (1999) 1097-1108.
24. Nava MM, Raimondi MT, Credi C, De Marco C, Turri S, Cerullo G and Osellame R. Interactions between structural and chemical biomimetism in synthetic stem cell niches. *Biomed. Mater*. 10 (2015).
25. Navarro M, Michiardi A, Castaño O and Planell JA. Biomaterials in orthopaedics *J. R. Soc. Interface* (2008) 5, 1137–1158
26. Nguyen MK and Alsberg E. Bioactive factor delivery strategies from engineered polymer hydrogels for therapeutic medicine. *Prog Polym Sci*. 2014 July ; 39(7): 1236–1265.
27. Niehage C, Steenblock C, Pursche T, Bornhäuser M, Corbeil D and Hoflack B. The Cell Surface Proteome of Human Mesenchymal Stromal Cells. *PLoS ONE* 6(5) 2011: e20399. doi:10.1371/journal.pone.0020399
28. Pakulska MM, Miersch S and Shoichet MS, Designer protein delivery: From natural to engineered affinity-controlled release Systems. *Science* 351, aac4750 (2016).
29. Pérez RA, Won JE, Knowles JC and Kim HW. Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev.*(2012)
30. Poveda-Reyes S, Moulisova V, Sanmartín-Masiá E, Quintanilla-Sierra L, Salmerón-Sánchez M, Gallego Ferrer G, Gelatin—Hyaluronic Acid Hydrogels with Tuned Stiffness to Counterbalance Cellular Forces and Promote Cell Differentiation. *Macromol. Biosci*. 2016

31. Privalova A, Markvicheva E, Sevrin Ch, Drozdova M, Kottgen C, Gilbert B, Ortiz M y Grandfils Ch. Biodegradable polyester-based microcarriers with modified surface tailored for tissue engineering. *J Biomed Mater Res Part A* 2015;103A:939–948.
32. Ross M y Wojciech P *Histología Texto y Atlas 7ma edición* Editorial Wolters Kluwer 2015
33. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12(1996) : 697-715.
34. Sáez V, Hernáez E, Sanz Angulo L y Katime I. Liberación controlada de fármacos. Micropartículas. *Revista Iberoamericana de Polímeros. Revista Iberoamericana de Polímeros. Volumen 5(2), Julio 2004.*
35. Saez V, Hernández JR y Peniche C. Las microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas. *Biotecnología Aplicada* 2007;24:98-107.
36. Sánchez-Carpintero I, Candelas D y Ruiz-Rodríguez R. Materiales de relleno: tipos, indicaciones y complicaciones. *Actas Dermosifiliogr.* 2010;101(5):381–393.
37. Sastre R, De Aza S y San Román J. *Biomateriales. CYTED Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.* 2000
38. Seok-Jung Kim, Won-Jong Bahk, Cheong-Ho Chang, Jae-Deog Jang and Kyung-Hwan Suhl. Treatment of osteonecrosis of the femoral head using autologous cultured osteoblast: a case report. *Journal of Medical case reports* 2008, 2-58.
39. Tsaryk R, Gloria A, Russo T, Anspach L, De Santis R, Ghanaati S, Unger RE, Ambrosio L, Kirkpratick CJ. Collagen-low molecular weight hyaluronic acid semi-interpenetrating network loaded with gelatin microspheres for cell and growth factor delivery for nucleus pulposus regeneration. *Acta Biomaterialia* 20 (2015) 10-21.
40. Welsch U. *Sobotta de Histología, 2ª Ed, Editorial Médica Panamericana, 2008.*
41. Zhang F, He C, Cao L, Feng W, Wang H et al Fabrication of gelatin-hyaluronic acid hybrid scaffolds with tunable porous structures for soft tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 48(3)(2011): 474-81.

Structural Effect of Different EDC Crosslinker Concentration in Gelatin-Hyaluronic Acid Scaffolds

Katia Jarquín-Yáñez¹, Jesús Arenas-Alatorre², Gabriela Piñón-Zárate¹, Rosa María Arellano-Olivares¹, Miguel Herrera-Enríquez¹, Beatriz Hernández-Téllez¹, Andrés E Castell-Rodríguez^{1*}

¹Department of Cell Biology and Tissue, Faculty of Medicine, UNAM, Mexico
²Department of Condensed Matter Physics Institute, UNAM, Mexico

Abstract

Introduction: Gelatin and hyaluronic acid are two biopolymers with different applications in tissue engineering. They may be employed to construct diverse scaffolds that allow cells to differentiate and proliferate on them. In order to obtain the best functional and mechanical conditions in scaffolds, they must be crosslinked to form covalent links between gelatin and hyaluronic acid. The crosslinker 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) is a compound widely used due to its low cytotoxicity. Besides, the concentration of the crosslinker may modify the physical properties and morphological characteristics of scaffolds when it forms covalent links between biopolymers, helping to construct different kinds of scaffolds used for developing soft tissues. However, the development of scaffolds made of gelatin and hyaluronic acid crosslinked with EDC has been poorly studied. In addition, the concentrations used for crosslinking gelatin and hyaluronic acid are contradictory. Therefore, the aim of this study was to analyze the structure of gelatin/hyaluronic acid scaffolds crosslinked with EDC.

Methods: Gelatin-hyaluronic acid scaffolds were prepared by direct freeze-drying. Afterwards, they were crosslinked with different concentrations of EDC (6, 30, 50 and 60 mM) for 12 h.

Results: This research has demonstrated that the gelatin/hyaluronic acid scaffolds crosslinked with the highest concentrations of the crosslinker had fewer water concentration absorbed, pore size diminished and pore number increased in comparison with control groups. Despite scaffolds composition has not changed in any of the concentrations, the bone marrow mesenchymal cells mortality percentage increased when cells were placed on the scaffolds of concentration 60 mM, perhaps for the residual 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride found in the scaffolds.

Conclusion: Our results revealed that different EDC concentrations may modify the physical and biological characteristics of gelatin/hyaluronic acid scaffolds; as a result, the scaffolds obtained may be used for the manufacture of different tissues in regenerative medicine.

Keywords: Biomaterials; EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride); Gelatin; Hyaluronic acid; Tissue engineering

Introduction

The connective tissue is composed of cells and extracellular matrix (ECM). This one, among other characteristics, it owns the capacity of giving support to the cells through binding motifs recognized by integrins; this tissue is insoluble and it does not have the capacity of diffusion. The ECM is formed by macromolecular nets highly hydrated composed by glycoproteins like collagen, elastin, fibronectin and laminin; and glycosaminoglycans like hyaluronic acid; chondroitin 6-sulfate, dermatan sulfate and heparan sulfate, which have been employed for constructing diverse tridimensional scaffolds very similar to the extracellular matrix from the connective tissue [1,2].

Collagen type I is the principal component of ECM. It has been used for constructing tridimensional structures, treating burn lesions and skin ulcers of different origin [3-6]. However, there are other molecules very useful for producing scaffolds. Gelatin (Ge) is a product derived from collagen. It is easy to extract, soluble in water and is completely reabsorbed *in vivo*. In addition, it possess low immunogenicity and due to its physicochemical properties like the presence of functional groups such as arginine, aspartic acid, glycine, proline and other aminoacids, it allows the attachment of cells such as fibroblasts [7,8]. Furthermore, the adhesion properties of Ge are regulated for the aminoacid sequence RGD (arginine-glycine-aspartic acid), that may be recognized for many integrins in cells from connective tissue [9-11]. Besides, it has been

demonstrated that the cellular functions in tridimensional scaffolds are better when natural proteins are used, instead short aminoacid sequences [12]. In addition, Ge has a triple helix structure equivalent such as collagen, that may form essential links for constructing tridimensional nets [13]. As a result, the Ge properties make this molecule an excellent candidate for drug delivery and for being used in tissue engineering [14-16].

On the other hand, the hyaluronic acid (HA) is a long chain polysaccharide, biocompatible and biodegradable, with high capacity to retain water under biological conditions [17]. HA is formed for repetitive disaccharide units of D-glucuronic acid and N-acetyl-D glucosamine, which are extensively found in ECM [18]. It has been shown that HA stabilizes and organizes the ECM, due to its interactions with other proteins, and also, regulates the adhesion and proliferation

*Corresponding author: Andrés E Castell-Rodríguez, Department of Cell Biology and Tissue, Faculty of Medicine, UNAM, Mexico, Tel: (52) (55) 56232192; Fax: (52) (55) 56232399; E-mail: castell@unam.mx

Received: March 01, 2016; Accepted: April 12, 2016; Published: April 20, 2016

Citation: Jarquín-Yáñez K, Arenas-Alatorre J, Piñón-Zárate G, Arellano-Olivares RM, Herrera-Enríquez M, et al. (2016) Structural Effect of Different EDC Crosslinker Concentration in Gelatin-Hyaluronic Acid Scaffolds. J Bioengineer & Biomedical Sci 6: 182. doi:10.4172/2155-9538.1000182

Copyright: © 2016 Jarquín-Yáñez K, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

of fibroblasts by the receptor CD44 [19]. HA biomedical tissue engineering includes the construction of scaffolds for wound healing and repairing bone defects [20,21], treatment against arthritis and as a component of implant materials [22].

In order to use a macromolecule to construct a biocompatible scaffold it should be crosslinked. Crosslinking improves the functional characteristics and mechanical structure of biomaterials used for tissue engineering. In this process a covalent crosslinking between two or more macromolecules occurs when the material is treated with different crosslinking agents [23].

The crosslinker 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) unlike other molecules like glutaraldehyde, is not part of the final product after the crosslinking reaction with the molecules that conforms the scaffold, so it does not induce cytotoxic effects. EDC reacts with the biopolymers hydroxyl groups in order to form active O-urea, which reacts with amino groups creating an amide link and releasing isourea. This last molecule is a sub product soluble in water that may be discharged easily [18]. To the best of our knowledge, EDC has been used as crosslinker of scaffolds made of collagen and calcium phosphate [24] and also in corneal replacement or regeneration, where collagen, gelatin and hyaluronic acid are the most common molecules used [25]. Nevertheless, the concentrations of the crosslinker used in scaffolds made of Ge and HA are contradictory. So, the aim of this investigation is the characterization of the chemical and morphological properties of Ge/HA scaffolds crosslinked with different concentrations of EDC.

Material and Methods

Animals

Six 250 g Wistar male rats were used for each experiment. Animals were kept under pyrogen free condition, and fed *ad libitum* in the animal facilities of the Department of Cell and Tissue Biology from the Faculty of Medicine, UNAM. This investigation was approved by the Faculty of Medicine Ethical Board, UNAM and Animal Sacrifice was realized according the Mexican Official Norm NOM 062-ZOO-1999.

Reactives

Type B Ge obtained from bovine skin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), with a molecular weight of 20,000-25,000 Da, with a gel-strength in the Bloom scale of 225 g and an isoelectric point (IP) of 4.7-5.2. HA obtained of *Streptococcus equi* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with a molecular weight of 403.3 g/mol, soluble in water (5 mg/ml) and with 99% purity. EDC, with a molecular weight of 191.7 g/mol and water solubility of ≤ 100 mg/ml, was obtained from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Cytotoxicity detection kit Dehydrogenase Lactic Acid (LDH) was obtained from Roche, Germany.

Ge/HA scaffolds manufacturing

Ge and HA were dissolved in a 4:1 proportion respectively in distilled water with constant agitation for 30 min at 50 °C. One ml of Ge/HA solution were frozen in liquid nitrogen in order to be lyophilized for 12 h at -56 °C with 0.036 m Bar of atmospheric pressure. Afterwards, the scaffolds were treated for 12 h at 4 °C with different concentrations of EDC (6, 30, 50 or 60 mM) dissolved in ethanol 96 %. Subsequently, the scaffolds were washed three times with distillate water and lyophilized under the conditions explained above. Scaffolds were incised in discs of 9mm diameter and 3 mm width. Subsequently, these samples were used to perform biological and physical tests.

Pores quantification

Scaffolds crosslinked with different EDC concentrations were processed in order to obtain 5 μ m histological sections, which were stained with hematoxylin and eosin (H-E). For histological evaluation three samples of each condition were analyzed, 10 areas were randomly selected and the number of pores was evaluated at 1000X in a Nikon E80i microscope. The average of the pore number in the scaffolds was expressed as number of pores/mm².

Scanning electron microscopy (SEM)

The scaffolds crosslinked with different concentrations of EDC were coated for 1 min with gold in an ionizator Polaron model 11HD. After wards, the scaffolds were examined with a ZEISS DSM950 Scanning Electron Microscope. Four photographs were taken per each scaffold at 1500X. The images obtained were analyzed with the Image-Pro Plus 7.0 program (Media Cybernetics, Inc. San Diego CA) in order to measure the pore size.

Microanalysis energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS)

In order to identify the elemental chemical composition of the scaffolds, they were analyzed with the EDS technique with the Noran probe, Voyager model 4.2.3., coupled in a Scanning Electron Microscope JEOL JSM5600LV model. From each sample, 10 random fields were selected and elements concentration analyzed.

Absorption capacity

Crosslinked scaffolds with 9 mm diameter by 3 mm width were weighed and immersed in 1 M phosphate buffer saline for 1 h at room temperature. Exceeding water was removed from the scaffolds by placed them on absorbent paper for 2 s, subsequently they were reweighed. Weight in grams, corresponding to the absorption capacity, was obtained with the following formula: CA= PH—PS, where CA is the absorption capacity, PH is the wet weight of the scaffold and PS is the dry weight of the scaffold. All experiments were performed in triplicate.

Cytotoxicity and cell culture *in vitro*

Ge/HA scaffolds were sterilized by immersing in 70% alcohol and placing at UV light all night, also they were washed 3 times in sterile phosphate buffer saline (PBS) with antibiotics (Ab) (1% penicillin, amphotericin-B and gentamicin (Biowest)) for 30 min at room temperature.

All assays were performed with bone marrow stromal cells (BMSCs) from Wistar rats. Briefly, BMSCs were expanded in Petri dishes with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with bovine fetal serum (BFS) 10% and Ab and maintained in culture at 37 °C and 5% CO₂.

5 $\times 10^4$ /ml BMSCs were seeded in the scaffolds in 24 well plates in Hank's Balanced Salt Solution for 4 h at 37 °C and 5% CO₂. As cytotoxicity positive control, cells were exposed to UV light in PBS, while PBS without cells and supernatant from cells without UV light exposure were used as negative control and basal cell death control respectively. After 4 h incubation, 100 μ l of supernatant from each sample were taken and placed in a 96 well plate and 100 μ l of the cytotoxicity detection kit LDH solution added and incubated for 20 min at room temperature and darkness. Finally, the 96 well plates were analyzed in a spectrophotometer at wavelength 490 nm. Each experiment was performed in triplicate. To determine the percentage

of cytotoxicity the resulting values of absorption were substituted in the following equation:

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{experimental average absorbance} - \text{absorbance of live cells number}}{\text{absorbance dead cells number} - \text{absorbance live cells number}} \times 100.$$

For cultures *in vitro*, 5×10^4 /ml BMSCs in DMEM supplemented medium were gently injected in the scaffolds with a 0.3 mm \times 13 mm needle, medium was replaced every other day during seven days. Scaffolds with cells were fixed with 10% formalin solution for 2h and included in paraffin in order to obtain 5 μ m slices that were stained with H-E for histological analysis. Lastly, photomicrographs were taken with a Nikon Eclipse 80i microscope.

Statistic analysis

Repeated measures analysis of Kruskal-Wallis was performed. A P value <0.05 was considered statistically significant. All analyzes were performed in the GraphPad Prism 6 software.

Results and Discussion

Scaffold production

Combining EDC at 6, 30, 50 or 60 mM with a mixture of 4% Ge and 1% HA, porous sponge-like scaffolds were obtained (Figure 1). The EDC crosslinking mechanism [26,27] depends of the reaction with carboxyl groups of Ge and/or HA, which produce activated O-urea, that may react with the amino groups of Ge, resulting in the amide bond formation and the release of soluble urea (Figure 2).

In addition, EDC may be easily deactivated in aqueous solution



Figure 1: Scaffolds of Ge/HA crosslinked with EDC. Ge/HA sponges crosslinked with different concentrations of EDC, (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride).

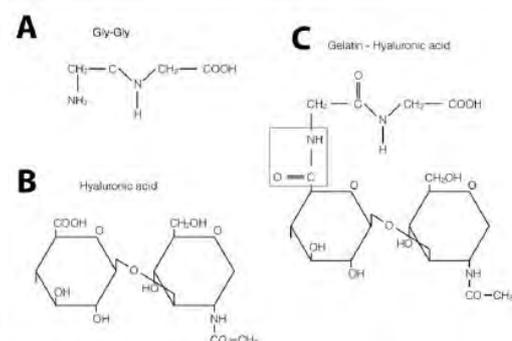


Figure 2: Formation of amide link in Ge and HA. Ge (A), HA (B), formation of amide bonds between Ge and HA during the crosslinking reaction induced by EDC (C).

[18], it is common in homogeneous reaction method, where EDC is added directly to Ge/HA mixture. In this study, a heterogeneous reaction method was used where the EDC diluted in ethanol/water (96:4) was added to the mixture of lyophilized Ge/HA. Thus, with diverse EDC concentrations we could obtain scaffolds with different degrees of hardness and solubility. The mixture of ethanol/water was used in order to prevent the dissolution of the Ge/HA lyophilized sponge. On the other hand, there are distinct methods of making three-dimensional porous scaffolds like electrospinning, phase separation and gas foaming [28,29]; however, the method used in this investigation, the lyophilization, is simple and not toxic that employs ice crystals as porogens [30]. As a result, the large hydrophilic capacity of Ge and HA was used to carry out the process of pore formation in lyophilization.

Ge/HA sponges morphology

Figures 3A-3D shows different types of Ge/HA sponge's morphologies crosslinked with different concentrations of EDC. The method performed resulted in the formation of porous scaffolds with the appearance of sponges. Also, it can be observed that the pore size was different when Ge/HA sponges were crosslinked with different concentrations of EDC (Figure 3E).

Scaffolds crosslinked with a 6 mM concentration of EDC had the biggest pores with an average size of 48.2 μ m; the sponges crosslinked with a 30 mM concentration of EDC had an average size of 34.69 μ m; sponge pores from the scaffold crosslinked with a 50 mM concentration of EDC had an average size of 30.48 μ m; finally, the sponges crosslinked with a 60 mM concentration of EDC had pores with an average size of 25.9 μ m. It is important to mention that scaffolds showed significant differences among all groups except for groups crosslinked with 30 and 50 mM of EDC (Figure 3E). Besides, the number of pores in the sponges was inversely proportional to the concentration of EDC (Figure 4).

The number of pores was greater in sponges crosslinked with 6 mM concentration of EDC and gradually decrease until the smallest number of pores was observed in the concentration of 60 mM of EDC (Figure 4D). Significant differences between the number of pores of the sponges crosslinked with the 6 mM concentration of EDC and the number of pores of the sponges crosslinked with 50 and 60 mM of EDC; nevertheless, no significant differences with sponges crosslinked with 30 mM of EDC was observed (Figure 4E). In all cases, the morphology of Ge/HA sponges depended of the EDC concentration.

It is important to note that two different layers were observed in the sponges. The scaffold superior part that was exposed directly to vacuum was different with respect to the structure to the inferior part of the scaffold, which was in contact with de mold where the scaffolds

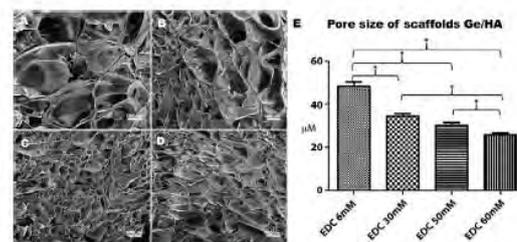


Figure 3: Micrographs with SEM of Ge/HA scaffolds. Scaffolds were constructed with different concentrations of EDC: 6 mM (A), 30 mM (B), 50 mM (C) and 60 mM (D). Pore size graphic (E). * $P < 0.05$.

were made. The great forming gelatin films capacity may contribute to the orientation of the pore channels in the superior part of scaffolds. On the other hand, the inferior part of the scaffolds had different forms due to the fact that vacuum was no homogeneous in the superior and inferior part of the scaffold.

It is important to notice that the number and pore size, are essential for cell growing, proliferation and adhesion, inducing the development of tissues and tissue regeneration [31]. As a result, it has been considered that a pore size of 40 to 200 μm is appropriate to create an adequate microenvironment for cell development.

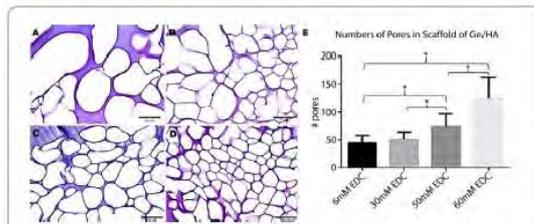


Figure 4: Scaffold histological slices stained with H-E. Ge-HA scaffolds crosslinked with different concentrations of EDC: 6 mM (A), 30 mM (B), 50 mM (C) y 60 mM (D). Pore numbers graphic (E). * $P < 0.05$.

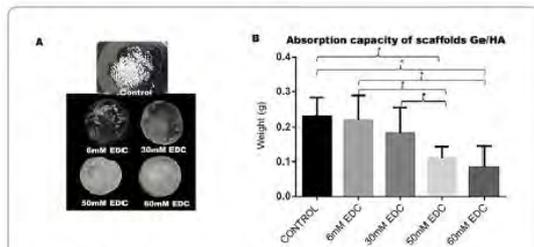


Figure 5: Absorption capacity of Ge/HA scaffolds. A. Ge-HA scaffolds with different concentrations of EDC, hydrated with PBS for one hour. B. Weight expressed in g after one hour in PBS. * $P < 0.05$.

Absorption capacity

In order to have a suitable scaffold for cell proliferation, it should have certain hydrophilic capacity, which may provide an appropriate contributions of nutrients dissolved in liquids, good oxygenation capacity and fluid body loss prevention during a patient treatment [28], for this reason in this study the absorption water capacity of sponges obtained after different concentrations of EDC was analyzed. The absorption water capacity in weight of every sponge made with different concentrations of EDC was obtained by subtracting the initial weight from the final weight of the scaffolds after the immersion in distilled water for one hour. The results of this experiment showed that the maxim water absorption was in the sponges manufactured without EDC. The water absorption capacity was decreased as the concentration of EDC was diminished (Figure 5). It has been reported previously [32] that when the crosslinkers concentration increased, decreases the absorption water capacity due to the development of networks between polymer chains in the scaffolds after been treated with different crosslinkers. So, if lower concentration of crosslinker is used, less polymer networks will be formed and a greater amount of free chains will be found. Furthermore, the hydrophilic capacity of hyaluronic acid is still preserved even if it is crosslinked with EDC.

Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS)

In order to know the chemical composition of Ge/HA scaffolds crosslinked with different concentrations of EDC, elements in each sample were analyzed by EDS. Figure 6 shows EDS analysis, in logarithmic scale, of the Ge/HA scaffolds. All scaffolds showed the presence of various elements such as carbon, oxygen, sodium, chlorine, sulfur and calcium. Figure 6G indicates the concentrations of several elements in scaffolds expressed in weight percent (wt%). The concentration of some elements in the sponges did not change significantly; nonetheless, is important to mention that concentration of sodium and sulfur changed in the scaffolds, not significant but taken into account. Both sodium and sulfur concentration were decreased as EDC concentration used in scaffolds increased. It is known that HA has no sulfur groups and therefore, although it is highly hydrophilic, it is less than other glycosaminoglycans. Nevertheless, when HA is combined with Ge the sulfur groups appeared, indicating that they were derivate from the Ge in a proportion of 0.80 in the sponges crosslinked with 6 mM of EDC; in contrast, sponges crosslinked with 60 mM of EDC showed a sulfur groups proportion of 0.06. The fact that the Ge/

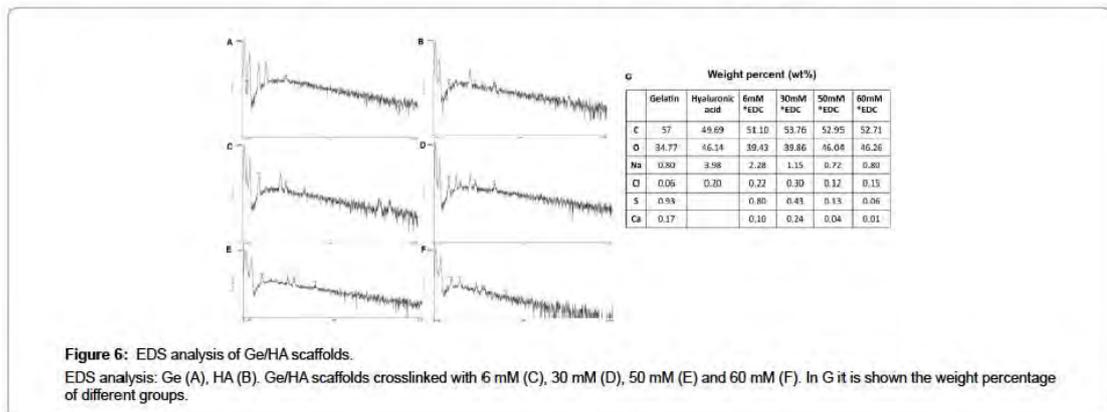


Figure 6: EDS analysis of Ge/HA scaffolds. EDS analysis: Ge (A), HA (B). Ge/HA scaffolds crosslinked with 6 mM (C), 30 mM (D), 50 mM (E) and 60 mM (F). In G it is shown the weight percentage of different groups.

HA sponges crosslinked with 60 mM of EDC presented less sulfur proportion is consistent with their reduced ability to attract water as it has already mentioned above. The ability of glycosaminoglycans to absorb water depends of the presence of negative sulfur molecules, which causes the attraction of sodium ions and water to connective tissue rich in proteoglycans. The fact that the Ge/HA sponges have shown to possess sulfur groups suggests that Ge/HA scaffolds may be suitable for cell growth and proliferation in order to form tissues.

Cytotoxicity

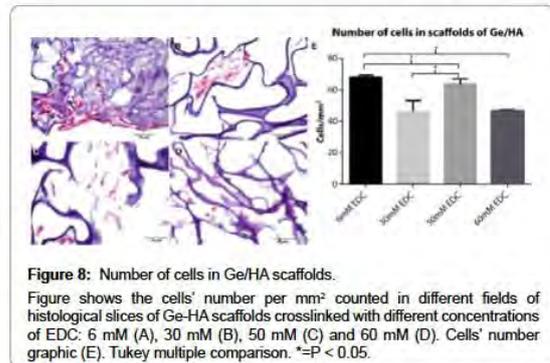
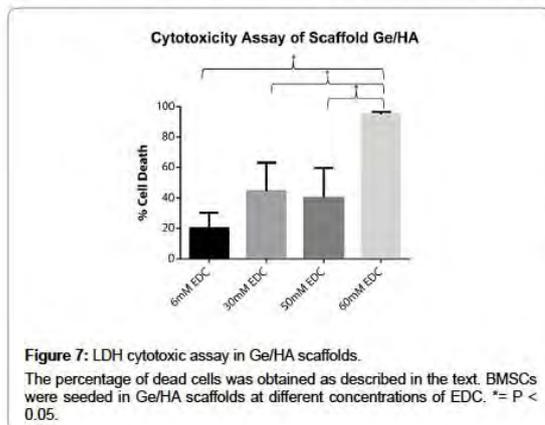
With the objective of analyze if the crosslinking process of Ge/HA is suitable for cell growth, a cytotoxicity test was conducted by quantifying the releasing of LDH enzyme colorimetrically. The LDH detection method in culture medium as indicator of cytotoxicity is a reliable and easy method, frequently used in tissue engineering [33].

The culture supernatant in all cases was obtained 4 h after the cells were seeded on the scaffolds crosslinked with different concentrations of EDC. Cytotoxicity results demonstrated that LDH concentration (color diminished) decreased as fewer amounts of dead cells were found in each experiment and control groups. Thus, it was observed that the maximum absorbance, 0.68, was in positive control groups (dead cells were seeded on scaffolds), the lower absorbance, 0.2, was the sample with live cells seeded on scaffolds, and the culture medium without cells did not show any absorbance signal. The cellular percentages of cytotoxicity were obtained following the equation described above in the methodology section. The results of the percentage cytotoxicity obtained were as follow: 6 mM of EDC= 20%, 30 mM of EDC= 44%, 50 mM of EDC= 40% and 60 mM of EDC= 94% of cellular percentages of cytotoxicity (Figure 7).

In all cases, any of the scaffolds crosslinked with different concentration of EDC induced cytotoxicity (all groups showed significant difference compared with control group of dead cells), with the exception of the scaffold made with 60 mM of EDC, that did not show significance with respect the control of dead cells. The fact that the Ge/HA scaffolds crosslinked with 60 mM of EDC induced cytotoxicity may be due to a inefficient waste removing method, as others have noted [23], or perhaps it may be necessary a longer lyophilization process in order to remove the crosslinker.

In vitro cultures

The scaffolds crosslinked with different concentrations of EDC



were seeded with 5×10^4 BMSC for 7 days, histological sections were obtained and stained with HE. On scaffolds crosslinked with 6 mM, 30 mM and 50 mM of EDC, cell clusters with eosinophilic cytoplasm, granular chromatin and cytoplasm projections were observed (Figures 8A-8C). Furthermore, it has been noticed on the scaffolds crosslinked with 60 mM of EDC just a few cells with notorious cell damage and small and piknotic nuclei (Figure 8D), signs of cell death. This finding is consistent with results of cytotoxicity, where it was observed that the scaffolds crosslinked with 60 mM of EDC showed increased cytotoxicity (Figure 8E).

Besides the concentration of EDC, cell death may be induced by the pore size of scaffolds and low water and oxygen diffusion into the scaffolds, as a result of the low water absorption capacity of scaffolds crosslinked with 60 mM of EDC, as we have already mentioned above.

Conclusion

This study has shown that the crosslinking of Ge and HA with different concentrations of EDC is useful for constructing scaffolds that may be used for diverse applications in tissue engineering. The scaffolds manufactured, depending of their properties of hydrophilicity, size and pore number, may be used with o without cells in order to facilitate the repair of distinctive tissues such as skin, cartilage and bone. In particular, the scaffolds crosslinked with 6, 30 and 50 mM concentrations of EDC may be useful in tissue engineering due to their low cytotoxicity.

Acknowledgement

This research was partially supported by project PAPIIT-DGAPA, UNAM, IT201313. The first author is a student of Ph.D. Program "Posgrado en Ciencia Médicas, Odontológicas y de la Salud" of the Universidad Nacional Autónoma de México and acknowledges the scholarship and financial support provided by CONACyT, UNAM. The authors thank to Erick Francisco Sánchez Ortega, Dulce María López, Raquel Guerrero Alquicira, Sara Judith Alvarez and Armando Zepeda Rodríguez for expert technical assistance, Christian Cárdenas Monroy for language technical advice and Nancy Carolina Piñón Zárate for providing Spanish-English translation and helpful technical advice.

References

- Jagur-Grodzinski J (2006) Polymers for tissue engineering, medical devices, and regenerative medicine. Concise general review of recent studies. Polym Adv Technol 17: 395-418.
- Christenson EM, Anseth KS, van den BeuckenJeroen JJP, Chan CK, Ercan B, et al. (2007) Nanobiomaterial applications in orthopedics. J Orthopaedic Res 25: 11-22.
- Shevchenko RV, James SL, James SE (2010) A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. J R Soc Interface 7: 229-258.

4. Heitland A, Piatkowski A, Noah EM, Pallua N (2004) Update on the use of collagen/glycosaminoglycate skin substitute-six years of experiences with artificial skin in 15 German burn centers. *Burns* 30: 471-475.
5. Silverstein G (2006) Dermal regeneration template in the surgical management of diabetic foot ulcers: a series of five cases. *J Foot Ankle Surg* 45: 28-33.
6. Anthony ET, Syed M, Myers S, Moir G, Navsaria H (2006) The development of novel dermal matrices for cutaneous wound repair. *Drug Discovery Today* 3: 81-86.
7. Hong SR, Chong MS, Lee SB, Lee YM, Song KW et al. (2004) Biocompatibility and biodegradation of cross-linked gelatin/hyaluronic acid sponge in rat subcutaneous tissue. *J Biomater Sci Polym Ed* 2004 15: 201-214.
8. Grover CN, Cameron RE, Best SM (2012) Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering. *J MechBehav Biomed Mater* 10: 62-74.
9. Ruoslahti E (1996) RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 697-715.
10. Eastoe JE (1955) The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin. *Biochem J* 61: 589-600.
11. Shu XZ, Liu Y, Palumbo F, Prestwich GD (2003) Disulfide-crosslinked hyaluronan-gelatin hydrogel films: a covalent mimic of the extracellular matrix for in vitro cell growth. *Biomaterials* 24: 3825-3834.
12. Jia X, Kick KL (2009) Hybrid multicomponent hydrogels for tissue engineering. *Macromol Biosci* 9: 140-156.
13. Gil ES, Spontak RJ, Hudson SM (2005) Effect of beta-sheet crystals on the thermal and rheological behavior of protein-based hydrogels derived from gelatin and silk fibroin. *MacromolBiosci* 5: 702-709.
14. Kimura Y, Ozeki M, Inamoto T, Tabata Y (2003) Adipose tissue engineering based on human preadipocytes combined with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* 24: 2513-2521.
15. Liu X, Smith LA, Hu J, Ma PX (2009) Biomimetic nanofibrous gelatin/apatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 30: 2252-2258.
16. Young S, Wong M, Tabata Y, Mikos AG (2005) Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *J Control Release* 109: 256-274.
17. Zhang F, He C, Cao L, Feng W, Wang H, et al. (2011) Fabrication of gelatin-hyaluronic acid hybrid scaffolds with tunable porous structures for soft tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 48: 474-81.
18. Choi YS, Hong SR, Lee YM, Song KW, Park MH, et al. (1999) Studies on gelatin-containing artificial skin: II. Preparation and characterization of cross-linked gelatin-hyaluronate sponge. *J Biomed Mater Res* 48: 631-9.
19. Spring FA, Dalchau R, Daniels GL, Mallinson G, Judson PA (1988) The Ina and Inb blood group antigens are located on a glycoprotein of 80,000 MW (the CDw44 glycoprotein) whose expression is influenced by the In(Lu) gene. *Immunology* 64: 37-43.
20. Benedetti L, Cortivo R, Berti T, Berti A, Pea F (1993) Biocompatibility and biodegradation of different hyaluronan derivatives (Hyaff) implanted in rats. *Biomater* 14: 1154-1158.
21. Larsen NE, Pollak CT, Reiner K, Leshchiner E, Balazs EA (1993) Hylan gel biomaterial, dermal and immunologic compatibility. *J Biomed Mater Res* 27: 1129-1132.
22. Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J (2008) Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinami medicina* 53: 397-411.
23. Park C, Vo C, L N, Kang T, Oh E, Lee BJ (2015) New method and characterization of self-assembled gelatin-oleic nanoparticles using a desolvation method via carbodiimide/N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) reaction. *Eur J Pharma and Biopharma* 89: 365-373.
24. Park JY, Jung IH, Kim YK, Lim YK, Lee JS, et al. (2015) Guided bone regeneration using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)-cross-linked type-I collagen membrane with biphasic calcium phosphate at rabbit calvarial defects. *Biomaterials Research* 19: 15.
25. Liu Y, Ren L, Wang Y (2013) Crosslinked collagen-gelatin-hyaluronic acid biomimetic film for cornea tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C* 33:196-201.
26. Weadock KS, Miller EJ, Keuffel EL, Dunn MG (1996) Effect of physical crosslinking methods on collagen-fiber durability in proteolytic solutions. *Journal of biomedical materials research* 32: 221-226.
27. Lee JM, Edwards HHL, Pereira CA, Samii SI (1996) Crosslinking of tissue-derived biomaterials in 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC). *J Mater Sci Mat Med* 7: 531-541.
28. Shabafrooz V, Mozafari M, Kohler GA, Assefa S, Vashae D, et al. (2013) The effect of hyaluronic acid on biofunctionality of gelatin-collagen tissue engineering scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 1-28.
29. Van Vierbergh S, Crudde V, Dubruel P, Masschaele B, Cosijns A, et al. (2007) Porous Gelatin Hydrogels: 1. Cryogenic Formation and Structure Analysis. *Biomacromolecules* 8: 331-333
30. Zhang H, Cooper AJ (2007) Aligned porous structures by directional freezing. *Adv. Mater* 19: 1529-1533.
31. Stancu IC, Dragusin DM, Vasile E, Trusca R, Antoniac I, et al. (2011) Porous calcium alginate-gelatin interpenetrated matrix and its biomineralization potential. *J Mater Sci Mater Med* 22: 451-460.
32. Kabiri M, Bushnak I, McDermot MT, Unsworth LD (2013) Toward a mechanistic understanding of ionic self-complementary peptide self-assembly: role of water molecules and ions. *Biomacromolecules* 14: 3943-3950
33. Göransson A, Gretzer C, Tengvall P, Wennerberg A (2007) Inflammatory response to titanium surfaces with fibrinogen and catalase coatings: an in vitro study. *J Biomed Mater Res A* 80: 693-9.

Citation: Jarquín-Yáñez K, Arenas-Alatorre J, Piñón-Zárate G, Arellano-Olivares RM, Herrera-Enríquez M, et al. (2016) Structural Effect of Different EDC Crosslinker Concentration in Gelatin- Hyaluronic Acid Scaffolds. J Bioengineer & Biomedical Sci 6: 182. doi:10.4172/2155-9538.1000182

OMICS International: Publication Benefits & Features

Unique features:

- Increased global visibility of articles through worldwide distribution and indexing
- Showcasing recent research output in a timely and updated manner
- Special issues on the current trends of scientific research

Special features:

- 700+ Open Access Journals
 - 50,000+ editorial team
 - Rapid review process
 - Quality and quick editorial, review and publication processing
 - Indexing at major indexing services
 - Sharing Option: Social Networking Enabled
 - Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
 - Better discount for your subsequent articles
- Submit your manuscript at: www.omicsonline.org/submit